

Organización y
Digitalización CSA Ltda



CSA126884

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-118506-00000-0000

Fecha: 2010-09-24 15:04:41

Dep. 2020 DIR.NUEVASCR

Tra. 11 PATENTEIYI

Eve: 378 FASENACIONALI

Act. 411 PRESENTACION

Folios: 253

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

PGT

**SUPERINTENDENCIA DELEGADA PARA LA
PROPIEDAD INDUSTRIAL**

DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES

10-118506

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

**NÚMERO DE PCT:
PCT/AU2009/000248**

**PATENTE: NUEVAS SECUENCIAS DE LA BRACHYSPIRA,
COMPOSICIONES INMUNOGENICAS, METODOS
PARA LA PREPARACION Y SU USO**

**CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL:
C07K 14/195 (2006.01), C07H 21/04 (2006.01)**

SOLICITANTE: SPIROGENE PTY LTD

DOMICILIO: Perth, Australia

APODERADO: Martha BONILLA CASTRO

Bogotá D.C., septiembre de 2010

*Procto. —
28-09-2010*



No. 10-118506- -00000-0000

Fecha: 2010-09-24 15:04:41 Dep. 2020 DIR.NUEVASC
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 253

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: 571- 2861473 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: 571- 2861473 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 Nombre: PHILLIPS, Nyree, D. Dirección: _____ Nacionalidad o Domicilio: _____		
5 PCT (86) Solicitud Internacional No. PCT/AU2009/000248 Fecha: Febrero 27 de 2009 Publicación Internacional No. WO/2009/105833 Fecha: Septiembre 3 de 2009			
6 Título (54): NUEVAS SECUENCIAS DE LA BRACHYSPIRA, COMPOSICIONES INMUNOGENICAS, METODOS PARA LA PREPARACION Y SU USO			
7 Clasificación Internacional (51) C07K 14/195 (2006.01), C07H 21/04 (2006.01)			
8 Prioridad ☒ SI ☐ NO	(33) País de Origen European Patent Organization	(32) Fecha Febrero 28 de 2008	(31) Número de solicitud 08152093.4
9 Comprobante de pago No.		Fecha:	

1947-1948

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



No. 10-118506-00000-0000

Fecha: 2010-09-24 15:04:41 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
 Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
 Act. 411 PRESENTACION Folios: 253

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 10 - 79,898
 FECHA : SEPTIEMBRE 24 DE 2010

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	Nº. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
B&R SOLUCIONES LEGALES	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	131974150	24/09/2010	799,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	110 PTC SOLICITUD DE PATENTE DE INVEN	554,000.00
		TOTAL :	\$ 554,000.00

SON: QUINIENTOS CINCUENTA Y CUATRO MIL PESOS

RESPONSABLE :

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

4

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-118506- -00000-0000

Fecha: 2010-09-24 15:04:41 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
 Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
 Act. 411 PRESENTACION Folios: 253

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 10 - 79,899
 FECHA : SEPTIEMBRE 24 DE 2010

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
B&R SOLUCIONES LEGALES	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	131974150	24/09/2010	799,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
9	50005-01-01 SOLICITUDES	*** REIVINDICACION UNITARIA ADICIONAL	234,000.00
TOTAL :			\$ 234,000.00

SON: DOSCIENTOS TREINTA Y CUATRO MIL PESOS

RESPONSABLE :

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

**TITULO: NUEVAS SECUENCIAS DE LA BRACHYSPIRA,
COMPOSICIONES INMUNOGENICAS, METODOS PARA LA
PREPARACION Y SU USO**

5

RESUMEN

Se describen el nuevo Polinucleótido y los aminoácidos de *Brachyspira* *hyodysenteriae*. Esas secuencias son de utilidad para el diagnostico de la enfermedad por *Brachyspira hyodysenteriae* en los animales y como un tratamiento terapéutico o tratamiento profiláctico de la enfermedad causada por la *Brachyspira hyodysenteriae* en los animales. Estas secuencias también pueden ser de utilidad para el diagnostico y tratamientos terapéuticos y /o profiláctico de enfermedades causadas en animales por otras especies de *Brachyspira*.

20

25

30

DESCRIPCIÓN

35 CAMPO DE LA INVENCION

Esta invención se refiere a los nuevos genes en la *Brachyspira* *hyodysenteriae* y a las proteínas codificadas en ella. La invención se refiere además a la utilización de estos nuevos genes y proteínas para el diagnóstico de la enfermedad causada por la *B. hyodysenteriae*, a las vacunas contra la *B. hyodysenteriae* y para la detección de compuestos que matan a la *B. hyodysenteriae* o bloquear los efectos patógenos de la *B. hyodysenteriae*. Estas secuencias también pueden ser útiles para el diagnóstico y tratamiento terapéutico y / o profilaxis de las enfermedades en animales causada por otras especies de la *Brachyspira*, incluyendo *B. intermedia*, *B. alvinipulli*., *B. aalborgi*., *B. innocens*., *B. murdochii*. y *B. pilosicoli*

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

50

La disentería porcina es una enfermedad endémica significativa de los cerdos en Australia y en todo el mundo. La disentería porcina es una enfermedad mucohemorrágica diarreica infecciosa, que se caracteriza por la inflamación y necrosis extensa de la superficie epitelial del intestino grueso. Las pérdidas económicas debido a la disentería porcina son el resultado principalmente del crecimiento en retrasos, pérdidas, costos de medicamentos y mortalidad. El agente que causa la disentería porcina fue identificado por primera vez como una espiroqueta anaeróbica (*Treponema hyodysenteriae*) en 1971, y recientemente fue reasignado al género *Brachyspira* como *B. hyodysenteriae*. Si la disentería porcina ha sido establecida en una granja de cerdos, el espectro de la enfermedad puede variar desde leve, transitorio o inaparente, a ser grave e incluso mortal. Estrategias de medicación en porquerizas individuales pueden enmascarar los signos clínicos y en algunas porquerizas la enfermedad

65 puede pasar desapercibida, o sólo puede ser sospechada. Sea el caso o
no que la enfermedad se produzca, la *B. hyodysenteriae* puede persistir
en los cerdos infectados, o en portadores tales como roedores, o en el
medio ambiente. Todas estas fuentes poseen gran potencial para la
transmisión de la enfermedad en rebaños no infectados. Las aves
70 comerciales de corral también pueden ser colonizadas por la *B.*
hyodysenteriae, aunque no está claro de que manera esto ocurre
normalmente en condiciones de campo.

La colonización por la *B. hyodysenteriae* provoca una fuerte respuesta
75 inmunológica contra la espiroqueta, por lo cual, la evidencia indirecta de la
exposición a la espiroqueta puede ser obtenida mediante la medición de
los títulos de anticuerpos circulantes en la sangre de los animales
infectados. Estos títulos de anticuerpos han sido reportados para
mantenerlos en niveles bajos, incluso en los animales que se han
80 recuperado de la disentería porcina. Por consiguiente las pruebas
serológicas para la detección de anticuerpos, tienen un potencial
considerable para la detección de infecciones subclínicas en cerdos
portadores que se han recuperado y que tienen una cantidad no
detectable de espiroquetas en su intestino grueso. Estas pruebas serían
85 particularmente valiosas en un formato de uso fácil, tales como un análisis
inmunoenzimático. Una variedad de técnicas ha sido desarrollada para
demostrar la presencia de anticuerpos contra el antígeno de la *B.*
hyodysenteriae, incluyendo las pruebas de inmunofluorescencia indirecta,
las pruebas de hemaglutinación, pruebas de micro titulación de
90 aglutinación, fijación del complemento y ELISA utilizando lipopolisacárido
o todo el sonicado de espiroquetas como antígeno. Todas estas pruebas
han sufrido problemas de especificidad, en relación con espiroquetas
intestinales no patógenas que pueden inducir anticuerpos de reacción
cruzada. Estas pruebas son útiles para detectar rebaños donde hay
95 enfermedad evidente y de altos títulos de anticuerpos circulantes, pero
son problemáticas en la identificación de rebaños sub-clínicamente
infectados y cerdos infectados individualmente. En consecuencia, hasta la

100 fecha, no hay análisis lo suficientemente sensibles y específicos que estén disponibles para la detección de anticuerpos contra la *B. hyodysenteriae*. La falta de pruebas de diagnóstico adecuadas ha dificultado el control de la disentería porcina.

105 Un número de métodos son empleados para el control de la disentería porcina, los cuales varían desde el uso profiláctico de agentes antimicrobianos, a través de la completa reducción de existencia de los rebaños infectados y la prevención de la reintroducción de cerdos portadores infectados. Todas estas opciones son costosas y, si se quiere que sean plenamente eficaces, se requiere el uso de sofisticadas pruebas de diagnóstico para supervisar el progreso. En la actualidad, la detección
110 de la disentería porcina en rebaños con infecciones subclínicas, y de animales portadores sanos, sigue siendo un problema importante y está obstaculizando la aplicación de medidas de control eficaces. El diagnóstico definitivo de la disentería porcina tradicionalmente ha exigido el aislamiento y la identificación de la *B. hyodysenteriae* en las heces o la
115 mucosa de los cerdos enfermos. Los principales problemas incluyen el crecimiento lento y las fastidiosas necesidades nutricionales de estas bacterias anaeróbicas y la confusión 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
120 polimerasa (PCR) para la detección de espiroquetas en las heces. Por desgracia, en las aplicaciones prácticas el límite de detección de PCR la hacía incapaz de detectar animales portadores con infecciones subclínicas. Como consecuencia de estos problemas de diagnóstico, hay
125 una clara necesidad de desarrollar una herramienta de diagnóstico simple y eficaz, capaz de detectar la infección por *B. hyodysenteriae* en el hato de cerdos y a nivel individual.

Una respuesta inmunológica fuerte es inducida en contra de la colonización espiroqueta seguida por la *B. hyodysenteriae*, y los cerdos recuperados de la disentería porcina están protegidos contra la reinfeción. A pesar de ello, los intentos de desarrollar vacunas para controlar la disentería porcina se han encontrado con muy poco éxito, ya sea porque han proporcionado una protección inadecuada a nivel de rebaño, o porque ha sido demasiado costoso y difícil de producir para que sean comercialmente viables. Vacunas bacterinas proporcionan cierto nivel de protección, pero tienden a ser lipopolisacárido serogrupo específico, el cual requiere el uso de bacterinas polivalentes. Además que son difíciles y costosas de producir a gran escala debido a los requisitos de crecimiento fastidioso anaeróbico de la espiroqueta.

Se han hecho varios intentos para desarrollar vacunas vivas atenuadas contra la disentería porcina. Este método tiene la desventaja de que las cepas atenuadas muestran una reducción de colonización, y por lo tanto provocan una disminución en la estimulación inmune. También hay renuencia por parte de los productores y los veterinarios de usar vacunas vivas para la disentería porcina debido a la posibilidad de reversión a la virulencia, especialmente por lo poco que se conoce sobre la regulación genética y la organización de la *B. hyodysenteriae*.

El uso de vacunas de subunidades recombinantes es una alternativa atractiva, puesto que los productos serían bien definidos (esenciales para propósitos de registro), y relativamente fácil de producir a gran escala. Hasta la fecha el primer uso reportado de una proteína recombinante de *B. hyodysenteriae* como candidato a vacuna (una proteína de 38 kDa flagelar) no pudo prevenir la colonización en los cerdos. Este fracaso es probable que se refiera específicamente a la proteína particular recombinante utilizada, así como a otras cuestiones de sistemas de entrega y las rutas, las tasas de dosis, la elección de los adyuvantes, etc (Gabe, JD, Chang, RJ, Slomiany, R , Andrews, WH y McCaman, MT

160 (1995) Aislamiento de proteínas extra citoplasmáticas de la *Serpulina*
hyodysenteriae B204 y la clonación molecular del gen *flaB1* que codifica
 una proteína flagelar de 38 kDa. *Infección e Inmunidad* 63:142-148). La
 primera proteína de la *B. hyodysenteriae* recombinante parcialmente de
 165 protección reportada y usada para vacunación fue una lipoproteína de
 29,7 kDa de la membrana externa (Bhlp29.7, también conocido como
 BmpB y BLPA), la cual es homologa a las lipoproteínas de la unión de
 metionina de varias bacterias patógenas. El uso de su proteína
 recombinante agregada Bhlp29.7 para la vacunación de los cerdos,
 170 seguido por el reto experimental con *B. hyodysenteriae*, se tradujo en 17-
 40% de los cerdos vacunados que desarrollaron la enfermedad en
 comparación con 50-70% de los cerdos sin vacunados de control que
 desarrollaron la enfermedad. Dado que la incidencia de la enfermedad
 para el Bhlp29.7 de los cerdos vacunados fue significativamente ($P =$
 175 0.047) menos que en los cerdos de control, Bhlp29.7 pareció tener
 potencial como un componente de la vacuna contra la disentería porcina
 (La, T, Phillips, ND, Reichel, MP and Hampson, DJ (2004). La protección de
 los cerdos de la Disentería porcina por la vacuna con la lipoproteína
 recombinante BmpB, a 29.7 kDa de membrana externa de la *Brachyspira*
hyodysenteriae. *Veterinary Microbiology* 102:97-109). Un número de otros
 180 intentos se han realizado para identificar las proteínas de la envoltura
 exterior de la *B. hyodysenteriae* que podrían ser utilizados como
 componentes recombinantes de la vacuna, pero de nuevo no hay vacuna
 que haya sido exitosamente fabricada. Un enfoque mucho más global es
 necesario para la identificación de proteínas potencialmente útiles
 185 inmunogénicas recombinantes de la *B. hyodysenteriae*.

Hasta la fecha, sólo un estudio utilizando el ADN para la vacunación ha
 sido reportado. En este estudio, el gen *B. hyodysenteriae* *ftnA* que
 190 codifica una ferritina putativa, se clonó en un plásmido de *E. coli* y el ADN
 del plásmido utilizado para capas de baño de oro para la vacunación
 balística. Un modelo murino para la disentería porcina se utilizó para

determinar el carácter protector de la vacunación con ADN y / o de la proteína recombinante. La vacunación con proteínas recombinantes indujo una buena respuesta sistémica contra la ferritina sin embargo la
195 vacunación con ADN indujo sólo una respuesta sistémica detectable. La vacunación con ADN seguida por un impulso con la proteína recombinante indujo una respuesta inmune sistémica a la ferritina sólo después de impulsarla con la proteína. Sin embargo, ninguno de los
200 regímenes de vacunación de la prueba fue capaz de proporcionar a los ratones con la protección contra la colonización por *B. hyodysenteriae* y las lesiones asociadas. Curiosamente, la vacunación de los ratones con el ADN sólo dio lugar a la exacerbación de la enfermedad significativa (Davis, A.J., Smith, S.C. and Moore, R.J. (2005). The *Brachyspira hyodysenteriae* *ftnA* gene: DNA vaccination and real-time PCR
205 quantification of bacteria in a mouse model of disease. Current Microbiology 50: 285-291).

OBJETO DE LA INVENCION

210 Los inventores han identificado nuevos genes de *B. hyodysenteriae* y las proteínas codificadas por esos genes. Se ha identificado además que estos nuevos genes y proteínas pueden ser utilizados con fines
215 terapéuticos y de diagnóstico. Por otra parte, los inventores han identificado que estos genes y / o las proteínas pueden ser utilizadas como una vacuna contra *B. hyodysenteriae* y / o diagnosticar infecciones a causa de la *B. hyodysenteriae*.

220 En consecuencia, en un primer aspecto, la presente invención proporciona nuevos polinucleótidos de la *B. hyodysenteriae* que tienen la secuencia de nucleótidos contenidos en la SEC ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21 y 23. La presente invención también proporciona las secuencias de nucleótidos que son homólogas a la SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7,

225 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21 y 23, donde la homología puede ser del 95%, 90%, 85%, 80%, 75% y 70%. Esta invención también incluye una vacuna de ADN o composición inmunogénica de ADN que contiene la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: secuencias 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21 y 23 y que son el 95%, 90%, 85%, 80%, 75% y 70% homólogas a estas secuencias. Esta invención incluye además una prueba de diagnóstico que contiene ADN que tiene la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: secuencias 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21 y 23 y que son el 95%, 90% , el 85%, 80%, 75% y 70% de homología con las secuencias.

235 En un aspecto de la invención, la composición de la vacuna es una composición de vacuna que comprende al menos dos moléculas de polinucleótidos que codifica la proteasa seleccionada del grupo formado por SEQ ID N ° 1, 3, 5 y 7 para el tratamiento o la prevención de la disentería porcina asociada con *Brachyspira hyodysenteriae*.

240 En otro aspecto de la invención, la composición de la vacuna es una composición de vacuna que comprende al menos tres moléculas de polinucleótidos que codifica la proteasa seleccionada del grupo formado por SEQ ID N ° 1, 3, 5 y 7 para el tratamiento o la prevención de la disentería porcina asociada con *Brachyspira hyodysenteriae*.

245 En otro aspecto de la invención, la composición de la vacuna es una composición de vacuna que consiste en moléculas de polinucleótidos que codifica la proteasa seleccionada del grupo que consiste en: SEC ID N ° 1, 3, 5 y 7 para el tratamiento o la prevención de la disentería porcina asociada con *Brachyspira hyodysenteriae*.

250 En otro aspecto de la invención, la composición de la vacuna es una composición de vacuna que comprende al menos dos polinucleótidos de lipasa y / o moléculas de peptidasa seleccionadas del grupo formado por

255 SEQ ID N ° 9, 11, 13 y 15 para el tratamiento o prevención de la disentería porcina asociada con *Brachyspira hyodysenteriae*.

260 En otro aspecto de la invención, la composición de la vacuna es una composición de vacuna que comprende al menos tres polinucleótidos lipasa y / o moléculas de peptidasa seleccionadas del grupo formado por SEQ ID N ° 9, 11, 13 y 15 para el tratamiento o la prevención de la disentería porcina asociada con *Brachyspira hyodysenteriae*.

265 En otro aspecto de la invención, la composición de la vacuna es una composición de vacuna que consiste en la codificación de polinucleótidos de lipasa y / o moléculas de peptidasa seleccionadas del grupo que consiste en: SEC ID N ° 9, 11, 13 y 15 para el tratamiento o la prevención de la disentería porcina asociada con *Brachyspira hyodysenteriae*.

270 En otro aspecto de la invención, la composición de la vacuna es una composición de vacuna que comprende al menos de dos moléculas de polinucleótidos de la toxina seleccionada del grupo formado por SEQ ID N ° 17, 19, 21 y 23 para el tratamiento o la prevención de la disentería porcina asociada con *Brachyspira hyodysenteriae*.

275 En otro aspecto de la invención, la composición de la vacuna es una composición de vacuna que comprende al menos de tres polinucleótidos de moléculas de toxina seleccionada del grupo formado por SEQ ID N ° 17, 19, 21 y 23 para el tratamiento o la prevención de la disentería porcina asociada con *Brachyspira hyodysenteriae*.

280 En otro aspecto de la invención, la composición de la vacuna es una composición de vacuna que consiste en moléculas de polinucleótidos de la toxina seleccionada del grupo que consiste en: SEC ID N ° 17, 19, 21 y 23 para el tratamiento o la prevención de la disentería porcina asociada con *Brachyspira hyodysenteriae*.

285 En otro aspecto de la invención, la composición de la vacuna es una composición de vacuna que consiste en moléculas de polinucleótidos de la toxina seleccionada del grupo que consiste en: SEC ID N ° 17, 19, 21 y 23 para el tratamiento o la prevención de la disentería porcina asociada con *Brachyspira hyodysenteriae*.

En otro aspecto de la invención, la composición de la vacuna es la
 290 composición de vacuna que comprende al menos de un polinucleótido de
 moléculas de hemolisina seleccionada del grupo formado por SEQ ID N °
 25, 27, 29 y 31 junto con al menos un polinucleótido seleccionado del
 grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21 y 23
 para el tratamiento o la prevención de la disentería porcina asociada con
 295 *Brachyspira hyodysenteriae*.

En otro aspecto de la invención, la composición de la vacuna es una
 composición de vacuna que comprende:
 (I) al menos un polinucleótido que codifica una molécula de la proteasa
 300 seleccionado del grupo de: SEC ID N ° 1, 3, 5 y 7, y / o
 (II) al menos un polinucleótido que codifica una lipasa y / o molécula de
 peptidasa seleccionada del grupo de: SEQ ID N ° 9, 11, 13 y 15 y / o
 (III) al menos un polinucleótido que codifica una molécula de la toxina
 seleccionada del grupo de: SEQ ID N ° 17, 19, 21 y 23 y / o
 305 (IV) al menos un polinucleótido que codifica una molécula de hemolisina
 seleccionada del grupo de: SEQ ID N ° 25, 27, 29 y 31 y / o
 para el tratamiento o la prevención de la disentería porcina asociada con
Brachyspira.

La presente invención proporciona también plásmidos que contienen el
 310 ADN que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17,
 19, 21, 23, 25, 27, 29 y 31; vectores de expresión procariota y/o
 eucariótica contienen AND que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 1, 3, 5,
 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29 y 31, y una celda que contiene
 315 los plásmidos que contienen el AND que tiene la secuencia de SEQ ID
 NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29 y 31.

La presente invención también proporciona nuevas proteínas de *B.*
hyodysenteriae que tiene la secuencia de aminoácidos que figura en la

320 SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30 y 32. Esta
invención también proporciona las proteínas que poseen el 95%, 90%,
85%, 80%, 75% y el 70% de homología con las secuencias contenidas en
SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30 y 32. La
325 presente invención también proporciona una vacuna o composición
inmunogénica que contienen las proteínas que tiene la secuencia de
aminoácidos contenidos en SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20,
22, 24, 26, 28, 30 y 32 o las secuencias de aminoácidos que poseen el
95%, 90%, 85%, 80%, 75% y 70% de homología con las secuencias
330 contenidas en SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26,
28, 30 y 32.

En un aspecto de la invención, la composición de la vacuna es una
composición de vacuna que comprende al menos de dos polipéptidos de
proteasa seleccionada del grupo formado por SEQ ID N ° 2, 4, 6 y 8 para
335 el tratamiento o la prevención de la disentería porcina asociada con
Brachyspira hyodysenteriae.

En otro aspecto de la invención, la composición de la vacuna es una
composición de vacuna que comprende al menos de tres polipéptidos de
proteasa seleccionada del grupo formado por SEQ ID N ° 2, 4, 6 y 8 para
340 el tratamiento o la prevención de la disentería porcina asociada con
Brachyspira hyodysenteriae.

En otro aspecto de la invención, la composición de la vacuna es una
composición de vacuna que consiste en polipéptidos de proteasa SEQ ID
345 N ° 2, 4, 6 y 8 para el tratamiento o la prevención de la disentería porcina
asociada con *Brachyspira hyodysenteriae*.

En un aspecto de la invención, la composición de la vacuna es una
composición de vacuna que comprende al menos de dos polipéptidos de
350 lipasa y / o peptidasa seleccionada del grupo formado por SEQ ID N ° 10,

12, 14 y 16 para el tratamiento o la prevención de la disentería porcina asociada con *Brachyspira hyodysenteriae*.

355 En otro aspecto de la invención, la composición de la vacuna es una composición de vacuna que comprende al menos de tres polipéptidos de lipasa y / o peptidasa seleccionada del grupo formado por SEQ ID N ° 10, 12, 14 y 16 para el tratamiento o la prevención de la disentería porcina asociada con *Brachyspira hyodysenteriae*.

360 En otro aspecto de la invención, la composición de la vacuna es una composición de vacuna que consiste en polipéptidos de lipasa y / o peptidasa del grupo que consiste de: SEC ID N ° 10, 12, 14 y 16 para el tratamiento o la prevención de la disentería porcina asociada con *Brachyspira hyodysenteriae*.

365 En un aspecto de la invención, la composición de la vacuna es una composición de vacuna que comprende al menos de dos polipéptidos de toxina seleccionada del grupo formado por SEQ ID N ° 18, 20, 22 y 24 para el tratamiento o la prevención de la disentería porcina asociada con *Brachyspira hyodysenteriae*.

370 En otro aspecto de la invención, la composición de la vacuna es una composición de vacuna que comprende al menos de tres polipéptidos de toxina seleccionada del grupo formado por SEQ ID N ° 18, 20, 22 y 24 para el tratamiento o la prevención de la disentería porcina asociada con *Brachyspira hyodysenteriae*.

375 En otro aspecto de la invención, la composición de la vacuna es una composición de vacuna que consiste en polipéptidos de toxina seleccionada del grupo que consiste en: SEC ID N ° 18, 20, 22 y 24 para el tratamiento o la prevención de la disentería porcina asociada con *Brachyspira hyodysenteriae*.

380 En otro aspecto de la invención, la composición de la vacuna es una composición de vacuna que consiste en polipéptidos de toxina seleccionada del grupo que consiste en: SEC ID N ° 18, 20, 22 y 24 para el tratamiento o la prevención de la disentería porcina asociada con *Brachyspira hyodysenteriae*.

385 En otro aspecto de la invención, la composición de la vacuna es una
composición de vacuna que comprende:

- (i) al menos un polipéptido de proteasa seleccionado del grupo de: SEC
ID N ° 2, 4, 6, u 8 y / o
- 390 (ii) al menos una polipéptido de lipasa y / o peptidasa seleccionado del
grupo de: SEQ ID N ° 10, 12, 14 o 16 y / o
- (iii) al menos una toxina seleccionada del grupo de: SEQ ID N ° 18, 20, 22
o 24 y / o
- (iv) al menos una hemolisina seleccionada del grupo de: SEQ ID N ° 26,
28, 30 o 32
- 395 para el tratamiento o la prevención de la disentería porcina asociada con
Brachyspira hyodysenteriae.

400 Es un aspecto adicional de esta invención tener un kit de diagnóstico que
contiene una o más proteínas que tiene una secuencia que figura en la
SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 22,, 24 , 26, 28, 30 y 32 o
que poseen el 95%, 90%, 85%, 80%, 75% y 70% de homología con las
secuencias contenidas en SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20,
22, 24, 26, 28, 30 y 32.

405 Es otro aspecto de esta invención tener secuencias de nucleótidos que
codifican las proteínas que tiene la secuencia de aminoácidos que figura
en la SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30 y 32.
La invención también abarca plásmidos, vectores de expresión eucariotas
y procariotas, y las vacunas de ADN que contienen el AND que tiene una
410 secuencia que codifica una proteína que tiene la secuencia de
aminoácidos que figura en la SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20,
22, 24, 26, 28, 30 y 32. Las células que contienen estos plásmidos y
vectores de expresión se incluyen en esta invención.

415 Esta invención incluye anticuerpos monoclonales que se unen a las
proteínas que tienen una secuencia de aminoácidos que figura en la SEQ
ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30 y 32 o se unen
a las proteínas que poseen el 95%, 90%, 85%, 80%, 75% y el 70% de
420 homología con las secuencias contenidas en SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10,
12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30 y 32. Los kits de diagnóstico que
contiene los anticuerpos monoclonales que se unen a las proteínas que
tienen una secuencia de aminoácidos contenidos en la SEC ID NO: 2, 4,
6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30 y 32 o se unen a las
425 proteínas que poseen el 95%, 90%, 85%, 80%, 75% y el 70% de
homología con las secuencias contenidas en SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10,
12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30 y 32 se incluyen en esta invención.
Estos kits de diagnóstico son capaces de detectar la presencia de *B.*
hyodysenteriae en un animal. El animal es preferentemente un mamífero
430 o un ave, más preferiblemente, pollo, ganso, pato, pavo, perico, perro,
gato, hámster, jerbos, conejos, hurones, caballos, vacas, ovejas, cerdos,
monos y humanos.

La invención también contempla el método de prevención o tratamiento
de una infección de la *B. hyodysenteriae* en un animal mediante la
435 administración a un animal de una vacuna de ADN que contiene una o
más secuencias de nucleótidos que figuran en SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9,
11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29 y 31 o secuencias que poseen el
95%, 90%, 85%, 80%, 75% y el 70% de homología de estas secuencias.
Esta invención también comprende un método de prevención o
440 tratamiento de una infección de la *B. hyodysenteriae* en un animal
mediante la administración a un animal de una vacuna que contiene una o
más proteínas que tiene la secuencia de aminoácidos que figuran en SEQ
ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30 y 32 o
445 secuencias que son el 95%, 90%, 85%, 80%, 75% y 70% homólogas a
estas secuencias.

La invención también contempla el método de generar una respuesta inmune en un animal mediante la administración a un animal de una composición inmunogénica que contenga una o más secuencias de nucleótidos que figuran en la SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, y 31 o secuencias que poseen el 95%, 90%, 85%, 80%, 75% y 70% de homología de estas secuencias. Esta invención también comprende un método para generar una respuesta inmune en un animal mediante la administración a un animal de una composición inmunogénica que contenga una o más proteínas que tienen la secuencia de aminoácidos que figuran en la SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30 y 32 o secuencias que poseen el 95%, 90%, 85%, 80%, 75% y el 70% de homología de estas secuencias.

460 **RESUMEN DETALLADO DE LA INVENCION.**

Antes de describir la presente invención en detalle, se debe entender que esta invención no se limita a los métodos particularmente ejemplo y puede, por supuesto, variar. También debe entenderse que la terminología que se utilizó en este documento es con el propósito de describir realizaciones particulares únicamente de la invención, y no se pretende que sean limitativos lo cual será limitado solamente por las reivindicaciones adjuntas.

470 Todas las publicaciones, las patentes y solicitudes de patente citados en este documento, ya sea supra o infra, se incorporan por referencia en su totalidad. Sin embargo, las publicaciones mencionadas en este documento se citan con el fin de describir y divulgar los protocolos, reactivos y los vectores que se presentan en las publicaciones y que podrían ser utilizados en relación con la invención. Nada de lo aquí presente debe ser interpretado como una admisión de que la invención no tiene derecho a antedatar dicha divulgación, en virtud de la invención anterior.

480 Además, la práctica de la presente invención emplea, a menos que se
indique lo contrario, las técnicas inmunológicas convencionales y de la
biología molecular y farmacología en la habilidad de la técnica. Estas
técnicas son bien conocidas por un trabajador calificado, y se explican
485 con detalle en la literatura. Ver eg., Coligan, Dunn, Ploegh, Speicher and
Wingfield "Current protocols in Protein Science" (1999) Volume I and II
(John Wiley & Sons Inc.); Sambrook et al., "Molecular Cloning: A
Laboratory Manual" (1989), 2nd Edition (Cold Spring Harbor Laboratory
press); and Prescott, Harley and Klein "Microbiology" (1999), 4th Edition
490 (WBC McGraw-Hill).

Cabe señalar que a medida que se utiliza aquí y en las reivindicaciones
añadidas, la forma singular "un", "uno", y "el,la,lo" incluye una referencia
plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Así, por
ejemplo, una referencia a "un gen" incluye una pluralidad de dichos
495 genes, y una referencia a "un animal" es una referencia a uno o más
animales, y así sucesivamente. A menos que se defina lo contrario, todos
los términos técnicos y científicos utilizados en este documento tienen el
mismo significado que comúnmente se entiende por un experto en la
materia a la que pertenece esta invención. A pesar de todos los
500 materiales y métodos similares o equivalentes a las descritas en este
documento se puede utilizar para practicar o probar la presente invención,
los materiales preferidos y los métodos se describen a continuación.

505 En el más amplio aspecto de la invención, se proporciona un nuevo
polinucleótido de la *B. hyodysenteriae* que tiene la secuencia de
nucleótidos que figura en la SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19,
21 y 23 o una secuencia de aminoácidos (polipéptidos) codificadas por
estos polinucleótidos.

510

El término "aminoácidos" pretende abarcar todas las moléculas, ya sean naturales o sintéticas, que incluyen tanto una funcionalidad de amino y una funcionalidad de ácido y susceptible de ser incluida en un polímero de origen natural aminoácidos. Aminoácidos ejemplares incluyen aminoácidos de origen natural; análogo, derivados y sus congéneres, los análogos de aminoácidos que tienen cadenas variantes laterales, y todos los estereoisómeros de cualquiera de cualquiera de los anteriores.

515

520

Un animal puede ser un mamífero o un ave que puede estar infectado con *Brachyspira*, especialmente con *B. hyodysenteriae*. Algunos ejemplos de mamíferos incluyen perros, gatos, hámster, jerbos, conejos, hurones, caballos, vacas, ovejas, cerdos, monos y humanos. Ejemplos de aves incluyen pollo, ganso, pato, pavo y perico. Es apreciado por los expertos en la materia que ciertas especies de *Brachyspira* son capaces de infectar a un amplio rango de hospedantes (véase, por ejemplo, Hampson et al., 2006, *Emerging Infectious diseases*, Vol. 12(5), p869-870, incorporated herein in its entirety by reference). En consecuencia, el término "animal" según lo utilizado adjunto incluye una serie de animales, pero sobre todo los cerdos y aves de corral.

525

530

El término "residuo conservado" se refiere a un aminoácido que es miembro de un grupo de aminoácidos que tienen ciertas propiedades comunes. El término "sustitución conservadoras 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 los cambios de aminoácidos entre las proteínas correspondientes de los organismos homólogos (Schulz, G. E. and R. H. Schinner., *Principles of Protein Structure*, Springer-Verlag). De acuerdo con 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 parecen más a otros en su impacto sobre la estructura de la proteína total (Schulz, G. E. and R. H.

535

540

Schirmer, Principles of Protein Structure, Springer-Verlag). Ejemplos de grupos de aminoácidos se definidos de esta forma incluyen: (I) un grupo con carga positiva que contiene Lys, Arg y His, (ii) un grupo con carga negativa que contiene Glu y Asp, (iii) un grupo aromático que contiene Phe, Tyr y Trp, (iv) un grupo de nitrógeno del ciclo que contiene His y Trp, (v) un gran grupo alifáticos no polares que contienen Val, Leu y De, (vi) un grupo poco polares que contienen Met y Cys, (vii) un pequeño grupo de residuos que contienen Ser, Thr, Asp, Asn, Gly, Ala, Glu, Gln y Pro, (viii) un grupo alifático que contiene Val, Leu, Ile, Met y Cys, y (ix) un pequeño grupo hidroxilo que contiene Ser y Thr.

Una "proteína de fusión" o "polipéptido de fusión" se refiere a una proteína quimérica como es conocido el término en el arte y puede ser construido utilizando métodos conocidos en el arte. En muchos ejemplos de proteínas de fusión, hay dos secuencias polipeptídicas diferentes, y en ciertos casos, puede haber más. Las secuencias polinucleótida que codifican la proteína de fusión pueden ser unidas de forma operativa en el marco de modo que la proteína de fusión puede ser traducida correctamente. Una proteína de fusión puede incluir secuencias polipeptídicas de la misma especie o de especies diferentes. En varias encarnaciones, el polipéptido de fusión puede contener una o más secuencias de aminoácidos vinculados a un polipéptido primero. En el caso de que más de una secuencia de aminoácidos se funde a un primer polipéptido, las secuencias de la fusión puede ser varias copias múltiples de la misma secuencia, o bien, pueden ser diferentes secuencias de aminoácidos. Los polipéptidos de fusión pueden ser fusionados con el N-terminal, la terminal C, o la N-y C-terminal del polipéptido en primer lugar. Ejemplos de proteínas de fusión son polipéptidos que contienen una etiqueta de glutatión S-transferasa (GST-etiquetas), la etiqueta de histidina (His-tag), un dominio de inmunoglobulina o un dominio de unión de inmunoglobulina. El término "polipéptido aislado" se refiere a un polipéptido, en ciertas realizaciones preparado a partir de la recombinación de ADN o ARN, o de origen sintético o de origen natural, o

575 alguna combinación de los mismos, que (1) no se asocia con las
proteínas que normalmente se encuentra con la naturaleza, (2) se separa
de la célula en la que normalmente se produce, (3) está libre de otras
proteínas celulares de la fuente misma, (4) es expresado por una célula
de una especie diferente, o (5) no se produce en la naturaleza. Es posible
580 que un polipéptido aislado exista, pero no califica como un polipéptido
purificado. El término "ácido nucleico aislado" y "polinucleótido aislado" se
refiere a un polinucleótido ya sea ADN genómico, cDNA, ARNm, ARNt,
ARNr, IRNA, o un polinucleótido obtenido de un orgánulo celular (como
las mitocondrias y cloroplastos), o ya sea de origen sintético, que (1) no
585 se asocia con la célula en la que el "ácido nucleico aislado" se encuentra
en la naturaleza, o (2) está 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 "polinucleótido" se refiere a una forma
590 polimérica de nucleótidos, ya sea ribo nucleótidos o
desoxirribonucleótidos o una forma modificada de cualquier tipo de
nucleótidos. Los términos también se entiende deben incluirse, como
equivalentes, análogos de ya sea ARN o ADN a partir de los análogos de
nucleótidos, y, en su caso a la realización que se describe, de una sola
595 cadena (como el sentido o anti sentido) y de polinucleótidos de doble
cadena.
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
600 totalidad o una parte de una secuencia de ácido nucleico, una secuencia
de nucleótidos que es al menos 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%,
98% o 99 % idéntica a una secuencia de ácido nucleico, una secuencia
de nucleótidos que hibrida en condiciones estrictas a una secuencia de
ácido nucleico; secuencias de nucleótidos que codifican los polipéptidos
que son funcionalmente equivalentes a los polipéptidos de la invención,
605 las secuencias de nucleótidos que codifican los polipéptidos que tiene al

610 menos cerca de 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% homología o idéntica a una secuencia de aminoácidos; secuencias de nucleótidos que codifican polipéptidos que tienen una actividad de un polipéptido de la invención y que tiene al menos un 60%, 70 %, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% o más de homología o identidad con una secuencia de aminoácidos; secuencias de nucleótidos que se diferencian por 1 a 2, 3, 5, 7, 10, 15 , 20, 30, 50, 75 o más sustituciones de nucleótidos, adiciones o supresiones, como las variantes alélicas de una secuencia de ácido nucleico; ácidos nucleicos derivados y evolutivamente relacionados con 615 una secuencia de ácido nucleico; y complementos de, y secuencias de nucleótidos como resultado de la degeneración del código genético, para todos los ácidos nucleicos precedentes y otros de la invención. Los ácidos nucleicos de la invención también incluyen homólogos, por ejemplo, orthologs y paralog, de una secuencia de ácido nucleico y también las variantes de una secuencia de ácido nucleico que ha sido el codón optimizado para la expresión en un organismo en particular (por ejemplo, la célula huésped).

620 El término "unido operativamente", al describir la relación entre dos regiones de ácidos nucleicos, se refiere a una yuxtaposición en donde las regiones se encuentran en una relación que les permite funcionar en su forma propuesta. Por ejemplo, una secuencia de control "operativamente vinculada" a una secuencia codificante se liga de tal manera que la expresión de la secuencia codificante se realiza en condiciones compatibles con las secuencias de control, tal como cuando las moléculas adecuadas (por ejemplo, los inductores y las polimerasas) son enlazado 630 al control o la secuencia reguladora (s).

El término "polipéptido", y los términos "proteínas" y "péptido", que se utilizan indistintamente en este documento, se refiere a un polímero de aminoácidos. Polipéptidos ejemplares incluyen productos de los genes, 635 proteínas de origen natural, homólogos, orthologs, paralog, fragmentos, y otros equivalentes, variantes y análogos de los anteriores.

Los términos "fragmento del polipéptido" o "fragmento", cuando se utiliza en referencia a un polipéptido de referencia, se refiere a un polipéptido en el que los residuos de aminoácidos se eliminan, en comparación con el mismo polipéptido de referencia, pero que donde la secuencia de aminoácidos restante es usualmente idéntico a las posiciones correspondientes en el polipéptido de referencia. Estas correcciones pueden ocurrir en el extremo amino-terminal o carboxilo-terminal del polipéptido de referencia, o bien ambas cosas. Los fragmentos suelen ser por lo menos 5, 6, 8 o 10 aminoácidos de largo, por lo menos 14 aminoácidos de largo, por lo menos 20, 30, 40 o 50 aminoácidos de largo, por lo menos 75 aminoácidos de largo, o por lo menos 100, 150 200 300 500 o más aminoácidos de longitud. Un fragmento puede retener una o mas de las actividades biológicas del polipéptido de referencia. En ciertas realizaciones, un fragmento puede abarcar un dominio que tiene la actividad biológica deseada, y aminoácidos adicionales opcionalmente en uno o ambos lados del dominio, los cuales pueden numerarse de 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, dicho sub-fragmento conserva una función de la región de la que se deriva. En otra realización, un fragmento puede tener propiedades inmunogénicas.

El término "polipéptido de la invención" se refiere a un polipéptido que contiene una secuencia de aminoácidos, o su equivalente, o fragmento de la misma. Los polipéptidos de la invención incluyen polipéptidos que contienen la totalidad o una parte de una secuencia de aminoácidos; una secuencia de aminoácidos con 1 a cerca de 2, 3, 5, 7, 10, 15, 20, 30, 50, 75 o más sustituciones de aminoácido conservante, una secuencia de aminoácidos que es al menos el 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a una secuencia de aminoácidos y fragmentos funcionales de los mismos. Los polipéptidos de la invención también incluyen homólogos, por ejemplo, orthologs y paralogos, de una secuencia de aminoácidos.

670 También es posible modificar la estructura de los polipéptidos de la invención con fines como la mejora de la eficacia terapéutica o profiláctica, o la estabilidad (por ejemplo, ex vivo la vida útil, resistencia a la degradación proteolítica en vivo, etc.) Tales polipéptidos modificados, cuando estén diseñados para mantener al menos una actividad de la forma de origen natural de la proteína, se consideran "equivalentes funcionales" de los polipéptidos se describe con más detalle aquí. Tales polipéptidos modificados se pueden producir, por ejemplo, por sustitución de aminoácidos, la eliminación o adición, dichas sustituciones pueden consistir total o parcialmente por sustituciones de aminoácidos conservantes.

675

680 Por ejemplo, es razonable esperar que una sustitución aislada de aminoácidos conservativos como la sustitución de una leucina con una isoleucina o valina, un aspartato con glutamato, una treonina con una serina, no tenga un efecto importante sobre la actividad biológica de la molécula resultante. Si un cambio en la secuencia de aminoácidos de un polipéptido de resultados en un homólogo funcional puede determinar fácilmente mediante la evaluación de la capacidad del polipéptido variante para producir una respuesta similar a la de la proteína de tipo salvaje. Polipéptidos en los que más que un remplazo ha tomado lugar puede ser probado de la misma manera.

685

690 El término "purificado" se refiere a una especie de objeto que es la especie predominante actual (es decir, sobre una base molar es más abundante que cualquier otra especie individual en la composición). Una "Fracción purificada" es una composición en donde la especie es objeto de al 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 esa determinación, sino sólo la especie (incluida la de interés) disuelto o disperso se tienen en cuenta.

695

700 Por lo general, una composición purificada tendrá una especie que es más de un 80% de todas las especies presentes en la composición, más

de un 85%, 90%, 95%, 99% o más de todas las especies presentes. Las especies de objeto pueden ser purificadas hasta homogeneidad esencial (especie de contaminantes no pueden ser detectados en la composición de los métodos de detección convencionales) en donde la composición es esencialmente una sola especie. Un experto en la materia puede purificar un polipéptido de la invención, utilizando técnicas estándar para la purificación de proteínas a la luz de las enseñanzas en este documento. La pureza de un polipéptido puede ser determinado por una serie de métodos conocidos para los expertos en la materia, incluyendo, por ejemplo, amino-terminal de análisis de la secuencia de aminoácidos, electroforesis en gel, el análisis de la espectrometría de masa y los métodos descritos en este documento.

Los términos "proteína recombinante" o "polipéptido recombinante" se refiere a un polipéptido que es producido por técnicas de ADN recombinante. Un ejemplo de estas técnicas incluye el caso en que el ADN que codifica la proteína expresada es insertada 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 reguladora" es un término genérico utilizado en todo el pliego de condiciones para hacer referencia a las secuencias de polinucleótido, tales como señales de iniciación, potenciadores, los reguladores y promotores, que son necesarios o deseables para afectar la expresión de la codificación y secuencias no codificantes a los que se están vinculados operativamente. Secuencias reguladoras ejemplares se describen en Goeddel; Gene Expression Technology: Methods in Enzymology, Academic Press, San Diego, CA (1990), e incluyen, por ejemplo, los promotores tempranos y tardíos del SV40, adenovirus o citomegalovirus promotor temprano inmediata, el sistema de laca, el sistema PRT, el TAC o el sistema de la CVR, promotor de T7, cuya expresión está dirigida por la ARN polimerasa T7, el principal operador y

735 regiones promotoras de fago lambda, las regiones de control de proteína de la cubierta fd, el promotor para el 3-fosfoglicerato quinasa u otras enzimas glucolíticas, los promotores de la fosfatasa ácida (por ejemplo, Pho5), los promotores de los factores de la levadura de α -acoplamiento, el promotor poliedro del sistema de baculovirus y otras secuencias conocidas para controlar la expresión de los genes de las células

740 procariotas o eucariotas o de sus virus, y varias combinaciones de los mismos. La naturaleza y el uso de secuencias de control pueden diferir dependiendo del organismo huésped. En procariotas, tales secuencias reguladoras generalmente incluyen promotor, sitio de unión ribosomal, y las secuencias de terminación de la transcripción. El término "secuencia reguladora" se pretende incluir, como mínimo, los componentes cuya presencia puede influir en la expresión, y también puede incluir otros componentes cuya presencia es ventajoso, por ejemplo, las secuencias de líder y las secuencias de la fusión pareja. En ciertas realizaciones, la transcripción de una secuencia de polinucleótidos está bajo el control de

750 una secuencia promotora (o una secuencia reguladora), que controla la expresión del polinucleótido en una celda de tipo de expresión que se destina. También se entenderá que el polinucleótido puede estar bajo el control de secuencias reguladoras que son las mismas o diferentes de las secuencias que controlan la expresión de la forma de origen natural de la polinucleótido.

755 El término "homología de secuencia" se refiere a la proporción de partidos de base entre dos secuencias de ácido nucleico o la proporción de partidos de aminoácidos entre dos secuencias de aminoácidos. Cuando una homología de secuencia se expresa como un porcentaje, por ejemplo, el 50%, el porcentaje representa la proporción de partidos a lo

760 largo de la secuencia de una secuencia deseada que se compara con otra secuencia. Lagunas (en cualquiera de las dos secuencias) se les permite maximizar surtidos longitudes de brecha de 15 bases o menos se suelen utilizar, 6 bases o menos se utilizan con más frecuencia, con dos bases o menos utilizados con mayor frecuencia. El término "identidad de la

765 secuencia" significa que las secuencias son idénticas (es decir, sobre una
base de nucleótidos por nucleótidos de los ácidos nucleicos o con
aminoácidos ácido-por-amino de polipéptidos) sobre una ventana de
comparación. El término "porcentaje de identidad de secuencia" se calcula
770 mediante la comparación de dos secuencias alineadas de forma óptima
sobre la ventana de comparación, determinar el número de posiciones en
las cuales los aminoácidos idénticos o nucleótidos se produce en ambas
secuencias para obtener el número de posiciones compensadas,
dividiendo el número de posiciones emparejadas por el número total de
775 posiciones en la ventana de comparación, y multiplicando el resultado por
100 para obtener el porcentaje de identidad de secuencia. Métodos para
el cálculo de identidad de secuencia son conocidos por los expertos en la
materia y se describen con más detalle a continuación.

El término "soluble" como se usa aquí con referencia a un polipéptido de
780 la invención o de otra proteína, significa que sobre la expresión en cultivos
celulares, por lo menos una parte del polipéptido o proteína expresada
permanece en la fracción citoplasmática de la célula y no fracciona con
los restos celulares en la lisis y centrifugación del lisado. Solubilidad de un
polipéptido podrá incrementarse en una variedad de métodos reconocidos
785 en la técnica, incluida la fusión de una secuencia de aminoácido
heteróloga, la eliminación de los residuos de aminoácidos, la sustitución
de aminoácidos (por ejemplo, enriqueciendo la secuencia con los residuos
de aminoácidos que tienen cadenas laterales hidrofílicas), y modificación
química (por ejemplo, la adición de grupos hidrofílicos).

790 La solubilidad de los polipéptidos se puede medir usando una variedad de
técnicas de arte reconocidos, incluidos, dispersión de luz dinámica para
determinar el estado de agregación, de absorción UV, la centrifugación
para separar la suma total de material no agregados, y electroforesis en
gel de SDS (por ejemplo, la cantidad de proteína en la fracción soluble se
795 compara con la cantidad de proteína en las fracciones solubles e
insolubles combinado). Cuando se expresa en una célula huésped, los
polipéptidos de la invención pueden ser por lo menos un 1%, 2%, 5%,

10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o más soluble, por ejemplo, por lo menos un 1%, 2%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o más de la cantidad total de la proteína expresada en la célula que se encuentra en la fracción citoplasmática. En ciertas realizaciones, un litro de cultura de células que expresan un polipéptido de la invención produciría por lo menos cerca de 0.1, 0.2, 0.5, 1, 2, 5, 10, 20, 30, 40, 50 miligramos o más de proteína soluble. En un ejemplo de realización, un polipéptido de la invención es por lo menos un 10% soluble y se producen menos de 1 miligramo de proteína de un litro de cultivo celular.

El término "específicamente hibrida" se refiere a la unión de ácido nucleico detectable y específica. Polinucleótidos, oligonucleótidos y ácidos nucleicos de la invención hibridan selectivamente a las cadenas de ácido nucleico en condiciones de hibridación y condiciones de lavado que minimizan apreciables cantidades de unión detectables a ácidos nucleicos no específicos. Las condiciones rigurosas se pueden utilizar para lograr condiciones de hibridación selectiva como se conoce en el arte y discutidos en este documento. En general, la homología de secuencia de ácidos nucleicos entre los polinucleótidos, los oligonucleótidos, y los ácidos nucleicos de la invención y una secuencia de ácido nucleico de interés será al menos del 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, el 90%, 95%, 98%, 99%, o más. En ciertos casos, la hibridación y las condiciones de lavado se realizan bajo condiciones rigurosas de acuerdo a los procedimientos convencionales de hibridación y como se describe más adelante en este documento.

Los términos "condiciones estrictas" o "condiciones estrictas de hibridación" se refieren a las condiciones específicas que promuevan la hibridación entre dos cadenas complementarias de polinucleótidos para formar un dúplex. Las condiciones rigurosas pueden ser seleccionadas para ser cerca de 5 ° C más bajo que el punto de fusión térmica (T_m) del dúplex de polinucleótido administrado a una fuerza iónica definida y el pH. La longitud de las cadenas de polinucleótidos complementarios y su

830 contenido GC determinará la T_m del dúplex, y por lo tanto las condiciones de hibridación necesarios para la obtención de una especificidad deseada de la hibridación. El T_m es la temperatura (bajo la fuerza iónica definida y el pH) en los cuales el 50% de una secuencia de polinucleótidos se hibrida con una línea perfectamente complementaria. En algunos casos
835 puede ser deseable aumentar el rigor de las condiciones de hibridación para que sea igual al T_m de un dúplex en particular.

Una variedad de técnicas para la estimación de la T_m están disponibles. Por lo general, los pares de bases GC en un dúplex se estima que contribuyen con alrededor del 3 ° C de la T_m, mientras que los pares AT
840 base se estima que contribuyen con alrededor del 2 ° C, hasta un máximo teórico de aproximadamente 80 a 100 ° C.

Sin embargo, modelos más sofisticados de T_m están disponibles en los cuales GC interacciones de apilamiento, efectos de disolvente, la temperatura de ensayo deseada y similares se tienen en cuenta. Por
845 ejemplo, las sondas pueden ser diseñados para tener una temperatura de disociación (T_d) de aproximadamente 60 ° C, utilizando la fórmula: $T_d = (((3 \times \# \text{ GC}) + (2 \times \# \text{ A})) \times 37) - 562) / \# \text{ pb} - 5$, donde GC #, # A y # pb 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.
850

La hibridación puede llevarse a cabo en 5x SSC, SSC 4x, SSC 3x, 2x SSC, SSC 1x o 0.2x SSC durante al menos 1 hora, 2 horas, 5 horas, 12 horas, o 24 horas. La temperatura de la hibridación se puede aumentar para ajustar el rigor de la reacción, por ejemplo, de unos 25 ° C
855 (temperatura ambiente), a unos 45 ° C y 50 ° C, 55 ° C y 60 ° C o 65 ° C. La reacción de hibridación también puede incluir otro agente que afecta a la rigurosidad, por ejemplo, la hibridación conducida en presencia de formamida al 50% aumenta el rigor de la hibridación a una temperatura definida.
860

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

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

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

Adecuadas condiciones de rigor son conocidos por los expertos en la materia o pueden determinarse experimentalmente por el experto en la materia. Ver por ejemplo, Current Protocols in Molecular Biology, John

895 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, 900 S. et al., Biochem. 31:12083 (1992).

905 El término "vector" se refiere a un ácido nucleico capaz de transportar a otro ácido nucleico a ese que se ha relacionado. Un tipo de vector que puede ser utilizado de acuerdo con la invención es un episoma es decir, un ácido nucleico capaz de reproducirse extra-cromosómicos. Otros vectores incluyen aquellos que son capaces de replicarse y expresarse autónomamente de ácidos nucleicos a los cuales están vinculados. Vectores capaces de dirigir la expresión de los genes a los que están vinculados operativamente se denominan como "vectores de expresión". 910 En general, los vectores de expresión de utilidad de las técnicas de ADN recombinante son a menudo en la forma de "plásmidos" que se refieren a las moléculas circulares de ADN de doble cadena que, en su forma de vectores no están vinculados al cromosoma. En la presente memoria, "plásmido" y "vector" son utilizados indistintamente así como el plásmido 915 es la forma más usual del vector. Sin embargo, la invención tiene por objeto la inclusión de esta otra forma de vectores de expresión que cumplen funciones equivalentes y que se conoce en el arte, posteriormente a esto.

920 Los ácidos nucleicos de la invención pueden ser utilizados como reactivo de diagnóstico para detectar la presencia o ausencia de las secuencias de AND y ARN objeto a los que se unen específicamente, por ejemplo, para determinar el nivel de expresión de un ácido nucleico de la invención. En otro aspecto, la presente invención contempla un método para detectar la presencia de un ácido nucleico de la invención o una parte de éstos en

925 una muestra,(a) proporcionando un par de oligonucleótidos de cadena simple, cada uno de los cuales tiene al menos ocho nucleótidos de longitud, complementario a las secuencias de ácido nucleico de la invención, y dentro de las secuencias a las cuales los oligonucleótidos son complementarios por lo menos diez nucleótidos aparte y (b) poniendo
930 en contacto los oligonucleótidos con una muestra que contiene al menos un ácido nucleico en condiciones de hibridación; (c) amplificando la secuencia de nucleótidos entre los dos primeros oligonucleótidos, y (d) detectando la presencia de la secuencia amplificada, de tal modo detectando la presencia de un ácido nucleico de la invención o una parte
935 de éstos en la muestra.

En otro aspecto de la invención, el polinucleótido de la invención esta proporcionada en un vector de expresión que contiene una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de la invención y vinculado operativamente a por lo menos una secuencia reguladora. Se debe
940 entender 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 deseada para expresarse. El número de vectores de copia, la capacidad de controlar ese número de copias y la expresión de cualquier otra proteína codificada por el vector,
945 así como los marcadores de antibióticos, se debe considerar.

Un vector de expresión que contiene el polinucleótido de la invención puede ser utilizado como un agente farmacéutico para el tratamiento de un animal infectado con *B. hyodysenteriae* o como una vacuna (también un agente farmacéutico) para evitar que un animal sea infectado con *B. hyodysenteriae*, o reducir los síntomas y el curso de la enfermedad si el
950 animal se infecta. Una manera de utilizar un vector de expresión como un agente farmacéutico es la de administrar una vacuna de ácido nucleico a el animal en riesgo de ser infectados o al animal después de ser infectados. La tecnología de la vacuna del ácido nucleico esta bien
955 descrito en el arte. Algunas descripciones se pueden encontrar en 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.). Vacunas de ácidos nucleicos pueden ser inyectadas en el músculo o por vía intradérmica, puede ser electro permeabilización en el animal (véase WO 01/23537, King et al.; and WO 01/68889, Malone et al.), a través de composiciones de lípidos (véase U.S. Patent 5,703,055, Felgner, et al), u otros mecanismos conocidos en el campo del arte.

Los vectores de expresión también puede ser transfectadas en las bacterias las cuales pueden ser administradas a los animales seleccionados para inducir una respuesta inmune a la proteína codificada por los nucleótidos de la invención contenida en el vector de expresión. El vector de expresión puede contener secuencias de expresión eucariotas de tal manera que los nucleótidos de esta invención se transcriben y se traducen en el animal huésped. Por otra parte, el vector de expresión puede ser transcrito en las bacterias y después se traduce en el animal huésped. La bacteria utilizada como un portador del vector de expresión debe ser atenuada, pero aún así invasora. Uno puede usar *Shigella* spp., *Salmonella* spp., *Escherichia* spp., Y *Aeromonas* spp., Sólo para nombrar unos pocos, que han sido atenuados, pero aún así son invasoras. Ejemplos de estos métodos se pueden encontrar en U.S. Patent 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.).

Por otra parte, los polinucleótidos de esta invención pueden ser colocados en ciertos virus que actúan un vector. Los vectores virales pueden expresar las proteínas de esta invención en la superficie del virus, o llevar polinucleótidos de esta invención dentro de una célula animal, donde el polinucleótido se transcrito y traducido dentro de una proteína. El animal infectado con los vectores virales puede desarrollar una respuesta inmunitaria a las proteínas codificadas por los polinucleótidos de esta invención. De esta manera se puede aliviar o prevenir una infección por *B. hyodysenteriae* en el animal que recibió los vectores virales. Ejemplos de

990 vectores virales se pueden encontrar en 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).

Esta invención se refiere a una célula huésped transfectadas con un gen recombinante para expresar un polipéptido de la invención. La célula huésped puede ser cualquier célula procariota o eucariota. Por ejemplo, 995 un polipéptido de la invención pueden ser expresado en las células bacterianas, tales como E. coli, células de insecto (baculovirus), levadura, plantas, o células de mamífero. En aquellos casos en que la célula huésped es humana, puede o no ser un sujeto vivo. Otras células hospedadoras apropiadas son conocidas por los expertos en la materia. 1000 Además, la célula huésped puede ser suplementada con moléculas de tARN que no suelen encontrarse en el huésped con el fin de optimizar la expresión del polipéptido. Por otra parte, la secuencia de nucleótidos puede ser modificada para optimizar la expresión en la célula huésped, sin embargo, la proteína producida tendría una alta homología con la 1005 proteína codificada originalmente. Otros métodos adecuados para maximizar la expresión del polipéptido se dará a conocer a aquellos en el arte.

La presente invención se refiere a los métodos de producción de polipéptidos de la invención. Por ejemplo, una célula huésped 1010 transfectadas con un vector de expresión que codifica un polipéptido de la invención pueden ser cultivadas en condiciones adecuadas para permitir la expresión del polipéptido que se produce. El polipéptido puede ser secretado y aislado de una mezcla de células y medio que contiene el polipéptido. Por otra parte, el polipéptido se puede mantener 1015 citoplasmático y las células recolectadas, lisadas y aislado de la proteína. Un cultivo celular incluye células huéspedes, los medios de comunicación y otros subproductos. Los medios adecuados para el cultivo celular son bien conocidos en el arte. El polipéptido puede ser aislado del medio de 1020 cultivo celular, las células del huésped, o ambas usando técnicas conocidas en la técnica de purificación de proteínas, incluyendo la

cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de filtración en gel, ultrafiltración, electroforesis, y la purificación de inmunoafinidad con anticuerpos específicos para epítopos particulares de un polipéptido de la invención.

1025

Así, una secuencia de nucleótidos que codifican la totalidad o una parte del polipéptido seleccionado 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 una construcción polinucleótida, como un vector de expresión, y transformar o transfectar en los huéspedes, ya sean eucariotas (levaduras mamíferos, aves, insectos o) o procariotas (células bacterianas), son procedimientos estándar. Procedimientos similares, o sus modificaciones, se puede emplear para preparar polipéptidos recombinantes de la invención por medio microbiano o de la tecnología de cultivo de tejidos.

1030

1035

Vectores adecuados para la expresión de un polipéptido de la invención incluyen plásmidos de los tipos: plásmidos pTrcHis derivados, los plásmidos pET-derivada, plásmidos pBR322-derivada, plásmidos pEMBL derivados, plásmidos pEX derivados, plásmidos pBTac derivado de pUC y derivados plásmidos para la expresión en las células procariotas, tales como E. coli. Los distintos métodos empleados en la preparación de los plásmidos y la transformación de los organismos huéspedes son bien conocidos en el arte.

1040

1045

Para otros sistemas de expresión adecuados tanto para las células procariotas y eucariotas, así como los procedimientos generales recombinantes, consulte Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2nd Ed., ed. by Sambrook, Fritsch and Maniatis (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) Chapters 16 and 17.

1050

Secuencias de codificación para un polipéptido de interés puede ser incorporado como parte de un gen de fusion que incluye una secuencia

de nucleótidos que codifica un polipéptido diferente. La presente
1055 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
1060 proteína de fusión que contiene el polipéptido heterólogo. El polipéptido
heterólogo puede ser fundido a (a) el C-terminal del polipéptido de la
invención, (b) el N terminal del polipéptido de la invención, o (c) de la
terminal C y el N-terminal del polipéptido de la invención. En ciertos
casos, la secuencia heteróloga codifica un polipéptido que permite la
detección, aislamiento, solubilización y / o estabilización del polipéptido a
1065 la que se funde. En otras encarnaciones, la secuencia heteróloga codifica
un polipéptido como un poli His etiqueta, myc, HA, GST, la proteína A,
proteína G, el péptido de unión a calmodulina, tioredoxina, la proteína de
unión a maltosa, la arginina poli, poli Su-Asp, BANDERA, una porción de
una proteína inmunoglobulina, y un péptido transcitosis.

1070 Sistemas de fusion de expresión pueden ser útiles cuando se desea
producir un fragmento inmunogénico de un polipéptido de la invención.
Por ejemplo, la proteína del cápside VP6 del rotavirus puede ser utilizado
como una proteína transportadora inmunológica para las porciones del
polipéptido, ya sea en la forma monomérica o en forma de una partícula
1075 viral. Las secuencias de ácido nucleico que corresponde a la porción de
un polipéptido de la invención para los cuales anticuerpos han de ser
criados pueden ser incorporados en un gen de fusion constructor que
incluye secuencias de codificación para una proteína de un virus final para
producir una serie de virus recombinantes que expresan proteínas de
1080 fusión que abarca una porción de la proteína, como parte del virión. El
antígeno superficial de la hepatitis B también puede ser utilizado en esta
función. Del mismo modo, la codificación quimérica de construcción para
proteínas de fusión que contiene una porción de un polipéptido de la
invención y la proteína del cápside del poliovirus puede ser creado para

- 1085 mejorar la inmunogenicidad (véase, por ejemplo, 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).
- Las proteínas de fusión pueden facilitar la expresión y / o purificación de las proteínas. Por ejemplo, un polipéptido de la invención se puede
- 1090 generar como glutatión-S-transferasa (GST) proteína de fusión. Estas proteínas de fusión GST se puede utilizar para simplificar la depuración de un polipéptido de la invención, por ejemplo, mediante el uso de matrices de glutatión derivatizado (véase, por ejemplo, *Current Protocols in Molecular Biology*, eds. Ausubel et al., (N.Y.: John Wiley & Sons, 1991)). En otra realización, un gen de fusión que codifica una secuencia
- 1095 líder de purificación, como un poli-(His) / secuencia del sitio enteroquinasa división en la N-terminal de la porción deseada de la proteína recombinante, puede permitir la purificación de la proteína de fusión expresada por cromatografía de afinidad utilizando una resina de Ni²⁺ +
- 1100 metal. La secuencia líder de purificación puede entonces ser posteriormente eliminada por el tratamiento con enteroquinasa para proporcionar la proteína purificada (por ejemplo, ver Hochuli et al., (1987) *J. Chromatography* 411: 177; and Janknecht et al., *PNAS USA* 88:8972).
- 1105 Técnicas para la toma de genes de fusión son bien conocidas. En esencia, la unión de varios fragmentos de ADN que codifican diferentes secuencias del polipéptido se realiza de acuerdo con las técnicas convencionales, empleando ramos o terminales alternes de composición para la ligación, enzimas de digestión de restricción para proveer de
- 1110 terminales adecuados, relleno de extremos cohesivos en su caso, el tratamiento de fosfatasa alcalina para evitar uniones indeseables y uniones enzimáticas. En otra realización, el gen de fusión se puede sintetizar mediante técnicas convencionales incluyendo sintetizadores automáticos de ADN. Por otra parte, la amplificación por PCR de
- 1115 fragmentos de genes puede llevarse a cabo mediante el uso de anclas primarias que dan lugar a proyecciones complementarias entre dos

fragmentos de genes consecutivos que posteriormente pueden ser recocidos para generar una secuencia del gen quimérico (véase, por ejemplo, Current Protocols in Molecular Biology, eds. Ausubel et al., John Wiley & Sons: 1992).

En otras realizaciones, la invención proporciona a los ácidos nucleicos de la invención inmovilizados sobre una superficie sólida, incluyendo, placas, placas de micro titulación, diapositivas, los granos, las partículas, esferas, películas, hilos, precipitados, geles, láminas, tubos, envases, vasos capilares, cojines, 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 tal 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 las mismas especies patógenas como tales polinucleótido (s).

En una forma preferida de la invención, se proporciona polipéptidos aislados *B. hyodysenteriae* como se describe en este documento, así como el polinucleótido que codifica secuencias de estos polipéptidos. Más deseable los polipéptidos de *B. hyodysenteriae* se proporcionan en forma sustancialmente purificada.

Polipéptidos preferidos de la invención tendrán una o más propiedades biológicas (por ejemplo, in vivo, in vitro o propiedades inmunológicas) del polipéptido native completo. Polipéptidos no funcionales se incluyen también en el ámbito de la invención, ya que pueden ser útiles, por ejemplo, como antagonistas de los polipéptidos funcionales. Las propiedades biológicas de los análogos, fragmentos o derivados en relación con el tipo salvaje se pueden determinar, por ejemplo, por medio de ensayos biológicos.

- 1150 Polipéptidos, incluyendo análogos, fragmentos y derivados, se pueden preparar de manera sintética (por ejemplo, utilizando las técnicas conocidas de fase sólida o la síntesis de péptidos en fase solución). Preferiblemente, las técnicas de síntesis en fase sólida son empleadas. Por otra parte, los polipéptidos de la invención puede ser preparada con técnicas bien conocidas de la ingeniería genética, como describió infra.
- 1155 En otra realización, los polipéptidos pueden ser purificados (por ejemplo, mediante la purificación de inmutafinidad) de un fluido biológico, tales como, pero no limitado a la del plasma, heces, suero u orina de animales, incluyendo pero no limitado a, cerdo, pollo, ganso, pato, pavo, perico, humano, mono, perro, gato, caballo, hámster, jerbos conejo, hurón, caballos, ganado y ovejas.
- 1160 Los análogos del polipéptido de *B. hyodysenteriae* incluye los polipéptidos que tiene la secuencia de aminoácidos, en donde uno o más de los aminoácidos son sustituidos por otro aminoácido, sustituciones del cual no alteran sustancialmente la actividad biológica de la molécula.
- 1165 De acuerdo con la invención, los polipéptidos de la invención o recombinante producida por síntesis química y otros fragmentos o derivados o análogos de la misma, incluyendo las proteínas de fusión, se puede utilizar como inmunógeno para generar anticuerpos que reconocen los polipéptidos.
- 1170 Una molécula es "antigénico" cuando es capaz de interactuar específicamente con una molécula de reconocimiento de antígenos del sistema inmune, tales como la inmunoglobulina (anticuerpo) o células T del receptor de antígeno. Una secuencia de aminoácidos antigénica contiene al menos un 5, y preferiblemente por lo menos unos 10, aminoácidos. Una porción antigénica de una molécula puede ser la parte
- 1175 que es inmunodominante para el anticuerpo o para el receptor de reconocimiento de las células T, 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

1180 molécula que es antigénica no tiene por qué ser en sí inmunogénica, es decir, capaz de provocar una respuesta inmune sin un portador.

1185 Un "anticuerpo" es cualquier inmunoglobulina, incluyendo anticuerpos y fragmentos de los mismos, que se unen a un epítipo específico. El término abarca anticuerpos policlonales, monoclonales, y quimérico, el último mencionado se describe con más detalle en U.S. Patent Nos. 4,816,397 y 4,816,567, así como las porciones de antígeno que unen los anticuerpos, incluyendo Fab, F (ab ') 2 y F (v) (incluyendo los anticuerpos de cadena sencilla). En consecuencia, la frase "molécula de anticuerpo" en sus diferentes formas gramaticales según lo utilizado en el texto
1190 contempla tanto una molécula de inmunoglobulina intacta y una parte inmunológicamente activa de una molécula de inmunoglobulina que contiene el sitio de combinación de anticuerpos. Un "sitio de combinación del anticuerpo" es la parte estructural de una molécula de anticuerpo formado por variables de cadena pesada y ligera y regiones hipervariables que se une específicamente a un antígeno.
1195

Ejemplos de moléculas de anticuerpos son moléculas de inmunoglobulina intacta, las moléculas de inmunoglobulina sustancialmente intactas y las partes de una molécula de inmunoglobulina que contienen el paratopo, que incluye las partes conocidas en el arte como Fab, F (ab ' Fab) 2 y F (v), porciones de las cuales son los preferidos para su uso en los métodos terapéuticos descritos en este documento.
1200

1205 Las Fab y F (ab ') 2 porciones de moléculas de anticuerpos se preparan mediante la reacción proteolítica de la papaína y pepsina, respectivamente, en las moléculas de anticuerpos sustancialmente intactos mediante métodos que son bien conocidos. Véase, por ejemplo, .S. Patent No. 4,342,566 to Theofilopolous et al. La porcion Fab 'de la molécula de anticuerpos son también bien conocidos y son producidos a partir de la F (ab') 2 porciones seguida por la reducción con mercaptoetanol de los enlaces disulfuricos que une las dos partes
1210

pesadas de la cadena, y seguido por la alquilación del mercaptano de proteína resultante con un reactivo como el yodoacetamida. Un anticuerpo que contienen moléculas intactas de anticuerpos se prefiere en este documento.

1215

La frase "anticuerpos monoclonales" en sus diferentes formas gramaticales se refiere a un anticuerpo que tiene sólo una especie de sitio de combinación de anticuerpos capaces de immunoreaccionar con un antígeno particular. Un anticuerpo monoclonal por lo tanto muestra una afinidad de union única para cualquier antígeno con el cual este immunoreaccionar. Un anticuerpo monoclonal por lo tanto puede contener una molécula de anticuerpo que tiene una pluralidad de sitios de combinación de anticuerpos, cada uno inmuno-específico para un antígeno diferente, por ejemplo, un anticuerpo bioespecíficos (quimérico) monoclonal

1220

1225

El término "adyuvante" se refiere a un compuesto o mezcla que mejora la respuesta inmune a un antígeno. Un adyuvante puede servir como un depósito de tejido que libera lentamente el antígeno y también como activador del sistema linfático que no específicamente mejora la respuesta inmune [Hood et al., in Immunology, p. 384, Second Ed., Benjamin/Cummings, Menlo Park, California (1984)]. A menudo, un reto principal con un antígeno solo, en ausencia de un adyuvante, dejará de provocar una respuesta inmune humoral o celular. Adyuvantes incluyen, pero no son limitado a, adyuvante completo de Freund, adyuvante incompleto de Freund, la saponina, geles minerales tales como el hidróxido de aluminio, sustancias activadoras de la superficie tales como lisolecitina, polioles plurónico, polianiones, péptidos, emulsiones de aceite o de hidrocarburos, hemocianinas de lapa, dinitrofenol , y adyuvantes humanos potencialmente útiles, tales como BCG (bacilo de Calmette-Guérin) y Corynebacterium parvum. Preferiblemente, el adyuvante es farmacéuticamente aceptable.

1230

1235

1240

1245 Varios 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, varios animales huéspedes pueden ser inmunizados por inyección con el polipéptido de la invención, incluyendo pero no limitándose a los conejos, ratones, ratas, ovejas, cabras, etc. En una realización, un polipéptido de la invención puede ser

1250 conjugado con un portador inmunogénico, por ejemplo, albúmina de suero bovino (BSA) o hemocianina de lapa (KLH). Diferentes adyuvantes pueden ser usados para aumentar la respuesta inmunológica, dependiendo de la especie huésped, incluyendo pero no limitándose a Freund (completa e incompleta), geles de minerales tales como el hidróxido de aluminio, tensioactivos tales como la lisolecitina, polioles

1255 plurónico, polianiones, péptidos, emulsiones de aceite, hemocianinas lapa, dinitrofenol, y adyuvantes humanos potencialmente útiles, tales como BCG (bacilo de Calmette-Guérin) y *Corynebacterium parvum*.

Para la preparación de anticuerpos monoclonales dirigidos hacia un

1260 polipéptido de la invención, cualquier técnica que se proporciona para la producción de moléculas de anticuerpos por las líneas continuas de células en cultivo pueden ser utilizados. Estos incluyen, pero no se limitan a la técnica del hibridoma originalmente desarrollado por Kohler et al., (1975) *Nature*, 256:495-497, la técnica de trioma, la técnica hibidroma con

1265 célula humana B [Kozbor et al., (1983) *Immunology Today*, 4:72], y la técnica de VEB-hibridoma para producir anticuerpos monoclonales humanos [Cole et al., (1985) in *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, pp. 77-96, Alan R. Liss, Inc.]. Inmortal, líneas de células productoras de anticuerpos pueden ser creados por otras técnicas de fusión, como la transformación directa de los linfocitos B con el ADN

1270 oncogénicos o transfección con el virus de Epstein-Barr. Véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. N ° 4341761, 4399121, 4427783, 4444887, 4451570, 4466917, 4472500, 4491632 y 4493890.

En una modalidad adicional de la invención, los anticuerpos monoclonales se pueden producir en los animales libres de gérmenes que utiliza la

- 1275 tecnología reciente. De acuerdo con la invención, anticuerpos de pollo o cerdo pueden ser utilizados y se pueden obtener mediante el uso de hibridomas de pollo o porcina o mediante la transformación de las células B con el virus VEB in vitro. De hecho, de acuerdo con 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] empalmando 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 la actividad biológica apropiada puede ser utilizada;
- 1280
- 1285 estos anticuerpos están dentro del alcance de esta invención. Tales anticuerpos quiméricos son los preferidos para el uso en la terapia de enfermedades o trastornos intestinales (infra describe), ya que los anticuerpos son menos probables que los anticuerpos xenogénicos para inducir una respuesta inmune, en particular, una respuesta alérgica, ellos mismos.
- 1290 De acuerdo con la invención, las técnicas descritas para la producción de anticuerpos de cadena sencilla (U.S. Patent 4,946,778) se puede adaptar para producir anticuerpos de cadena simple específicos para un polipéptido de la invención. Una realización adicional de la invención utiliza las técnicas descritas para la construcción de expresión de bibliotecas Fab [Huse et al., (1989) Science, 246:1275-1281] para permitir la identificación rápida y fácil de fragmentos Fab monoclonales con la especificidad deseada para un polipéptido de la invención.
- 1295
- 1300 Los fragmentos de anticuerpos, los cuales contienen el idiotipo de la molécula de anticuerpo, se pueden generar mediante técnicas conocidas. Por ejemplo, los fragmentos incluyen pero no están limitados a: el F (ab')₂ fragmento que puede ser producido por la digestión de la pepsina de la molécula de anticuerpo, el Fab' fragmentos que pueden ser generados por la reducción de los puentes de disulfuro de la F (ab)₂ fragmento, y los fragmentos Fab que pueden ser generados por el tratamiento de la molécula de anticuerpo con papaína y un agente reductor.
- 1305

- En la producción de anticuerpos, la detección de los anticuerpos deseados se puede realizar mediante técnicas conocidas en el arte, por ejemplo, radioinmunoensayo, ELISA "sandwich" inmunoensayos, ensayos inmunoradiométrico, gel de reacciones de precipitación de difusión, los ensayos de inmunodifusión, en inmunoensayos in situ (con oro coloidal, las etiquetas de la enzima o un radioisótopo, por ejemplo), Western blot, reacciones de precipitación, ensayos de aglutinación (por ejemplo, ensayos de aglutinación en gel, pruebas de hemaglutinación), ensayos de fijación de complemento, inmunofluorescencia, ensayos con la proteína A, los ensayos de inmunoelectroforesis, etc En una encarnación, la unión del anticuerpo se detecta mediante la detección de una etiqueta en el anticuerpo primario. En otra realización, el anticuerpo primario se detecta mediante la detección de la unión de un anticuerpo secundario o reactivo para el anticuerpo primario. En otra realización, el anticuerpo secundario se etiqueta. En una encarnación, la unión del anticuerpo se detecta mediante la detección de una etiqueta en el anticuerpo primario. En otra realización, el anticuerpo primario se detecta mediante la detección de la unión de un anticuerpo secundario o reactivo para el anticuerpo primario. En otra realización, el anticuerpo secundario es etiquetado. Muchos medios son conocidos en la técnica para detectar ligamento en un inmunoensayo y están dentro del ámbito de aplicación de la presente invención. Por ejemplo, para seleccionar anticuerpos que reconocen un epítipo específico de un polipéptido de la invención, se puede ensayar hibridomas generados para un producto que se une a un fragmento de un polipéptido de la invención que contienen tal epítipo.
- La invención abarca también los métodos de diagnóstico y pronóstico para detectar la presencia de *B. hyodysenteriae* con un polipéptido de la invención y / o anticuerpos que se unen al polipéptido de la invención y kits útiles para el diagnóstico y pronóstico de las infecciones por *B. hyodysenteriae*.

1340 Métodos de diagnóstico y de pronóstico en general se llevará a cabo
utilizando una muestra biológica obtenida de un animal, tales como pollo o
cerdo. Una "muestra" se refiere al tejido o liquido de un animal
sospechoso de contener alguna especie de *Brachyspira*, tales como *B.*
1345 *hyodysenteriae*, o su 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, el estómago, los
intestinos y en los componentes de cultivo in vitro de células.

1350 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 (preferentemente unido a un soporte
sólido) que específicamente se une al polipéptido de la invención bajo
condiciones que permiten la formación de complejos de reacción que
comprende el anticuerpo y el polipéptido de la invención, y (b) detectar la
1355 formación de complejos de reacción que comprende el anticuerpo y el
polipéptido de la invención en la muestra, en donde la detección de la
formación de complejos de reacción indican la presencia del polipéptido
de la invención en la muestra.

1360 Preferiblemente, el anticuerpo utilizado en este método se deriva de un
anticuerpo policlonal purificado por afinidad, y preferiblemente un
anticuerpo monoclonal. Además, es preferible que las moléculas de
anticuerpo utilizadas en este documento este en la forma de Fab, Fab, F
(ab')₂ o F(v) partes o moléculas de anticuerpos completos.

1365 En particular, los métodos preferidos para la detección de *B.*
hyodysenteriae basado en el método anterior incluyen pruebas de
inmunoabsorción enzimática, radioinmunoensayo, ensayos
inmunoradiométrico y ensayos inmunoenzimático, incluyendo ensayos
sándwich con monoclonales y / o anticuerpos policlonales.

1370

Tres procedimientos que son especialmente útiles utilizan ya sea el polipéptido de la invención (o un fragmento de la misma) marcados con una etiqueta detectable de anticuerpos Ab1 etiquetadas con un marcador detectable, o 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" indica el polipéptido de la invención:

1375

- 1380 A. $AA^* + Ab_1 = AA^*Ab_1$
 B. $AA + Ab_1^* = AA Ab_1^*$
 C. $AA + Ab_1 + Ab_2^* = Ab_1 AA Ab_2^*$

1385

Los procedimientos y su aplicación son familiares a los expertos en la materia y, en consecuencia pueden ser utilizados dentro del ámbito de aplicación de la presente invención. La "competencia" procedimiento, el procedimiento A, se describe en U.S. Patent Nos. 3,654,090 and 3,850,752. El procedimiento B es representativo de las bien conocidas técnicas de ensayo competitivas. El procedimiento C, el "sándwich" procedimiento, se describe en U.S. Patent Nos. RE 31,006 and 4,016,043. Sin embargo otros procedimientos son conocidos, como el "doble anticuerpo" o procedimiento "DASP", y se pueden ser utilizados.

1390

En cada caso, el polipéptido de la invención compleja con uno o más anticuerpos o socios obligatorios y un miembro del complejo se etiqueta con un marcador detectable. El hecho de que un complejo se ha formado y, si lo desea, el importe de las mismas, se puede determinar por métodos conocidos aplicables a la detección de etiquetas.

1395

Se desprende de lo anterior, que una propiedad característica de Ab2 es que reaccionara con Ab1. Esta reacción se debe a que Ab1, se crio en una especie de mamíferos, se ha utilizado en otras especies como antígeno para aumentar el anticuerpo, Ab2. Por ejemplo, Ab2 puede ser criado en cabras utilizando anticuerpos de conejo como antígenos. Ab2

1400

1405 por lo tanto, sería un anticuerpo de conejo criado en cabras. Para efectos de esta descripción y las reivindicaciones, Ab1 se conoce como anticuerpo primario, y Ab2 se conoce como secundaria o anti-Ab1 anticuerpos.

1410 Las etiquetas más comúnmente empleadas para estos estudios son elementos radiactivos, enzimas, sustancias químicas que presentan fluorescencia cuando se expone a la luz ultravioleta, y otros. Ejemplos de materiales fluorescentes capaces de ser utilizados como etiquetas incluyen fluoresceína, rodamina y auramina. Un material especial de detección son los anticuerpos de conejo preparado en cabras y conjugado con fluoresceína, a través de un isotiocianato. Ejemplos de isótopos preferidos incluyen ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S , ^{36}Cl , ^{51}Cr , ^{57}Co , ^{58}Co , ^{59}Fe , ^{90}Y , ^{125}I , ^{131}I , y ^{186}Re . La etiqueta radiactiva puede ser detectado por cualquiera de los procedimientos disponibles en la actualidad. Mientras que muchas enzimas pueden ser utilizadas, los ejemplos de enzimas preferidos son peroxidasa, β -glucuronidasa, β -D glucosidasa, β D galactosidasa, ureasa, oxidasa de glucosa más peroxidasa y fosfatasa alcalina. Las enzimas se conjugan a la partícula seleccionada por la reacción de puente con moléculas como carbodiimidas, diisocianatos, glutaraldehído y similares. Las etiquetas de la enzima puede ser detectado por cualquiera de las técnicas utilizadas actualmente: colorimétricas, espectrofotométricas, fluorospectrophotometric, amperométricos o gasométricos. U.S. Patent Nos. 3,654,090; 3,850,752; and 4,016,043 se refiere a modo de ejemplo para su divulgación de material alternativo etiquetado y de métodos.

1425 La invención también proporciona un método de detección de anticuerpos a un polipéptido de la invención en muestras biológicas, mediante los pasos siguientes: (a) proporcionar un polipéptido de la invención o un fragmento del mismo, (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 se forma.

1430

1435 En otra realización de la invención, se proporcionan métodos in vitro para evaluar el nivel de anticuerpos a un polipéptido de la invención en una muestra biológica mediante los pasos siguientes: (a) detectar la formación de complejos de reacción en una muestra biológica de acuerdo al método señalado anteriormente, y (b) la evaluación de la cantidad de complejos de reacción formados, cantidad de reacción de complejos de los cuales
1440 compleja corresponde con el nivel de polipéptido de la invención en la muestra biológica.

Además, se proporcionan métodos in vitro para la vigilancia del tratamiento terapéutico de una enfermedad asociada con *B. hyodysenteriae* en un animal huésped, mediante la evaluación, como se describe arriba, los niveles de anticuerpos a un polipéptido de la invención
1445 de una serie de muestras biológicas obtenidas en diferentes puntos de tiempo de un huésped animal sometidos a tratamiento terapéutico.

La presente invención proporciona métodos para detectar la presencia o ausencia de *B. hyodysenteriae* en una muestra biológica mediante: (a) la entrada de la muestra biológica en contacto con una sonda polinucleótido o cartilla del polinucleótido de la invención en virtud de las condiciones adecuadas de hibridación, y (b) detectar cualquier dúplex formado entre la sonda o la cartilla y de ácidos nucleicos en la muestra.
1450

De acuerdo con una realización de la invención, la detección de *B. hyodysenteriae* puede llevarse a cabo directamente mediante la amplificación de secuencias de polinucleótidos de una muestra biológica, utilizando técnicas conocidas y después detectando la presencia de secuencias de polinucleótido de la invención.
1455

En una forma de la invención, la secuencia de ácido nucleico objetivo es amplificada por PCR y después detectadas utilizando cualquiera de los métodos específicos mencionados anteriormente. Otras técnicas de diagnóstico útil para detectar la presencia de secuencias de polinucleótidos incluyen, pero no se limitan a: 1) PCR alelo-específicas, 2) el análisis de una sola hebra de conformación, 3) electroforesis en gel de
1460
1465 gradiente de desnaturalización, 4) los ensayos de protección de RNasa,

5) el uso de las proteínas que reconocen los desajustes de nucleótidos, como la E. coli mutS proteínas; 6) oligonucleótidos alelo-específicas, y 7), hibridación in situ fluorescente.

1470

Además de los métodos anteriores secuencias de polinucleótido pueden ser detectados utilizando tecnología de las sondas convencionales.

1475

Cuando las sondas son utilizadas para detectar la presencia de las secuencias de polinucleótidos deseadas, la muestra biológica a ser analizados, tales como sangre o suero, se puede tratar, si se desea, para extraer los ácidos nucleicos. Las secuencias de polinucleótido de la muestra se pueden preparar de varias maneras para facilitar la detección de la secuencia de destino, por ejemplo, desnaturalización, la digestión de restricción, electroforesis o punto secante. La región de orientación de la

1480

secuencia de polinucleótidos de la muestra por lo general debe ser por lo menos parcialmente de cadena simple para formar híbridos con la secuencia de orientación de la sonda. Si la secuencia es, naturalmente, de cadena sencilla, 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.

1485

Ejemplo de secuencias de polinucleótidos y sondas son incubadas bajo condiciones que promueven la formación estable de híbridos de la secuencia de objetivo en la sonda con la secuencia de polinucleótidos supuesta deseado en la muestra. Preferiblemente, las condiciones de alta severidad se utilizan para evitar falsos positivos.

1490

Detección, en su caso, del híbrido resultante se realiza normalmente mediante el uso de sondas marcadas. Por otra parte, la sonda puede ser sin etiqueta, pero puede ser detectable por su unión específica con un ligando que tiene la etiqueta, ya sea directa o indirectamente. Un etiquetado adecuado y los métodos de sondas etiquetado y ligandos se conocen en la materia, e incluyen, por ejemplo, etiquetas radiactivas que pueden ser incorporados por los métodos conocidos (por ejemplo,

1495

desplazamiento de la mella, al azar de cebado o kinasing), biotina, grupos fluorescentes, los grupos de quimioluminiscencia (por ejemplo, dioxetanes, particularmente activa dioxetanes), enzimas, anticuerpos, etc. Las variaciones de este esquema básico se conocen en la materia, e incluyen las variaciones que facilitan la separación de los híbridos a ser detectados a partir de materias extrañas y / o que amplifican la señal de la fracción etiquetada.

También se contempla dentro del alcance de esta invención que los ensayos de la sonda de ácido nucleico de la invención puede emplear un cóctel de sondas de ácido nucleico capaz de detectar las secuencias de polinucleótido deseado de esta invención. Así, en un ejemplo para detectar la presencia de secuencias de polinucleótido de la invención en una muestra de células, más de una sonda complementaria a una secuencias de polinucleótidos se emplea y, en particular el número de sondas diferentes es alternativamente 2, 3, ó 5 diferentes secuencias de la sonda de acido nucleico.

Las secuencias de polinucleótido descritas en este documento (preferiblemente en forma de puntas de prueba) también se puede inmovilizar a un soporte en fase sólida para la detección de especies de *Brachyspira*, incluyendo pero no limitándose a, *B. hyodysenteriae*, *B. intermedia*, *alvinipulli* B., *aalborgi* B. *B. innocens*, *murdochii* B. y *B. pilosicoli*.

Por otra parte las secuencias de polinucleótido aquí descritos forman parte de una colección de moléculas de ADN que se pueden utilizar para detectar simultáneamente un número de genes de especies diferentes de *Brachyspira*, tales como *B. hyodysenteriae*. En otra forma alternativa de la invención de las secuencias de polinucleótido se describe en este documento, junto con otras secuencias de polinucleótidos (como

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 de *Brachyspira*, como *B. Hyodysenteriae* y / o cualquiera de las secuencias de polinucleótidos otros vinculados al soporte sólido.

- 1530 Técnicas para la producción de colecciones de moléculas de ADN inmovilizado se han descrito en la técnica. En general, los métodos de arte más importantes describen la síntesis de moléculas de ácidos nucleicos de cadena simple, utilizando por ejemplo técnicas de enmascaramiento para construir varias permutaciones de las secuencias en las distintas posiciones discretas en el sustrato sólido. U.S. Patent No.
- 1535 5,837,832 describe un método mejorado para la producción de matrices de ADN inmovilizados en sustratos de silicio basado en tecnología de integración de gran escala. En particular U.S. Patent No. 5,837,832 describe una estrategia denominada "mosaico" para sintetizar conjuntos específicos de las sondas en lugares espacialmente definidas sobre un
- 1540 sustrato que puede ser utilizado para producir las bibliotecas de ADN inmovilizado de la presente invención. U.S. Patent No. 5,837,832 también proporciona referencias para las técnicas anteriores que también puede ser utilizadas. Sondas de secuencia de polinucleótido puede ser sintetizada in situ en la superficie del sustrato.
- 1545 Por otra parte, solo las moléculas de cadena se pueden sintetizar del sustrato sólido y cada secuencia de pre-formados aplicada a una posición discreta en el sustrato sólido. Por ejemplo, las secuencias de polinucleótido pueden ser impresas directamente sobre el sustrato mediante dispositivos robóticos equipados con pernos o aparatos
- 1550 eléctricos.
- Las secuencias de la colección suelen ser inmovilizadas sobre o en regiones discretas de un sustrato sólido. El sustrato puede ser poroso para permitir la inmovilización en el sustrato o prácticamente no porosa, en cuyo caso las secuencias de la colección suelen ser inmovilizado en la
- 1555 superficie del sustrato. El sustrato sólido puede ser de cualquier material al que polipéptidos pueden unirse, ya sea directa o indirectamente. Ejemplos de sustratos sólidos son de vidrio plano, las obleas de silicio, la mica, la cerámica y los polímeros orgánicos, como plásticos, incluyendo poliestireno y polimetacrilato. También puede ser posible el uso de
- 1560 membranas semi-permeables, como las membranas de nitrocelulosa o

1565 nylon, que están ampliamente disponibles. Las membranas semipermeables se pueden montar sobre una superficie sólida más robusta, como el vidrio. Las superficies opcionalmente se pueden cubrir con una capa de metal, como oro, platino o de metales de transición.

1570 Preferiblemente, el sustrato sólido es generalmente un material que tiene una superficie rígida o semi-rígido. En realizaciones preferidas, al menos una superficie del sustrato será prácticamente plana, aunque en algunas formas de realización puede ser deseable para la síntesis de regiones separadas físicamente de los polímeros diferentes, por ejemplo, planteó regiones o trincheras grabado. También es preferible que el sustrato sólido es adecuado para la aplicación de alta densidad de secuencias de ADN en áreas discretas de típicamente 50 a 100 micras, dando una densidad de 10000 a 40000 dots/cm-2.

1575 El sustrato sólido está convenientemente dividido en secciones. Esto puede lograrse mediante técnicas como la fotograbado, o por la aplicación de tintas hidrofóbicas, por ejemplo, las tintas base de teflón (Cel-line, EE.UU.).

1580 Posiciones discretas, en los que se encuentra cada miembro diferente de la biblioteca puede tener cualquier forma conveniente, por ejemplo, circular, rectangular, elíptica, con forma de cuña, etc

1585 Fijación de las secuencias de polinucleótido al sustrato puede ser por medio covalentes o no covalentes. Las secuencias de polinucleótidos se pueden unir al sustrato a través de una capa de moléculas que se unen las secuencias de la biblioteca. Por ejemplo, las secuencias de polinucleótido puede ser marcado con biotina y el sustrato recubierto con avidina o estreptavidina. Una característica conveniente de utilizar secuencias de polinucleótido biotina es que la eficiencia de acoplamiento al sustrato sólido se puede determinar fácilmente. Dado que las secuencias de polinucleótido puede obligar a sólo poco a algunos sustratos sólidos, a menudo es necesario para proporcionar una interfaz química entre el sustrato sólido (como en el caso de vidrio) y las

1590

1595 secuencias de ácido nucleico. Ejemplos de interfaces químicos
adecuados incluyen glicol hexaethylene. Otro ejemplo es el uso de vidrio
recubiertos con polilisina, la polilisina entonces que es químicamente
1600 modificados mediante el procedimiento habitual de presentar un ligando
de afinidad. Otros métodos para la fijación de las moléculas a las
superficies de sustrato sólido mediante el uso de agentes de
acoplamiento se conocen en la materia, véase, por ejemplo WO98/49557.
La unión de secuencias de polinucleótidos complementarios a la
biblioteca de ácido nucleico inmovilizado puede ser determinado por una
1605 variedad de medios tales como los cambios en las características ópticas
de la secuencia de polinucleótidos consolidados (es decir, por el uso de
bromuro de etidio) o por el uso de la etiqueta de los ácidos nucleicos,
tales como polipéptidos marcadas con fluorocromos. Otras técnicas de
detección que no requieren el uso de etiquetas incluyen técnicas ópticas
como optoacoustics, reflectometría, elipsometría y la resonancia de
plasmones superficiales (ver WO97/49989).
1610 Por lo tanto, la presente invención proporciona un sustrato sólido al
respecto que tiene inmovilizado al menos un polinucleótido de la
invención, preferiblemente dos o más secuencias de polinucleótidos
diferentes de la presente invención.
La presente invención también puede utilizarse como profiláctico o
1615 terapéutico, que puede ser utilizado con el propósito de estimular las
respuestas mediadas por humoral y celular en los animales, como pollos y
cerdos, de tal modo proporcionando la protección contra la colonización
con especies de *Brachyspira*, incluyendo pero no limitado a *B.*
hyodysenteriae, *B. intermedia*, *B. alvinipulli*, *aalborgi* *B.*, *innocens* *B.*,
1620 *murdochii* *B.* y *B. pilosicoli*. La infección natural con una especie
Brachyspira, tales como *B. hyodysenteriae* induce la circulación los títulos
de anticuerpos contra las proteínas descritas en este documento. Por lo
tanto, las secuencias de aminoácidos se describe en este documento o
partes del mismo, tienen el potencial para formar la base de una
administración oral o sistémica profiláctico o terapéutico para proporcionar

1625 una protección contra la espiroquetosis intestinal.
 Es muy apreciado por los expertos en el arte hay un alto grado de
 conservación de la secuencia entre las especies de *Brachyspira*. Por
 ejemplo, como se muestra a continuación la toxina *B. hyodysenteriae*
 1630 (H46) y proteína de membrana externa (H114) tienen un alto grado de
 similitud entre un número de especies de *Brachyspira*. Entre especies
 similitud de nucleótidos para la lipasa *B. hyodysenteriae* (H46)
Brachyspira especies similitud a nivel de nucleótidos (%)
 H46

1635	<i>Brachyspira</i>	<i>hyodysenteriae</i>	100
	<i>Brachyspira</i>	<i>pilosicoli</i>	81,9
	<i>Brachyspira</i>	<i>intermedia</i>	95,5
	<i>Brachyspira</i>	<i>murdochii</i>	85,9
	<i>Brachyspira</i>	<i>alvinipulli</i>	84,8

1640 Entre especies similitud de nucleótidos para la toxina de *B.*
hyodysenteriae (H72)

Brachyspira especies similitud a nivel de nucleótidos (%)
 H72

	<i>Brachyspira</i>	<i>hyodysenteriae</i>	100
1645	<i>Brachyspira</i>	<i>pilosicoli</i>	83,3
	<i>Brachyspira</i>	<i>intermedia</i>	95,0
	<i>Brachyspira</i>	<i>murdochii</i>	87,3
	<i>Brachyspira</i>	<i>alvinipulli</i>	85,8

1650 También como se muestra en el ejemplo 22, la secuencias de nucleótidos
 y aminoácidos de la presente invención son capaces de producir
 reacciones cruzadas en un rango de especies de *Brachyspira* no sólo *B.*
hyodysenteriae. En consecuencia, polipéptidos utilizados en la presente
 invención son capaces de usar contra otras especies de las especies de
Brachyspira no sólo *B. hyodysenteriae*.
 1655 En consecuencia, en una realización de la presente invención proporciona
 las secuencias de aminoácidos se describe en este documento o

1660 fragmentos de los mismos o los anticuerpos que se unen las secuencias de aminoácidos o polinucleótido las secuencias descritas en este documento en una cantidad terapéuticamente efectiva mezcla con un vehículo farmacéuticamente aceptable, diluyente o excipiente.

1665 La expresión "cantidad terapéuticamente efectiva" se utiliza aquí en el sentido de una cantidad suficiente para reducir en al menos un 15%, preferentemente al menos un 50%, más preferiblemente al menos un 90%, y preferiblemente evitar un déficit clínicamente significativo en el actividad, la función y la respuesta del huésped animal. Por otra parte, una cantidad terapéuticamente efectiva es suficiente para provocar una mejora en una condición clínicamente significativa en el animal huésped.

1670 La frase "farmacéuticamente aceptable" se refiere a las entidades moleculares y composiciones que son fisiológicamente tolerables y no suelen producir una reacción alérgica o trastornos similares, tales como molestias gástricas y similares, cuando se administra a un animal. El término "PORTADOR" se refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente o
1675 vehículo con el que se administra el compuesto. Tales portadores farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, como el agua y aceites, incluyendo los de petróleo, animal, vegetal o sintético, como el aceite de maní, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo, etc. soluciones acuosas de glicerol son empleados como portadores de preferencia, en particular para soluciones inyectables. Los portadores farmacéuticos
1680 adecuadas se describen en Martin, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18 de Ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, (1990).

De una forma más específica en la invención, se proporcionan composiciones farmacéuticas que contienen las cantidades de las
1685 secuencias de aminoácidos terapéuticamente efectivas descritas aquí o un análogo, parte o producto derivado de anticuerpos junto a diluyentes farmacéuticamente aceptables, preservativos, solubilizantes, emulsionantes, adyuvantes y/o portadores. Tales composiciones incluyen

- diluyentes de varias soluciones buffer (e.g., Tris-HCl, acetato, fosfato), pH y fuerza iónica y aditivos tales como detergentes y agentes solubilizantes (e.g., tween 80 polisorbato 80), antioxidantes (e.g., ácido ascórbico, metabisulfito de sodio), preservativos (e.g., Thimersol, alcohol bencílico) y sustancias aglutinantes (e.g., lactosa, manitol). El material puede ser incorporado a preparaciones particulares de compuestos poliméricos, tales como ácido poliláctico, ácido poliglicólico, etc. o dentro de liposomas. El ácido hialurónico también puede ser utilizado. Tales composiciones pueden influenciar el estado físico, la estabilidad, la proporción de liberación de *in vivo* y la proporción de despeje *in vivo* de las proteínas presentes y de los derivados. Véase, e.g., *Martin, Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18th Ed. (1990, Mack Publishing Co., Easton, PA 18042) páginas 1435-1712 que se encuentran aquí incluidas por referencia. La composición puede ser preparada en forma líquida, o tal vez en un polvo, en forma liofilizada.
- Alternativamente, los Polinucleótidos de la invención pueden ser optimizados para su manifestación en plantas (e.g., maíz). La planta puede ser transformada con plásmidos que contienen los Polinucleótidos optimizados. Luego, la planta es sembrada, y las proteínas de la invención se expresan en la planta, o la versión de la planta-optimizada se expresa. Más tarde la planta es cultivada, y la sección de la planta que contiene las proteínas de la invención es procesada para ser alimento del animal. Ejemplos del estado de la técnica que detallan estos métodos pueden ser hallados en la Patente U.S. 5,914,123 (Arntzen, et al.); Patente U.S. 6,034,298 (Lam, et al.); y la Patente U.S. 6,136,320 (Arntzen, et al.).
- Se tendrá en cuenta el que las composiciones farmacéuticas suministradas de acuerdo a la invención pueden ser administradas por cualquier tipo de método conocido dentro de la técnica. Preferiblemente, la composición farmacéutica para administración, son administradas por inyección, medio oral, o por vía pulmonar o nasal. Las secuencias de aminoácidos descritas aquí, o anticuerpos derivados de estos, son

preferiblemente suministrados por intravenosa, intraarterial, intraperitoneal, intramuscular, o vías subcutáneas de administración. Alternativamente, la secuencia de aminoácido descrita aquí o anticuerpos derivados de estos, propiamente formulados, pueden ser administrados por vía nasal u oral.

1725

Dentro de una representación específica de la invención, la composición de una vacuna puede ser una "vacuna combinada" con uno o más secuencias de polinucleótidos o polipéptidos de la invención, las cuales tienen una parte funcional similar, que son combinadas dentro de una

1730

vacuna. Por ejemplo, los cuatro siguientes grupos funcionales pueden ser combinados tal como se muestra en las siguientes tablas:

Grupo: Proteasas

Gen	Secuencia Polinucleótida	Secuencia Polipéptida
NAV-H197	SEQ ID No.1	SEQ ID No.2
NAV-H188	SEQ ID No.3	SEQ ID No.4
NAV-H185	SEQ ID No.5	SEQ ID No.6
NAV-H179	SEQ ID No.7	SEQ ID No.8

Grupo: Lipasas/Peptidasas

Gen	Secuencia Polinucleótida	Secuencia Polipéptida
NAV-H191	SEQ ID No.9	SEQ ID No.10
NAV-H186	SEQ ID No.11	SEQ ID No.12
NAV-H184	SEQ ID No.13	SEQ ID No.14
NAV-H46	SEQ ID No.15	SEQ ID No.16

Grupo: Toxinas

Gen	Secuencia Polinucleótida	Secuencia Polipéptida
NAV-H177	SEQ ID No.17	SEQ ID No.18
NAV-H72	SEQ ID No.19	SEQ ID No.20
NAV-H66	SEQ ID No.21	SEQ ID No.22
NAV-H40	SEQ ID No.23	SEQ ID No.24

1735

Grupo: Hemolisinas

Gen	Secuencia Polinucleótida	Secuencia Polipéptida
NAV-H68	SEQ ID No.25	SEQ ID No.26

NAV-H43	SEQ ID No.27	SEQ ID No.28
NAV-H33	SEQ ID No.29	SEQ ID No.30
NAV-H32	SEQ ID No.31	SEQ ID No.32

Un requisito previo para la combinación de vacunas es la falta de competitividad (i.e. entre antígenos) y una alta compatibilidad respecto al sujeto que será inmunizado. De acuerdo a la norma internacional aplicada, en relación a la inmunización, una vacuna combinada debe proporcionar una protección, la cual es comparable a los logros alcanzados por vacunaciones separadas. De igual forma, la combinación de antígenos es un proceso complicado, que se asocia a un numero de problemas e incertidumbres.

Debido a que los componentes de una vacuna combinada no son sustancias inertes, la combinación de varios componentes dentro de una sola mezcla, puede afectar negativamente la inmunogenicidad de los componentes antigénicos individuales. Por ejemplo, la interacción entre antígenos diferentes, o entre antígenos y otros componentes típicamente

utilizados en tales vacunas, pueden ocurrir debido a las diferencias en las cargas, residuos químicos, detergentes, formaldehido, concentración de iones, etc. estos cambios pueden ocurrir instantáneamente después del contacto con diferentes antígenos, con cada uno, o con otras sustancias, usualmente presentes en las formulaciones de las vacunas. Sin embargo,

no se puede predecir en qué medida la inmunogenicidad de los antígenos individuales pueden ser influenciados al mezclarlos en una combinación.

Como consecuencia, esta situación puede ocurrir en caso de que uno o más antígenos de la vacuna proporcionen únicamente una seroprotección insuficiente para una o más enfermedades, lo cual hace al producto no

apto para la práctica médica.

La producción de vacunas combinadas efectivas es un tema complicado, el cual depende de las reacciones multidimensionales entre los componentes individuales de la vacuna, y no permite extrapolar cualquier

efecto en los componentes observados cuando se administran por separado.

1765

Se ha encontrado que las vacunas combinadas, de acuerdo a la presente invención, pueden ser combinadas con uno o más antígenos, y permanecer efectivo y estable.

1770

El término "estable", como se usa en el contexto de la presente invención, se refiere que la formulación de la vacuna combinada puede ser mantenida por un periodo de ocho días, o preferiblemente 14 días a temperatura ambiente sin ninguna pérdida substancial respecto a la inmunogeneidad y estabilidad de estos compuestos antígenos. Con el fin de lograr la estabilidad, los agentes estabilizantes, tales como la

1775

sacarosa, pueden ser agregados a la composición de la vacuna. En vez de sacarosa, o además otros estabilizantes, e.g. albumina sérica humana, manosa, trehalosa, manitol, o poligelina, también pueden ser agregados como agentes estabilizantes. La vacuna de la presente invención muestra un pH, preferiblemente entre 5.0 a 8.0, o más aun

1780

preferiblemente entre 6.0 a 7.0, en donde el valor del pH de 6.8 a 7.8 el más indicado.

El término "efectivo", tal como se utiliza aquí, se refiere al hecho de que la secuencia de la invención, administrada una sola vez o en repetida administración a un sujeto (por ejemplo un mamífero), proporciona protección en contra de una enfermedad específica.

1785

Tal como se usa aquí el término "conferir protección" significa que la secuencia de la invención, respecto a la administración, genera una respuesta inmunológica en el sujeto vacunado, cuya respuesta es capaz de proteger dicho sujeto de los síntomas de la infección subsecuente.

1790

También está contemplado dentro de la presente invención, es el uso de las secuencias de polinucleótidos de la invención, al igual que secuencias hibridizables de polinucleótidos de ribosoma y antisentido codificando una secuencia de amino ácidos de acuerdo a la invención, para la manufacturación de un medicamento, para la modulación de una

1795

enfermedad asociada a *B. hyodysenteriae*.

- Las secuencias de polinucleótidos que codifican estructuras antisentido o ribosomas para su uso en métodos terapéuticos, son administrados directamente a placer como una estructura de ácido nucleico desenvainado. La aceptación de estructuras de ácidos nucleicos desenvainados por células bacterianas, es logrado por varias técnicas de transfección, por ejemplo aquellas que incluyen el uso de agentes de transfección. Ejemplos de estos agentes de transfección son agentes cationicos (por ejemplo fosfato de calcio y DEAE-dextrano) y lipofectantes. Usualmente, estructuras de ácidos nucleicos son mezcladas con agentes de transfección para producir una composición.
- 1800
- 1805 Alternativamente, la estructura antisentido o ribosomal puede ser combinada con un portador farmacéuticamente aceptable o diluyente para producir una composición farmacéutica. Portadores adecuados y diluyentes pueden incluir soluciones salinas isotónicas, por ejemplo una solución salina de fosfato-regulada. La composición puede ser formulada para vía parenteral, intramuscular, intravenosa, subcutánea, intraocular, oral o administración transdérmica. Las rutas de administración descritas anteriormente tienen como objeto ser solamente guía, ya que debe ser un practicante experimentado el que sea capaz de determinar la ruta óptima de administración, y la dosis para un animal en especial y su condición.
- 1810
- 1815 La invención también proporciona kit para el estudio de animales con sospecha de estar infectados por *Brachyspira species*, como la *B. hyodysenteriae*. o para confirmar que un animal está infectado con una especie *Brachyspira*, tal como *B. hyodysenteriae*. En una próxima representación de esta invención, los kits aptos para ser usados por especialistas deben ser hechos para determinar la presencia o ausencia de *Brachyspira species*, , pero no limitado para, *B. hyodysenteriae*, *B. intermedia*, *B. alvinipulli*, *B. aalborgi*, *B. innocens*, *B. murdochii*, y *B. pilosicoli* en aquellos animales bajo sospecha de estar infectados o para medir cuantitativamente las especies *Brachyspira*, incluyendo, pero no limitado para la infección por *B. hyodysenteriae*, *B. intermedia*, *B.*
- 1820
- 1825

1830 *alvinipulli*, *B. aalborgi* y *B. pilosicoli*. De acuerdo a las técnicas de prueba discutidas anteriormente, tales kits pueden contener al menos una versión etiquetada de uno de las secuencias de amino ácidos descritas aquí, o su patrón obligatorio, como por ejemplo, un mismo anticuerpo específico, y las instrucciones de funcionamiento del método seleccionado, e.g., "competitivo", "sándwich", "DASP" y similares. Alternativamente, tales kits pueden contener al menos una secuencia polinucleotida, complementaria

1835 a una porción de uno de las secuencias de polinucleotidos descritas en este documento, junto a instrucciones para su uso. Los kits también pueden contener agentes adicionales, tales como buffer, estabilizadores, etc.

De acuerdo, un kit de prueba para la demostración de la presencia de una especie *Brachyspira*, incluyendo, pero no limitado para, *B. hyodysenteriae*, *B. intermedia*, *B. alvinipulli*, *B. aalborgi*, *B. innocens*, *B. murdochii*, y *B. pilosicoli*, pueden contener lo siguiente:

- 1845 (a) Una cantidad predeterminada de al menos un componente inmunoquímicamente reactivo, etiquetado, obtenido por la unión directa o indirecta de una de las secuencias de amino ácidos descritas aquí, o un patrón específico de unión, para una etiqueta identificable;
- (b) Otros reactivos ; y
- (c) Instrucciones para el uso de este kit.

- 1850 Más específicamente, el kit de prueba de diagnostico debe contener
- (a) Una cantidad conocida de una de las secuencias de amino ácidos descritas aquí, al igual que descritas anteriormente (o un patrón de unión) generalmente unido a una fase solida para formar un inmunosorbente, o de manera alternativa, una
- 1855 etiqueta adecuada obligatoria, indicando la finalización de los productos etc;
- (b) Si es necesario, otro reactivo; y
- (c) Instrucciones para el uso de dicho kit.

En una próxima variación, el kit de prueba debe contener:

- 1860 (a) Un componente etiquetado, el cual ha sido obtenido a unir una de las secuencias de amino ácidos descritas aquí, a una etiqueta identificable;
- (b) Uno o más reactivos inmunoquímicos adicionales, de los cuales al menos un reactivo es un ligando o un ligando inmovilizado,
- 1865 tal ligando es seleccionado del grupo, consistiendo de:
- (i) Un ligando capaz de unirse con el componente etiquetado (a);
- (ii) Un ligando capaz de unirse con un patrón de unión de un componente etiquetado (a);
- 1870 (iii) Un ligando capaz de unirse con al menos uno de los componentes para ser determinado; o
- (iv) Un ligando capaz de unirse con al menos uno de los patrones de unión de el menos uno de los componentes para ser determinado; y
- 1875 (c) Instrucciones para el desarrollo de un protocolo para la detección y/o determinación de uno o más componentes de una reacción inmunoquímica entre una de las secuencias de amino ácidos descritas aquí y un patrón específico de unión.

En esta realización, la presente invención provee un simple kit de puntos de atención, que utiliza principios similares a los ampliamente utilizados en los kits de prueba en suero, para la rápida detección de los anticuerpos circulantes en el animal, para que los polipéptidos de la invención le permitan a un profesional del cuidado de la salud o veterinario, detectar rápidamente una infección *Brachyspira*, y para rápidamente dar comienzo

1880 a medidas terapéuticas preventivas, efectiva y comprobadas. El uso del kit puede representar un nivel estándar del cuidado de todos los animales que están en riesgo de desarrollar una infección causada por la *Brachyspira*.

1885

Los métodos y kits de la presente invención también proveen medios para

1890 detectar o monitorear una infección *Brachyspira*, incluyendo un cambio en

- el estado. Puede ser especialmente útil en detectar una fase temprana de la infección *Brachyspira*. Así, la invención también provee los medios para que un profesional del cuidado de la salud o un veterinario puedan monitorear el progreso de la infección *Brachyspira* (empeoramiento, 1895 mejoramiento, o que se mantenga igual) durante el seguimiento de un tratamiento. Usualmente, el profesional del cuidado de la salud o veterinario debería establecer un protocolo para la recolección y análisis de una de muestra biológica del animal en intervalos seleccionados. Usualmente la muestra es obtenida de forma intermitente durante un 1900 periodo prescrito. El periodo de tiempo entre la toma de muestras intermitentes puede ser dictaminado por la condición del animal, y puede tener un intervalo para cada muestra de 24 horas, hasta una muestra tomada con días, semanas o inclusive meses de diferencia.
- Un kit de puntos de atención para ser usado en el método, usualmente 1905 incluye un medio, al haber colocado uno o más polipéptidos capturados, en donde la muestra está conectada con el medio para exponer los polipéptidos capturados junto a los anticuerpos circulantes contenidos en la muestra. El kit incluye los medios para la obtención de la muestra, que puede incluir un implemento, tal como una aguja o un sistema de vacío, 1910 incluyendo una superficie que contenga un medio. El sistema para la adquisición también pueden incluir un recipiente para la recepción de la muestra, donde el contenedor tiene una superficie de contacto con el suero, que se contiene el medio. Dentro de otra representación común, la prueba para detectar la complejidad de los anticuerpos circulantes, y la 1915 captura de anticuerpos, puede incluir un ELISA, y puede ser utilizado para cuantificar la cantidad de anticuerpos circulantes, a los polipéptidos de la invención en una muestra. En una representación alternativa, los medios de adquisición pueden incluir un implemento que contenga un casete que contenga el método.
- 1920 Un método y kit de la presente invención para la detección de los anticuerpos circulantes a los polipéptidos de la invención, pueden ser hechos por adaptación a los métodos y kits conocidos en la tema para la

rápida detección de otras proteínas y ligandos en una muestra biológica. Ejemplos de los métodos y kits que pueden ser adaptados a la presente invención, son descritos en la Patente U.S. 565,503, emitido a May et al. en Agosto 12, 1997, Patente U.S. 6,500,627, emitido a O'Conner et al. en Diciembre 31, 2002, Patente U.S. 4,870,007, emitido a Smith-Lewis en Septiembre 26, 1989, Patente U.S. 5,273,743, emitido a Ahlem et al. en Diciembre 28, 1993, y la Patente U.S. 4,632,901, emitido a Valkers et al. en Diciembre 30, 1986, todas estas referencias hechas aquí, fueron incorporadas por referencia.

Un método rápido de un paso para detectar los anticuerpos circulantes a los polipéptidos de la presente invención, puede reducir el tiempo para detectar el desarrollo de la infección *Brachyspira*. Un método típico puede incluir los pasos de: obtener una muestra de un animal en riesgo de estar bajo sospecha de tener una infección *Brachyspira*; mezclando parte de la muestra con un o mas polipéptidos detectores, los cuales se unen específicamente a uno de los anticuerpos circulantes, para iniciar la unión de los polipéptidos detectores a los anticuerpos circulantes dentro de la muestra; hacer contacto entre la mezcla de la muestra y los polipéptidos detectores con un anticuerpo inmovilizado capturado, el cual se une específicamente a los polipéptidos detectores, donde el anticuerpo capturado no reacciona con el polipéptidos detector, para unir el polipéptido detector a los anticuerpos circulantes, y los anticuerpos circulantes a los anticuerpos capturados, para formar un complejo identificable; removiendo polipéptidos detectores no unidos, y cualquier muestra del complejo que no se halla unido; y detectando el polipéptidos detector del complejo. El polipéptidos detector puede ser etiquetado con un marcador identificable, tales como marcas radioactivas, enzimas, colorante biológico, cuenta magnética, o biotina, mientras sea bien conocido en la técnica.

Los siguientes ejemplos son provisto para el propósito de ilustración, y no tienen intención de limitar el ámbito de la invención.

1955 EJEMPLO 1: SECUENCIACION DEL GENOMA

Un campo porcino Australiano, aislado de *B. hyodysenteriae* (cepa WA1) es secuenciado según el método de la escopeta. Esta cepa ha sido bien caracterizada, y muestra ser virulenta, siguiendo el reto experimental de los cerdos. La espiroqueta es cultivada en un típico cultivo de caldo de soja anaeróbico y 100 µg de ADN fueron extraídos utilizando un método de bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) para preparar ADN cromosomal de alta calidad, apto para la preparación de la colección de ADN genómico. El ADN genómico es esquilado, utilizando un GeneMachines Hydroshear, y el ADN fragmentado, procesado para clonación, según el protocolo recomendado por los proveedores del pSMART vector system (Lucigen). Una pequeña colección de inserto (2-3 kb) y una colección mediana de inserto (3-10 kb) son construidos dentro de la versión de copia baja del pSMART vector.

1970 EJEMPLO 2: ANOTACION

Secuencias parciales de genoma para *B. hyodysenteriae* son ensamblados y anotados por la Instalación Australiana de Búsqueda del Genoma (AGRF). El Centro de computación de bioinformática y biológico (CBBC por sus siglas en inglés) usa el sistema espejos actualizados de la base de datos más importante a nivel internacional que ha desarrollado sistemas de software de tecnología de punta para la anotación de las características de las secuencias de genomas muy extensas. Una variedad de herramientas de bioinformática de dominio público, son utilizados para analizar y re-analizar la secuencia como parte de un proceso que asegure la calidad en el análisis de información. Marcos de lectura abiertos (ORFs) son predichos, utilizando una variedad de programas, incluyendo GeneMark, GLIMMER, ORPHEUS, SELFID y GetORF. Los ORFs putativos son examinados para una homología (ADN y proteína) con bases de datos internacionales, utilizando motores de búsqueda, incluyendo BLAST y FASTA. Todos los ORFs previstos son analizados para determinar su localización celular, utilizando programas

- tales como PSI-BLAST, FASTA, MOTIFS, FINDPATTERNS, PHD, SIGNALP y PSORT. Bases de datos, incluyendo Interpro, Prosite, ProDom, Pfam y Blocks, son utilizados para proveer proteínas asociadas de superficie, tales como dominios transmembranosos, péptidos líder, homologías para conocer proteínas superficiales, lipoproteína de la firma, membrana externa de anclaje y sitios de unión de una célula huésped. Filogenética y otros análisis de evolución molecular es conducida con los genes identificados y con otras especies, para apoyo en el desarrollo de la función. En el análisis In silico de ambos genomas parcialmente secuenciados, se ha producido una lista entendible de todos los ORFs previstos en la presente información disponible. Cada ORF es revisado para información descriptiva, tales como peso molecular previsto, punto isoelectrico, hidrofobia, y localización subcelular, para permitir la correlación con el proceso in vitro del producto del gen original. Los genes previstos, los cuales codifican proteínas similares a componentes superficiales, y factores virulentos en otras bacterias patogénicas son seleccionados como posibles blancos para vacuna.
- 2005 EJEMPLO 3: ANALISIS DE LA DISTRIBUCION DEL GEN USANDO PCR**
 Uno o dos pares principales, los cuales se unen a regiones diferentes de la región codificante del gen objetivo, son diseñados y optimizados para detección PCR. El análisis de distribución de los genes objetivo de *B. hyodysenteriae*, es logrado en 23 cepas de *B. hyodysenteriae*, incluyendo dos cepas, las cuales muestran haber sido no virulentas. Los conjuntos primarios, utilizados en el análisis de distribución, son mostrados en la Tabla 1. El análisis PCR es realizado en un volumen total de 25µl, utilizando Taq de ADN polimerasa. La mezcla de amplificación, constituida de 1xPCR buffer (que contiene 1.5 mM de MgCl₂), 1 U de Taq de ADN polimerasa, 0.2mM de cada dNTP, 0.5 µM del par principal, y 1µl de una plantilla de ADN cromosomal purificado. Las condiciones cíclicas ocasionaron un paso inicial de desnaturalización de 5 min a 94°C, seguido de 30 ciclos de desnaturalización a 94°C por 30 s, recocido a 50°C por 15 s,

2020 y extensión primaria a 72°C por 1 min. Los productos PCR son sometidos a electroforesis en 1% (p/v) de gel agarosa en 1xTAE buffer (40mM de tris-acetato, 1 mM EDTA), coloreado con 1µg/ml de solución de bromuro de etidio, y revisado bajo luz ultravioleta (UV).

2025

2030

2035

2040

2045

2050

TABLA 1
OLIGONUCLEOTIDOS PRIMARIOS UTILIZADOS EN EL ANALISIS DE
DISTRIBUCION PCR DE GENES CANDIDATOS PARA VACUNA DE LA
B.HYODYSENTERIAE

2055

Gen	Nombre primario	Secuencia Primaria(5'-3')	SEQ ID No.
NAV-H32	H32-F4	CATATTTCTGGTGATTCTC	SEQ ID No.33
	H32-R564	TTTTTTGATAAATAAGTTTTTTATTTG	SEQ ID No.34
NAV-H33	H33-F4	TTTAATACTCCTATATTATTAATTATTT	SEQ ID No.35
	H33-R396	AAGGAGAATCACCAGAAA	SEQ ID No.36
NAV-H40	H40-F16	AAATATGCTTCCATTATAGG	SEQ ID No.37
	H40-R1815	ACTTTTAGGAAGAAGTTTAAC	SEQ ID No.38
NAV-H43	H43-F4	GATATAATTATAATAATAGTGTTAATAC	SEQ ID No.39
	H43-R1296	TTCAGTGTCTGAATCATTC	SEQ ID No.40
NAV-H46	H46-F327	TATGATGGGGCATAGTATGG	SEQ ID No.41
	H46-R769	TATCTCCTACAGGGTCTTTTCG	SEQ ID No.42
NAV-H66	H66-F17	ATGATAAAGCTTGGGAAGATTATC	SEQ ID No.43
	H66-R255	ATAATGTGTTTTACATCCAAC	SEQ ID No.44
NAV-H68	H68-F53	TTATGCTCTCTGCTTTATTTTCTGG	SEQ ID No.45
	H68-R596	TCTTTTATTATTCCTTCTTTATGCC	SEQ ID No.46
NAV-H72	H72-F128	CTATGGCAGAAAACAAAGTC	SEQ ID No.47
	H72-R614	GCAGATAAAGATAAATCAAGTC	SEQ ID No.48
NAV-H177	H177-F20	AAAGAGCTTGGCAG	SEQ ID No.49
	H177-R258	CTTATCATAATGGTATTTACAAGATG	SEQ ID No.50
NAV-H179	H179-F420	TGCTATTGCTGATGCTACTAC	SEQ ID No.51
	H179-R705	ATTATCTTGATGAGGATGCTTTC	SEQ ID No.52
NAV-H184	H184-F314	TAGATAAAGATGATGATGAAAAAAG	SEQ ID No.53
	H184-R762	AAATAAACCTAAATAAGCACC	SEQ ID No.54
NAV-H185	H185-F294	TGGGTTTAGAATAGGTGCAGG	SEQ ID No.55
	H185-R796	ATTTTAATGTTTGTCTTTTTGC	SEQ ID No.56
NAV-H186	H186-F44	TAGAAAAGATGCCTATGCTG	SEQ ID No.57
	H186-R718	TTACAAGAGAAAAATAAACCTG	SEQ ID No.58
NAV-H188	H188-F293	TGGGGAATCATACAAATAGAAG	SEQ ID No.59
	H188-R565	GGCTCATCAAAGGAAGAACC	SEQ ID No.60
NAV-H191	H191-F8	ATAATAAAAAAGAAGAAAAAGAG	SEQ ID No.61
	H191-R403	GTCTGTATCCTAATAAAATAGTATG	SEQ ID No.62
NAV-H197	H197-F39	TCTTGGGCTTACATTTACTTTG	SEQ ID No.63
	H197-R354	TGATTTCTGACTTCTTTTTTG	SEQ ID No.64

2060

EJEMPLO 4: BIOINFORMATICA

La secuencia de la escopeta del genoma *B. hyodysenteriae* resulto en un 73% (2,347.8 kb de un 2,300 kb previsto) del genoma a ser secuenciado.

2065 Estas secuencias están compuestas de 171 cóntigos, con un tamaño
contigo promedio de 13.7 kb. De los 171 cóntigos, 1,860 marcos de
lectura abiertos (ORFs) son previstos. A comparación de los ORFs
previstos, con genes presentados en el acido nucleico y bases de datos
de proteínas, indicaron que aproximadamente un 70% en cada especie,
2070 tienen relación con genes contenidos en las bases de datos. El 30%
sobrante de ORFs previsto de cada genoma, no tienen identidad alguna
conocida.

EJEMPLO 5: CANDIDATOS PARA VACUNA

2075 Los ORFs muestran una fuerte homología con proteínas putativas
virulentas, presentes en las bases de datos públicas, son seleccionados
como objeto para vacuna. La Tabla 2 muestra genes seleccionados como
objetivos para vacuna, y su similitud con otros genes conocidos.

2080

2085

2090

TABLA 2

2095 FUNCIÓN DE LOS GENES DE *B. Hyodysenteriae* BASADOS EN SU
SIMILITUD CON LAS SECUENCIAS DE AMINOACIDOS DE
PROTEÍNAS BACTERIANAS SIMILARES OBTENIDAS DE LA BASE DE
DATOS SWISS-PROT

Gen	Función	Identidad (amino ácidos)	Similitud (amino ácidos)
NAV- H32	Hemolisina proteína hemolítica (HlpA) of <i>Nostoc</i> sp. Nucleótido seq. SEQ ID No.25 Amino acido seq. SEQ ID No.26	49/137 (35%)	77/137 (56%)
NAV- H33	Hemolisina proteína hemolítica of <i>Prevotella intermedia</i> Nucleótido seq. SEQ ID No.27 Amino acido seq. SEQ ID No.28	64/117 (54%)	83/117 (70%)
NAV- H40	Toxina transglicosilasa mureína lítico (contiene LysM / dominios invasin) Nucleótido seq. SEQ ID No.19 Amino acido seq. SEQ ID No.20	120/449 (26%)	185/449 (41%)
NAV- H43	Hemolisina hemolisinas y proteínas relacionadas de <i>Anabaena variabilis</i> Nucleótido seq. SEQ ID No.29 Amino acido seq. SEQ ID No.30	150/425 (35%)	242/425 (56%)
NAV- H46	Lipasa Lisofosfolipasa Nucleotido seq. SEQ ID No.15 Amino acido seq. SEQ ID No.16	116/299 (38%)	188/299 (62%)
NAV-	Toxina	42/85	60/85

H66	toxina (YoeB) de <i>Escherichia coli</i> Nucleótido seq. SEQ ID No.21 Amino acido seq. SEQ ID No.22	(58%)	(76%)
NAV-H68	Hemolisina Hemolisina relacionada con la proteína de Dehalococcoides sp. Nucleótido seq. SEQ ID No.31 Amino acido seq. SEQ ID No.32	121/415 (29%)	204/415 (49%)
NAV-H72	Toxina transglycosylate mureína lítico (posiblemente unido a la membrana externa) Nucleótido seq. SEQ ID No.23 Amino acid seq. SEQ ID No.24	51/141 (36%)	6/141 (53%)
NAV-H177	Toxina toxina (YoeB) de <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> Nucleótido seq. SEQ ID No.17 Amino acido seq. SEQ ID No.18	44/86 (51%)	64/86 (74%)
NAV-H179	Proteasa ATP-dependiente ClpX proteasa Nucleótido seq. SEQ ID No.1 Amino acido seq. SEQ ID No.2	227/388 (58%)	291/388 (75%)
NAV-H184	Peptidasa Nucleótido seq. SEQ ID No.9 Amino acido seq. SEQ ID No.10	148/445 (33%)	241/445 (54%)
NAV-H185	Proteasa metaloproteasa de membrana de zinc asociados Nucleótido seq. SEQ ID No.3 Amino acido seq. SEQ ID No.4	199/455 (43%)	289/455 (63%)
NAV-H186	Peptidasa Zn-dependiente peptidasa	132/406 (32%)	234/406 (57%)

	Nucleótido seq. SEQ ID No.11 Amino acido seq. SEQ ID No.12		
NAV- H188	Proteasa adenylata cyclasa Nucleótido seq. SEQ ID No.5 Amino acido seq. SEQ ID No.6	147/509 (28%)	269/509 (52%)
NAV- H191	Lipasa Nucleótido seq. SEQ ID No.13 Amino acido seq. SEQ ID No.14	70/223 (31%)	117/223 (52%)
NAV- H197	Proteasa serina proteasa tripsina-like Nucleótido seq. SEQ ID No.7 Amino acid seq. SEQ ID No.8	184/445 (41%)	267/445 (60%)

2100 EJEMPLO 6: DISTRIBUCION DEL GEN

La distribución total de cada ORFs es resumido en la Tabla 3. Un total de 23 cepas de *B. hyodysenteriae* son analizados. La distribución es determinada por el resultado acumulativo de PCR, utilizando hasta dos conjuntos primarios diferentes. Todos los ORFs están presentes en 87-
2105 100% de las cepas probadas de *B. hyodysenteriae*.

2110

2115

TABLA 3
DISTRIBUCION GENETICA DE LOS CANDIDATOS DE VACUNA DEL *B. Hyodysenterie* ANALISADA POR PCR UTILIZANDO UN PANEL DE 23
CEPAS DIFERENTES

Gen	Distribución (%)
NAV-H32	91
NAV-H33	91
NAV-H40	100
NAV-H43	91
NAV-H46	100
NAV-H66	100
NAV-H68	91
NAV-H72	87
NAV-H177	91
NAV-H179	100
NAV-H184	100
NAV-H185	100
NAV-H186	100
NAV-H188	100
NAV-H191	100
NAV-H197	100

2120

EJEMPLO 7: EXTRACCION DE PLASMIDOS

Los clones de *Escherichia coli* JM109 albergan los plásmidos pET-19b (Novagen) los cuales son sembrados desde almacenamientos de glicerol sobre placas de agar Luria-Bertani (LB) suplementado con 100 mg / l de ampicilina y se incubaron a 37 ° C durante 16 h. Una sola colonia es utilizada para inocular 10 ml del caldo LB suplementado con 100mg/l de ampicilina y el caldo de cultivo fue incubado a 37C por 12 h con mezcla por inversion. La totalidad del cultivo de la noche anterior es centrifugado a 5,000 x g por 10 min y el plásmido contenido en las células es extraído,

2125

2130 utilizando el kit QIAprep Spin Miniprep (Qiagen), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. El plásmido purificado es cuantificado utilizando un fluorómetro, y la concentración de ADN es ajustada a 100µg/ml por dilución con una solución buffer TE(10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0). El plásmido purificado pET-19b es almacenado a -20°C.

2135

EJEMPLO 8: PREPARACION DEL VECTOR

Dos µg del plásmido pET-19b purificado, es dejado a 37°C por 1-4 h en un volumen total de 50 µl que contienen 50mM Tris-HCl (pH 7.5), 100 mM MgCl₂, 0.1 mg/ml albumina de suero bovino (BSA) y 5 U de NdeI y BamHI (fermentadores). Los vectores linealizados son verificados por electroforización de 1µl de la reacción por medio de 1% (p/v) de gel agarosa en 1x TAE buffer a 90v por 1 h. El ADN electroforizado es coloreado con 1µg/ml de bromuro de etidio y observado bajo luz UV. Los vectores pET-19b linealizados, son purificados utilizando el kit UltraClean PCR Clean-up (Mo Bio Laboratories), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Los vectores lineares purificados son cuantificados utilizando el espectrómetro NanoDrop ND1000, y la concentración de ADN ajustado a 50 µg/ml por dilución con una solución TE buffer. Los vectores linealizados son almacenados a -20°C.

2150

EJEMPLO 9: PREPARACION DEL INSERTO-DISEÑO PRIMARIO

Los pares primarios son diseñados para amplificar la región codificante del gen objetivo, tanto como sea posible. Todas las secuencias primarias incluyen sitios de reconocimiento terminal de enzimas de restricción, para permitir la unión cohesiva del amplicón resultante en el vector pET-19b linealizados. Las secuencias primarias utilizadas para clonación son mostradas en la Tabla 4. Los primarios son analizados utilizando Amplify 3.0 (University of Wisconsin) y la secuencia teórica de amplicón es insertada en la secuencia del vector pET-19b en la posición apropiada. La translación deducida del casete de expresión química pET-19b, es lograda utilizando Vector NTI Advance versión 10 (Invitrogen) para

confirmar que los insertos de genes estén en los marcos de lectura correctos.

TABLA 4

2165 OLIGONUCLEOTIDOS PRIMARIOS UTILIZADOS EN LA CLONACION DE LOS GENES *B. Hyodysenteriae* EN EL VECTOR pET-19b. EL PESO MOLECULAR APARENTE ES DETERMINADO DEL SDS-PAGE

Gen	Nombre primario	Secuencia Primaria (5'-3')	MW previsto de la proteína original (Da)	MW Aparente de proteína recombinante (kDa)
NAV-H32	H32-F-Nde1	TATGCATATGTCTGGTGATTCTCCTTTA G (SEQ ID No.65)	25,326	20.5
	H32-R-BamH1	TGCGGATCCTTTTTTGATAAATAAG (SEQ ID No.66)		
NAV-H33	H33-F-Nde1	GGAAGATAACATATGTTTAATACTC (SEQ ID No.67)	18,465	13.9
	H33-R-BamH1	TCCTAGGATCCTATCTAAAGGAGAATCA CCAG (SEQ ID No.68)		
NAV-H40	H40-F-Nde1	AAATATGCATATGTTATAGGATGCACTT TTGCCTC (SEQ ID No.69)	69,479	61.4
	H40-R-BamH1	CTTTTAGGATCCAGTTTAACAGGATCTA TTGATC (SEQ ID No.70)		
NAV-H43	H43-F-Nde1	AATCCATATGGATATAATTATAATAATAG TGTTAATAC	51,176	48.4

		(SEQ ID No.71)		
	H43-R- BamH1	ATCTGGATCCTATTCAGTGTCTGAATCA TTCTTTTCATCAG (SEQ ID No.72)		
NAV- H46	H46-F- Nde1	CTTCATATGGAAATGCTTAATAGAGTTT TAATATCAG (SEQ ID No.73)	38,153	32.2
	H46-R- BamH1	AATAGGATCCTATATGAGCATTAAAGCCA AGCAATTATC (SEQ ID No.74)		
NAV- H66	H66-F- Nde1	ATTTTCATATGATAAAGCTTGGGAAGATT ATC (SEQ ID No.75)	12,678	10.9
	H66-R- BamH1	AATTGGATCCATAATGTGTTTTACATCC AAC (SEQ ID No.76)		
NAV- H68	H68-F- Nde1	ATTACATATGGAAATACTACTAGTTTATT TATTTG (SEQ ID No.77)	55,123	50.4
	H68-R- BamH1	CATTGGATCCTGAATCAGATGTCTCTTG TATAT (SEQ ID No. 78)		
NAV- H72	H72-F- Nde1	GATACATATGATACAAAGAATACATGCC AGAATAG (SEQ ID No.79)	28,201	24.6
	H72-R- BamH1	ATGTGGATCCCATAGTTTTGAGTTTCCT C (SEQ ID No.80)		
NAV-	H177-F-	GTTTCATATGAAAGAGCTTGGCAG	12,997	10.8

H177	Nde1	(SEQ ID No.81)		
	H177-R- BamH1	ATATGGATCCCTTATCATAATGGTATTTA CAAGATG (SEQ ID No.82)		
NAV- H179	H179-F- Nde1	TTAACATATGGTTCTCTTTGCGGAAGAG (SEQ ID No.83)	48,109	54.6
	H179-R- BamH1	TTAGGATCCCATCAATACCTAATTTTCA TTAAC (SEQ ID No.84)		
NAV- H184	H184-F- Nde1	TTAACATATGTCAGAGAATAGTTTAAAA ATAGAATAAAAG (SEQ ID No.85)	53,101	57.2
	H184-R- BamH1	TTAAGGATCCGAAGCAAATGAAAGTTCT TTAATC (SEQ ID No.86)		
NAV- H185	H185-F- Nde1	TTTTCATATGGCACAACTAATGAATCA GCTATATT (SEQ ID No.87)	58,175	67.8
	H185-R- BamH1	TTAAGGATCCGTTAAGCAGCACCAGAG AATTATAATC (SEQ ID No.88)		
NAV- H186	H186-F- Nde1	CTTACATATGGGAACAAGAGTTGTTTTA GAAAAGATG (SEQ ID No.89)	49.786	56.1
	H186-R- BamH1	ACTGGGATCCGACTTGCTTATATCCTTA GTACCG (SEQ ID No. 90)		
NAV- H188	H188-F- Nde1	TAATCATATGATGTACAGTCAGGTTATG ATAG (SEQ ID No.91)	64,413	68.8
	H188-R-	ACTGGGATCCTGTACCGACATTCTCTTC		

	BamH1	AC (SEQ ID No.92)		
NAV-H191	H191-F-Nde1	AAAGCATATGGAAGAAAAAAATCCAAA TTGGAAAG (SEQ ID No.93)	36,953	37.8
	H191-R-BamH1	ATACGGATCCAATATATGTTCACGTCC ATAGCCTC (SEQ ID No.94)		
NAV-H197	H197-F-Nde1	CTTTCATATGCTTGGGCTTACATTTACTT TGGTTGG (SEQ ID No.95)	56,670	66.6
	H197-R-BamH1	ATAAGGATCCCATAAGTCATTCTTGCTC GTTTTATAG (SEQ ID No.96)		

EJEMPLO 10: AMPLIFICACION DE LOS INSERTOS DE GENES

2170 Todos los insertos de genes objetivo son amplificados por PCR en un volumen total de 100µl, utilizando Taq polimerasa de ADN y Pfu. En resumen, la mezcla de amplificación consiste de 1 X PCR buffer (que contiene 1.5 mM de MgCl₂), 2 U de Taq de ADN polimerasa, 0.01 U Pfu ADN polimerasa, 0.2 mM de cada dNTP, 0.5 µM del par principal apropiado y 1µl de ADN cromosomal purificado. El ADN cromosomal purificado es preparado de la misma cepa *B. hyodysenteriae* utilizada para la secuenciación del genoma. Las condiciones cíclicas involucran un paso inicial de desnaturalización de 5 min a 94°C, seguido de 30 ciclos de desnaturalización a 94°C por 30 s, recocidos a 50°C por 15s, y extensión primaria a 72°C por 1 min. Los productos de PCR son sometidos a electroforesis en 1% (p/v) de gel agarosa en 1x TAE buffer, coloreado con una solución de 1µg/ml de bromuro de etidio y visto bajo luz UV. Después de verificar la presencia del tamaño correcto del producto de PCR, la reacción PCR es purificada utilizando el kit UltraClean PCR Clean-up (Mo Bio Laboratories).

2185

EJEMPLO 11: RESTRICCION DE LA DIGESTION DE ENZIMAS DE LOS INSERTOS DE GENES

2190 Treinta µl del producto purificado de PCR es dejado en un volumen total de 50µl con 1 U de NdeI y 1 U de BamHI. El inserto de ADN es purificado utilizando el kit UltraClean PCR Clean-up (Mo Bio Laboratories). El inserto de ADN purificado es cuantificado utilizando el espectrómetro NanoDrop ND1000, y la concentración es ajustada a 10 µg/ml por dilución con solución TE buffer. El inserto purificado reducido de ADN es inmediatamente utilizado para ligación de vectores.

2195

EJEMPLO 12: LIGACION DE LOS INSERTOS DEL GEN EN EL VECTOR pET-19B

Todas las reacciones de ligación son llevadas a cabo en un volumen total de 20 µl. veinticinco ng de pTrcHis linealizado es encubado con una

2200 cantidad equi-molar de inserto restringido a 16°C por 16 h in 30 mM Tris-HCl (pH 7.8), 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT y 1 mM ATP que contiene 1 U de T4 ADN ligasa (Fermentadores). Una reacción de ligación idéntica que contiene ADN no insertado es también incluido como un control negativo de recircularización de vector.

2205

EJEMPLO 13: TRANSFORMACION DE LIGACIONES pET-19B EN CÉLULAS *E. COLI* JM190

Las células competentes *E. coli* JM190 son descongelados de -80°C, almacenados en hielo, y luego 50 µl de las células son transferidos a tubos

2210 de micro fugas de 1.5ml a temperatura hielo, que contienen 5 µl de las reacciones de ligación de la noche anterior. Los tubos son mezclados al golpear levemente la base de cada tubo en el soporte, y luego dejado en hielo por 30 min. Las células sufren de shock térmico al colocar los tubos en un baño de agua a 42°C durante 45 s antes de devolver los tubos al

2215 hielo durante 2 min. Las células transformadas son recuperadas en 1 ml de caldo LB por 1 h a 37°C mezclando suavemente. Las células recuperadas son cultivadas a 2,500 x g por 5 min, y las células son resuspendidas en 50 µl de caldo LB fresco. Los 50 µl de las células resuspendidas son igualmente esparcidas en un plato de agar de LB que

2220 contiene 100mg/l de ampicilina, utilizando una varilla de vidrio esterilizada. Los platos son incubados a 37°C por 16 h.

EJEMPLO 14: DETECCION DE Pet-19b RECOMBINANTE EN *E. COLI* POR MEDIO DE PCR

2225 Doce colonias transformantes individuales para cada estructura son mezcladas en un caldo fresco de LB de placas de agar que contienen 100 mg/l de ampicilina y son incubados a 37°C por 16 h. una sola colonia de cada transformación es resuspendida en 50 µl de TE buffer y luego hervida por 1 min. Dos µl de las células hervidas son usadas como

2230 plantilla para el PCR. La mezcla de amplificación consiste de 1x PCR buffer (que contiene 1.5 mM de MgCl₂), 1 U of Taq de ADN polimerasa, 0.2 mM de cada dNTP, 0.5 µM del pET-19b-F primario (5'-

GGAATTGTGAGCGGATAAC-3') y 0.5 μ M del pET-19b-R primario (5'-GCAAAAAACCCCTCAAGAC-3'). Las condiciones cíclicas involucran un
 2235 paso inicial de desnaturalización de 5 min a 94°C, seguido de 30 ciclos de desnaturalización a 94°C por 30 s, recociendo a 60°C durante 15 s, y una primera extensión a 72°C por 1 min. El producto de PCR es sometido a electroforesis en 1% (p/v) de gel agarosa en 1 x TAE buffer, coloreado con 1 μ g/ml de solución de bromuro de etidio y visto bajo luz Ultra Violeta.

2240

EJEMPLO 15: PURIFICACION DE LOS PLASMIDOS pET-19b RECOMBINANTES

Un clon de *E. coli* JM190 que acoge satisfactoriamente al plásmido pET-19b ligado, son inoculados en 5ml de caldo LB, suplementado con 100
 2245 mg/l de ampicilina, y el cultivo del caldo es incubado a 37°C por 12 h por mescla. El cultivo de la noche anterior es centrifugado a 5,000 x g por 10 min y el plásmido contenido en las células extraídas, al utilizar el QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. El plásmido pET-19b recombinante purificado es almacenado a -20°C.

2250

EJEMPLO 16: TRANSFORMACION DE LOS PLASMIDOS pET-19b RECOMBINANTES EN CÉLULAS *E. COLI* BL21 (DE3)

Células *E. coli* BL21 (DE3) competentes son descongelados de -80°C, almacenados en hielo, y luego 20 μ l de las células son transferidos a tubos
 2255 de micro fugas de 1.5ml a temperatura hielo, que contienen 1 μ l del plásmido pET-19b recombinante purificado. Los tubos son mezclados al golpear levemente la base de cada tubo en el soporte, y luego dejado en hielo por 30 min. Las células sufren de shock térmico al colocar los tubos en un baño de agua a 42°C durante 45 s antes de devolver los tubos al
 2260 hielo durante 2 min. Las células transformadas son recuperadas en 1 ml de caldo LB por 1 h a 37°C con una leve mescla. Cincuenta μ l de las células son igualmente esparcidas en un plato de agar de LB que contiene 100mg/l de ampicilina, utilizando una varilla de vidrio esterilizada. Los platos son incubados a 37°C por 16 h.

2265

EJEMPLO 17: EXPRESION DE RECOMBINACION DE PROTENINAS ETIQUETADAS HIS

Cuatro colonias aisladas de recombinantes pET-19b plásmido en *E. coli* BL21 (DE3) se inoculan en 3 ml de caldo de LB en un tubo de centrifugación de 10ml con 100 mg /l ampicilina y 1 mM IPTG y se incubaron a 37 ° C durante 16 h con agitación. Las células se recogen por centrifugación a 5.000 xg durante 10 min a 4 ° C. El sobrenadante se descarta y cada grano se resuspende con 300 µl de solución reguladora de carga x 1 SDS-PAGE (250 mM Tris-HCl pH 6,0, y 8% p/v de SDS, 200 mM DTT, 40% v / v de glicerol y 0,04% p/v azul de bromofenol). Después de hervir el tubo durante 5 minutos, los restos celulares son granulados por centrifugación a 10.000 x g durante 10 min a 4 ° C. El sobrenadante se transfiere a un tubo nuevo y se almacenan a -20 ° C hasta su análisis.

2270

2275

2280

EJEMPLO 18: BUSQUEDA - SDS

Análisis de SDS-PAGE de la proteína implicada en la separación electroforética utilizando un sistema discontinuo con solución reguladora con Tris-glicina. Diez µl del lisado celular preparado se carga en los pozos de un gel de poliacrilamida. El gel está compuesto de un gel de apilamiento (125 mM Tris-HCl pH 6,8, 4% p/v acrilamida, el 0,15% p/v bis-acrilamida y 0,1% p/v de SDS) y un gel separador (375 mM Tris-HCl pH 8,8, 12% p/v acrilamida, 0,31% p/v bis-acrilamida y 0,1% p/v de SDS). Estos geles son polimerizados por la adición de 0,1% (v / v) TEMED y 0,05% (p/v) de sulfato de amonio recién preparada y agregado la célula mini-proteica de doble placa (Bio-Rad). Las muestras se ejecutan a 150 V a temperatura ambiente (TA) hasta que el colorante azul de bromofenol haya llegado al fondo del gel. Las normas de peso molecular Pre-marcados son tratadas con electroforesis en paralelo con las muestras a fin de permitir estimaciones de peso molecular.

2285

2290

- 2295 Después de la electroforesis, el gel es inmediatamente teñido con azul Coomassie brillante de G250 o sometido a electro-transferencia a membrana de nitrocelulosa por Western blotting.

EJEMPLO 19: ANALISIS DE WESTERN BLOT

- 2300 La transferencia electroforética de las proteínas separadas del gel de SDS-PAGE a la membrana de nitrocelulosa, se realiza mediante el sistema buffer de transferencia Towbin. Luego de la electroforesis, el gel es equilibrado en la sustancia reguladora (25 mM Tris, 192 mM glicina, 20% v/v metanol, pH 8.3) por 15 minutos. Las proteínas contenidas en el
- 2305 gel son transferidas a la membrana de nitrocelulosa utilizando el aparato transblot mini- proteico (Bio-Rad). Después del montaje del soporte de gel, de acuerdo a las instrucciones del fabricante, la transferencia electroforética se realiza a 30 V de un día para otro a 4°C. La recién transferida membrana de nitrocelulosa que contiene las proteínas
- 2310 separadas es bloquea con 10 ml de solución salina regulada- Tris (TBS; 20 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, pH 7.5) conteniendo 5% (p/v) leche en polvo durante 1 hora a RT. La membrana es limpiada con TBS que contiene 0.1% (v/v) de Tween 20 (TBST) y luego incubada con 10 ml de anti-anticuerpos del ratón (diluida 5000-mitad en TBST) por una hora a
- 2315 temperatura ambiente. Luego de limpiarlo tres veces por 5 minutos con TBST, la membrana es incubada con 10ml de goat anti-mouse igG (molécula completa) La membrana es desarrollada utilizando el kit de sustrato alcalino fosfatado (Bio Rad). La reacción desarrollada se detiene limpiando la membrana con agua destilada. Luego la membrana es
- 2320 secada y analizada para presentación.

EJEMPLO 20: EXPRESION Y PURIFICACION DE PROTEINAS RECOMBINADAS AUTO ETIQUETADAS

- Una colonia individual de plásmido pET-19b recombinante en E. coli BL21
- 2325 (DE3) es inoculada en 20 ml de caldo LB dentro de un tubo de centrifugado de 50 ml, que contiene 100 mg/l de ampicilina y incubada a

- 37 °C por 16 horas con agitación continua. Un matraz Erlenmeyer de 2 litros con 500 ml de caldo de LB suplementado con 100 mg / l de ampicilina se inocula con 10 ml en el cultivo de un día para otro y
- 2330 incubados a 37 ° C hasta que la densidad óptica de las células a 600 nm sea 0,5 (aproximadamente 3-4 h). El cultivo es entonces inducido por la adición de IPTG a la concentración final de 1mM y el retorno de las células a 37°C con agitación continua. Luego de 6 horas de inducción, el cultivo se transfiere a dos botellas de centrifugado de 250 ml y luego
- 2335 estas son centrifugadas a 5000 x g por 10 minutos a 25°C. El exceso flotante se descarta y cada grano es resuspendido en 4 ml de Ni-NTA de sustancia reguladora natural de lisis. (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 10 mM de imidazol, pH 8.0). Las células resuspendidas son agrupadas y almacenadas a -20°C de un día para otro.
- 2340 La suspensión de células es removida de -20°C y descongelada en hielo. Cinco µl de ADNsa I (10 mg/ml) son adicionados al descongelamiento lisado y incubado en hielo por una hora. El lisado es centrifugado a 20000 x g por 15 minutos a 4°C. El excedente flotante es transferido a una columna de 10 ml que contiene un volumen base de 1 ml de Ni-NTA
- 2345 resina agarosa (Qiagen). La proteína recombinante agrupada es dejada para unirse a la resina por medio de mezcla por inversión por 1 h a 4C. La resina es entonces purificada con 30 ml de Ni-NTA buffer ish nativo (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 20 mM imidazol, pH 8,0) antes de eluir con 9 ml de Ni-NTA nativo elución buffer (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 250 mM de imidazol, pH 8,0). Tres fracciones de 3 ml del eluente se
- 2350 recogen y almacenan a 4°C. Treinta µl de cada eluente se trata con 10 µl de 4 x de muestras de tratamientos buffer y se lleva a ebullición durante 5 minutos. Las muestras son sometidas a búsqueda -SDS y teñidas con azul brillante de Coomassie G250. El gel teñido se equilibra en agua
- 2355 destilada durante 1 hora y secado entre dos hojas de celulosa durante la noche a temperatura ambiente.

EJEMPLO 21: DIALISIS Y LIOFILIZACION DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE PURIFICADA AGRUPADA

- 2360 Las proteínas eluidas son mezcladas y transferidas a un tubo hidratado de diálisis con un peso molecular limite (MWCO) de 3,500 Da. 200µl alícuotas de la mezcla eluida son tomados y cuantificados, utilizando un Protein Assay (Bio-Rad) comercial. Las proteínas son dializadas en 2 l de agua destilada a 4C por medio de agitación. El buffer de diálisis es cambiado 8 veces en intervalos de 12 horas. Las proteínas dializadas son transferidas del tubo de diálisis a un tubo de centrifuga de 50 ml (volumen máximo 40ml) y los tubos son ubicados durante la noche a -80C. Los tubos son ubicados en un liofilizador, y eventualmente, liofilizados. Las proteínas liofilizadas son rehidratadas con PBS a una concentración calculada de 2 mg/ml y almacenados a -20C.
- 2365
- 2370

EJEMPLO 22: SEROLOGIA UTILIZANDO PROTEÍNAS RECOMBINANTES

- Diez µg de la proteína recombinante purificada son diluidos en 10 ml de una solución buffer de carbonato y 100µl son agregados a cada pozo de las microplacas tituladas de 96-pozos. La proteína es dejada en reposo para que cubra durante la noche a 4C. La placa es bloqueada con 150 µl de PBS-BSA (1% p/v) en cada pozo por 1 hora a temperatura ambiente (RT) con mezcla y luego lavado tres veces con 150 µl de PBST (0.05% v/v). El suero de cerdo es diluido 1:800 en 100µl de PBST-BSA (0.1% p/v) e incubado a RT por 2 horas por mezcla. Las placas son lavadas antes de añadir 100 µl de goat anti-porcina IgG (molécula entera)-HRP diluido 1:5,00 en PBST. Después de incubar por 1 h a RT, las placas son lavadas, y 100µl de substrato de TBM son agregados. El desarrollo de un color ocurre por 10 minutos a RT antes de ser detenida con la adición de 50 µl de 1 M de ácido sulfúrico. La densidad óptica de cada pozo se lee a 450 nm. El suero de cerdos mezclado, de diferentes fuentes y estados de salud, fueron utilizados en el análisis. Esto incluyo a cerdos de grupos con buena salud (N1-N3), cerdos hiperinmunizados (M1-M3), cerdos puestos
- 2375
- 2380
- 2385

2390 a prueba experimentalmente (H1-H5) y cerdos recuperados de diferentes
 2395 hatos (H6-H13).

Como se muestra en la tabla 5A y 5B, todas las proteínas reaccionaron fuertemente con el suero del cerdo hiperinmunizado con la bacteria *B. hyodysenteriae* (M1; 1.5077 ± 0.1635) y reacciono con menor fuerza con el suero de cerdo hiperinmunizado con *B. pilosicoli* (M2; 1.1646 ± 0.1206) y *B. innocens* (M3; 1.2777 ± 0.1626) indicando un nivel de reactividad con cerdos que reconocen otras spp. *Brachyspira*. La cera reacciono con mayor debilidad con el suero de los credos de alto nivel de salud (N1-N3; 0.2087 a 0.4695), seguido por los credos puestos a prueba experimentalmente que muestren síntomas de SD (H1-H5; 0.4586 a 0.7992), y aun mas fuerte con cerdos que se han recuperado de la SD (H6-H13; 0.8043 a 1.0068). En resumen, estos resultados indican que todas estas proteínas de toxina son inmunogénicas en cerdos infectados
 2405 natural y experimentalmente.

CUADRO 5 A
 REACTIVIDAD DE LAS PROTEÍNAS DE LA TOXINA CON EL SUERO
 2410 DE CERDOS SANOS Y EL SUERO DE CERDOS HIPERINMUNIZADOS.

PROTEIN A	Reactividad por ELISA (absorbancia)					
	N1	N2	N3	M1	M2	M3
H32	0.2717	0.3117	0.2952	1.5901	1.3577	1.3059
H33	0.4091	0.2087	0.4378	1.4951	1.1724	1.1682
H40	0.2555	0.4695	0.3649	1.4227	1.0322	1.2454
H43	0.3619	0.4015	0.2229	1.5621	1.1762	1.2901
H46	0.4477	0.4233	0.4080	1.4551	1.0495	1.3666
H66	0.3879	0.3948	0.3532	1.5907	1.1884	1.2712
H68	0.4324	0.3032	0.4305	1.4700	1.3013	1.2538
H72	0.4063	0.3464	0.3994	1.4398	1.1234	1.3686

H177	0.3120	0.2691	0.2416	1.4369	1.0888	1.1734
H184	0.3122	0.4090	0.3337	1.5272	1.1815	1.3018
H186	0.4182	0.2953	0.3807	1.5170	1.0628	1.3069
H191	0.2279	0.4236	0.3064	1.5856	1.2405	1.2804

N1, N2, N3, Mezcla de Suero de cerdos con un estado de salud alto; M1, suero de cerdo hiperinmunizados con toxina de *B. hyodysenteriae*, M2, suero de cerdo hiperinmunizados con toxina *B. pilosicoli*; M3, suero de cerdo hiperinmunizados con toxina de *B. Innocens*.

2415

TABLA 5 B

LA REACTIVIDAD DE LAS PROTEÍNAS DE LA TOXINA CON CERDOS INFECTADOS DE FORMA NATURAL Y EXPERIMENTAL

Proteína	Reactividad por Elisa (absorbancia)												
	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12	H13
H32	0.4833	0.6912	0.5262	0.6574	0.7546	0.9813	0.9178	0.9255	0.9175	0.9818	0.8449	0.9348	0.9648
H33	0.5222	0.5676	0.6789	0.7410	0.6260	0.8055	0.9209	0.9399	1.0015	0.9940	0.9935	0.8112	0.9104
H40	0.5420	0.5971	0.7517	0.6687	0.7598	0.9529	0.8589	0.9741	0.9707	0.9547	0.9941	0.8493	0.9247
H43	0.7525	0.7265	0.6551	0.7322	0.6341	0.9296	0.8495	0.9727	0.8595	0.8740	0.8904	0.8561	0.9640
H46	0.5805	0.6675	0.7590	0.4625	0.7028	1.0068	0.8821	0.8777	1.0061	0.8220	0.8861	0.9881	0.9221
H66	0.7491	0.4752	0.5211	0.7666	0.6005	0.9489	0.9014	0.9198	0.9346	0.8687	0.9511	0.8935	0.9807
H68	0.5704	0.4900	0.6527	0.7199	0.6310	0.9498	0.8224	0.8103	0.9700	0.8518	0.9759	0.8348	0.9201
H72	0.7278	0.5590	0.7650	0.6436	0.7045	0.8182	0.8109	0.9585	0.8662	0.9753	0.9535	0.8751	0.8683
H177	0.6225	0.7260	0.6126	0.4586	0.6151	0.8633	0.9477	0.9244	0.8944	0.9351	0.9108	0.9347	0.9111
H184	0.7287	0.7513	0.6898	0.7992	0.7451	0.8312	0.9383	0.8721	0.8894	0.8818	0.9832	0.8301	0.9998
H186	0.5169	0.5928	0.5295	0.7065	0.7003	0.8853	0.9182	0.9092	0.9155	0.9263	0.8836	0.8453	0.8878
H191	0.6753	0.5940	0.6794	0.7840	0.7252	0.8043	0.9727	0.8179	0.8280	0.9880	0.9468	0.9598	0.8049

H1, H2, H3, H4, H5, Mezcla de sueros de cerdos infectados experimentalmente presentan signos clínicos agudos grave de SD.
H6, H7, H8, H9, H10, H11, H12, H13; mezcla de sueros de cerdos comerciales recuperados de SD

EJEMPLO 23: CONSTRUCCIÓN DE LAS ESTRUCTURAS
2425 RECOMBINANTE pET-19b

La Clonación de los insertos diversos en el vector de expresión pET-19b produjo estructuras recombinantes de diferentes tamaños. La secuencia de nucleótidos de las estructuras Pet-19B comprobó que el casete de expresión está en el marco correcto para todas las estructuras. La traducción prevista
2430 de los casete de expresión, indico que todas sus proteínas recombinantes agregadas y que la secuencia de amino ácidos, deducida de las proteínas de la espiroqueta originaria eran idénticas.

EJEMPLO 24: EXPRESION Y PURIFICACION DE LAS PROTEINAS
2435 RECOMBINANTES.

La expresión de los clones recombinantes seleccionados de la E. coli se realizo a escala para generar suficiente proteína para la vacuna de los ratones. Todos los genes clonados producen proteínas recombinantes provistas de una fusión de hexa-histidina con una de peso molecular
2440 aparentemente similar al peso molecular previsto de la proteína original como se muestra en la tabla 4. Todas las proteínas recombinantes fueron altamente reactivas en la técnica "western blotting" usando su anti-anticuerpo. La Purificación de sus proteínas recombinante agregada se realizo por Cromatografía de afinidad bajo condiciones de desnaturalización.
2445 Las coloraciones SDS-PAGE y azul de Coomassie de todas las proteínas recombinantes muestran la purificación de las proteínas.

EEJMPLO 25: VACUNAS DE CERDOS UTILIZANDO LAS PROTEINAS
RECOMBINANTES PURIFICADAS AGRAGADAS.

2450 Cuatro proteínas purificadas recombinantes agregadas (0.5 mg de cada una) fueron mezcladas para un volumen total de 1 ml. Se hicieron 4 vacunas.

- a) La Hemolisina recombinante consiste en: NAV-H32, NAV-H33, NAV-H43 y NAV-H68;
- b) La toxina recombinante consiste en: NAV-H40, NAV-H66, NAV-H72 y
2455 NAV-H177;
- c) La Lipasa / Peptidasa recombinante consiste en: NAV-H46, NAV-H184, NAV-H186 y NAV-H191;
- d) La Proteasa recombinante consiste en: NAV-H179, NAV-H185, NAV-H188 y NAV-H197.

- 2460 Cuatro de diez grupos de cerdos sero- negativos (de 5 semanas de edad) fueron inyectados intramuscularmente con 2 ml de la vacuna que consiste en 2 mg de la mezcla de antígeno emulsificado con un adyuvante oleoso en agua. Los cerdos fueron vacunados dos veces intramuscularmente en la espalda y en el cuello a las 5 semanas de nacidos y a las ocho semanas de edad.
- 2465 A Todos los cerdos se les tomo una muestra de sangre justo antes de la primera vacuna, inmediatamente antes de la segunda vacuna y dos semanas después de la segunda vacuna.
- 2470 Los sueros se recolectaron de las tomas de muestra de sangre y fueron usados para medir la respuesta inmune a las proteínas contenidas en las vacunas. Debido a que 4 proteínas fueron combinadas en cada vacuna, el suero de cada grupo de cerdos se examino contra las cuatro proteínas separadamente. La técnica de ELISA fue realizada de la misma manera como se señala en el ejemplo 22.
- 2475 Como lo muestra la tabla 6, todos los cerdos respondieron fuertemente a los patrones dados por la vacunación, incrementando los niveles de anticuerpos significativamente después de la primera (11.60 – veces - 17.69 mayoría de veces; $P < 0.001$) y la segunda (2.41 – veces – 2.78 – mayoría de veces; $P < 0.001$) inyección intramuscular. Estos resultados muestran claramente la inmunogenicidad de esta toxina proteínica en los cerdos y la efectividad del programa de vacunación, induciendo la producción de niveles altos de anticuerpos en los cerdos.
- 2480
- 2485

TABLA 6

LA INMUNOGENICIDAD DE LAS PROTEÍNAS DE LA TOXINA EN CERDOS
DESPUÉS DE LA VACUNACIÓN INTRAMUSCULAR. TODOS LOS
VALORES DE LA ELISA SE EXPRESAN MEDIANTE ABSORBENCIA $\pm$
DESVIACIÓN STANDARD

Proteína	Antes - vacunación	Antes - Estimulo		Después – de la vacunación (2 semanas)	
	ELISA valores	ELISA valores	Mayoría de veces	ELISA valores	Mayoría de veces
H32	0.0721±0.026 1	1.0371±0.218 7	14.39	2.6219±0.2817	2.53
H33	0.0598±0.028 3	1.0015±0.343 3	16.75	2.5104±0.3236	2.51
H40	0.0851±0.022 2	1.0007±0.201 9	11.76	2.5329±0.3949	2.53
H43	0.0727±0.027 6	1.0419±0.280 1	14.34	2.6357±0.2240	2.53
H46	0.0642±0.021 6	0.9950±0.222 3	15.51	2.7623±0.2948	2.78
H66	0.0926±0.024 0	1.0750±0.210 1	11.60	2.6948±0.2723	2.51
H68	0.0768±0.023 7	1.0454±0.273 1	13.62	2.6750±0.2824	2.56
H72	0.0708±0.026 8	1.0108±0.196 3	14.27	2.6665±0.3795	2.64
H177	0.0724±0.021 6	1.0251±0.216 9	14.15	2.6791±0.2818	2.61
H184	0.0569±0.021 2	0.9983±0.197 8	17.55	2.5985±0.2409	2.60
H186	0.0676±0.022 5	1.0783±0.235 2	15.96	2.6001±0.3314	2.41
H191	0.0598±0.021 0	1.0585±0.245 5	17.69	2.6283±0.3248	2.48

2500

2505

EJEMPLO 26: PROTECCION DE LOS CERDOS MEDIANTE LA VACUNACION CON PROTEINAS RECOMBINANTES PURIFICADAS AGRUPADAS.

Cuatro proteínas recombinantes purificadas agrupadas (0.5 mg de cada uno)

- 2510 son mezclados en un volumen total de 1 ml. Cuatro vacunas son hechas:
- a) La Hemolisina recombinante consiste en: NAV-H32, NAV-H33, NAV-H43 y NAV-H68;
 - b) La toxina recombinante consiste en: NAV-H40, NAV-H66, NAV-H72 y NAV-H177;
 - 2515 c) La Lipasa / Peptidasa recombinante consiste en: NAV-H46, NAV-H184, NAV-H186 y NAV-H191;
 - d) La Proteasa recombinante consiste en: NAV-H179, NAV-H185, NAV-H188 y NAV-H197.

2520 Cuatro de diez grupos de cerdos sero- negativos (de 5 semanas de edad) fueron inyectados intramuscularmente con 2 ml de la vacuna que consiste en 2 mg de la mezcla de antígeno emulsificado con un adyuvante oleoso en agua. Un quinto grupo de diez cerdos seronegativos es utilizado como

2525 controles negativos y son vacunados falsamente con PBS emulsificado en el adyuvante. Todos los cerdos son vacunados dos veces intramuscularmente en la espalda y cuello tanto los de cinco semanas como los de ocho semanas. Todos los cerdos son puestos a prueba con 100 ml de un cultivo activo de *B. Hyodysenteriae* ($\sim 10^9$ cel/ml) por medio de una sonda gástrica a las diez semanas de edad, y los cerdos son observados diariamente en

2530 búsqueda de síntomas clínicos de la disentería porcina durante el experimento (hasta seis semanas después de han sido puestos a prueba) y una examinación post - mortem. Dos veces a la semana a todos los cerdos se les practica un frotis rectal para un cultivo bacteriológico selectivo.

2535

2540

REIVINDICACIONES

Reivindicación 1. Un polinucleótido aislado que comprende de una
2545 secuencia de nucleótidos que codifican:

- a. una molécula de la toxina seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID No.s: 17, 19, 21 y
- b. una lipasa y / o molécula de Peptidasa seleccionada del grupo que
2550 consistente de SEQ ID NO.S: 9, 11, 13, y 15; y/o
- c. Una molécula de Proteasa seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NOs: 1, 3, 5, y 7.

Reivindicación 2. Un polinucleótido aislado, de acuerdo a la reivindicación 1,
2555 que comprende además de una secuencia de nucleótidos que codifican:

- d. Una molécula de la Hemolisina seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO: 25, 27, 29, y 31.

Reivindicación 3. Una molécula de ADN comprendida por una secuencia que es de por lo menos de un 70%, preferiblemente al menos de un 80%, y aun mas preferiblemente por lo menos de un 90% homologa a un polinucleótido de acuerdo a la Reivindicación 1 ó a la Reivindicación 2.

2565

Reivindicación 4. Un polipéptido aislado que comprende la secuencia de amino-ácidos que codifican:

- a. Una molécula de la toxina seleccionada del grupo que consiste de SEQ
2570 ID NO.s: 18, 20, 22, y 24; y/o

- b. Una molécula de lipasa y/o peptidasa seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NOs: 10, 12, 14, y 16; y/o

Una molécula de proteasa, seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NOs:
2575 2, 4, 6, and 8.

Reivindicación 5. Un polipéptido aislado, de acuerdo a la reivindicación 4, que mas adelante comprenderá una secuencia de aminoácido,

codificando:

2580

- c. Una molécula de hemolisina, seleccionada de grupo que consiste de SEQ ID NO: 26, 28, 30, and 32.

2585

Reivindicación 6. Un polipéptido aislado que comprende una secuencia de nucleótidos, el cual codifica una secuencia de polipéptidos, de acuerdo a la reivindicación 4 o la reivindicación 5.

2590

Reivindicación 7. Un Plásmido que comprende un polinucleótido de acuerdo a las reivindicaciones 1, 2 o 6, ó una molécula de ADN de acuerdo a la reivindicación 2.

Reivindicación 8. Un plásmido de acuerdo a la reivindicación 7, en donde dicho plásmido es un vector de expresión.

2595

Reivindicación 9. Una célula que contiene un plásmido de acuerdo a la reivindicación 7 ó a la reivindicación 8.

2600

Reivindicación 10. Una proteína aislada que comprende una secuencia que es al menos del 70%, preferiblemente menos de un 80% y aun más preferiblemente de un 90% homologa a un polipéptido de acuerdo a la reivindicación 4 o a la reivindicación 5.

2605

Reivindicación 11. Una composición inmunogénica que comprende un plásmido, de acuerdo a la reivindicación 7 o a la reivindicación 8, un polipéptido de acuerdo a la reivindicación 4 o a la reivindicación 5, una célula de acuerdo a la reivindicación 9 o una proteína de acuerdo a la reivindicación 10.

2610

Reivindicación 12. Una composición de la vacuna para la prevención de la infección por la *Brachyspira* que comprende un plásmido de acuerdo a la reivindicación 7 o a la reivindicación 8, un polipéptido de acuerdo a la reivindicación 4 o a la reivindicación 5, una célula de acuerdo a la reivindicación 9 o una proteína de acuerdo a la reivindicación 10.

2615

Reivindicación 13. Una composición de la vacuna de acuerdo a la

reivindicación 12, en donde la infección por la *Brachyspira* es una infección causada por la *Brachyspira Hyodysenteriae*.

Reivindicación 14. Una composición de la vacuna de acuerdo a la reivindicación 12 o a la reivindicación 13, en donde la composición incluye 2 de:

a. Una molécula de toxina seleccionada del grupo que consiste de SEQ, ID, NOs: 18, 20, 22, y 24;

2625

b. Una molécula de lipasa y/o peptidasa seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NOs: 10, 12, 14, 16;

c. Una molécula de proteasa seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NOs: 2, 4, 6, y 8; y

2630

Una molécula de Hemolisina que consiste de SEQ ID NOs: 26, 28, 30, y 32.

Reivindicación 15. Una composición de una vacuna de acuerdo con cualquiera de la reivindicaciones 12 a 14, en donde la composición incluye por lo menos tres de:

a. Una molécula de la toxina seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NOs: 18, 20, 22, y 24;

2640

b. Una molécula de lipasa y/o peptidasa seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NOs: 10, 12, 14, y 16;

c. Una molécula de proteasa seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NOs: 2, 4, 6, y 8; y

2645

d. Una molécula de Hemolisina seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NOs: 26, 28, 30, y 32.

Reivindicación 16. Un método de diagnóstico para la infección causada por lo *Brachyspira* que comprende:

2650

- a. Proporcionar una muestra de un animal que se sospecha de estar infectado por la *Brachyspira*;
- 2655 b. Poner en contacto la muestra con uno o más polipéptidos que comprenden una secuencia de amino-ácidos seleccionados de un grupo que consiste de 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, y 24,
- c. Poner en incubación la muestra y un polipéptido, bajo unas condiciones
- 2660 las cuales permitan la formación de los complejos antígeno- anticuerpo; y
- d. Determinar si el complejo antígeno-anticuerpo, se forma con uno o más polipéptidos.
- 2665 En donde la formación del complejo antígeno-anticuerpo nos indica si el animal ha sido infectado por la *Brachyspira*.

Reivindicación 17. Un método de acuerdo a la reivindicación 16, en donde la infección por la *Brachyspira* es una infección causada por la *Brachyspira hyodysenteriae*.

Reivindicación 18. Un método de acuerdo a la reivindicación 16 o a la reivindicación 17, en donde el paso b además incluye una secuencia de amino-ácidos seleccionados del grupo que consiste de 2, 4, 6, 8, 12, 14, 16, 18, 20, 22, y 24.

Reivindicación 19. Un kit para el diagnóstico de la infección por *Brachyspira* que comprende uno o más Polipéptidos que comprende la secuencia de amino-ácidos seleccionada del grupo que consiste de: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, y 24.

LISTA DE SECUENCIAS

SEQUENCE LISTING

<110> Murdoch University

<120> Novel Sequences of Brachyspira, Immunogenic Compositions,
Methods for Preparation and Use Thereof

<130> 52578

<160> 96

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 1230

<212> DNA

<213> *Brachyspira hyodysenteriae*

<400> 1

atgtctaaaa agaataatga taagaaagaa gtttgttctc tttgcggaag agaattaaaa 60

gaattaagcc gatataattga aggcaatgaa ggatatttgt gttcggattg ttcttcata
120

gcaaatgact attttaatat gaatatgcag aagaaaaaat ctaaagaaaa agattatgat
180

ataaagatat tgctccaaa acaaataaaa tctttacttg atgaatatgt tgtaggtcag
240

gattatgcca aaaaggtatt atctgtatct gtttataatc attataaaag aatcactcag
300

aatgctgaag ataaaaatga tggtgaaata gagaagtcta atgtactttt aataggacct
360

acaggaagcg gtaaaacatt attggcaaga actttggcta aggctttaa tgtacctttt
420

gctattgctg atgctactac tgtaacagag gctggttatg taggcgatga tggtgagaat
480

atacttttaa gacttataca gaatgctgat ggagatataa aattagctga aaaaggcata
540

atatatattg atgagataga taaaatttca cgtaaaagcg aatctcggtc tataacaaga
600

gatgtatcag gtgaaggagt tcagcaggct ttattaaaaa ttgttgaagg tactgttgct
660

actgttcctc ctcatggcgg aagaaagcat cctcatcaag ataatcttca tatagacact
720

tctaataatac tttttatatg cggagggtgct ttcattgata tagaaaaatc tattgctgaa
780

agaacttcta agaaagggtt aggatttgct gctgaagtta attctatgga taatctaaat
840

tatgatgaga taatgaaaaa tattgctact gaggatttag ttaaatacgg gcttatacct
900

gaacttatag gaaggcttcc tggtatagct actttagaag agcttaaaga agaagagctt
960

ttgaaaatat taaaagagcc taagaatgct ttgactaagc agtatcagaa attattctct
1020

tatgataata tagaattaa aatagatgat gatgcattaa aatcaatagt taaaaagact
1080

atggaagagc atactggagc tagaggactt agagctttat ttgagagagt tatgcttgat
1140

gctatgtatg atatgcctaa tgaaagtaaa gaaaaacaag tgtttgagct tgataaaaaa
1200

tatgttaatg aaaaattagg tattgatgat
1230

<210> 2

<211> 410

<212> PRT

<213> *Brachyspira hyodysenteriae*

<400> 2

Met	Ser	Lys	Lys	Asn	Asn	Asp	Lys	Lys	Glu	Val	Cys	Ser	Leu	Cys	Gly
1				5					10					15	

Arg	Glu	Leu	Lys	Glu	Leu	Ser	Arg	Tyr	Ile	Glu	Gly	Asn	Glu	Gly	Tyr
			20					25					30		

Leu Cys Ser Asp Cys Ser Ser Ile Ala Asn Asp Tyr Phe Asn Met Asn
 35 40 45

Met Gln Lys Lys Lys Ser Lys Glu Lys Asp Tyr Asp Ile Lys Ile Leu
 50 55 60

Pro Pro Lys Gln Ile Lys Ser Leu Leu Asp Glu Tyr Val Val Gly Gln
 65 70 75 80

Asp Tyr Ala Lys Lys Val Leu Ser Val Ser Val Tyr Asn His Tyr Lys
 85 90 95

Arg Ile Thr Gln Asn Ala Glu Asp Lys Asn Asp Val Glu Ile Glu Lys
 100 105 110

Ser Asn Val Leu Leu Ile Gly Pro Thr Gly Ser Gly Lys Thr Leu Leu
 115 120 125

Ala Arg Thr Leu Ala Lys Ala Leu Asn Val Pro Phe Ala Ile Ala Asp
 130 135 140

Ala Thr Thr Val Thr Glu Ala Gly Tyr Val Gly Asp Asp Val Glu Asn
 145 150 155 160

Ile Leu Leu Arg Leu Ile Gln Asn Ala Asp Gly Asp Ile Lys Leu Ala
 165 170 175

Glu Lys Gly Ile Ile Tyr Ile Asp Glu Ile Asp Lys Ile Ser Arg Lys
 180 185 190

Ser Glu Ser Arg Ser Ile Thr Arg Asp Val Ser Gly Glu Gly Val Gln
 195 200 205

Gln Ala Leu Leu Lys Ile Val Glu Gly Thr Val Ala Thr Val Pro Pro
 210 215 220

His Gly Gly Arg Lys His Pro His Gln Asp Asn Leu His Ile Asp Thr

225		230		235		240
Ser Asn Ile Leu Phe Ile Cys Gly Gly Ala Phe Ile Asp Ile Glu Lys						
	245		250		255	
Ser Ile Ala Glu Arg Thr Ser Lys Lys Gly Leu Gly Phe Ala Ala Glu						
	260		265		270	
Val Asn Ser Met Asp Asn Leu Asn Tyr Asp Glu Ile Met Lys Asn Ile						
	275		280		285	
Ala Thr Glu Asp Leu Val Lys Tyr Gly Leu Ile Pro Glu Leu Ile Gly						
	290		295		300	
Arg Leu Pro Val Ile Ala Thr Leu Glu Glu Leu Lys Glu Glu Glu Leu						
	305		310		315	320
Leu Lys Ile Leu Lys Glu Pro Lys Asn Ala Leu Thr Lys Gln Tyr Gln						
	325		330		335	
Lys Leu Phe Ser Tyr Asp Asn Ile Glu Leu Lys Ile Asp Asp Asp Ala						
	340		345		350	
Leu Lys Ser Ile Val Lys Lys Thr Met Glu Glu His Thr Gly Ala Arg						
	355		360		365	
Gly Leu Arg Ala Leu Phe Glu Arg Val Met Leu Asp Ala Met Tyr Asp						
	370		375		380	
Met Pro Asn Glu Ser Lys Glu Lys Gln Val Phe Glu Leu Asp Lys Lys						
	385		390		395	400
Tyr Val Asn Glu Lys Leu Gly Ile Asp Asp						
	405		410			

<210> 3

<211> 1503

<212> DNA

<213> *Brachyspira hyodysenteriae*

<400> 3

gtgttaagga aattgatata tattatTTTT ttgcattcaa ttctttttaa tttttttatt
60

tttgcaaaaa ctaatgaatc agctatatta aattacactc aatatatgga aagaataaaa
120

tccataatac cagaaatgaa attaactgca tctcaagaaa gcaatgccta taataattta
180

acaaaagcaa aaagctccgg agacgttaaa ttgatttgc aggctggtgc tataggaatg
240

caaagccatt ttgatgaata caatttttta gcaacatcag attttaatta taatgggttt
300

agaatagggtg caggattcag cggacttgta ccatactctg gaactagatg gtctgtagaa
360

attaacatg acagtTTTT cggcgacttt aatacaggag atatttcatt accggttgat
420

acgcctctag gtagaataaa tggaaaactt ccaaatttaa gtactaatga ttttaaatac
480

tattatccaa gcataaaaaat tcaaatagct cagcctatTT taagggtttt ttttggtaaa
540

ttggatagat accctataaa agatgcagaa tatcagctta ccatagcaaa attaaaaaga
600

ataatagacg acaacagcgt attaacatct tatcagaaaa tttattatca atggataatg
660

gcaagaaaat taatagattt atatgatgat atgataagag aagcaagaag ttttgaaaat
720

caagtataca gaagatatac aagcggagtt atagataatg actcatatca gaatgcaaaa
780

agacaaacat taaaatatat agaagcaaga gataaatctg aattaatgct taaaaaata
840

atgagaaata ttcaattctt tatacctgaa gaaaatatac agccaaatga agatgattgg
900

aatcagacat tagaaacctc tataaatgct aaaatagata tagtaccatt tttagaaagt
960

gctcagggac aaatggctta tcaattaaaa ttaagaagcg aatatgctat ttcagtaatg
1020

aaaaataatg ctctgcctga tttatctata gtaggaagcg tatcattatc aagtttagat
1080

gacagcggat attttaaadc tttttctacc atgactaatg ttgattattt tgtagggctt
1140

atgttttcct accccatagg cggacgtgat gctaaagcta aaatggaaga tgcttatgct
1200

gctttgaatg ctgttacggc tgattttgat aggggaaca gagattttga cgttcagata
1260

ggtacttatt atgatgagtt tgaggcatac aaaaaaatgc tagaaaataa aaaattggaa
1320

gttaatgcta tagtatcaag aataaatacg caaatgcta aattcagaca aggaagactc
1380

cctatagatg aaataataaa tgcaaggctt gatttagcac aggcaagagc agaacttctt
1440

aatttgcagt atttaataat aagcactggt atggattata attctctggt gctgcttaac
1500

aat
1503

<210> 4
<211> 501
<212> PRT
<213> *Brachyspira hyodysenteriae*

<400> 4

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		

225					230						235					240
Gln	Val	Tyr	Arg	Arg	Tyr	Thr	Ser	Gly	Val	Ile	Asp	Asn	Asp	Ser	Tyr	
				245					250					255		
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	
	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		
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	
	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			

Thr Gln Tyr Met Glu Arg Ile Lys Ser Ile Ile Pro Glu Met Lys Leu
 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

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
 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

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
 210 215 220

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

9/71

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
 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

<210> 5

<211> 1773

<212> DNA

<213> *Brachyspira hyodysenteriae*

<400> 5

atgattaaga acatatttta taaatcatta ctcattttga tattatcaag tgctttaatg
 60

tttataggta tactgtttac tgtgcaatat aataatatta tgtacagtca ggttatgata
 120

gtaaatatta tggaaatgct tgaaaaagag attgatttat atgatgtgca aactgaagat
 180

gcttttagaa aatttgtact gcagtcagat aaagaagaat taagaatcag cataatatct
 240

acaaatgggg ttgtagtagc tgatacgatg acagatacct ctaaaaatcc tatggggaat
 300

catacaaata gaagcgatgt tatagaggca ttgcatagta tggaaaataa gccggctttt
 360

tctataaata cctctattag tcagaaaact ccttatatgt atgtatccaa aaaaattaaa
 420

gctgatgata aaagagatta tatacttaga gtttcaattc ctatagagtc agttaataaa
480

tatttgataa gcttcttatt tacagccgta atgggttatag gtatagttat tataattatg
540

gctttgggtc ttcctttgat gagccgtaat attatgattc ctttctatat gataaaagaa
600

accctggata atatatataa taataaatct ccgacaccta aaaatttaac gggatacaat
660

gatataaata ctattcttta tgatataaat gaacttgctg ttagtttgaa tgaaaatatt
720

acaggttatt agactgaaag agaaaagctt aattatgtac ttgagaatat agcacagggt
780

attatagctg ttaataaaaa taaggagata ttttttatta atcagtatgc tttagatttg
840

cttgaaattt ctgacagcaa tataagaaaa ctcaatgaaa taataaaaga tgatgatgta
900

atagaaaaaa tagataatgc catagagttc agcagatttt caaaatttga tgttaaagaa
960

catactatgg atatagaaat aagcatcata cctataagaa ataatgaaaa tataatctgca
1020

ttaataaaat ttgaagatgt tacagatata agaaagggtg agatagaaaa gcaggacttc
1080

tttataaatg cttcccatga attaaaaact cctctcactt ctataatagg atattctgaa
1140

cttcttattg ctacaggagg cggaaagaat caggcagatt ttataaaaag aataaataat
1200

gaagctttta gaatgaaaga tttagttatt gatatgctta cattgagcag aatagaagct
1260

aattggaaag aaactggtga tgaagaaata gacataaaag atattgttct tgatgtattt
1320

gaaagcaata gaataaaatc cgagcagaga aatatagatg tagaattaga tatagaatct
1380

gctgttataa tggctaataa agagaaaatt actgaagtag ttaataattt agttgataat
1440

gctataaaat atactgatga tgacggtaaa gtaaagatat atttaaagaa taattctgat
1500

aaagctatat tttcagtaaa agatacagga tgcggtatcg cacctcagta tttgaatagg
1560

gtttttgaaa gatttttcag agttaaaaat aataaatatt tgaaagttca tggtagagg
1620

cttggactta caatagtaaa aaatatatgt aattattata atgctgacat tcatattaaa
1680

agtgaagaga atgtcggtac agaaatgact gttgtattta atttgataa agaagaagaa
1740

tctaaaaata ttgaaaaaat agaaaaaat aat
1773

<210> 6

<211> 591

<212> PRT

<213> *Brachyspira hyodysenteriae*

<400> 6

Met	Ile	Lys	Asn	Ile	Phe	Tyr	Lys	Ser	Leu	Leu	Ile	Leu	Ile	Leu	Ser
1				5					10					15	

Ser	Ala	Leu	Met	Phe	Ile	Gly	Ile	Leu	Phe	Thr	Val	Gln	Tyr	Asn	Asn
		20						25						30	

Ile	Met	Tyr	Ser	Gln	Val	Met	Ile	Val	Asn	Ile	Met	Glu	Met	Leu	Glu
		35						40						45	

Lys	Glu	Ile	Asp	Leu	Tyr	Asp	Val	Gln	Thr	Glu	Asp	Ala	Phe	Arg	Lys
	50					55					60				

Phe	Val	Leu	Gln	Ser	Asp	Lys	Glu	Glu	Leu	Arg	Ile	Ser	Ile	Ile	Ser
65						70				75					80

12/71

Thr Asn Gly Val Val Val Ala Asp Thr Met Thr Asp Thr Ser Lys Asn
85 90 95

Pro Met Gly Asn His Thr Asn Arg Ser Asp Val Ile Glu Ala Leu His
100 105 110

Ser Met Glu Asn Lys Pro Ala Phe Ser Ile Asn Thr Ser Ile Ser Gln
115 120 125

Lys Thr Pro Tyr Met Tyr Val Ser Lys Lys Ile Lys Ala Asp Asp Lys
130 135 140

Arg Asp Tyr Ile Leu Arg Val Ser Ile Pro Ile Glu Ser Val Asn Lys
145 150 155 160

Tyr Leu Ile Ser Phe Leu Phe Thr Ala Val Met Val Ile Gly Ile Val
165 170 175

Ile Ile Ile Met Ala Leu Val Leu Pro Leu Met Ser Arg Asn Ile Met
180 185 190

Ile Pro Phe Tyr Met Ile Lys Glu Thr Leu Asp Asn Ile Tyr Asn Asn
195 200 205

Lys Ser Pro Thr Pro Lys Asn Leu Thr Gly Tyr Asn Asp Ile Asn Thr
210 215 220

Ile Leu Tyr Asp Ile Asn Glu Leu Ala Val Ser Leu Asn Glu Asn Ile
225 230 235 240

Thr Gly Tyr Gln Thr Glu Arg Glu Lys Leu Asn Tyr Val Leu Glu Asn
245 250 255

Ile Ala Gln Gly Ile Ile Ala Val Asn Lys Asn Lys Glu Ile Phe Phe
260 265 270

Ile Asn Gln Tyr Ala Leu Asp Leu Leu Glu Ile Ser Asp Ser Asn Ile

13/71

275

280

285

Arg Lys Leu Asn Glu Ile Ile Lys Asp Asp Asp Val Ile Glu Lys Ile
 290 295 300

Asp Asn Ala Ile Glu Phe Ser Arg Phe Ser Lys Phe Asp Val Lys Glu
 305 310 315 320

His Thr Met Asp Ile Glu Ile Ser Ile Ile Pro Ile Arg Asn Asn Glu
 325 330 335

Asn Ile Ser Ala Leu Ile Lys Phe Glu Asp Val Thr Asp Ile Arg Lys
 340 345 350

Val Glu Ile Glu Lys Gln Asp Phe Phe Ile Asn Ala Ser His Glu Leu
 355 360 365

Lys Thr Pro Leu Thr Ser Ile Ile Gly Tyr Ser Glu Leu Leu Ile Ala
 370 375 380

Thr Gly Gly Gly Lys Asn Gln Ala Asp Phe Ile Lys Arg Ile Asn Asn
 385 390 395 400

Glu Ala Leu Arg Met Lys Asp Leu Val Ile Asp Met Leu Thr Leu Ser
 405 410 415

Arg Ile Glu Ala Asn Trp Lys Glu Thr Val Asp Glu Glu Ile Asp Ile
 420 425 430

Lys Asp Ile Val Leu Asp Val Phe Glu Ser Asn Arg Ile Lys Ser Glu
 435 440 445

Gln Arg Asn Ile Asp Val Glu Leu Asp Ile Glu Ser Ala Val Ile Met
 450 455 460

Ala Asn Lys Glu Lys Ile Thr Glu Val Val Asn Asn Leu Val Asp Asn
 465 470 475 480

14/71

Ala Ile Lys Tyr Thr Asp Asp Asp Gly Lys Val Lys Ile Tyr Leu Lys
 485 490 495

Asn Asn Ser Asp Lys Ala Ile Phe Ser Val Lys Asp Thr Gly Cys Gly
 500 505 510

Ile Ala Pro Gln Tyr Leu Asn Arg Val Phe Glu Arg Phe Phe Arg Val
 515 520 525

Lys Asn Asn Lys Tyr Leu Lys Val His Gly Thr Gly Leu Gly Leu Thr
 530 535 540

Ile Val Lys Asn Ile Cys Asn Tyr Tyr Asn Ala Asp Ile His Ile Lys
 545 550 555 560

Ser Glu Glu Asn Val Gly Thr Glu Met Thr Val Val Phe Asn Leu Tyr
 565 570 575

Lys Glu Glu Glu Ser Lys Asn Ile Glu Lys Ile Glu Lys Asn Asn
 580 585 590

<210> 7

<211> 1509

<212> DNA

<213> *Brachyspira hyodysenteriae*

<400> 7

atggagcaaa aaaaacgttc atttatgttc tttttaaatc ttgggcttac atttactttg
 60

gttggtataa ttattttcttt tttcattttt tcatatgaaa aaaattataa aaaagatgag
 120

ttcttggttc atgcccaggc agcacctgaa aaaacatctt ttacaggttc attagatggt
 180

gccttagctg tagaaaatgc tataagagat gttgtggata aaaatatgcc tgctgtagtt
 240

aatatatcta cagaaataga agcaggacaa actgaagaag atagatatgc cgatgaattc
300

tttagatttt tcttcggaga tcaaatgcct agacaaaaaa gaagtcagaa atcattagga
360

agcggtttca taatcaatga agaaggatat gtgctttcta attaccatgt tgtaaaaggc
420

gctactaaaa taatgattac gctttatgga gaagacggag agcttcctgc aaaattaata
480

ggttatgatg aggcttatga cttagcatta ctaaaaatag aggatgaaaa tagaactttc
540

ccttatgttg ctttaggaga cagtgatgct atagagcctg gtgaatttgc tattgctata
600

ggaaaccctt acggacttaa taatacagtt actttcggta ttgtaagtgc taaaggaaga
660

agcgatgttg gtgctaataa atatcaaaga tatatacaaa ctgatgttgc tataaaccct
720

ggtaactcag gaggaccttt attcaatata catggacagg ttataggaat aaacacattg
780

atatattcta cttctggcgg aagcataggt ataggatttg ctactcctat taatcttgct
840

acttcagtaa tgactgattt aaaagaaaat ggaagagtta caagaggata tttaggtata
900

tatttacaag atatcgatgg aaatctttca agaggtttaa atgttaagca aaacagcgga
960

gtatatgtaa gtgaggttgt acctgattca cctgctgcaa aaggcggatt acaggacgga
1020

gatattataa tagagtatga tggtgaaaaa atgactaaat caggtgattt attcaataaa
1080

gtagccacta ctaaagtagg aaaagaagtt actgttaaatt atttaagaaa tggaagagaa
1140

agaagcacta aaatcactat agaagctaga gttgaagatg aagaggttgt acctacaaga
1200

caatctcaga ataactcaca aggaagtact cgttcttgga tgggattaga tgtttcta
1260

atcactcctg aaatatctca aagacttcag ataagaagca atgagcgagg tgttgtagta
1320

cttaatatga ctcaaaactc aaaggcatat caaaatggac ttagaccagg agatgttata
1380

aaagctatta atggataaac aatatcaaact actgatgatt atgataattt tgtaaaatct
1440

tatggtaatg ataagtcctt tacaataact ataaaacgag caagaatgac ttatgttata
1500

attatagaa
1509

<210> 8
<211> 503
<212> PRT
<213> *Brachyspira hyodysenteriae*

<400> 8

Met	Glu	Gln	Lys	Lys	Arg	Ser	Phe	Met	Phe	Phe	Leu	Asn	Leu	Gly	Leu
1				5					10					15	

Thr	Phe	Thr	Leu	Val	Gly	Ile	Ile	Ile	Ser	Phe	Phe	Ile	Phe	Ser	Tyr
			20					25						30	

Glu	Lys	Asn	Tyr	Lys	Lys	Asp	Glu	Phe	Leu	Val	His	Ala	Gln	Ala	Ala
		35					40						45		

Pro	Glu	Lys	Thr	Ser	Phe	Thr	Gly	Ser	Leu	Asp	Gly	Ala	Leu	Ala	Val
	50					55					60				

Glu	Asn	Ala	Ile	Arg	Asp	Val	Val	Asp	Lys	Asn	Met	Pro	Ala	Val	Val
65					70					75				80	

Asn	Ile	Ser	Thr	Glu	Ile	Glu	Ala	Gly	Gln	Thr	Glu	Glu	Asp	Arg	Tyr
				85				90						95	

Ala Asp Glu Phe Phe Arg Phe Phe Phe Gly Asp Gln Met Pro Arg Gln
 100 105 110

Lys Arg Ser Gln Lys Ser Leu Gly Ser Gly Phe Ile Ile Asn Glu Glu
 115 120 125

Gly Tyr Val Leu Ser Asn Tyr His Val Val Lys Gly Ala Thr Lys Ile
 130 135 140

Met Ile Thr Leu Tyr Gly Glu Asp Gly Glu Leu Pro Ala Lys Leu Ile
 145 150 155 160

Gly Tyr Asp Glu Ala Tyr Asp Leu Ala Leu Leu Lys Ile Glu Asp Glu
 165 170 175

Asn Arg Thr Phe Pro Tyr Val Ala Leu Gly Asp Ser Asp Ala Ile Glu
 180 185 190

Pro Gly Glu Phe Ala Ile Ala Ile Gly Asn Pro Tyr Gly Leu Asn Asn
 195 200 205

Thr Val Thr Phe Gly Ile Val Ser Ala Lys Gly Arg Ser Asp Val Gly
 210 215 220

Ala Asn Lys Tyr Gln Arg Tyr Ile Gln Thr Asp Val Ala Ile Asn Pro
 225 230 235 240

Gly Asn Ser Gly Gly Pro Leu Phe Asn Ile His Gly Gln Val Ile Gly
 245 250 255

Ile Asn Thr Leu Ile Tyr Ser Thr Ser Gly Gly Ser Ile Gly Ile Gly
 260 265 270

Phe Ala Thr Pro Ile Asn Leu Ala Thr Ser Val Met Thr Asp Leu Lys
 275 280 285

Glu Asn Gly Arg Val Thr Arg Gly Tyr Leu Gly Ile Tyr Leu Gln Asp
290 295 300

Ile Asp Gly Asn Leu Ser Arg Gly Leu Asn Val Lys Gln Asn Ser Gly
305 310 315 320

Val Tyr Val Ser Glu Val Val Pro Asp Ser Pro Ala Ala Lys Gly Gly
325 330 335

Leu Gln Asp Gly Asp Ile Ile Ile Glu Tyr Asp Gly Glu Lys Met Thr
340 345 350

Lys Ser Gly Asp Leu Phe Asn Lys Val Ala Thr Thr Lys Val Gly Lys
355 360 365

Glu Val Thr Val Lys Tyr Leu Arg Asn Gly Arg Glu Arg Ser Thr Lys
370 375 380

Ile Thr Ile Glu Ala Arg Val Glu Asp Glu Glu Val Val Pro Thr Arg
385 390 395 400

Gln Ser Gln Asn Asn Ser Gln Gly Ser Thr Arg Ser Trp Met Gly Leu
405 410 415

Asp Val Ser Asn Ile Thr Pro Glu Ile Ser Gln Arg Leu Gln Ile Arg
420 425 430

Ser Asn Glu Arg Gly Val Val Val Leu Asn Met Thr Gln Asn Ser Lys
435 440 445

Ala Tyr Gln Asn Gly Leu Arg Pro Gly Asp Val Ile Lys Ala Ile Asn
450 455 460

Gly Ile Thr Ile Ser Asn Thr Asp Asp Tyr Asp Asn Phe Val Lys Ser
465 470 475 480

Tyr Gly Asn Asp Lys Ser Phe Thr Ile Thr Ile Lys Arg Ala Arg Met

19/71

485

490

495

Thr Tyr Val Ile Ile Ile Glu
500

<210> 9

<211> 1353

<212> DNA

<213> *Brachyspira hyodysenteriae*

<400> 9

atgtcagaga atagtttttaa aaatagaata aaagaaatat ataatgatat aaaaaataag
60

gcaaaggata ttgatgaaat agaaatttat atgtcagtaa gcggagaaga ggagtttact
120

gtaagagaaa aagattttaga taaatatact tatgctgaat ctggaggaat aggtttaaga
180

ttgattaaag acggtaaagt tggaataagt ttacagaga aaataagctc tgatataaat
240

atagatgac ttattaataa tgcaaaaact tcattacatt atgctgactc tgaacctgaa
300

tataataaac ttatagataa agatgatgat gaaaaaagtt atgatatgat taataaagat
360

atagttaatc tgtctaatga taaacttaaa gaaatttcat tatcaataga agataaatta
420

tattctcttg ataatagaat tgtaaagtga ccctctgcag gattagcaag atataatttt
480

aataaatgta taataaacag caatggtata tgcaagaag aaaagaaaaa cagtatagca
540

tattatggtg aagtaatagc aaaagaaaat gatatagtaa aaactttttt tgatgtttat
600

tcttcaacag atgctgtatt tgatgttgct tcttttacia aaaatattgt tgataatggt
660

gtcaataaat tatctgcaaa gcctatagaa agcggaaaat ataaaactgt atttacaat
720

aaagctatga gaataattat aggtgcttat ttaggtttat tttcttcaga agcagttcag
780

aaaaaattat cacttcttca gggaaaattg aatcagaaaa tagcaagcag tatcataaat
840

attaaagata ttcctattta tgataaagga ttagcaaata caaattttga cggagaagg
900

tctaaaacta aagattttaa tataataact aacgggggtt taaatagcta tctttataat
960

aattatacag caaaaaaaga cggcataaaa acaacttcgc atgcttcaag aggattttaa
1020

acttcaatag gaatatcttg tcataatttt attttgaga atggaaataa tactcaggaa
1080

gaattgattt cccaaattca aaatggagta ttagtaaatt ctctaaccgg aactcatgca
1140

ggagtaaattg ctataagcgg agatttttct ttacaggcag aaggcataaa aatagaaaat
1200

ggaaaattat catatacagc aaatcctttc attgtttcag gtaatatatt agatctttta
1260

agcaatgtag aaatgcttgc caatgatact gattatcatc attcatctat atatgcacct
1320

agtgctttga ttaaagaact ttcatttgct tca
1353

<210> 10

<211> 451

<212> PRT

<213> *Brachyspira hyodysenteriae*

<400> 10

Met	Ser	Glu	Asn	Ser	Phe	Lys	Asn	Arg	Ile	Lys	Glu	Ile	Tyr	Asn	Asp
1				5					10					15	

Ile	Lys	Asn	Lys	Ala	Lys	Asp	Ile	Asp	Glu	Ile	Glu	Ile	Tyr	Met	Ser
			20				25						30		

Val Ser Gly Glu Glu Glu Phe Thr Val Arg Glu Lys Asp Leu Asp Lys
 35 40 45

Tyr Thr Tyr Ala Glu Ser Gly Gly Ile Gly Leu Arg Leu Ile Lys Asp
 50 55 60

Gly Lys Val Gly Ile Ser Phe Thr Glu Lys Ile Ser Ser Asp Ile Asn
 65 70 75 80

Ile Asp Asp Leu Ile Asn Asn Ala Lys Thr Ser Leu His Tyr Ala Asp
 85 90 95

Ser Glu Pro Glu Tyr Asn Lys Leu Ile Asp Lys Asp Asp Asp Glu Lys
 100 105 110

Ser Tyr Asp Met Ile Asn Lys Asp Ile Val Asn Leu Ser Asn Asp Lys
 115 120 125

Leu Lys Glu Ile Ser Leu Ser Ile Glu Asp Lys Leu Tyr Ser Leu Asp
 130 135 140

Asn Arg Ile Val Asn Val Pro Ser Ala Gly Leu Ala Arg Tyr Asn Phe
 145 150 155 160

Asn Lys Cys Ile Ile Asn Ser Asn Gly Ile Cys Lys Glu Glu Lys Lys
 165 170 175

Asn Ser Ile Ala Tyr Tyr Gly Glu Val Ile Ala Lys Glu Asn Asp Ile
 180 185 190

Val Lys Thr Phe Phe Asp Val Tyr Ser Ser Thr Asp Ala Val Phe Asp
 195 200 205

Val Ala Ser Phe Thr Lys Asn Ile Val Asp Asn Val Val Asn Lys Leu
 210 215 220

Ser Ala Lys Pro Ile Glu Ser Gly Lys Tyr Lys Thr Val Phe Thr Asn

His His Ser Ser Ile Tyr Ala Pro Ser Ala Leu Ile Lys Glu Leu Ser
 435 440 445

Phe Ala Ser
 450

<210> 11
 <211> 1263
 <212> DNA
 <213> *Brachyspira hyodysenteriae*

<400> 11
 atggtaaaaa gattaacctt aaaaaatgga acaagagttg ttttagaaaa gatgcctatg
 60

ctggatactg tatctatagg ttttatatatt ttaacaggaa gtgctaataa gaaaaaagaa
 120

gaaaatggat atactcattt catagagcat atgcttttta aaggcactga caaaattagt
 180

gcaaaagagc ttattagaaa tattgaaggt gtaggcggta tatttaaatgc atttacttca
 240

agacatttaa cttcttttta tatcaatata atatctaaat attttgacag agctgttaat
 300

gcttttagaaa atatcatgct tcattctgca ttcagagaag atgatataaa cagagaaaaa
 360

aaagttatta tcgaagagct taaaatgtca aatgatactc ctgaagaaat atcagctaata
 420

caattttttg ctgctgctta taaaggtact tctatgagct tccctatagg aggaaatatt
 480

aataatataa aaaaaataag cagagataaa atttattctt attttaaaga gcattttaat
 540

tctaataatt taatcatatc aatagctgga aattttgata ttgattatgc tggtgaaaga
 600

ttagaaaaaa taaaattaga aaaaagaaat aaaacagtta atgatgatct tcctttttat
 660

225		230		235		240									
Lys	Ala	Met	Arg	Ile	Ile	Ile	Gly	Ala	Tyr	Leu	Gly	Leu	Phe	Ser	Ser
				245					250					255	
Glu	Ala	Val	Gln	Lys	Lys	Leu	Ser	Leu	Leu	Gln	Gly	Lys	Leu	Asn	Gln
			260					265					270		
Lys	Ile	Ala	Ser	Ser	Ile	Ile	Asn	Ile	Lys	Asp	Ile	Pro	Ile	Tyr	Asp
		275					280					285			
Lys	Gly	Leu	Ala	Asn	Thr	Asn	Phe	Asp	Gly	Glu	Gly	Ser	Lys	Thr	Lys
	290					295					300				
Asp	Leu	Asn	Ile	Ile	Thr	Asn	Gly	Val	Leu	Asn	Ser	Tyr	Leu	Tyr	Asn
305					310					315					320
Asn	Tyr	Thr	Ala	Lys	Lys	Asp	Gly	Ile	Lys	Thr	Thr	Ser	His	Ala	Ser
				325					330					335	
Arg	Gly	Phe	Lys	Thr	Ser	Ile	Gly	Ile	Ser	Cys	His	Asn	Phe	Ile	Leu
			340					345					350		
Glu	Asn	Gly	Asn	Asn	Thr	Gln	Glu	Glu	Leu	Ile	Ser	Gln	Ile	Gln	Asn
		355					360					365			
Gly	Val	Leu	Val	Asn	Ser	Leu	Thr	Gly	Thr	His	Ala	Gly	Val	Asn	Ala
	370					375					380				
Ile	Ser	Gly	Asp	Phe	Ser	Leu	Gln	Ala	Glu	Gly	Ile	Lys	Ile	Glu	Asn
385					390					395					400
Gly	Lys	Leu	Ser	Tyr	Thr	Ala	Asn	Pro	Phe	Ile	Val	Ser	Gly	Asn	Ile
				405					410					415	
Leu	Asp	Leu	Leu	Ser	Asn	Val	Glu	Met	Leu	Ala	Asn	Asp	Thr	Asp	Tyr
		420						425					430		

tataaaacta taactaaaga aaaacaggaa attaatcagg tttatttttc tcttgtaaca
720

ccttcatata atgcatgcga taataaaaaa agatagcta tgaatatagt taatgatata
780

ttcggaggaa gttcttattc aagattatct cagtcaataa gagaaaataa aggactttgt
840

tataatatat atagttataa ttctagtttt ataaacggag gtacatttga gatacatggt
900

tctactagtt tggataggta tgcagaaaca atagaaagca tatattgtga aatagaaaaa
960

ttggttaatg aaagaatatc tgaagaagaa attgaagaaa ctaaagagag ttataaaggt
1020

tctatggcat ttagtaaatt cagtgcagaa tttataatga ataaaaatgc aaggcatgaa
1080

ttatatttat ctaaatatgt ttcatttaaa gagctttaca atataataga taaaatagat
1140

ttaaaacttg ttaatgaagt tatagacgaa aaattgatga ataaaaaatt ctttttaaca
1200

tctgtaggag caagcggtag taaggatata agcaagtctt taagcagtaa acttaaattg
1260

aat
1263

<210> 12

<211> 421

<212> PRT

<213> *Brachyspira hyodysenteriae*

<400> 12

Met	Val	Lys	Arg	Leu	Thr	Leu	Lys	Asn	Gly	Thr	Arg	Val	Val	Leu	Glu
1				5					10					15	

Lys	Met	Pro	Met	Leu	Asp	Thr	Val	Ser	Ile	Gly	Phe	Ile	Phe	Leu	Thr
				20				25						30	

Gly Ser Ala Asn Glu Lys Lys Glu Glu Asn Gly Tyr Thr His Phe Ile
35 40 45

Glu His Met Leu Phe Lys Gly Thr Asp Lys Ile Ser Ala Lys Glu Leu
50 55 60

Ile Arg Asn Ile Glu Gly Val Gly Gly Ile Phe Asn Ala Phe Thr Ser
65 70 75 80

Arg His Leu Thr Ser Phe Tyr Ile Asn Ile Ile Ser Lys Tyr Phe Asp
85 90 95

Arg Ala Val Asn Ala Leu Glu Asn Ile Met Leu His Ser Ala Phe Arg
100 105 110

Glu Asp Asp Ile Asn Arg Glu Lys Lys Val Ile Ile Glu Glu Leu Lys
115 120 125

Met Ser Asn Asp Thr Pro Glu Glu Ile Ser Ala Asn Gln Phe Phe Ala
130 135 140

Ala Ala Tyr Lys Gly Thr Ser Met Ser Phe Pro Ile Gly Gly Asn Ile
145 150 155 160

Asn Asn Ile Lys Lys Ile Ser Arg Asp Lys Ile Tyr Ser Tyr Phe Lys
165 170 175

Glu His Phe Asn Ser Asn Asn Leu Ile Ile Ser Ile Ala Gly Asn Phe
180 185 190

Asp Ile Asp Tyr Ala Val Glu Arg Leu Glu Lys Ile Lys Leu Glu Lys
195 200 205

Arg Asn Lys Thr Val Asn Asp Asp Leu Pro Phe Tyr Tyr Lys Thr Ile
210 215 220

Thr Lys Glu Lys Gln Glu Ile Asn Gln Val Tyr Phe Ser Leu Val Thr

[illegible]

<210> 13
<211> 972
<212> DNA
<213> *Brachyspira hyodysenteriae*

<400> 13
atggaagata ataaaaaaga agaaaaagag caaataaaaa aagaaaaaga acaaaagaaa
60
cttgaagaaa aaaaatccaa attggaaaga aaacagaaaa aaatagagga aaagataaga
120
agaaaaaatt tgcttggcga gtatctcact tatccaagta tggctgttaa tttataaaa
180
gctgataaga aaataaagcc tgaaaagtat atatttgata aaaataaggc ccaatatata
240
ttatatatttg cacctcagtt aaaagaaaat gaaagtccaa aaaaacaggt tatagtttat
300
ttatatggcg gaggctggag agagggtaat gctaatttat acagattcgt tggaagaaga
360
tttgcaaaag agaaatttca tactatttta ttaggatata gactcagtaa aaaatataaa
420
taccocgctc aaatagaaga tgtatttgca ggatttaata aggcactaga agttttgaaa
480
aataagaata ttgattattc tgatattata gtaatagggt catcagcagg tgcacatttg
540
ggagctttgc ttgtatacca taaggaaatg cataagaaat acaatataga ttctaattat
600
tttaaaggat atgtatcgct tggaggacca actgatttaa atgtatgtac taatgatata
660
ataactccta tgcttgatca gctatttgaa gagggatata atagagaaga tgctaatect
720
tataatcata tagacggaag cgagaaaaca aaggatttat gcgttcattc agaattggat
780
cctatttggtg atgctgataa ttcaattaat ttttctaata aggttaatag ctttcatgac
840

ggcttggctg agtgtattat atttgataat aaaaatattt atcataataa tttagttaat
900

ggtatattct ttgaggctat ggacagtgaac catatattgg ataaagtatt taaatggatt
960

gaaaagttaa ac
972

<210> 14
<211> 324
<212> PRT
<213> *Brachyspira hyodysenteriae*

<400> 14

Met Glu Asp Asn Lys Lys Glu Glu Lys Glu Gln Ile Lys Lys Glu Lys
1 5 10 15

Glu Gln Lys Lys Leu Glu Glu Lys Lys Ser Lys Leu Glu Arg Lys Gln
20 25 30

Lys Lys Ile Glu Glu Lys Ile Arg Arg Lys Asn Leu Leu Gly Glu Tyr
35 40 45

Leu Thr Tyr Pro Ser Met Ala Val Asn Phe Ile Lys Ala Asp Lys Lys
50 55 60

Ile Lys Pro Glu Lys Tyr Ile Phe Asp Lys Asn Lys Ala Gln Tyr Ile
65 70 75 80

Leu Tyr Phe Ala Pro Gln Leu Lys Glu Asn Glu Ser Pro Lys Lys Gln
85 90 95

Val Ile Val Tyr Leu Tyr Gly Gly Gly Trp Arg Glu Gly Asn Ala Asn
100 105 110

Leu Tyr Arg Phe Val Gly Arg Arg Phe Ala Lys Glu Lys Phe His Thr
115 120 125

29/71

Ile Leu Leu Gly Tyr Arg Leu Ser Lys Lys Tyr Lys Tyr Pro Ala Gln
 130 135 140

Ile Glu Asp Val Phe Ala Gly Phe Asn Lys Ala Leu Glu Val Leu Lys
 145 150 155 160

Asn Lys Asn Ile Asp Tyr Ser Asp Ile Ile Val Ile Gly Ser Ser Ala
 165 170 175

Gly Ala His Leu Gly Ala Leu Leu Val Tyr His Lys Glu Met His Lys
 180 185 190

Lys Tyr Asn Ile Asp Ser Asn Ile Phe Lys Gly Tyr Val Ser Leu Gly
 195 200 205

Gly Pro Thr Asp Leu Asn Val Cys Thr Asn Asp Ile Ile Thr Pro Met
 210 215 220

Leu Asp Gln Leu Phe Glu Glu Gly Tyr Asn Arg Glu Asp Ala Asn Pro
 225 230 235 240

Tyr Asn His Ile Asp Gly Ser Glu Lys Thr Lys Val Leu Cys Val His
 245 250 255

Ser Glu Leu Asp Pro Ile Cys Asp Ala Asp Asn Ser Ile Asn Phe Ser
 260 265 270

Asn Lys Val Asn Ser Phe His Asp Gly Leu Ala Glu Cys Ile Ile Phe
 275 280 285

Asp Asn Lys Asn Ile Tyr His Asn Asn Leu Val Asn Gly Ile Phe Phe
 290 295 300

Glu Ala Met Asp Ser Glu His Ile Leu Asp Lys Val Phe Lys Trp Ile
 305 310 315 320

Glu Lys Leu Asn

<210> 15
<211> 930
<212> DNA
<213> *Brachyspira hyodysenteriae*

<400> 15
atggaaatgc ttaatagagt tttaatatca gatgatggtc atagaatgta tacatatatt
60

tttaagcctg attccaaacc aaaagcaata gttcagatag ttcatggact tggagagcat
120

gccggaagat ataaagagat tgctgaaaaa ctcaataaag aaggattttt agtttgtgcc
180

gatgatcata gaggattcgg aagaagcact gtaagtaaag atcaaatagg gcatatgggc
240

gataaaaacg gacatgaact tattatagaa gatatgaggc atttaatggg aaatactaaa
300

gctgattatc ctaatcttcc ttattttatg atggggcata gtatgggttc ttttcttact
360

agaggttttt taattaaata tcataaagat tttaatggcg ctataataat ggggtactaga
420

ggaaaaccta agggaataga aaatctagga aaaactatag ctaatattca gaagtcatta
480

ttcgggggaa gaaaaagagc ttattttactt gataaattat cagtaggcgg atacggtaaa
540

aaattctttc ctaaagataa ttcagatttg gcatggctta cttcggataa agaagaaatt
600

aaaaaagccc aggaagacga atactttgca aataaacctg caagtataga aacatatata
660

caattatttg aacttattga taaaatttca gataaggata attactcttc tatggataaa
720

aatttccta tacttttaat atcaggagcg aaagaccctg taggagatat gggaaagggc
780

gttaaattggg ttcatgaaat gtatgaatca ttaggattca aagatgttac tataagtctt
840

tatgaaaatg gaagacatga aataacttaac gatgttcaaa gagatgatgt agctaaagag
900

ataattgctt ggcttaatgc tcatatagca
930

<210> 16

<211> 310

<212> PRT

<213> *Brachyspira hyodysenteriae*

<400> 16

Met Glu Met Leu Asn Arg Val Leu Ile Ser Asp Asp Gly His Arg Met
1 5 10 15

Tyr Thr Tyr Ile Phe Lys Pro Asp Ser Lys Pro Lys Ala Ile Val Gln
20 25 30

Ile Val His Gly Leu Gly Glu His Ala Gly Arg Tyr Lys Glu Ile Ala
35 40 45

Glu Lys Leu Asn Lys Glu Gly Phe Leu Val Cys Ala Asp Asp His Arg
50 55 60

Gly Phe Gly Arg Ser Thr Val Ser Lys Asp Gln Ile Gly His Met Gly
65 70 75 80

Asp Lys Asn Gly His Glu Leu Ile Ile Glu Asp Met Arg His Leu Met
85 90 95

Val Asn Thr Lys Ala Asp Tyr Pro Asn Leu Pro Tyr Phe Met Met Gly
100 105 110

His Ser Met Gly Ser Phe Leu Thr Arg Gly Phe Leu Ile Lys Tyr His
115 120 125

Lys Asp Leu Asn Gly Ala Ile Ile Met Gly Thr Arg Gly Lys Pro Lys
 130 135 140

Gly Ile Glu Asn Leu Gly Lys Thr Ile Ala Asn Ile Gln Lys Ser Leu
 145 150 155 160

Phe Gly Gly Arg Lys Arg Ala Tyr Leu Leu Asp Lys Leu Ser Val Gly
 165 170 175

Gly Tyr Gly Lys Lys Phe Phe Pro Lys Asp Asn Ser Asp Leu Ala Trp
 180 185 190

Leu Thr Ser Asp Lys Glu Glu Ile Lys Lys Ala Gln Glu Asp Glu Tyr
 195 200 205

Phe Ala Asn Lys Pro Ala Ser Ile Glu Thr Tyr Ile Gln Leu Phe Glu
 210 215 220

Leu Ile Asp Lys Ile Ser Asp Lys Asp Asn Tyr Ser Ser Met Asp Lys
 225 230 235 240

Asn Phe Pro Ile Leu Leu Ile Ser Gly Ala Lys Asp Pro Val Gly Asp
 245 250 255

Met Gly Lys Gly Val Lys Trp Val His Glu Met Tyr Glu Ser Leu Gly
 260 265 270

Phe Lys Asp Val Thr Ile Ser Leu Tyr Glu Asn Gly Arg His Glu Ile
 275 280 285

Leu Asn Asp Val Gln Arg Asp Asp Val Ala Lys Glu Ile Ile Ala Trp
 290 295 300

Leu Asn Ala His Ile Ala
 305 310

<210> 17

<211> 258
 <212> DNA
 <213> *Brachyspira hyodysenteriae*

<400> 17
 atgaaaatag tttttaatga aagagcttgg caggaatata tagagtgggt atcagaagat
 60

aaaaaaatag taaaaaaaat taacgacttg attaaagata taataagaaa tccttgtgat
 120

ggaataggaa aagcagaaaa attaaaatat gataaaaaag atctttactc tagaagaata
 180

aataaagaac atagattagt atatcatata gaaaataatc aattaataat aacatcttgt
 240

aaataccatt atgataag
 258

<210> 18
 <211> 86
 <212> PRT
 <213> *Brachyspira hyodysenteriae*

<400> 18

Met Lys Ile Val Phe Asn Glu Arg Ala Trp Gln Glu Tyr Ile Glu Trp
 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

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

85

<210> 19
<211> 1815
<212> DNA
<213> *Brachyspira hyodysenteriae*

<400> 19
atgaaaaata tttttaata tgcttcatt ataggatgca cttttgcctc gcttaatttt
60

gcggtgatt atatagatta taaagtaaaa aacggcgata ctttatttgg aatagctttc
120

gctcatgata tgagtgcaaa tgaattttta aaagttaata atataaaaga tcctgataaa
180

tataatctta gagtaggaga aactttaaaa gtaaaagata aagggtatac tcttgatat
240

gactctgata ataaagtttt cggcttgaaa ggagaagaag gaaactcata caaagattat
300

aaagtaaaaa acgggggatac tttatttggg atagcatttg cccatggaat gactgcta
360

gaatttctag ctataaataa tattaagat gccataaat ataatcttag agtaggacaa
420

actcttaaag tagcaaataa tcaaaaagaa aataatgctt cttcaaataa tataaataat
480

agtgataata cagaaaatta tgatacttat aaagtgcaaa gcggtgatac tttatacgga
540

atagctttct ctcatggtat gacagcaagc gaatttttaa agattaataa tatagatgat
600

cctgataaat ataaactata tgtaggtaaa actatgtatg tttaatcatc taaaaaagaa
660

aataatttaa acacaaataa tgaaaaagat acaggaaaag aaatagaata ctatactgta
720

aaaagcggcg ataccttata cggaatagct tttcaaatg atattagcgt aaatgatttt
780

ctaagaatta acaatataga tgatccttta aaatacaaat taagaacagg cgaaaaatta
840

aaaatatatg caagagaaaa tgcttcaa atacacaaagca aaactataaa aacatataga
900

gtaaaaaacg gagatactct tggagagata gcattaagaa attctatgtc tttgaaagat
960

cttcttcaat taaataatct aaaaaataat tatgtgctta aagtaggaga tactttaaaa
1020

atatatgata atattaatat aacaagttct tcaacatcaa caacatacag aactttggaa
1080

aattataaag taaaaagcgg tgatacttta agcggaatag ctctagcaag aggaatggat
1140

ctagtagaat tatactccat aaataatata aatgacaaat atattttgaa agttggagat
1200

aatcttaaag tatatgctaa ccctaaaaaa acaactactt tagtaatatc aaattataaa
1260

gttcaaagcg gagatagttt atactcaata gcaaaaaaac ataaaatgga tttaagagat
1320

ttaatgcagc ttaataatat aaaaaatgct 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 gattcggtac tggtataata
1620

cttaaacata aaaacggata taatacttct tatgctcatc tttctaagat aaatgttaaa
1680

cttgagata tagtaaagaa aggagattat ataggagaca ttggcgatac tggatatgata
1740

gatagaagcg aactatattt taagatttct tatcagggaa gatcaataga tcctgttaa
1800

cttcttccta aaagt
1815

<210> 20
<211> 605
<212> PRT
<213> *Brachyspira hyodysenteriae*

<400> 20

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

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
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

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
 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

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
 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

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
 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

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
 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

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
 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

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
 595 600 605

<210> 21
 <211> 264
 <212> DNA
 <213> *Brachyspira hyodysenteriae*

<400> 21
 atgaataaaa ttttttatga taaagcttgg gaagattatc tttattttca aaagaatgac
 60

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> 22
 <211> 88
 <212> PRT
 <213> *Brachyspira hyodysenteriae*

<400> 22

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

```

<210> 23
<211> 711
<212> DNA
<213> Brachyspira hyodysenteriae

<400> 23
atgatagaat caatacaaag aatacatgcc agaataggcg agattcagga tacttttaat
60

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 attttgctaa agctataaat
300

gcttataaaa aagcttcagt agaaagtttc cctactaaat atgatgatat aattaaagag
360

gcagcagaga aatattcttt gcctgaaaat ttaataaaaag cggttataaa gcaggaatca
420

```

aactatgtgc ctaatgctgt aagtcataaa ggtgctgttg gtttgatgca gataatgccg
480

caaacaggtg ttggcttagg tattactgat acagaaatgc ttaaagatcc atacactaat
540

ataatggctg gaagcagata tttatcacag atgttaaaca gatatgatgg aagacttgat
600

ttatctttat ctgcttataa tgccggacct gctttggtag acagattaca gagaatccct
660

aatatagagg aaactcaaaa ctatgttaaa aacattatag gatataaaa g
711

<210> 24

<211> 237

<212> PRT

<213> *Brachyspira hyodysenteriae*

<400> 24

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		

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
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

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
 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

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
 225 230 235

<210> 25
 <211> 564
 <212> DNA
 <213> *Brachyspira hyodysenteriae*

<400> 25
 atgcatattt ctggtgattc tccttttagat aggaaagttg gagatgctag ttattatttt
 60

gctactgttc aacattgctg ggggtgggct acttggaata gagcttgga atattttgat
 120

gtaactatgg aaagtataaa ttttgaagat gtaaaaaaaaa caattagaaa aagatacaaa
 180

gattttaata taaaagatta ctggcaaaga tggtttccta gaataaaaaa agagcattct
240

tctgtatggg attatcaatg gacttactgt attatctcaa aaaatggaat atgcattaat
300

ccaagtataa atttaacttc taatatagga tttggagaag attctacca cactacaaat
360

gaaaatgatg aaaatataaa tagtaaaaca taccctatgg atactgaaaa tattattcat
420

cctaaagaaa taaaatgtga tgaaagagct gattttgaaa tagctattaa aagatttaat
480

ataaaacctt tctctttaac atctaata accagagaag ttaaaagaat tataaaacaa
540

ataaaaaact tatttatcaa aaaa
564

<210> 26

<211> 188

<212> PRT

<213> *Brachyspira hyodysenteriae*

<400> 26

Met His Ile Ser Gly Asp Ser Pro Leu Asp Arg Lys Val Gly Asp Ala
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

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
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

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
180 185

<210> 27

<211> 396

<212> DNA

<213> *Brachyspira hyodysenteriae*

<400> 27

atgtttaata ctcctatatt attaattatt tttaaaagaa aatataactgc attaaaagtt
60

ttagatacaa taagaaatgt aaaacccaaa aaattatata tagcagctga tggctggaga
120

aatgaagaag aaaaaacaaa atgtattgat acaagagaag ctgtattaga agctgtagat
180

tgggaatgcg aagtaaaaac tttatttcaa gataaaaatt taggatgctg ttatggctcct
240

gtaaatgctg taaattggtt atttgaaaat gaagaacaag gaataatact tgaagatgat
300

gttatagctg aaacttcttt ttttattatt gcgagaaatt acttaactat tataaagata
360

atgaaaaaat tatgcatatt tctggtgatt ctcctt
396

<210> 28
<211> 132
<212> PRT
<213> *Brachyspira hyodysenteriae*

<400> 28

Met Phe Asn Thr Pro Ile Leu Leu Ile Ile Phe Lys Arg Lys Tyr Thr
1 5 10 15

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
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

Asn Tyr Leu Thr Ile Ile Lys Ile Met Lys Lys Leu Cys Ile Phe Leu
115 120 125

Val Ile Leu Leu
130

<210> 29
<211> 1296
<212> DNA
<213> *Brachyspira hyodysenteriae*

<400> 29
atggatataa ttataataat agtgtaata cttttaaatg gtatttttgc catgtcggaa
60

attgcagtaa tttctgctag aaaatcttct cttatgaaag acagcaaaga aggaaataaa
120

ggtgcaaaga ctgcattagc ttttagcagat aatcctgaca aattttttatc tacaatacaa
180

ataggtataa ctttaaatagg tatattaaca ggtatttact caggcgatac agttgccaaa
240

gaagtttcaa atttacttgt aaaaataaat gtaccattaa attatgcttc tttaatagct
300

caggtattgg tggtagcatt ggtaacatat cttacattga tattcggaga gcttgtgcct
360

aaaagaatag gaatggtaat gcctgaaaga atagcaaaag tggttgcagc tcctatgaca
420

atacttgcaa agataggtgc tccttttgtg tggatattat caaatagcgc attgcttggt
480

tcaagagttt tgggtataaa agatgataaa agtcctgtta ctgaagagga aataaaatct
540

atgatagaag agggcagaca agggggagaa gttaaggaga tagaacagaa tattatagag
600

agggttttct ttttgggaga tagaaaaata gaatctataa tgacacatag aaatgatatg
660

gtatttttag atataaatat gagtaatgat gagataaaaa agatagtatc aaaacattct
720

ttttctgctt atcctgttgt tgataaaaat ttggataata ttgtaggagt tgtaagagta
780

actgatatat tcgataaatt aaataacttca aaggctaaaa tagaaaagtt tgtgaagaaa
840

gctaattact ttcataacaa tatggaagtt tatttggttc ttgaagagat gaaaaagaat
900

aataactaaaa taggtcttgt atcagatgag tttgggaata tagacggaat gattactcaa
960

agcgatatat tcgaggcttt agtgggttct gtaacagaag gaaaagacag taaggatatt
1020

agaaagagaa agagcggaag ttggtttgta gatggtcaat gtcctatgta tgatttctta
1080

gagtattttg aaatagaaga tgaaaatgct tctaataatt ataatactat aagcggtttg
1140

attttagaat tattacagca tgtacctagt gaaggagaat ctttagaatg gaagaattta
1200

aatttagaag ttgttgatat ggacggtgct agaatagata aggttatagt aaataaaata
1260

gaaaaaactg atgaaaagaa tgattcagac actgaa
1296

<210> 30

<211> 432

<212> PRT

<213> *Brachyspira hyodysenteriae*

<400> 30

Met	Asp	Ile	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	

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
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

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
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

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
245 250 255

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

49/71

260

265

270

Lys Ile Glu Lys Phe Val Lys Lys Ala Asn Tyr Phe His Asn Asn Met
 275 280 285

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
 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

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
 405 410 415

Val Asn Lys Ile Glu Lys Thr Asp Glu Lys Asn Asp Ser Asp Thr Glu
 420 425 430

<210> 31

<211> 1386

<212> DNA

<213> *Brachyspira hyodysenteriae*

<400> 31

atggaaatac tactagttta tttatttgaa atatttataa ttattattct tattatgctc
60

tctgctttat tttctggaag tgagactgca tatacatcta ttgatgatgt tactttaatg
120

cgtttggtca gagagaaaaa aatcaaagaa gaagataaaa aatattggga aaagtcaagt
180

tctatgatac ctaccctact tgttggtaat aacatagtta atatatcagc aagttccatt
240

ataactgtat ttgctgtaag gcttgctgac attctgccgc atgtatcaac aaatgtgatg
300

gttacaatat caactgccac aataacaata cttattatta tattcggaga aatacttcct
360

aaagtcttaa tgagagttaa tgctgaaaaa atgatgcctt atcttctata ttttatgaag
420

ttttgtcatt ttatattcaa gcctataact ttcttaatgg ataaagtaac tacttttata
480

atgaattatt ttgtacctaa aagattaaga gatgctgaaa aaagaagtgc tttatcaagt
540

atggaagata tcactactat aatacatttg gggcataaag aaggaataat aaaagaatat
600

acacatgaaa tgcttacagg agtaatagat tttagaaata aaactgtaga agagataatg
660

acgccccgtg ttgatatggt atgtattgaa gctgaaacag atgtaaataa aataataaaa
720

cttactgtag aatcaggact ttcaagattt cctgtttatg aggaaacagt agatcatata
780

ataggatatat tccatacaag agctttattt aaagaatatg ttaaaggcgg cggaagatg
840

aacaaagtaa aaaagaaagc aatagattat ataatgcttc cctactttgt acctgaaact
900

aaaactataa gcagcttatt tagtgatatg caaaagaaaa aacttcagat ggtaattact
960

attgatgaat acggcggaac tgccggactt gttactatgg aagatataat agaagagata
1020

atgggtgata tagaagatga aagtgataaa aaagaagctg atgtaataag atttaaggga
1080

aaaagaatta taataaatgg aatgcttct atagaagatg tcaacaaaac tttaaaatta
1140

gaattagagc atgaagaata tcaaactata gcaggatatg ttattgatat gcttgatcat
1200

atacctgaaa caaatgagag attcatatta aaaggatata gggtaagaat aatgaaagtt
1260

gaagacagaa gaatagttga aatggaattt actcctataa aatttgcaag aacaaatgaa
1320

agtgataata ttgatataca agagacatct gattcagaaa aaaatgattt agaaatttta
1380

aatgaa
1386

<210> 32

<211> 462

<212> PRT

<213> *Brachyspira hyodysenteriae*

<400> 32

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 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

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
 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

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
 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
 225 230 235 240

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
 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
 305 310 315 320

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
 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
 385 390 395 400

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
 435 440 445

Thr Ser Asp Ser Glu Lys Asn Asp Leu Glu Ile Leu Asn Glu
 450 455 460

<210> 33
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 33
catatttctg gtgattctc
19.

<210> 34
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 34
ttttttgata aataagtttt ttatttg
27

<210> 35
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 35
tttaatactc ctatattatt aattattt
28

<210> 36
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 36

aaggagaatc accagaaa
18

<210> 37
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 37
aaatatgctt ccattatagg
20

<210> 38
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 38
acttttagga agaagtttaa c
21

<210> 39
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 39
gatataatta taataatagt gttaatac
28

<210> 40
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> Primer

<400> 40

ttcagtgtct gaatcattc
19

<210> 41

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer

<400> 41

tatgatgggg catagtatgg
20

<210> 42

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer

<400> 42

tatctcctac agggctcttc g
21

<210> 43

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer

<400> 43

atgataaagc ttgggaagat tatc
24

<210> 44

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer

<400> 44

ataatgtggtt ttacatccaa c
21

<210> 45

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer

<400> 45

ttatgctctc tgctttattt tctgg
25

<210> 46

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer

<400> 46

tcttttatta ttccttcttt atgcc
25

<210> 47

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer

<400> 47

ctatggcaga aaacaaagtc
20

<210> 48
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 48
gcagataaag ataaatcaag tc
22

<210> 49
<211> 14
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 49
aaagagcttg gcag
14

<210> 50
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 50
cttatcataa tggatatttac aagatg
26

<210> 51
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 51

59/71

tgctattgct gatgctacta c
21

<210> 52
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 52
attatcttga tgaggatgct ttc
23

<210> 53
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 53
tagataaaga tgatgatgaa aaaag
25

<210> 54
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 54
aaataaacct aaataagcac c
21

<210> 55
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> Primer

<400> 55
tgggtttaga ataggtgcag g
21

<210> 56
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 56
attttaatgt ttgtcttttt gc
22

<210> 57
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 57
tagaaaagat gcctatgctg
20

<210> 58
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 58
ttacaagaga aaaataaacc tg
22

<210> 59
<211> 22
<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer

<400> 59

tggggaatca tacaaataga ag
22

<210> 60

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer

<400> 60

ggctcatcaa aggaagaacc
20

<210> 61

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer

<400> 61

ataataaaaa agaagaaaa gag
23

<210> 62

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer

<400> 62

gtctgtatcc taataaaata gtatg
25

<210> 63
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 63
tcttgggctt acatttactt tg
22

<210> 64
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 64
tgattttotga cttctttttt g
21

<210> 65
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 65
tatgcatatg tctgggtgatt ctccttttag
29

<210> 66
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 66

tgcggtcct ttttgataa ataag
25

<210> 67
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 67
ggaagataac atatgtttaa tactc
25

<210> 68
<211> 32
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 68
tcctaggatc ctatctaaag gagaatcacc ag
32

<210> 69
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 69
aaatatgcat atgttatagg atgcactttt gcctc
35

<210> 70
<211> 34
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> Primer

<400> 70
cttttaggat ccagtttaac aggatctatt gatc
34

<210> 71
<211> 38
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 71
aatccatag gatataatta taataatagt gttaatac
38

<210> 72
<211> 41
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 72
atctggatcc tattcagtgt ctgaatcatt cttttcatca g
41

<210> 73
<211> 37
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 73
cttcatatgg aaatgcttaa tagagtttta atatcag
37

<210> 74
<211> 38
<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer

<400> 74

aataggatcc tatatgagca ttaagccaag caattatc
38

<210> 75

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer

<400> 75

atttcatatg ataaagcttg ggaagattat c
31

<210> 76

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer

<400> 76

aattggatcc ataatgtgtt ttacatccaa c
31

<210> 77

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer

<400> 77

attacatatg gaaatactac tagtttattt atttg
35

<210> 78
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 78
cattggatcc tgaatcagat gtctcttgta tat
33

<210> 79
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 79
gatacatatg atacaaagaa tacatgccag aatag
35

<210> 80
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 80
atgtggatcc catagttttg agtttcctc
29

<210> 81
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 81

gtttcatatg aaagagcttg gcag
24

<210> 82
<211> 36
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 82
atatggatcc cttatcataa tggatattac aagatg
36

<210> 83
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 83
ttaacatatg gttctctttg cggaagag
28

<210> 84
<211> 34
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 84
ttaggatccc atcaatacct aatttttcat taac
34

<210> 85
<211> 41
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> Primer

<400> 85

ttaacatatg tcagagaata gttttaaaaa tagaataaaa g
41

<210> 86

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer

<400> 86

ttaaggatcc gaagcaaag aaagttcttt aatc
34

<210> 87

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer

<400> 87

ttttcatatg gcacaaacta atgaatcagc tatatt
36

<210> 88

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer

<400> 88

ttaaggatcc gttaagcagc accagagaat tataatc
37

<210> 89

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer

<400> 89

cttacatatg ggaacaagag ttgttttaga aaagatg
37

<210> 90

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer

<400> 90

actgggatcc gacttgctta tacccttagt accg
34

<210> 91

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer

<400> 91

taatcatatg atgtacagtc aggttatgat ag
32

<210> 92

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer

<400> 92

actgggatcc tgtaccgaca ttctcttcac
30

<210> 93
<211> 36
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 93
aaagcatatg gaagaaaaaa aatccaaatt ggaaag
36

<210> 94
<211> 36
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 94
atacggatcc aatatatggt cactgtccat agcctc
36

<210> 95
<211> 36
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 95
ctttcatatg cttgggctta catttacttt ggttgg
36

<210> 96
<211> 37
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 96

ataaggatcc cataagtcac tcttgctcgt tttatag
37

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

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
3 September 2009 (03.09.2009)(10) International Publication Number
WO 2009/105833 A1

(51) International Patent Classification:

C07K 14/195 (2006.01) C07H 21/04 (2006.01)

(21) International Application Number:

PCT/AU2009/000248

(22) International Filing Date:

27 February 2009 (27.02.2009)

(25) Filing Language:

English

(26) Publication Language:

English

(30) Priority Data:

08152093.4 28 February 2008 (28.02.2008)

EP

(71) Applicant (for all designated States except US): MURDOCH UNIVERSITY [AU/AU]; South Street, Murdoch, Western Australia 6150 (AU).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): HAMPSON, David, J. [AU/AU]; 416 Carradine Road, Bedfordale, Western Australia 6112 (AU). LA, Tom [AU/AU]; 49 Abercairn Way, Parkwood, Western Australia 6149 (AU). BELLGARD, Matthew, I. [AU/AU]; 20 Campion Crescent, Attadale, Western Australia 6156 (AU). PHILLIPS, Nyree, D. [AU/AU]; 70 Alpine Road, Kalamunda, Western Australia 6076 (AU).

(74) Agent: GRIFFITH HACK; Level 19, 109 St Georges Terrace, Perth, Western Australia 6000 (AU).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every

kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AO, 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, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(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, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

- with international search report (Art. 21(3))
- with sequence listing part of description (Rule 5.2(a))

(54) Title: NOVEL SEQUENCES OF BRACHYSPIRA, IMMUNOGENIC COMPOSITIONS, METHODS FOR PREPARATION AND USE 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.

WO 2009/105833 A1

NOVEL SEQUENCES OF BRACHYSPIRA, IMMUNOGENIC COMPOSITIONS,
METHODS FOR PREPARATION AND USE THEREOF

FIELD

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. intermedia*, *B. alvinipulli*, *B. aalborgi*, *B. innocens*, *B. murdochii*, and *B. pilosicoli*.

BACKGROUND

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 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* *fina* 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* *ftnA* gene: DNA vaccination and real-time PCR quantification of bacteria in a mouse model of disease. Current Microbiology 50: 285-291).

SUMMARY

Inventors have identified novel genes from *B. hyodysenteriae* and the proteins encoded by those genes. They have further identified that these novel genes and proteins can be used for therapeutic and diagnostic purposes. Moreover, the inventors have identified that these genes and/or the proteins can be used as a vaccine against *B. hyodysenteriae* and/or diagnose *B. hyodysenteriae* infections.

Accordingly, in a first aspect, the present invention provides novel *B. hyodysenteriae* polynucleotides having the nucleotide sequence contained in SEQ ID NOs: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21 and 23. The present invention also provides nucleotide sequences that are homologous to SEQ ID NOs: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21 and 23, where the homology can be 95%, 90%, 85%, 80%, 75% and 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 and 23 and sequences that are 95%, 90%, 85%, 80%, 75% and 70% homologous 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 and 23 and sequences that are 95%, 90%, 85%, 80%, 75% and 70% homologous to these sequences.

In one aspect of the invention, the vaccine composition is a vaccine composition comprising at least two polynucleotides encoding protease molecules selected from the group consisting of SEQ ID No.1, 3, 5 and 7 for the treatment or prevention of swine dysentery associated with *Brachyspira hyodysenteriae*.

In another aspect of the invention, the vaccine composition is a vaccine composition comprising at least three polynucleotides encoding protease molecules selected from the group consisting of SEQ ID No.1, 3, 5 and 7 for the treatment or prevention of swine dysentery associated with *Brachyspira hyodysenteriae*.

In yet another aspect of the invention, the vaccine composition is a vaccine composition consisting of polynucleotides encoding protease molecules selected from the group consisting of: SEQ ID No.1, 3, 5 and 7 for the treatment or prevention of swine dysentery associated with *Brachyspira hyodysenteriae*.

In a further aspect of the invention, the vaccine composition is a vaccine composition comprising at least two polynucleotides encoding lipase and/or peptidase molecules selected from the

group consisting of SEQ ID No.9, 11, 13 and 15 for the treatment or prevention of swine dysentery associated with *Brachyspira hyodysenteriae*.

In another aspect of the invention, the vaccine composition is a vaccine composition comprising at least three polynucleotides encoding lipase and/or peptidase molecules selected from the group consisting of SEQ ID No.9, 11, 13 and 15 for the treatment or prevention of swine dysentery associated with *Brachyspira hyodysenteriae*.

In yet another aspect of the invention, the vaccine composition is a vaccine composition consisting of polynucleotides encoding lipase and/or peptidase molecules selected from the group consisting of: SEQ ID No.9, 11, 13 and 15 for the treatment or prevention of swine dysentery associated with *Brachyspira hyodysenteriae*.

In a further aspect of the invention, the vaccine composition is a vaccine composition comprising at least two polynucleotides encoding toxin molecules selected from the group consisting of SEQ ID No.17, 19, 21 and 23 for the treatment or prevention of swine dysentery associated with *Brachyspira hyodysenteriae*.

In another aspect of the invention, the vaccine composition is a vaccine composition comprising at least three polynucleotides encoding toxin molecules selected from the group consisting of SEQ ID No.17, 19, 21 and 23 for the treatment or prevention of swine dysentery associated with *Brachyspira hyodysenteriae*.

In yet another aspect of the invention, the vaccine composition is a vaccine composition consisting of polynucleotides encoding toxin molecules selected from the group consisting of: SEQ ID No.17, 19, 21 and 23 for the treatment or prevention of swine dysentery associated with *Brachyspira hyodysenteriae*.

In another aspect of the invention, the vaccine composition is vaccine composition comprising at least one polynucleotide encoding hemolysin molecules selected from the group consisting of SEQ ID No.25, 27, 29 and 31 together with at least one polynucleotide selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21 and 23 for the treatment or prevention of swine dysentery associated with *Brachyspira hyodysenteriae*.

In another aspect of the invention, the vaccine composition is a vaccine composition comprising:

- (i) at least one polynucleotide encoding a protease molecule selected from the group of: SEQ ID No.1, 3, 5 and 7; and/or
- (ii) at least one polynucleotide encoding a lipase and/or peptidase molecule selected from the group of: SEQ ID No. 9, 11, 13 and 15 and/or

(iii) at least one polynucleotide encoding a toxin molecule selected from the group of: SEQ ID No. 17, 19, 21 and 23 and/or

(iv) at least one polynucleotide encoding a hemolysin molecule selected from the group of: SEQ ID No. 25, 27, 29 and 31 and/or

for the treatment or prevention of swine dysentery associated with *Brachyspira*.

The present invention also provides 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, and 31; 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, and 31; 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, and 31.

The present invention also provides 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 and 32. This invention also provides proteins that are 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 and 32. The present invention also provides a vaccine or 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 and 32 or amino acid sequences that are 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 and 32.

In one aspect of the invention, the vaccine composition is a vaccine composition comprising at least two protease polypeptides selected from the group consisting of SEQ ID No. 2, 4, 6 and 8 for the treatment or prevention of swine dysentery associated with *Brachyspira hyodysenteriae*.

In another aspect of the invention, the vaccine composition is a vaccine composition comprising at least three protease polypeptides selected from the group consisting of SEQ ID No. 2, 4, 6 and 8 for the treatment or prevention of swine dysentery associated with *Brachyspira hyodysenteriae*.

In yet another aspect of the invention, the vaccine composition is a vaccine composition consisting of protease polypeptides SEQ ID No. 2, 4, 6 and 8 for the treatment or prevention of swine dysentery associated with *Brachyspira hyodysenteriae*.

In one aspect of the invention, the vaccine composition is a vaccine composition comprising at least two lipase and/or peptidase polypeptides selected from the group consisting of SEQ ID No. 10, 12, 14 and 16 for the treatment or prevention of swine dysentery associated with *Brachyspira hyodysenteriae*.

In another aspect of the invention, the vaccine composition is a vaccine composition comprising at least three lipase and/or peptidase polypeptides selected from the group consisting of SEQ ID

No.10, 12, 14 and 16 for the treatment or prevention of swine dysentery associated with *Brachyspira hyodysenteriae*.

In yet another aspect of the invention, the vaccine composition is a vaccine composition consisting of lipase and/or peptidase polypeptides from the group consisting of: SEQ ID No.10, 12, 14 and 16 for the treatment or prevention of swine dysentery associated with *Brachyspira hyodysenteriae*.

In one aspect of the invention, the vaccine composition is a vaccine composition comprising at least two toxin polypeptides selected from the group consisting of SEQ ID No.18, 20, 22 and 24 for the treatment or prevention of swine dysentery associated with *Brachyspira hyodysenteriae*.

In another aspect of the invention, the vaccine composition is a vaccine composition comprising at least three toxin polypeptides selected from the group consisting of SEQ ID No.18, 20, 22 and 24 for the treatment or prevention of swine dysentery associated with *Brachyspira hyodysenteriae*.

In yet another aspect of the invention, the vaccine composition is a vaccine composition consisting of toxin polypeptides selected from the group consisting of: SEQ ID No.18, 20, 22 and 24 for the treatment or prevention of swine dysentery associated with *Brachyspira hyodysenteriae*.

In a further aspect of the invention, the vaccine composition is a vaccine composition comprising:

- (i) at least one protease polypeptide selected from the group of: SEQ ID No.2, 4, 6, or 8 and/or
 - (ii) at least one lipase and/or peptidase polypeptide selected from the group of: SEQ ID No. 10, 12, 14, or 16 and/or
 - (iii) at least one toxin selected from the group of: SEQ ID No. 18, 20, 22 or 24 and/or
 - (iv) at least one hemolysin selected from the group of: SEQ ID No. 26, 28, 30 or 32
- for the treatment or prevention of swine dysentery associated with *Brachyspira hyodysenteriae*.

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 and 32 or that are 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 and 32.

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 and 32. 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 and 32. 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 and 32 or bind to proteins that are 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 and 32. 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 and 32 or bind to proteins that are 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 and 32 are included in this invention. These diagnostic kits can detect the presence of *B. hyodysenteriae* in an animal. The animal is preferably a mammal or a 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, and 31 or sequences that are 95%, 90%, 85%, 80%, 75% and 70% homologous 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 and 32 or sequences that are 95%, 90%, 85%, 80%, 75% and 70% homologous to these sequences.

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, and 31 or sequences that are 95%, 90%, 85%, 80%, 75% and 70% homologous 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 and 32 or sequences that are 95%, 90%, 85%, 80%, 75% and 70% homologous to these sequences.

DETAILED DESCRIPTION OF THE PREFERRED EMBODIMENTS OF THE INVENTION

Before describing the present invention in detail, it is to be understood that this invention is not limited to particularly exemplified methods and may, of course, vary. It is also to be understood that the terminology used herein is for the purpose of describing particular embodiments of the invention only, and is not intended to be limiting which will be limited only by the appended claims.

All publications, patents and patent applications cited herein, whether *supra* or *infra*, are

hereby incorporated by reference in their entirety. However, publications mentioned herein are cited for the purpose of describing and disclosing the protocols, reagents and vectors which are reported in the publications and which might be used in connection with the invention. Nothing herein is to be construed as an admission that the invention is not entitled to antedate such disclosure by virtue of prior invention.

Furthermore, the practice of the present invention employs, unless otherwise indicated, conventional immunological and molecular biological techniques and pharmacology within the skill of the art. Such techniques are well known to the skilled worker, and are explained fully in the literature. See, eg., Coligan, Dunn, Ploegh, Speicher and Wingfield "Current protocols in Protein Science" (1999) Volume I and II (John Wiley & Sons Inc.); Sambrook *et al.*, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" (1989), 2nd Edition (Cold Spring Harbor Laboratory press); and Prescott, Harley and Klein "Microbiology" (1999), 4th Edition (WBC McGraw-Hill).

It must be noted that as used herein and in the appended claims, the singular forms "a," "an," and "the" include plural reference unless the context clearly dictates otherwise. Thus, for example, a reference to "a gene" includes a plurality of such genes, and a reference to "an animal" is a reference to one or more animals, and so forth. Unless defined otherwise, all technical and scientific terms used herein have the same meanings as commonly understood by one of ordinary skill in the art to which this invention belongs. Although any materials and methods similar or equivalent to those described herein can be used to practice or test the present invention, the preferred materials and methods are now described.

In the broadest aspect of the invention there is provided a novel *B. hyodysenteriae* polynucleotide having the nucleotide sequence contained in SEQ ID NOs: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21 and 23 or an amino acid sequence (polypeptide) encoded by these polynucleotides.

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 a mammal or a bird that can be infected with *Brachyspira*, especially *B. hyodysenteriae*. 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. It is appreciated by those skilled in the art that certain *Brachyspira* species are capable of infecting a broad host range (see, for example, Hampson *et al.*, 2006, Emerging Infectious diseases,

Vol. 12(5), p869-870, incorporated herein in its entirety by reference). Accordingly the term “animal” as used herein encompasses a range of animals, but especially pigs and poultry.

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, Ile, 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 to 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 to 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; 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; 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; 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).

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 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 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 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 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.

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% identical to a subject amino acid sequence; 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 of 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 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 homology between the polynucleotides, 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. In certain instances, hybridization and washing conditions are performed under stringent conditions according to conventional hybridization procedures and as described further herein.

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 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.

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. 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.

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 (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 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 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 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 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 as a vector. Viral vectors can either express the proteins of this invention on the 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).

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 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 Ni^{2+} metal resin. The purification leader sequence may then be subsequently removed by treatment with enterokinase to provide the 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 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 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, 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.

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 a polypeptide of the invention. An additional embodiment of the invention utilises the techniques described for the

100



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.

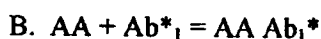
The invention provides methods for detecting the presence of a polypeptide of the invention in a sample, with the following steps: (a) contacting a sample suspected of containing a polypeptide of the invention with an antibody (preferably bound to a solid support) that specifically binds to the polypeptide 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:



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" 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.

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 Ab₂ is that it will react with Ab₁. This reaction is because Ab₁, raised in one mammalian species, has been used in another species as an antigen to raise the antibody, Ab₂. For example, Ab₂ may be raised in goats using rabbit antibodies as antigens. Ab₂ therefore would be anti-rabbit antibody raised in goats. For purposes of

this description and claims, Ab₁ will be referred to as a primary antibody, and Ab₂ will be referred to as a secondary or anti-Ab₁ antibody.

The labels most commonly employed for these studies are radioactive elements, 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, ¹⁴C, ³²P, ³⁵S, ³⁶Cl, ⁵¹Cr, ⁵⁷Co, ⁵⁸Co, ⁵⁹Fe, ⁹⁰Y, ¹²⁵I, ¹³¹I, and ¹⁸⁶Re. The radioactive 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 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 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 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, 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 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 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 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. intermedia*, *B. 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.

It is well appreciated by those skilled in the art there is a high degree of sequence conservation between species of *Brachyspira*. For example, as shown below *B. hyodysenteriae* toxin (H46) and outer membrane protein (H114) have a high degree of similarity between a number of *Brachyspira* species. Cross-species nucleotide similarity for *B. hyodysenteriae* lipase (H46)

<i>Brachyspira</i> species	Similarity at nucleotide level (%)
	H46
<i>Brachyspira hyodysenteriae</i>	100
<i>Brachyspira pilosicoli</i>	81.9
<i>Brachyspira intermedia</i>	95.5
<i>Brachyspira murdochii</i>	85.9
<i>Brachyspira alvinipulli</i>	84.8

Cross-species nucleotide similarity for *B. hyodysenteriae* toxin (H72)

<i>Brachyspira</i> species	Similarity at nucleotide level (%)
	H72
<i>Brachyspira hyodysenteriae</i>	100
<i>Brachyspira pilosicoli</i>	83.3
<i>Brachyspira intermedia</i>	95.0
<i>Brachyspira murdochii</i>	87.3
<i>Brachyspira alvinipulli</i>	85.8

Also as shown in Example 22, the nucleotide and amino acid sequences of the present invention are capable of producing cross-reactivity over a range of *Brachyspira* species not just *B. hyodysenteriae*. Accordingly, polypeptides used in the present invention are capable of use against other species of *Brachyspira* species not just *B. hyodysenteriae*.

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.

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.

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 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).

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, solubilizers, 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. 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, 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 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.).

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, 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.

In a specific embodiment of the invention, a vaccine composition may be a "combination vaccine" with one or more polynucleotide or polypeptide sequences of the invention which have a similar functional role that are combined in a vaccine. For example, the following four different functional groups can be combined as identified in the following tables:

Group: Proteases

Gene	Polynucleotide sequence	Polypeptide sequence
NAV-H197	SEQ ID No.1	SEQ ID No.2
NAV-H188	SEQ ID No.3	SEQ ID No.4
NAV-H185	SEQ ID No.5	SEQ ID No.6
NAV-H179	SEQ ID No.7	SEQ ID No.8

Group: Lipases/Peptidases

Gene	Polynucleotide sequence	Polypeptide sequence
NAV-H191	SEQ ID No.9	SEQ ID No.10
NAV-H186	SEQ ID No.11	SEQ ID No.12
NAV-H184	SEQ ID No.13	SEQ ID No.14
NAV-H46	SEQ ID No.15	SEQ ID No.16

Group: Toxins

Gene	Polynucleotide sequence	Polypeptide sequence
NAV-H177	SEQ ID No.17	SEQ ID No.18
NAV-H72	SEQ ID No.19	SEQ ID No.20
NAV-H66	SEQ ID No.21	SEQ ID No.22
NAV-H40	SEQ ID No.23	SEQ ID No.24

Group: Hemolysins

Gene	Polynucleotide sequence	Polypeptide sequence
NAV-H68	SEQ ID No.25	SEQ ID No.26
NAV-H43	SEQ ID No.27	SEQ ID No.28
NAV-H33	SEQ ID No.29	SEQ ID No.30
NAV-H32	SEQ ID No.31	SEQ ID No.32

A prerequisite for combination vaccines is a lack of competition (i.e. between antigens) and a high compatibility with respect to the subject to be immunized. According to international standard applied in connection with immunization, a combination vaccine should confer a protection which is comparable to that achieved by separate vaccinations. However, the combination of antigens is a complicated process which is associated with a number of problems and uncertainties.

As the individual components of a combination vaccine are not inert substances, the combination of various components into one mixture can negatively influence the immunogenicity of the individual antigenic components. For example, interactions between the different antigens or between the antigens and other components typically used in such vaccines can occur due to differences in charge, chemical residues, detergents, formaldehyde, concentration of ions etc. These changes can occur instantaneously after contacting the different antigens with each other or with other substances usually present in vaccine formulations. Moreover, these changes can also occur with a significant delay after mixing, for example during storage, shipping, etc. However, it cannot be predicted to which extent the immunogenicity of individual antigens may be influenced by mixing them to one combination. As a consequence, a situation can occur in which one or more antigens of the vaccine only confer an insufficient seroprotection against one or more of diseases which renders the product unsuitable for medical practice.

The production of effective combination vaccines is a complex matter which depends on multidimensional interactions between the individual components of the vaccine and does not allow to extrapolate any effect of the components observed when administered separately.

It has been found that the combination vaccines according to the present invention may be combined with one or more further antigens and remain effective and stable.

The term "stable" as used in the context of the present invention means that the combination vaccine formulation can be kept for a period of eight days or more preferably 14 days at room temperature without any substantial loss with respect to immunogenicity and stability of its distinct antigen compounds. In order to enhance stability, stabilizing agents such as saccharose can be added to the vaccine composition. Instead of saccharose or in addition thereto, other stabilizers, e.g. human serum albumin, mannose, trehalose, mannite, or polygeline can also be added as stabilizing agents. The vaccines of the present invention exhibit a pH value of preferably between 5.0 to 8.0, more preferably between 6.0 to 7.0, wherein a pH value of 6.8 to 7.8 is most preferred.

The term "effective" as used herein, refers to the fact that the sequence of the invention upon single or repeated administration to a subject (for example, a mammal) confers protection against a specific disease.

As used herein the term "conferring protection" means that the sequence of the invention, upon administration, induces an immunological response in the vaccinated subject which response is capable to protect said subject from the symptoms of subsequent infection.

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 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.

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 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 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. 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 not limited to *B. hyodysenteriae*, *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, 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. intermedia*, *B. alvinipulli*, *B. aalborgi*, *B. innocens*, *B. murdochii*, and *B. pilosicoli*, may contain the following:

(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.

In one embodiment, the present invention provides simple point-of-care kit that uses principles similar to the widely-used serum testing kits, for the rapid detection of the circulating antibodies in the animal to the polypeptides of the invention will allow the healthcare professional or veterinarian to rapidly diagnose *Brachyspira* infection, and to rapidly institute proven and effective therapeutic and preventive measures. The use of the kit can represent the standard of care for all animals that are

at risk of developing *Brachyspira* infection.

The methods and kits of the present invention can also provide a means for detecting or monitoring *Brachyspira* infection including the change in status. It can be especially useful in detecting early stage *Brachyspira* infection. Thus, the invention also provides a means for a healthcare professional or veterinarian to monitor the progression of *Brachyspira* infection (worsening, improving, or remaining the same) during and following treatment. Typically, the healthcare professional or veterinarian would establish a protocol of collecting and analysing a quantity of biological sample from the animal at selected intervals. Typically the sample is obtained intermittently during a prescribed period. The period of time between intermittent sampling may be dictated by the condition of the animal, and can range from a sample each 24 hours to a sample taken days, weeks or even months apart.

A point-of-care kit for use in the method typically comprises a media having affixed thereto one or more capture polypeptides, whereby the sample is contacted with the media to expose the capture polypeptides to the circulating antibodies contained in the sample. The kit includes an acquiring means that can comprise an implement, such as a needle or vacutainer, having a surface comprising the media. The acquiring means can also comprise a container for accepting the sample, where the container has a serum-contacting surface that comprises the media. In another typical embodiment, the assay for detecting the complex of the circulating antibodies and the capture polypeptides can comprise an ELISA, and can be used to quantitate the amount of circulating antibodies to the polypeptides of the invention in a sample. In an alternative embodiment, the acquiring means can comprise an implement comprising a cassette containing the media.

A method and kit of the present invention for detecting the circulating antibodies to the polypeptides of the invention can be made by adapting the methods and kits known in the art for the rapid detection of other proteins and ligands in a biological sample. Examples of methods and kits that can be adapted to the present invention are described in US Patent 5,656,503, issued to May et al. on August 12, 1997, US Patent 6,500,627, issued to O'Conner et al. on December 31, 2002, US Patent 4,870,007, issued to Smith-Lewis on September 26, 1989, US Patent 5,273,743, issued to Ahlem et al. on December 28, 1993, and US Patent 4,632,901, issued to Valkers et al. on December 30, 1986, all such references being hereby incorporated by reference.

A rapid one-step method of detecting the circulating antibodies to the polypeptides of the present invention can reduce the time for detecting the development of *Brachyspira* infection. A typical method can comprise the steps of: obtaining a sample from an animal at risk of or suspected of having a *Brachyspira* infection; mixing a portion of the sample with one or more detecting polypeptides which specifically bind to one of the circulating antibodies, so as to initiate the binding

of the detecting polypeptides to the circulating antibodies in the sample; contacting the mixture of sample and detecting polypeptides with an immobilized capture antibody which specifically binds to the detecting polypeptides, which capture antibody does not cross-react with the detecting polypeptide, so as to bind the detecting polypeptide to the circulating antibodies, and the circulating antibodies to the capture antibody, to form a detectable complex; removing unbound detecting polypeptide and any unbound sample from the complex; and detecting the detecting polypeptide of the complex. The detectable polypeptide can be labelled with a detectable marker, such as a radioactive label, enzyme, biological dye, magnetic bead, or biotin, as is well known in the art.

The following examples are provided for the purposes of illustration and are not intended to limit the scope of the invention.

EXAMPLE 1: GENOME SEQUENCING

An Australian porcine field isolate of *B. hyodysenteriae* (strain WA1) is shotgun sequenced. This strain has been well-characterised and shown to be virulent following experimental challenge of pigs. The spirochaete is grown in anaerobic trypticase soy broth culture and 100 µg DNA was extracted using a cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) method to prepare high quality chromosomal DNA suitable for preparation of genomic DNA libraries. The genomic DNA is sheared using a GeneMachines Hydroshear, and the fragmented DNA processed for cloning as per the protocol recommended by the suppliers of the pSMART vector system (Lucigen). A small insert (2-3 kb) library and a medium insert (3-10 kb) library are constructed into the low copy version of the pSMART vector.

EXAMPLE 2: ANNOTATION

Partial genome sequences for *B. hyodysenteriae* are assembled and annotated by the Australian Genome Research Facility (AGRF) in Queensland and at Murdoch University by the Centre for Bioinformatics and Biological Computing (CBBC). The CBBC uses up-to-date mirrors of the major international databases and have developed leading edge bioinformatics software and strategies for annotation of features in large genome sequences. A range of public domain bioinformatics tools are used 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 such as 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 has produced 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 virulence factors in other pathogenic bacteria are selected as potential vaccine targets.

EXAMPLE 3: ANALYSIS OF GENE DISTRIBUTION USING PCR

One or two primer pairs which anneal to different regions of the target gene coding region are designed and optimised for PCR detection. Distribution analysis of the *B. hyodysenteriae* target genes is performed on 23 strains of *B. hyodysenteriae*, including two strains which have been shown to be avirulent. Primer sets used in the distribution analysis are shown in Table 1. PCR analysis is performed in a 25 µl total volume using Taq DNA polymerase. The amplification mixture consisted 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 primer pair, and 1 µl purified chromosomal template DNA. Cycling conditions involved an initial template denaturation step of 5 min at 94°C, followed by 30 cycles of denaturation at 94°C for 30 s, annealing at 50°C for 15 s, and primer extension at 72°C for 1 min. The PCR products are subjected to electrophoresis in 1% (w/v) agarose gels in 1x TAE buffer (40 mM Tris-acetate, 1 mM EDTA), stained with a 1 µg/ml ethidium bromide solution and viewed over ultraviolet (UV) light.

TABLE 1
OLIGONUCLEOTIDE PRIMERS USED IN THE PCR DISTRIBUTION ANALYSIS OF THE
B. HYODYSENTERIAE VACCINE CANDIDATE GENES

Gene	Primer name	Primer Sequence (5'-3')	SEQ ID No.
NAV-H32	H32-F4	CATATTTCTGGTGATTCTC	SEQ ID No.33
	H32-R564	TTTTTTGATAAATAAGTTTTTTATTTG	SEQ ID No.34
NAV-H33	H33-F4	TTTAATACTCCTATATTATTAATTATTT	SEQ ID No.35
	H33-R396	AAGGAGAATCACCAGAAA	SEQ ID No.36
NAV-H40	H40-F16	AAATATGCTTCCATTATAGG	SEQ ID No.37
	H40-R1815	ACTTTTAGGAAGAAGTTTAAC	SEQ ID No.38
NAV-H43	H43-F4	GATATAATTATAATAATAGTGTTAATAC	SEQ ID No.39
	H43-R1296	TTCAGTGTCTGAATCATTC	SEQ ID No.40
NAV-H46	H46-F327	TATGATGGGGCATAGTATGG	SEQ ID No.41
	H46-R769	TATCTCCTACAGGGTCTTTCG	SEQ ID No.42
NAV-H66	H66-F17	ATGATAAAGCTTGGGAAGATTATC	SEQ ID No.43
	H66-R255	ATAATGTGTTTTACATCCAAC	SEQ ID No.44
NAV-H68	H68-F53	TTATGCTCTCTGCTTTATTTTCTGG	SEQ ID No.45
	H68-R596	TCTTTTATTATTCCTTCTTTATGCC	SEQ ID No.46
NAV-H72	H72-F128	CTATGGCAGAAAACAAAGTC	SEQ ID No.47
	H72-R614	GCAGATAAAGATAAATCAAGTC	SEQ ID No.48
NAV-H177	H177-F20	AAAGAGCTTGGCAG	SEQ ID No.49
	H177-R258	CTTATCATAATGGTATTTACAAGATG	SEQ ID No.50
NAV-H179	H179-F420	TGCTATTGCTGATGCTACTAC	SEQ ID No.51
	H179-R705	ATTATCTTGATGAGGATGCTTTC	SEQ ID No.52
NAV-H184	H184-F314	TAGATAAAGATGATGATGAAAAAAG	SEQ ID No.53
	H184-R762	AAATAAACCTAAATAAGCACC	SEQ ID No.54
NAV-H185	H185-F294	TGGGTTTAGAATAGGTGCAGG	SEQ ID No.55
	H185-R796	ATTTTAATGTTTGTCTTTTTC	SEQ ID No.56
NAV-H186	H186-F44	TAGAAAAGATGCCTATGCTG	SEQ ID No.57
	H186-R718	TTACAAGAGAAAAATAAACCTG	SEQ ID No.58
NAV-H188	H188-F293	TGGGGAATCATACAAATAGAAG	SEQ ID No.59
	H188-R565	GGCTCATCAAAGGAAGAACC	SEQ ID No.60
NAV-H191	H191-F8	ATAATAAAAAAGAAGAAAAAGAG	SEQ ID No.61
	H191-R403	GTCTGTATCCTAATAAAATAGTATG	SEQ ID No.62
NAV-H197	H197-F39	TCTTGGGCTTACATTTACTTTG	SEQ ID No.63
	H197-R354	TGATTTCTGACTTCTTTTTTG	SEQ ID No.64

EXAMPLE 4: BIOINFORMATICS

Shot-gun sequencing of the *B. hyodysenteriae* genome resulted in 73% (2,347.8 kb out of a predicted 2,300 kb) of the genome to be sequenced. These sequences are comprised of 171 contigs with an average contig size of 13.7 kb. From the 171 contigs, 1,860 open-reading frames (ORFs) are predicted. Comparison of the predicted ORFs with genes present in the nucleic acid and protein databases indicated that approximately 70% in each species have homology with genes contained in the databases. The remaining 30% of the predicted ORFs from each genome have no known identity.

EXAMPLE 5: VACCINE CANDIDATES

ORFs showing strong homology with putative virulence-associated proteins present in the public databases are selected as vaccine targets. Table 2 shows the genes selected as vaccine targets and their similarity with other known genes.

TABLE 2
FUNCTION OF *B. Hyodysenteriae* GENES BASED ON SIMILARITY WITH THE AMINO
ACID SEQUENCE OF SIMILAR BACTERIAL PROTEINS OBTAINED FROM THE SWISS-
PROT DATABASE

Gene	Function	Identity (amino acids)	Similarity (amino acids)
NAV-H32	Hemolysin hemolytic protein (HlpA) of <i>Nostoc</i> sp. Nucleotide seq. SEQ ID No.25 Amino acid seq. SEQ ID No.26	49/137 (35%)	77/137 (56%)
NAV-H33	Hemolysin hemolytic protein of <i>Prevotella intermedia</i> Nucleotide seq. SEQ ID No.27 Amino acid seq. SEQ ID No.28	64/117 (54%)	83/117 (70%)
NAV-H40	Toxin lytic murein transglycosylase (contains LysM/invasin domains) Nucleotide seq. SEQ ID No.19 Amino acid seq. SEQ ID No.20	120/449 (26%)	185/449 (41%)
NAV-H43	Hemolysin hemolysins and related proteins of <i>Anabaena variabilis</i> Nucleotide seq. SEQ ID No.29 Amino acid seq. SEQ ID No.30	150/425 (35%)	242/425 (56%)
NAV-H46	Lipase Lysophospholipase Nucleotide seq. SEQ ID No.15 Amino acid seq. SEQ ID No.16	116/299 (38%)	188/299 (62%)
NAV-H66	Toxin toxin (YoeB) of <i>Escherichia coli</i> Nucleotide seq. SEQ ID No.21 Amino acid seq. SEQ ID No.22	42/85 (58%)	60/85 (76%)
NAV-H68	Hemolysin hemolysin-related protein of <i>Dehalococcoides</i> sp. Nucleotide seq. SEQ ID No.31 Amino acid seq. SEQ ID No.32	121/415 (29%)	204/415 (49%)
NAV-H72	Toxin lytic murein transglycosylate (possibly outer membrane-bound) Nucleotide seq. SEQ ID No.23 Amino acid seq. SEQ ID No.24	51/141 (36%)	6/141 (53%)
NAV-H177	Toxin toxin (YoeB) of <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> Nucleotide seq. SEQ ID No.17 Amino acid seq. SEQ ID No.18	44/86 (51%)	64/86 (74%)
NAV-H179	Protease ATP-dependent ClpX protease Nucleotide seq. SEQ ID No.1 Amino acid seq. SEQ ID No.2	227/388 (58%)	291/388 (75%)
NAV-H184	Peptidase Nucleotide seq. SEQ ID No.9 Amino acid seq. SEQ ID No.10	148/445 (33%)	241/445 (54%)
NAV-	Protease	199/455	289/455 (63%)

H185	membrane associated zinc metalloprotease Nucleotide seq. SEQ ID No.3 Amino acid seq. SEQ ID No.4	(43%)	
NAV-H186	Peptidase Zn-dependent peptidase Nucleotide seq. SEQ ID No.11 Amino acid seq. SEQ ID No.12	132/406 (32%)	234/406 (57%)
NAV-H188	Protease adenylate cyclase Nucleotide seq. SEQ ID No.5 Amino acid seq. SEQ ID No.6	147/509 (28%)	269/509 (52%)
NAV-H191	Lipase Nucleotide seq. SEQ ID No.13 Amino acid seq. SEQ ID No.14	70/223 (31%)	117/223 (52%)
NAV-H197	Protease trypsin-like serine protease Nucleotide seq. SEQ ID No.7 Amino acid seq. SEQ ID No.8	184/445 (41%)	267/445 (60%)

EXAMPLE 6: GENE DISTRIBUTION

The overall gene distribution of each ORF is summarized in Table 3. A total of 23 *B. hyodysenteriae* strains are analysed. The distribution is determined from the cumulative result of PCR using up to two different primer sets. All of the ORFs are present in 87-100% of the *B. hyodysenteriae* strains tested.

TABLE 3
GENE DISTRIBUTION OF THE *B. Hyodysenteriae* VACCINE CANDIDATES ANALYSED
BY PCR USING A PANEL OF 23 DIFFERENT STRAINS

Gene	Distribution (%)
NAV-H32	91
NAV-H33	91
NAV-H40	100
NAV-H43	91
NAV-H46	100
NAV-H66	100
NAV-H68	91
NAV-H72	87
NAV-H177	91
NAV-H179	100
NAV-H184	100
NAV-H185	100
NAV-H186	100
NAV-H188	100
NAV-H191	100
NAV-H197	100

EXAMPLE 7: PLASMID EXTRACTION

Escherichia coli JM109 clones harbouring the pET-19b plasmid (Novagen) 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 h. A single colony is used to inoculate 10 ml of LB broth supplemented with 100 mg/l ampicillin and the broth culture was incubated at 37°C for 12 h with shaking. The entire overnight culture is centrifuged at 5,000 x g for 10 min and the plasmid contained in the cells extracted using the QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. The purified plasmid is quantified using a fluorometer and the DNA concentration adjusted to 100 µg/ml by dilution with TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) buffer. The purified pET-19b plasmid is stored at -20°C.

EXAMPLE 8: VECTOR PREPARATION

Two µg of the purified pET-19b plasmid is digested at 37°C for 1-4 h in a total volume of 50 µl containing 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 100 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 0.1 mg/ml bovine serum albumin (BSA) and 5 U of NdeI and BamHI (Fermentas). The linearised vectors are verified by electrophoresing 1 µl of the digestion reaction through a 1% (w/v) agarose gel in 1x TAE buffer at 90V for 1 h. The electrophoresed DNA is stained with 1 µg/ml ethidium bromide and viewed over UV light.

Linearised pET-19b vectors are purified using the UltraClean PCR Clean-up Kit (Mo Bio Laboratories) according to the manufacturer's instructions. The purified linear vectors are quantified using the NanoDrop ND1000 spectrophotometer and the DNA concentration adjusted to 50 µg/ml by dilution with TE buffer. The linearised vectors are stored at -20°C.

EXAMPLE 9: INSERT PREPARATION - PRIMER DESIGN

Primer pairs are designed to amplify as much of the coding region of the target gene as possible. All primers sequences include terminal restriction enzyme recognition sites to enable cohesive-end ligation of the resultant amplicon into the linearised pET-19b vector. The primer sequences used for cloning are shown in Table 4. The primers are tested using Amplify 3.0 (University of Wisconsin) and the theoretical amplicon sequence is inserted into the appropriate position in the pET-19b vector sequence. Deduced translation of the chimeric pET-19b expression cassette is performed using Vector NTI Advance version 10 (Invitrogen) to confirm that the gene inserts would be in the correct reading frame.

TABLE 4
OLIGONUCLEOTIDE PRIMERS USED IN THE CLONING OF THE *B. Hyodysenteriae*
GENES INTO THE pET-19b VECTOR. THE APPARENT MOLECULAR WEIGHT IS
DETERMINED FROM SDS-PAGE

Gene	Primer name	Primer Sequence (5'-3')	Predicted MW of native protein (Da)	Apparent MW of recombinant protein (kDa)
NAV-H32	H32-F-NdeI	TATGCATATGTCTGGTGATTCTCCTTTAG (SEQ ID No.65)	25,326	20.5
	H32-R-BamHI	TGCGGATCCTTTTTTGATAAATAAG (SEQ ID No.66)		
NAV-H33	H33-F-NdeI	GGAAGATAACATATGTTTAATACTC (SEQ ID No.67)	18,465	13.9
	H33-R-BamHI	TCCTAGGATCCTATCTAAAGGAGAATCACCAG (SEQ ID No.68)		
NAV-H40	H40-F-NdeI	AAATATGCATATGTTATAGGATGCACTTTTGCCTC (SEQ ID No.69)	69,479	61.4
	H40-R-BamHI	CTTTTAGGATCCAGTTTAACAGGATCTATTGATC (SEQ ID No.70)		
NAV-H43	H43-F-NdeI	AATCCATATGGATATAATTATAATAATAGTGTTAATAC (SEQ ID No.71)	51,176	48.4
	H43-R-BamHI	ATCTGGATCCTATTCACTGTCTGAATCATTCTTTTCATC AG (SEQ ID No.72)		
NAV-H46	H46-F-NdeI	CTTCATATGGAAATGCTTAATAGAGTTTAAATATCAG (SEQ ID No.73)	38,153	32.2
	H46-R-BamHI	AATAGGATCCTATATGAGCATTAAAGCAAGCAATTATC (SEQ ID No.74)		
NAV-H66	H66-F-NdeI	ATTTTCATATGATAAAGCTTGGAAGATTATC (SEQ ID No.75)	12,678	10.9
	H66-R-BamHI	AATTGGATCCATAATGTGTTTACATCCAAC (SEQ ID No.76)		
NAV-H68	H68-F-NdeI	ATTACATATGGAAATACTACTAGTTTATTTATTG (SEQ ID No.77)	55,123	50.4
	H68-R-BamHI	CATTGGATCCTGAATCAGATGTCTCTTGATATAT (SEQ ID No.78)		
NAV-H72	H72-F-NdeI	GATACATATGATACAAAGAATACATGCCAGAATAG (SEQ ID No.79)	28,201	24.6
	H72-R-BamHI	ATGTGGATCCCATAGTTTTGAGTTTCCTC (SEQ ID No.80)		
NAV-H177	H177-F-NdeI	GTTTCATATGAAAGAGCTTGGCAG (SEQ ID No.81)	12,997	10.8
	H177-R-BamHI	ATATGGATCCCTTATCATAATGGTATTTACAAGATG (SEQ ID No.82)		
NAV-H179	H179-F-NdeI	TTAACATATGGTTCTCTTTCGCGAAGAG (SEQ ID No.83)	48,109	54.6
	H179-R-BamHI	TTAGGATCCCATCAATACCTAATTTTTCATTAAC (SEQ ID No.84)		
NAV-H184	H184-F-NdeI	TTAACATATGTCAGAGAATAGTTTAAAAATAGAATAA AAG (SEQ ID No.85)	53,101	57.2
	H184-R-BamHI	TTAAGGATCCGAAGCAAATGAAAGTTCTTAATC (SEQ ID No.86)		
NAV-H185	H185-F-NdeI	TTTTTCATATGGCACAACTAATGAATCAGCTATATT (SEQ ID No.87)	58,175	67.8
	H185-R-BamHI	TTAAGGATCCGTTAAGCAGCACCAGAGAATTATAATC (SEQ ID No.88)		
NAV-H186	H186-F-NdeI	CTTACATATGGGAACAAGAGTTGTTTATAGAAAAGATG	49,786	56.1

H186	NdeI	(SEQ ID No.89)		
	H186-R-BamHI	ACTGGGATCCGACTTGCTTATATCCTTAGTACCG (SEQ ID No. 90)		
NAV-H188	H188-F-NdeI	TAATCATATGATGTACAGTCAGGTTATGATAG (SEQ ID No.91)	64,413	68.8
	H188-R-BamHI	ACTGGGATCCTGTACCGACATTCTCTTCAC (SEQ ID No.92)		
NAV-H191	H191-F-NdeI	AAAGCATATGGAAGAAAAAAATCCAAATTGGAAAG (SEQ ID No.93)	36,953	37.8
	H191-R-BamHI	ATACGGATCCAATATATGTTCACTGTCCATAGCCTC (SEQ ID No.94)		
NAV-H197	H197-F-NdeI	CTTTCATATGCTTGGGCTTACATTACTTGGTTGG (SEQ ID No.95)	56,670	66.6
	H197-R-BamHI	ATAAGGATCCCATAAGTCATTCTTGCTCGTTTTATAG (SEQ ID No.96)		

EXAMPLE 10: AMPLIFICATION OF THE GENE INSERTS

All target gene inserts are amplified by PCR in a 100 µl total volume using Taq DNA polymerase and Pfu DNA polymerase. Briefly, the amplification mixture consists of 1X PCR buffer (containing 1.5 mM of MgCl₂), 2 U of Taq DNA polymerase, 0.01 U Pfu DNA polymerase, 0.2 mM of each dNTP, 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 min at 94°C, followed by 30 cycles of denaturation at 94°C for 30 s, annealing at 50°C for 15 s, and primer extension at 72°C for 1 min. The PCR products are subjected to electrophoresis in 1% (w/v) agarose gels in 1x TAE buffer, stained with a 1 µg/ml ethidium bromide solution and 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).

EXAMPLE 11: RESTRICTION ENZYME DIGESTION OF THE GENE INSERTS

Thirty µl of the purified PCR product is digested in a 50 µl total volume with 1 U of NdeI and 1 U of BamHI. The digested insert DNA are purified using the UltraClean PCR Clean-up Kit (Mo Bio Laboratories). Purified digested insert DNA are quantified using the NanoDrop ND1000 spectrophotometer and the DNA concentration adjusted to 10 µg/ml by dilution with TE buffer. The purified restricted insert DNA are used immediately for vector ligation.

EXAMPLE 12: LIGATION OF THE GENE INSERTS INTO THE pET-19B VECTOR

Ligation reactions are all performed in a total volume of 20 µl. Twenty five ng of linearised pTrcHis is incubated with an equi-molar amount of restricted insert at 16°C for 16 h 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 (Fermentas). An identical ligation reaction containing no insert DNA is also included as a vector re-circularisation negative control.

EXAMPLE 13: TRANSFORMATION OF pET-19B LIGATIONS INTO *E. COLI* JM109 CELLS

Competent *E. coli* JM109 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. The tubes are mixed by gently tapping the bottom of each tube on the bench and left on ice for 30 min. The cells are then heat-shocked by placing the tubes into a 42°C waterbath for 45 s before returning the tube to ice for 2 min. The transformed cells are recovered in 1 ml LB broth for 1 h at 37°C with gentle mixing. The recovered cells are harvested at 2,500 x g for 5 min and the cells

resuspended in 50 µl of fresh LB broth. The entire 50 µl of 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 h.

EXAMPLE 14: DETECTION OF RECOMBINANT pET-19b 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 h. A single colony from each transformation event is resuspended in 50 µl of TE buffer and boiled for 1 min. 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 pET-19b-F primer (5'-GGAATTGTGAGCGGATAAC-3') and 0.5 µM of the pET-19b-R primer (5'-GCAAAAACCCCTCAAGAC-3'). Cycling conditions involve an initial template denaturation step of 5 min at 94°C, followed by 30 cycles of denaturation at 94°C for 30 s, annealing at 60°C for 15 s, and a primer extension at 72°C for 1 min. The PCR products are subjected to electrophoresis in 1% (w/v) agarose gels in 1x TAE buffer, stained with a 1 µg/ml ethidium bromide solution and viewed over UV light.

EXAMPLE 15: PURIFICATION OF RECOMBINANT pET-19b PLASMIDS

An *E. coli* JM109 clone harbouring the successfully ligated pET-19b plasmids are inoculated into 5 ml of LB broth supplemented with 100 mg/l ampicillin and the broth culture is incubated at 37°C for 12 h with shaking. The entire overnight culture is centrifuged at 5,000 x g for 10 min and the plasmid contained in the cells extracted using the QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. The purified recombinant pET-19b plasmid is stored at -20°C.

EXAMPLE 16: TRANSFORMATION OF RECOMBINANT pET-19b PLASMIDS INTO *E. COLI* BL21 (DE3) CELLS

Competent *E. coli* BL21 (DE3) cells are thawed from -80°C storage on ice and then 20 µl of the cells are transferred into ice-cold 1.5 ml microfuge tubes containing 1 µl of the recombinant purified pET-19b plasmid. The tubes are mixed by gently tapping the bottom of each tube on the bench and left on ice for 30 min. The cells are then heat-shocked by placing the tubes into a 42°C waterbath for 45 s before returning the tube to ice for 2 min. The transformed cells are recovered in 1 ml LB broth for 1 h at 37°C with gentle mixing. Fifty µl of the recovered 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 h.

EXAMPLE 17: EXPRESSION OF RECOMBINANT HIS-TAGGED PROTEINS

Four isolated colonies of recombinant pET-19b plasmid in *E. coli* BL21 (DE3) is inoculated into 3 ml LB broth in a 10 ml centrifuge tube containing 100 mg/l ampicillin and 1 mM IPTG and incubated at 37°C for 16 h with shaking. The cells are harvested by centrifugation at 5,000 x g for 10 min at 4°C. The supernatant is discarded and each pellet is resuspended with 300 µl of 1 x SDS-PAGE loading 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). After boiling the tube for 5 min, the cellular debris is pelleted by centrifugation at 10,000 x g for 10 min at 4°C. The supernatant is transferred to a new tube and stored at -20°C until analysis.

EXAMPLE 18: SDS-PAGE

SDS-PAGE analysis of protein involved electrophoretic separation using a discontinuous Tris-glycine buffer system. Ten µl of the prepared cell lysate is loaded into the wells of a polyacrylamide gel. The gel is comprised of 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). Samples are run at 150 V at room temperature (RT) until the bromophenol blue dye-front reached 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 or subjected to electro-transfer onto nitrocellulose membrane for Western blotting.

EXAMPLE 19: 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 min. The proteins in the gel are transferred to nitrocellulose membrane using the mini-Protean transblot apparatus (Bio-Rad). After assembly of the gel holder according to the manufacturer's instructions, electrophoretic transfer is performed 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; 20 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, pH 7.5) containing 5% (w/v) skim milk powder for 1 h at RT. The membrane is washed with TBS containing 0.1% (v/v) Tween 20 (TBST) and then incubated with 10

ml mouse anti-his antibody (diluted 5,000-fold with TBST) for 1 h at RT. After washing three times for 5 min with TBST, the membrane is incubated with 10 mL goat anti-mouse IgG (whole molecule)-AP diluted 5,000-fold in TBST for 1 h 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.

EXAMPLE 20: EXPRESSION AND PURIFICATION OF RECOMBINANT HIS-TAGGED PROTEINS

A single colony of the recombinant pET-19b plasmid in *E. coli* BL21 (DE3) is inoculated into 20 ml LB broth in a 50 ml centrifuge tube containing 100 mg/l ampicillin and incubated at 37°C for 16 h with shaking. A 2 l conical flask containing 500 ml 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 h). The culture is then induced by adding IPTG to a final concentration of 1 mM and the cells returned to 37°C with shaking. After 6 h of induction, the culture is transferred to two 250 ml centrifuge bottles and the bottles are centrifuged at 5,000 x g for 10 min at 25°C. The supernatant is discarded and each pellet is resuspended with 4 ml of Ni-NTA native lysis buffer (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 10 mM imidazole, pH 8.0). The resuspended cells are pooled and stored at -20°C overnight.

The cell suspension is removed from -20°C storage and thawed on ice. Five µl of DNase I (10 mg/ml) is added to the thawed lysate and incubated on ice for 1 h. The lysate is centrifuged at 20,000 x g for 15 min at 4°C. The supernatant is transferred to a 10 ml column containing a 1 ml bed volume of Ni-NTA agarose resin (Qiagen). The recombinant his-tagged protein is allowed to bind to the resin for 1 h at 4°C with end-over-end mixing. The resin is then washed with 30 ml of Ni-NTA native wash buffer (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 20 mM imidazole, pH 8.0) before elution with 9 ml of Ni-NTA native elution buffer (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 250 mM imidazole, pH 8.0). Three 3 ml fractions of the eluate are collected and stored at 4°C. Thirty µl of each eluate is treated with 10 µl of 4 x sample treatment buffer and boiled for 5 min. The samples are subjected to SDS-PAGE and stained with Coomassie Brilliant Blue G250. The stained gel is equilibrated in distilled water for 1 h and dried between two sheets of cellulose overnight at RT.

EXAMPLE 21: DIALYSIS AND LYOPHILISATION OF THE PURIFIED RECOMBINANT HIS-TAGGED PROTEIN

The eluted proteins are pooled and transferred into a hydrated dialysis tube 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. 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 freeze-drier 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.

EXAMPLE 22: SEROLOGY USING RECOMBINANT PROTEIN

Ten µg of purified recombinant protein is diluted in 10 ml of carbonate buffer and 100 µl is added to each well of a 96-well microtitre plate. The protein is allowed to coat overnight at 4°C. The plate is blocked with 150 µl of PBS-BSA (1% w/v) in each well for 1 hour at room temperature (RT) with mixing and then washed three times with 150 µl of PBST (0.05% v/v). Pig sera are diluted 1:800 in 100 µl of PBST-BSA (0.1% w/v) and incubated at RT for 2 hours with mixing. Plates are washed before adding 100 µl of goat anti-swine IgG (whole molecule)-HRP diluted 1:5,000 in PBST. After incubating for 1 hr at RT, the plates are washed and 100 µl of TMB substrate added. Colour development is allowed to occur for 10 minutes at RT before being stopped with the addition of 50 µl of 1 M sulphuric acid. The optical density of each well is read at 450 nm. Pooled serum from pigs of different sources and health status were used in this analysis. These included pigs from high health status herds (N1-N3), hyperimmunised pigs (M1-M3), experimentally challenged pigs (H1-H5) and recovered pigs from different herds (H6-H13).

As shown in Tables 5A and 5B, all proteins reacted strongly with serum from the pig hyperimmunised with *B. hyodysenteriae* bacteria (M1; 1.5077 ± 0.1635) and reacted less strongly with serum from pigs hyperimmunised with *B. pilosicoli* (M2; 1.1646 ± 0.1206) and *B. innocens* (M3; 1.2777 ± 0.1626) indicating some level of cross-reactivity with pigs recognising other *Brachyspira* spp.. The proteins reacted weakest with serum taken from high-health status pigs (N1-N3; 0.2087 to 0.4695), followed by experimentally challenged pigs showing acute severe symptoms of SD (H1-H5; 0.4586 to 0.7992), and strongest with pigs which had recovered from SD (H6-H13; 0.8043 to 1.0068). As a whole, these results indicate that all these toxin proteins are immunogenic in naturally and experimentally infected pigs.

TABLE 5A
REACTIVITY OF TOXIN PROTEINS WITH HEALTHY PIG SERUM
AND HYPERIMMUNISED PIG SERUM.

Protein	ELISA Reactivity (absorbance)					
	N1	N2	N3	M1	M2	M3
H32	0.2717	0.3117	0.2952	1.5901	1.3577	1.3059
H33	0.4091	0.2087	0.4378	1.4951	1.1724	1.1682
H40	0.2555	0.4695	0.3649	1.4227	1.0322	1.2454
H43	0.3619	0.4015	0.2229	1.5621	1.1762	1.2901
H46	0.4477	0.4233	0.4080	1.4551	1.0495	1.3666
H66	0.3879	0.3948	0.3532	1.5907	1.1884	1.2712
H68	0.4324	0.3032	0.4305	1.4700	1.3013	1.2538
H72	0.4063	0.3464	0.3994	1.4398	1.1234	1.3686
H177	0.3120	0.2691	0.2416	1.4369	1.0888	1.1734
H184	0.3122	0.4090	0.3337	1.5272	1.1815	1.3018
H186	0.4182	0.2953	0.3807	1.5170	1.0628	1.3069
H191	0.2279	0.4236	0.3064	1.5856	1.2405	1.2804

N1, N2, N3; pooled serum from high-health status pigs; M1; serum from pig hyperimmunised with *B. hyodysenteriae* bacterin; M2; serum from pig hyperimmunised with *B. pilosicoli* bacterin; M3; serum from pig hyperimmunised with *B. innocens* bacterin

TABLE 5B

REACTIVITY OF TOXIN PROTEINS WITH NATURALLY AND EXPERIMENTALLY INFECTED PIG SERUM.

Protein	ELISA Reactivity (absorbance)												
	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12	H13
H32	0.4833	0.6912	0.5262	0.6574	0.7546	0.9813	0.9178	0.9255	0.9175	0.9818	0.8449	0.9348	0.9648
H33	0.5222	0.5676	0.6789	0.7410	0.6260	0.8055	0.9209	0.9399	1.0015	0.9940	0.9935	0.8112	0.9104
H40	0.5420	0.5971	0.7517	0.6687	0.7598	0.9529	0.8589	0.9741	0.9707	0.9547	0.9941	0.8493	0.9247
H43	0.7525	0.7265	0.6551	0.7322	0.6341	0.9296	0.8495	0.9727	0.8595	0.8740	0.8904	0.8561	0.9640
H46	0.5805	0.6675	0.7590	0.4625	0.7028	1.0068	0.8821	0.8777	1.0061	0.8220	0.8861	0.9881	0.9221
H66	0.7491	0.4752	0.5211	0.7666	0.6005	0.9489	0.9014	0.9198	0.9346	0.8687	0.9511	0.8935	0.9807
H68	0.5704	0.4900	0.6527	0.7199	0.6310	0.9498	0.8224	0.8103	0.9700	0.8518	0.9759	0.8348	0.9201
H72	0.7278	0.5590	0.7650	0.6436	0.7045	0.8182	0.8109	0.9585	0.8662	0.9753	0.9535	0.8751	0.8683
H177	0.6225	0.7260	0.6126	0.4586	0.6151	0.8633	0.9477	0.9244	0.8944	0.9351	0.9108	0.9347	0.9111
H184	0.7287	0.7513	0.6898	0.7992	0.7451	0.8312	0.9383	0.8721	0.8894	0.8818	0.9832	0.8301	0.9998
H186	0.5169	0.5928	0.5295	0.7065	0.7003	0.8853	0.9182	0.9092	0.9155	0.9263	0.8836	0.8453	0.8878
H191	0.6753	0.5940	0.6794	0.7840	0.7252	0.8043	0.9727	0.8179	0.8280	0.9880	0.9468	0.9598	0.8049

H1, H2, H3, H4, H5; pooled serum from experimentally infected pigs showing acute severe clinical signs of SD

H6, H7, H8, H9, H10, H11, H12, H13; pooled serum from commercial pigs recovered from SD

EXAMPLE 23: CONSTRUCTION OF THE RECOMBINANT pET-19b CONSTRUCTS

Cloning of the various inserts into the pET-19b expression vector produced recombinant constructs of various sizes. Nucleotide sequencing of the pET-19b constructs verified that the expression cassette is in the correct frame for all the constructs. The predicted translation of the pET-19b expression cassette indicated that all the recombinant his-tagged proteins and the deduced amino acid sequence of the native spirochaete proteins were identical.

EXAMPLE 24: EXPRESSION AND PURIFICATION OF RECOMBINANT PROTEINS

Expression of the selected recombinant *E. coli* clones is performed in medium-scale to generate sufficient recombinant protein for vaccination of mice. All genes cloned produce recombinant proteins possessing the hexa-histidine fusion with an apparent molecular weight similar to the predicted molecular weight of the native protein as shown in Table 4. All recombinant proteins were highly reactive in western blotting using the anti-his antibody. Purification of the his-tagged recombinant proteins is by affinity chromatography under denaturing conditions. SDS-PAGE and Coomassie Blue staining of all recombinant proteins show purification of the proteins.

EXAMPLE 25: VACCINATION OF PIGS USING THE PURIFIED RECOMBINANT HIS-TAGGED PROTEINS

Four purified recombinant his-tagged proteins (0.5 mg of each) were pooled in a total volume of 1 ml. Four vaccines were made:

- a) Haemolysin recombinant consisting of: NAV-H32, NAV-H33, NAV-H43 and NAV-H68;
- b) Toxin recombinant consisting of: NAV-H40, NAV-H66, NAV-H72 and NAV-H177;
- c) Lipase/Peptidase recombinant consisting of NAV-H46, NAV-H184, NAV-H186 and NAV-H191;
- d) Protease recombinant consisting of: NAV-H179, NAV-H185, NAV-H188 and NAV-H197.

Four groups of ten sero-negative pigs (5 weeks old) were injected intramuscularly with 2 ml of vaccine consisting of 2 mg of the pooled antigen emulsified with a water-in-oil adjuvant. The pigs were vaccinated twice intramuscularly into the back of the neck at 5 weeks of age and at 8 weeks of age. All pigs were bled immediately before the first vaccination, immediately before the second vaccination and two weeks after the second vaccination. Serum was collected from the blood and used to measure immune-responsiveness to the proteins contained in the vaccines. Since four proteins are combined in each vaccine, serum from each group of pigs is tested against all four proteins individually. The ELISA was performed the same way as outlined in Example 22.

As shown in Table 6, all pigs responded strongly to the vaccination regime given with antibody levels increasing significantly after the first (11.60-fold-17.69-fold increase; $P < 0.001$) and second (2.41-fold-2.78-fold increase; $P < 0.001$) intramuscular injections. These results clearly demonstrate the immunogenicity of these toxin proteins in pigs and the effectiveness of the vaccination regime in inducing high antibody levels in the pig.

TABLE 6
IMMUNOGENICITY OF TOXIN PROTEINS IN PIGS FOLLOWING INTRAMUSCULAR
VACCINATION. ALL ELISA VALUES ARE EXPRESSED AS MEAN ABSORBANCE $\pm$
STANDARD DEVIATION

Protein	Pre-Vacc.	Pre-Boost		Post-vaccination (2 weeks)	
	ELISA value	ELISA Value	Fold increase	ELISA value	Fold increase
H32	0.0721 $\pm$ 0.0261	1.0371 $\pm$ 0.2187	14.39	2.6219 $\pm$ 0.2817	2.53
H33	0.0598 $\pm$ 0.0283	1.0015 $\pm$ 0.3433	16.75	2.5104 $\pm$ 0.3236	2.51
H40	0.0851 $\pm$ 0.0222	1.0007 $\pm$ 0.2019	11.76	2.5329 $\pm$ 0.3949	2.53
H43	0.0727 $\pm$ 0.0276	1.0419 $\pm$ 0.2801	14.34	2.6357 $\pm$ 0.2240	2.53
H46	0.0642 $\pm$ 0.0216	0.9950 $\pm$ 0.2223	15.51	2.7623 $\pm$ 0.2948	2.78
H66	0.0926 $\pm$ 0.0240	1.0750 $\pm$ 0.2101	11.60	2.6948 $\pm$ 0.2723	2.51
H68	0.0768 $\pm$ 0.0237	1.0454 $\pm$ 0.2731	13.62	2.6750 $\pm$ 0.2824	2.56
H72	0.0708 $\pm$ 0.0268	1.0108 $\pm$ 0.1963	14.27	2.6665 $\pm$ 0.3795	2.64
H177	0.0724 $\pm$ 0.0216	1.0251 $\pm$ 0.2169	14.15	2.6791 $\pm$ 0.2818	2.61
H184	0.0569 $\pm$ 0.0212	0.9983 $\pm$ 0.1978	17.55	2.5985 $\pm$ 0.2409	2.60
H186	0.0676 $\pm$ 0.0225	1.0783 $\pm$ 0.2352	15.96	2.6001 $\pm$ 0.3314	2.41
H191	0.0598 $\pm$ 0.0210	1.0585 $\pm$ 0.2455	17.69	2.6283 $\pm$ 0.3248	2.48

**EXAMPLE 26: PROTECTION OF PIGS BY VACCINATION WITH PURIFIED
RECOMBINANT HIS-TAGGED PROTEINS**

Four purified recombinant his-tagged proteins (0.5 mg of each) are pooled in a total volume of 1 ml. Four vaccines are made:

- a) Hemolysin recombinant consisting of: NAV-H32, NAV-H33, NAV-H43 and NAV-H68;
- b) Toxin recombinant consisting of: NAV-H40, NAV-H66, NAV-H72 and NAV-H177;
- c) Lipase/Peptidase recombinant consisting of NAV-H46, NAV-H184, NAV-H186 and NAV-H191;
- d) Protease recombinant consisting of: NAV-H179, NAV-H185, NAV-H188 and NAV-H197.

Four groups of ten sero-negative pigs (5 weeks old) are injected intramuscularly with 2 ml of vaccine consisting of 2 mg of the pooled antigen emulsified with a water-in-oil adjuvant. A fifth group of ten sero-negative pigs is used as negative controls and are sham vaccinated with PBS emulsified in the adjuvant. All the pigs are vaccinated twice intramuscularly into the back of the neck at 5 weeks of age and at 8 weeks of age. All pigs are challenged with 100 ml of an active *B. hyodysenteriae* culture ($\sim 10^9$ cells/ml) by gastric gavage at ten weeks of age, and the pigs are observed daily for clinical signs of swine dysentery during the experiment (up to six weeks post-challenge) and at post-mortem examination. Twice weekly, all pigs are rectally swabbed for selective bacteriological culture.

CLAIMS:

1. An isolated polynucleotide comprising a nucleotide sequence encoding:
 - a. a toxin molecule selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 17, 19, 21, and 23; and/or
 - b. a lipase and/or peptidase molecule selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 9, 11, 13, and 15; and/or
 - c. a protease molecule selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 1, 3, 5, and 7.
2. An isolated polynucleotide according to claim 1, further comprising a nucleotide sequence encoding:
 - d. a hemolysin molecule selected from the group consisting of SEQ ID NO: 25, 27, 29, and 31.
3. An isolated DNA molecule comprising a sequence that is at least 70%, preferably at least 80%, and more preferably at least 90% homologous to a polynucleotide according to claim 1 or claim 2.
4. An isolated polypeptide comprising the amino acid sequence encoding:
 - a. a toxin molecule selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 18, 20, 22, and 24; and/or
 - b. a lipase and/or peptidase molecule selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 10, 12, 14, and 16; and/or
 - c. a protease molecule selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 2, 4, 6, and 8.
5. An isolated polypeptide according to claim 4, further comprising an amino acid sequence encoding:
 - d. a hemolysin molecule selected from the group consisting of SEQ ID NO: 26, 28, 30, and 32.
6. An isolated polynucleotide comprising a nucleotide sequence which encodes a polypeptide sequence according to claim 4 or claim 5.
7. A plasmid comprising a polynucleotide according to claims 1, 2 or 6, or a DNA molecule according to claim 2.
8. A plasmid according to claim 7, wherein said plasmid is an expression vector.
9. A cell containing a plasmid according to claim 7 or claim 8.
10. An isolated protein comprising a sequence that is at least 70%, preferably at least 80%, and more preferably at least 90% homologous to a polypeptide according to claim 4 or claim 5.

11. An immunogenic composition comprising a plasmid according to claim 7 or claim 8, a polypeptide according to claim 4 or claim 5, a cell according to claim 9 or a protein according to claim 10.
12. A vaccine composition for the prevention of *Brachyspira* infection comprising a plasmid according to claim 7 or claim 8, a polypeptide according to claim 4 or claim 5, a cell according to claim 9 or a protein according to claim 10.
13. A vaccine composition according to claim 12, wherein the *Brachyspira* infection is infection with *Brachyspira hyodysenteriae*.
14. A vaccine composition according to claim 12 or claim 13, wherein the composition comprises at least two of:
 - a. a toxin molecule selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 18, 20, 22, and 24;
 - b. a lipase and/or peptidase molecule selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 10, 12, 14, and 16;
 - c. a protease molecule selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 2, 4, 6, and 8; and
 - d. a hemolysin molecule selected from the group consisting of SEQ ID NO: 26, 28, 30, and 32.
15. A vaccine composition according to any one of claims 12 to 14, wherein the composition comprises at least three of:
 - a. a toxin molecule selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 18, 20, 22, and 24;
 - b. a lipase and/or peptidase molecule selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 10, 12, 14, and 16;
 - c. a protease molecule selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 2, 4, 6, and 8; and
 - d. a hemolysin molecule selected from the group consisting of SEQ ID NO: 26, 28, 30, and 32.
16. A method of diagnosing *Brachyspira* infection comprising:
 - a. providing a sample from an animal suspected of being infected with *Brachyspira*;
 - b. contacting the sample with one or more polypeptides comprising the amino acid sequence selected from the group consisting of 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, and 24,

- c. incubating the sample and polypeptide under conditions which allow for the formation of antibody-antigen complexes; and
- d. determining whether an antibody-antigen complex with one or more polypeptides is formed,

wherein the formation of an antibody-antigen complex indicates the animal is infected with *Brachyspira*.

- 17. A method according to claim 16, wherein the *Brachyspira* infection is infection with *Brachyspira hyodysenteriae*.
- 18. A method according to claim 16 or claim 17, wherein step b further comprises an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO: 26, 28, 30, and 32.
- 19. A kit for diagnosing *Brachyspira* infection comprising one or more polypeptides comprising the amino acid sequence selected from the group consisting of 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, and 24.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/AU2009/000248

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl.

C07K 14/195 (2006.01) C07H 21/04 (2006.01)

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)

SEARCH CONDUCTED: SEE BELOW

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 practicable, search terms used)

Blast search on GenomeQuest of the sequences in the claims

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	WO 2008 / 017636 A2 (NOVARTIS AG and MURDOCH UNIVERSITY) 14 February 2008 See SEQ. ID. NO.s: 25-30, 36-38, 40, 51-54, 58, 61-62; abstract inter alia See claim 7 inter alia	1-13, 16-19 14-15



Further documents are listed in the continuation of Box C



See patent family annex

* Special categories of cited documents:	"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
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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
"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)	"&" document member of the same patent family
"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	

Date of the actual completion of the international search

01 June 2009

Date of mailing of the international search report

09 JUN 2009

Name and mailing address of the ISA/AU

AUSTRALIAN PATENT OFFICE
PO BOX 200, WODEN ACT 2606, AUSTRALIA
E-mail address: pct@ipaustallia.gov.au
Facsimile No. +61 2 6283 7999

Authorized officer

GAVIN THOMPSON
AUSTRALIAN PATENT OFFICE
(ISO 9001 Quality Certified Service)
Telephone No : (02) 6283 2240

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/AU2009/000248

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out 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
2. ☒ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table(s) 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.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/AU2009/000248

This Annex lists the known "A" publication level patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

Patent Document Cited in Search Report	Patent Family Member
WO 2008017636	NONE
Due to data integration issues this family listing may not include 10 digit Australian applications filed since May 2001.	
END OF ANNEX	

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud <Internacional No.

PCT/AU2009/000248

A: CLASIFICACIÓN DEL ASUNTO:

Int. Cl
CO7K 14/195 (2006/01)
CO7H 21/04 (2006/01)

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (IPC sigla en Inglés) o tanto a la clasificación nacional como la IPC

B. CAMPOS BUSCADOS

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido por símbolos de clasificación).

Documentación buscada diferente a la documentación mínima hasta donde esos documentos hayan sido incluidos en los campos buscados.

Bases Electrónicas de datos consultadas durante la búsqueda Internacional (nombre de la base de datos, y de ser posible, términos de búsqueda utilizados).

Búsqueda BLAST en GenomeQuest, de las secuencias en las reivindicaciones.

A. C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS COMO RELEVANTES

Categoría	Cita del documento, con indicación, en su caso, de la sentencia relevante	Pertinente para reclamo No.
	WO 2008 / 017636 A2 (NOVARTIS AG y MURDOCH UNIVERSITY) 14 se Febrero de 2008	
X	Ver SEQ. ID. NO.s : 25-30, 36-38, 40, 51-54, 58, 61-62; resumen entre otros.	1-13, 16-19
Y	Ver reivindicación 7 entre otros	14-15

- [] Documentos adicionales son listados en la continuación del Cuadro C.
[] Ver familia de patentes anexas.

* Categorías especiales de documentos citados:

- "A" documento que define el estado general del artículo que no se considera de particular importancia
- "E" documento anterior, pero publicado después de la fecha de Presentación internacional
- "L" documento que puede provocar dudas sobre la(s) reivindicación(es) de prioridad, o el cual se cita para establecer la fecha de publicación de otra cita u otra razón especial (como se especifica)
- "O" documento que se refiere a una divulgación oral, uso, exposición u otros medios
- "P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional, pero después de la fecha de prioridad reivindicada.
- "T" documento posterior, publicado después de la fecha de Presentación internacional o de prioridad y no en conflicto con la solicitud, pero citados para comprender el principio o la teoría subyacente a la invención
- "X" documento de especial importancia; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implica una actividad inventiva cuando el documento se toma solo
- "Y" documento de especial importancia, la invención reivindicada no puede considerarse que implique actividad inventiva cuando el documento está combinado con uno o más documentos, siendo tal combinación evidente para un experto en la materia.
- "&" documento que pertenece a la misma familia de patentes

Fecha de la terminación real de la búsqueda Internacional
01 de junio de 2009 828.01.2009)

Fecha de envío del informe de búsqueda Internacional
9 de Junio de 2009

Nombre y dirección postal de la ISA / US
Oficina de Patentes Australiana
P.O. Box 200, WODEN ACT 2606, AUSTRALIA
Dirección del correo electrónico: pct@ipaaustralia.gov.au
Fax No. +61 2 6283 7999

Funcionario Autorizado:
GAVIN THOMPSON
OFICINA DE PATENTES DE AUSTRALIA
(ISO 9001 Servicio Certificado de Calidad)
Teléfono No. (02) 6283 2240

INFORME DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud Internacional No.

PCT/AU2009/000248

Casilla No. I Nucleótidos y / o secuencia de aminoácidos (s)
(Continuación de 1.c de la primera hoja).

1. Con respecto a los nucleótidos y / o secuencia de aminoácidos divulgados en la solicitud internacional, la búsqueda Internacional se ha llevado a cabo sobre la base de:
 - a. Clase de material
 - ☒ Un listado de secuencias
 - ☐ Tablas (s) relacionada a el listado de secuencia.
 - b. Formato de material.
 - ☒ En papel
 - ☒ En formato electrónico.
 - c. Tiempo de presentación y entrega.
 - ☐ Contenida en la solicitud Internacional como fue presentada.
 - ☐ Presentada junto con la solicitud Internacional en formato electrónico.
 - ☒ Proporcionado posteriormente a esta Autoridad para los fines de la búsqueda.
2. Además, en caso de que más de una versión o copia de un listado de secuencia y /o tablas (s) correspondientes hayan sido presentadas o entregadas, se debe verificar que la información suministrada en las copias siguientes o adicionales sea la misma de la solicitud presentada, o no vayan más allá de la solicitud, según los estatutos requeridos.
3. Comentarios adicionales:

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Información sobre los miembros de la familia de Patentes

Solicitud Internacional No.

PCT/AU2009/000248

Este Anexo relaciona el conocido nivel de publicación "A" de los miembros de familia de patentes, con relación a los documentos de patentes citados en el arriba mencionado Informe de búsqueda Internacional. La oficina de patentes de Australia no es en ningún caso responsable de estos datos, los cuales son dados únicamente con el fin de proporcionar información.

Documentos de patentes citados en el Informe de Búsqueda.

Miembros de Familia de Patentes.

WO 2008017636 NINGUNO

Debido a problemas de integración de datos de este listado de la familia no puede incluir solicitudes de Australia de 10 dígitos presentadas desde mayo de 2001.

Fin del Anexo.

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 P/78792.PCT	FOR FURTHER ACTION	See item 4 below
International application No. PCT/AU2009/000248	International filing date (<i>day/month/year</i>) 27 February 2009 (27.02.2009)	Priority date (<i>day/month/year</i>) 28 February 2008 (28.02.2008)
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 <i>bis</i> .1(a).																								
2.	This REPORT consists of a total of 5 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: <table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 10%; text-align: center;">☒</td> <td style="width: 30%;">Box No. I</td> <td style="width: 80%;">Basis of the report</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">☐</td> <td>Box No. II</td> <td>Priority</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">☐</td> <td>Box No. III</td> <td>Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">☐</td> <td>Box No. IV</td> <td>Lack of unity of invention</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">☒</td> <td>Box No. V</td> <td>Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">☐</td> <td>Box No. VI</td> <td>Certain documents cited</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">☐</td> <td>Box No. VII</td> <td>Certain defects in the international application</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">☒</td> <td>Box No. VIII</td> <td>Certain observations on the international application</td> </tr> </table>	☒	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
☒	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).																								

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No. +41 22 338 82 70	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="padding: 2px;">Date of issuance of this report 31 August 2010 (31.08.2010)</td> </tr> <tr> <td style="padding: 2px;"> Authorized officer Dorothee Mülhausen e-mail: pt01.pct@wipo.int </td> </tr> </table>	Date of issuance of this report 31 August 2010 (31.08.2010)	Authorized officer Dorothee Mülhausen e-mail: pt01.pct@wipo.int
Date of issuance of this report 31 August 2010 (31.08.2010)			
Authorized officer Dorothee Mülhausen e-mail: pt01.pct@wipo.int			

241
PATENT COOPERATION TREATY

From the:
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

To:

Griffith Hack
Level 19
109 St Georges Terrace
PERTH WA 6000

PCT

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

(PCT Rule 43bis.1)

Date of mailing
(day/month/year) **09 JUN 2009**

Applicant's or agent's file reference
p78792.PCT

FOR FURTHER ACTION
See paragraph 2 below

International application No.
PCT/AU2009/000248

International filing date (day/month/year)
27 February 2009

Priority date (day/month/year)
28 February 2008

International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC
INT. CL.
C07K 14/195 (2006.01) C07H 21/04 (2006.01)

Applicant
MURDOCH UNIVERSITY et al

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 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 AUSTRALIAN PATENT OFFICE PO BOX 200, WODEN ACT 2606, AUSTRALIA E-mail address: pct@ipaaustralia.gov.au Facsimile No. +61 2 6283 7999	Date of completion of this opinion 01 June 2009	Authorized Officer GAVIN THOMPSON AUSTRALIAN PATENT OFFICE (ISO 9001 Quality Certified Service) Telephone No. +61 2 6283 2240
--	---	--

241
**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.

PCT/AU2009/000248

Box No. I Basis of this 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 (under 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, 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(s) 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:

242
WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.

PCT/AU2009/000248

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)	Claims 14-15	YES
	Claims 1-13, 16-19	NO
Inventive step (IS)	Claims None	YES
	Claims 1-19	NO
Industrial applicability (IA)	Claims 1-19	YES
	Claims None	NO

2. Citations and explanations:

NOVELTY (N) Claims 1-13, 16-19

D1: WO 2008 / 017636 A2

It seems that the word "encoding" has rendered claims 1-2 and 4-5 unclear (see 'Box No. VIII Certain observations on the international application') by its unnecessary presence, so these claims have been interpreted by ignoring it so that a statement on novelty and inventive step can be sensibly made.

D1 discloses the same polynucleotide sequences as instant SEQ. ID. NO.s: 21, 23, 27, 29 in its SEQ. ID. NO.s 25, 37, 53, 61 respectively. Also instant SEQ. ID. NO.s 25, 31 and 3 are disclosed in its instant SEQ. ID. NO.s 51, 29 and 27 to the extent of homologies of 90.78 per cent, 87.52 per cent and 81.64 per cent, respectively. This renders claims 1-3 not novel.

D1 discloses the same polypeptide sequences as instant SEQ. ID. NO.s: 4, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32 in its SEQ. ID. NO.s 28, 40, 58, 26, 38, 52, 54, 62, 30. This renders claims 4-5 not novel.

D1 further discloses plasmids comprising the previously indicated polynucleotides, their incorporation into expression vectors (p. 17 l. 16-18), these being put into cells (p. 18 l. 18-20), immunogenic compositions comprising these expression vectors (claim 6) and vaccines based on these expression vectors and cells containing them to treat *Brachyspira hyodysenteriae* (claims 7-8) and diagnosis of *Brachyspira hyodysenteriae* infection and kit thereof (claims 26 and 32). This renders claims 6-13 and 16-19 not novel.

D1 does not disclose vaccines made up from 2 or 3 or more immunogenic polypeptides. Therefore, claims 14-15 are novel when compared with D1.

INVENTIVE STEP (IS) Claims 1-19

Claims 1-13, 16-19 lack an inventive step when compared with D1 as a consequence of their lack of novelty with respect to it.

Claims 14-15 lack an inventive step when compared with D1 as it would be within the routine skills of the skilled person when seeking to produce further vaccines against *Brachyspira hyodysenteriae* infection with 2 or more immunogenic polypeptides rather than just one. No inventive step can be attributed to such an activity. Therefore, claims 14-15 lack an inventive step when compared with D1.

INDUSTRIAL APPLICABILITY (IA) Claims 1-19

While no unified criteria exist for industrial applicability, immunogenic polypeptides and their use in vaccines against *Brachyspira hyodysenteriae* infection recommends industrial applicability.

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:

Claim 1-2 are not clear as it claims polynucleotides "encoding" sequences that are themselves polynucleotides. The word: "encoding" therefore seems unneeded.

Claim 4-5 are not clear as it claims polypeptides "encoding" the following sequences when they do not perform that function; it is polynucleotides that encode polypeptides.

Claim 4-5 are additionally unclear as it posits the polypeptides of the introductory line as encoding the listed polypeptide sequences.

TRTADO DE COOPERACION DE PATENTES

PCT

Informe Internacional Preliminar sobre patentabilidad

(Capítulo 1 del tratado de cooperación de patentes)

(Artículo 44 bis del PCT)

Referencia del archivo del Solicitante o del Agente P78792.PCT

Solicitud Internacional No. PCT/AU2009/000248

PARA ACCIONES POSTERIORES Véase el punto 4 abajo

Fecha de presentación internacional (día/mes/año)

27 de Febrero de 2009 (02/27/2009)

Fecha de Prioridad (día /mes/año)

28 de Febrero de 2008 (02/28/2008)

Clasificación de Patente Internacional (Octava edición a menos que haya una edición mayor indicada)

Ver información relevante en forma PCT/ISA/237

Solicitante

SPIROGENE PTY LTD

1. Este informe Preliminar Internacional sobre Patentabilidad (capítulo I) es expedido por la oficina Internacional en nombre de la Autoridad de Búsqueda Internacional bajo la Norma 44bis.1 (a)
2. Este Informe consta de un total de 5 hojas, incluyendo esta hoja de portada.

En las hojas adjuntas, cualquier referencia a la opinión escrita de la Administración de la búsqueda internacional debe entenderse como una referencia al informe preliminar internacional sobre patentabilidad (Capítulo I) en su lugar.

3. Este informe contiene indicaciones relacionadas a los siguiente puntos:

☒ **Casilla No. I**

bases del Informe

- | | |
|--|--|
| ☐ Casilla No. II | Prioridad |
| ☐ Casilla No. III | No creación de opinión en lo que respecta a la novedad, actividad Inventiva y aplicación Industrial. |
| ☐ Casilla No. IV | Falta de unidad de la invención |
| ☒ Casilla No. V | Declaración motivada de conformidad con el artículo 35 (2) Actividad inventiva o aplicación Industrial; citas y explicaciones Apoyando dicha Declaración |
| ☐ Casilla No. VI | Algunos documentos citados |
| ☐ Casilla No. VII | Algunos defectos en la Solicitud Internacional |
| ☐ Casilla No. VIII | Algunas observaciones sobre la solicitud Internacional |

4. La oficina Internacional comunicara este informe a la oficina designada de acuerdo a la Norma 44 bis.3(c) y 93 bis.1 pero no, salvo cuando el solicitante, formule una solicitud expresa en virtud del artículo, 23 (2), antes de la expiración de 30 meses desde la fecha de Prioridad (Norma 44 bis.2).

Fecha de emisión de este informe
31 DE Agosto de 2010 (08/31/2010)

Oficina Internacional de la OMPI
34, chemin des Colombettes
1211 Ginebra 20, Suiza

Fax No. +41 22 338 82 70

Funcionario Autorizado
DOROTHÉE MÜLHAUSEN
E-mail: pt03.pct@wipo.int

Forma PCT/IB/373 (enero de 2004)

TRATADO DE COOPERACION DE PATENTES**PCT**

Opinión escrita de la Autoridad de Búsqueda Internacional

(Norma 43bis. 1 del PCT)

De:

La Autoridad de Búsqueda Internacional

Para:

GRIFFITH HACK

PISO 19

109 St George Terrace

PERTH WA 6000

Fecha de envío: 09 de Junio de 2009

(Día/mes/año)

Archivo de referencia del Solicitante o del Agente
P78792. PCT

ACCIONES FUTURAS

Véase abajo el parágrafo 2

Solicitud Internacional No.

PCT/AU2009/000248

Fecha de presentación Internacional (día/mes/año)

27 de Febrero de 2009

Fecha de Prioridad (día/mes/año)

28 de Febrero de 2008 (02/28/2008)

Clasificación de Patentes Internacional (IPC) o ambos Clasificación
Nacional e IPC

INT. CL

CO7K 14/195 (2006/01)

CO7H 21/04 (2006/01)

Solicitante

MURDOCH UNIVERSITY et al

1. Esta opinión contiene indicaciones relativas a los siguientes artículos

☒	Casilla No. I	bases del Informe
☐	Casilla No. II	Prioridad

- | | | |
|-------------------------------------|-------------------------|--|
| ☐ | Casilla No. III | No creación de opinión en lo que respecta la novedad, actividad Inventiva y aplicación Industrial. |
| ☐ | Casilla No. IV | Falta de unidad de la invención |
| ☒ | Casilla No. V | Declaración motivada de conformidad con el artículo 35 (2) Actividad inventiva o aplicación Industrial; citas y explicaciones Apoyando dicha Declaración |
| ☐ | Casilla No. VI | Algunos documentos citados |
| ☐ | Casilla No. VII | Algunos defectos en la Solicitud Internacional |
| ☐ | Casilla No. VIII | Algunas observaciones sobre la solicitud Internacional |

2. ACCIONES FUTURAS

Si se hace una solicitud de examen preliminar internacional, esta solicitud será considerada para ser escrita por la("IPEA"), esto no se aplica salvo cuando el solicitante opta por una autoridad distinta de ésta IPEA y el IPEA seleccionado haya notificado a la Oficina Internacional en virtud del artículo 66. 1bis (b) las solicitudes escritas por esta Autoridad internacional Investigativa no será considerada.

Si este concepto esta según lo dispuesto anteriormente considerada como una opinión escrita de la IPEA, el solicitante es invitado a presentar a la IPEA una respuesta por escrito junto a su caso con la correcciones antes de que expiren los 3 meses desde la fecha de envió del formato PCT/ISA/220 o antes de la expiración de 22 meses desde la fecha de prioridad, o lo que expire mas tarde.

Para obtener más opciones, vea el Formulario PCT/ISA/220

3. Para más detalles, véanse las notas relativas al formulario PCT/ISA/220.

Nombre y dirección de correo de ISA
 OFICINA DE PATENTES AUSTRALIANA
 P.O. Box 200, WODEN ACT 2606, AUSTRALIA
 Dirección de correo electrónico: pct@ipaustalia.gov.au
 Fax No. +61 2 6283 7999

Fecha de conclusión de este dictamen
 01 de Junio de 2009 (06/01/2009)

Funcionario autorizado

GAVIN THOMPSON

OFICINA DE PATENTES AUSTRALIANA

(ISO 9001 Servicio de calidad certificado)

Teléfono No. +61 2 6383 2240

Forma PCT/ISA/237 (hoja de cubierta) (Abril de 2007)

OPINION ESCRITA DE LA AUTORIDAD DE BÚSQUEDA INTERNATIONAL

Solicitud Internacional No.
PCT/AU2009/000248

Casilla No. I Base de esta opinión

1. Con respecto al idioma, esta opinión se ha establecido con base en:
 - ☒ La solicitud internacional en el idioma en el que se presentó.
 - ☐ Una traducción de la solicitud internacional al, _____, el cual es el idioma de una traducción aportada para propósitos de la búsqueda internacional (Reglas 12.3 (a) y 23.1 (b)).
 2. ☐ Esta opinión se ha establecido teniendo en cuenta la **rectificación de un error evidente** autorizado por, o notificado a esta Autoridad bajo la Regla 91 (Regla 43bis.1 (a))
 3. Respecto a cualquier secuencia de nucleótidos y/o aminoácidos divulgadas en la solicitud internacional y necesarias para la invención declarada, esta opinión se ha establecido en base de:
 - a. Clase de material.
 - ☒ Una lista de secuencias
 - ☐ Tabla (s) en relación a la lista de secuencias.
 - b. Formato del material
 - ☒ En papel
 - ☒ En formato Electrónico
 - c. Tiempo de presentación / entrega
 - ☐ Contenida en la Solicitud Internacional tal como fue presentada
 - ☐ Presentado junto con la solicitud internacional en formato electrónico.
 - ☒ Proporcionado posteriormente a esta Autoridad para los fines de la Búsqueda.
 4. ☒ Además, en el caso de que más de una versión o copia de una lista de secuencias y/o la tabla correspondiente se haya presentado o proveído, se debe verificar que la información provista en las copias siguientes o adicionales sea la misma de la solicitud presentada, o no vayan más allá de la solicitud, según los estatutos requeridos.
 5. Comentarios adicionales:
-

Forma PCT/ISA/237 (Casilla No. I) (abril de 2007)

Opinión escrita de la Autoridad de búsqueda internacional

Solicitud Internacional No.

PCT/AU2009/000248

Casilla No. V Declaración motivada según la norma 43 bis.1 (a) (I) en lo que respecta a la Novedad, actividad inventiva o aplicación Industrial; citas y explicaciones apoyando tal declaración.

1. Declaración

Novedad (N)	Reivindicaciones	14-15	SI
	Reivindicaciones	1-13,16-19	NO
Actividad Inventiva	Reivindicaciones	Ninguna	SI
	Reivindicaciones	1-19	NO
Aplicabilidad Industrial (IA)	Reivindicaciones	1-19	SI
	Reivindicaciones	1-19	NO
	Reivindicaciones	Ninguna	NO

2. Citas y explicaciones:

NOVEDAD (N) Reivindicaciones 1-13, 16-19

D1: WO 2008 / 017636 A2

Tal parece que la palabra "Codificar" no ha hecho claras las reivindicaciones 1-2 y 4-5 (ver la casilla No. VIII Algunas observaciones sobre la solicitud internacional) por su presencia innecesaria, entonces estas reivindicaciones han sido interpretados haciendo caso omiso de esta, de manera que una declaración sobre la novedad y actividad inventiva puede ser sensible.

D1 Revela la misma secuencia de polinucleótidos como en la siguiente secuencia SEQ.ID.NO.s: 21, 23, 27,29 en su SEQ. ID NO.s 25, 37,53, 61 respectivamente. Así como ejemplo la siguiente SEQ. ID. NO.s 25,31 y 3 se dan a conocer en su ejemplo la SEQ. ID. NO.s 51,29 y 27 para la

extension de los homologos de 90,78 por ciento, 87,52 por ciento y 81,64 por ciento, respectivamente. Esto hace que las reivindicaciones 1-3, no sean novedosas.

DI revela las secuencias polipeptídicas mismo instante SEQ. ID. NO.s: 4, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30,32 en su SEQ. ID. NO.s 28, 40, 58, 26,38, 52, 54, 62,30. Esto hace que las reivindicaciones 4-5 no sean novedosas.

DI Además revela plásmidos que incluyen los polinucleótidos indicados anteriormente, su incorporación a los vectores de expresión (p. 17 1,16-18), que son puestos en las células (p. 18 1,18-20), composiciones inmunogénicas que incluyen estos vectores de expresión (reivindicación 6) y las vacunas basadas en estos vectores de expresión y las células que las contienen para el tratamiento de la *Brachyspira hyodysenteriae* (reclamaciones 7-8) y el diagnóstico de la infección por la *Brachyspira Hyodysenteriae* y un equipo para esta (reivindicaciones de 26 y 32). Esto hace que las reivindicaciones 6-13 16-19 no sean novedosas.

DI no revela vacunas compuestos por 2 o 3 o más polipéptidos inmunogénicas. Por lo tanto, las reivindicaciones 14-15 son nuevas en comparación con DI.

ACTIVIDAD INVENTIVA (IS) Reivindicaciones 1-19

Las Reivindicaciones 1-13, 16-19 carecen de actividad inventiva si se comparan con D1 como consecuencia de su falta de novedad con respecto a esta.

Las Reivindicaciones 14-15 carecen de una actividad inventiva si se compara con D1, ya que está estaría dentro de las habilidades rutinarias del experto cuando se trata de producir futuras vacunas contra la infección por *Brachyspira hyodysenteriae* con 2 o más polipéptidos inmunogénicos en lugar de sólo uno. Ninguna actividad inventiva se puede atribuir a tal actividad. Por lo tanto, las reivindicaciones 14-15 carecen de una actividad inventiva si se compara con D1.

APLICABILIDAD INDUSTRIAL (IA) Reivindicaciones 1-19

Mientras no existan criterios unificados para la aplicación industrial, los polipéptidos inmunogénicos y su uso en las vacunas contra la infección *hyodysenteriae* *Brachyspira* recomienda la aplicación industrial.

**OPINION ESCRITA DE LA AUTORIDAD DE BÚSQUEDA
INTERNACIONAL**

Solicitud Internacional No.

PCT/AU2009/000248

**Casilla No. VIII Algunas observaciones sobre la solicitud
internacional.**

Las siguientes observaciones sobre la claridad de las reivindicaciones, la descripción y planos o el hecho, de si las reivindicaciones están totalmente apoyadas por la descripción, se hacen:

Las Reivindicaciones 1-2 no son claras, ya que estas reivindican que polinucleótidos "codifican" secuencias que son en sí polinucleótidos. La palabra "codifican" por lo tanto parece innecesaria.

Las Reivindicaciones 4-5 no son claras, ya que estas reivindican que los polipéptidos "codifican" las siguientes secuencias, cuando estas no son aquellas que realizan esa función; son los polinucleótidos los que codifican lo polipéptidos.

Adicionalmente las reivindicaciones 4-5, no están claras ya estas ubican a los polipéptidos de primera línea como los que codifican el listado de secuencias de polipéptidos.

Forma PCT/ISA/237 (Casilla No. VIII) (Abril de 2007)

TABLA DE CONTENIDO

Documento	Página
Formulario Solicitud	1
Comprobante de pago de la Tasa por Presentación de la Solicitud	3
Título y Resumen	5
Descripción	6
Reivindicaciones	95
Lista de Secuencias	99
Copia de la Solicitud Internacional	170
Copia del Reporte Internacional de Búsqueda (ISR)	232
Traducción simple del Reporte Internacional de Búsqueda (ISR)	235
Copia del Reporte Preliminar Internacional de Patentabilidad	240
Copia de la Opinión Escrita de la ISA	441
Traducción simple del Reporte Preliminar Internacional de Patentabilidad	244
Traducción simple de la Opinión Escrita de la ISA	246

234



No. 10-118506-00000-0000

Fecha: 2010-09-24 15:04:41 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 253



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 D.C.,
2020

Doctor(a)
BONILLA CASTRO MARTHA
Apoderado(a) y/o Representante de
SPIROGENE PTY LTD

REFERENCIA	Radicación No.	10 118506
	Solicitud internacional	PCT/AU2009/000248
	Fecha inicio fase nacional	28/09/2010
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	

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.

Continúa en la página siguiente...



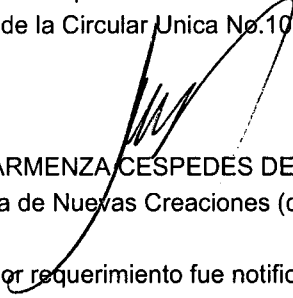
Continuación radicado No: 10 118506

256



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Unica No.10 de 2001.


ALIX CARMENZA CESPEDÉS DE VERGEL
Directora de Nuevas Creaciones (c)

01 OCT. 2010

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha _____
adpa11

Bogotá, D.C., Diciembre de 2010



Señores
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
División de Nuevas Creaciones

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-118506-00002-0000

Ref: Respuesta a requerimiento

Fecha: 2010-12-01 14:19:58 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 444 RESPUESTAREQUE Folios: 7

Número de Expediente: 10-118506

**Patente: NUEVAS SECUENCIAS DE LA
BRACHYSPIRA,
COMPOSICIONES
INMUNOGENICAS, METODOS
PARA LA PREPARACION Y SU
USO**

Fecha Oficio Requerimiento: Octubre 01 de 2010

Oficio Requerimiento No.: 12859

Martha BONILLA CASTRO, mayor de edad, con domicilio en Bogotá D. C., actuando como apoderada de **SPIROGENE PTY LTD**, estando dentro del término legal, doy respuesta al requerimiento de información realizado a la solicitud de la referencia, de la siguiente manera:

Me permito anexar los siguientes documentos:

- Copia Auténtica de la Cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante y Poder, otorgado por el representante legal de la empresa y legalizado de acuerdo a lo dispuesto en los artículos 259 y 260 del Código de Procedimiento Civil.
- Copia Auténtica del Certificado de existencia y representación legal de la sociedad, legalizado de acuerdo a lo dispuesto en los artículos 259 y 260 del Código de Procedimiento Civil.
- Traducción Simple del Certificado de existencia y representación legal de la sociedad, legalizado de acuerdo a lo dispuesto en los artículos 259 y 260 del Código de Procedimiento Civil.

Cordialmente,


Martha BONILLA CASTRO
C.C. 41.566.976
T.P. 41.527

COLOMBIA

TRASPASO, REPRESENTACION Y PODER

Para patentes, modelos de utilidad, diseños industriales, marcas de fábrica, nombres comerciales, enseñas, lemas comerciales, nombres de dominio, derechos de autor y registros sanitarios.

Nosotros, abajo firmados

David J. Hampson
Tom La
Matthew I. Bellgard
Nyree D. Phillips ✓

aquí llamados CEDENTES, propietarios de:

Solicitud de patente PCT/AU2009/000248

declara(n) por el presente instrumento que ceden dicha

A SPIROGENE PTY LTD

sociedad organizada y existente bajo las leyes de

domiciliada en

Building 191, Murdoch University,
South Street, Murdoch WA 6150, Australia

Y representada por

SPIROGENE PTY LTD

domiciliado en

Building 191, Murdoch University, South
Street, Murdoch WA 6150, Australia

(aquí llamado el CESIONARIO)

Por el presente acto, el CESIONARIO acepta dicho traspaso y nombra a ALVARO RAMIREZ BONILLA TP. 118.770., c.c. 79.790.039; MARTHA BONILLA CASTRO, T.P. 41527., c.c. 41.566.976, domiciliados en la Calle 26 4ª-45 Piso 11 Edificio Torre KLM, Bogotá, Colombia, en obediencia a lo dispuesto en el parágrafo 1º de Artículo 543 del Código de Comercio, el primero como principal, el segundo y la tercera como suplente como mis (nuestros) representantes en todos los asuntos de propiedad industrial con facultad para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales. El

ASSIGNMENT REPRESENTATION AND POWER OF ATTORNEY

For patents, utility models, industrial designs, trademarks, commercial names, trade emblems, slogans, domain names, copyrights and health registrations.

We, the undersigned

David J. Hampson
Tom La
Matthew I. Bellgard
Nyree D. Phillips

hereinafter the ASSIGNORS owner of

Colombian Patent Application No.
PCT/AU2009/000248

declares by this document that assigns the mentioned

To SPIROGENE PTY LTD

a corporation organized and existent under the laws of Australia

domiciled in

Building 191, Murdoch University, South Street,
Murdoch WA 6150, Australia

And represented by

SPIROGENE PTY LTD

domiciled in

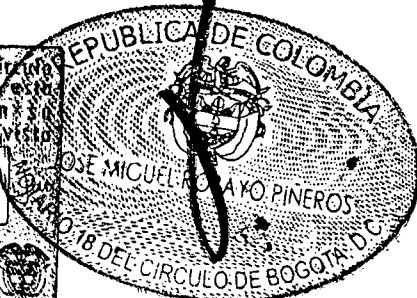
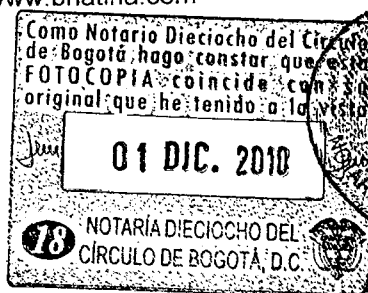
Building 191, Murdoch University, South Street,
Murdoch WA 6150, Australia

(which in this document will be called the ASSIGNEE)

The ASSIGNEE accepts the said assignment and do hereby appoint ALVARO RAMIREZ BONILLA, TP. 118.770, C.C.79.790.039; MARTHA BONILLA CASTRO, T.P. 41527., c.c. 41.566.976, with domicile on Calle 26 4ª-45 Piso 11 Edificio Torre KLM, Bogota, Colombia, in due compliance with the terms of Paragraph 1st. of Article 543 of the Commercial Code, the first as principal, the second and third as alternate, as our representatives for all industrial property matters with faculty to receive notifications and to appoint attorneys in and out of Court. The alternate shall replace the principal in case of his

Calle 26 4A-45 Piso 11 Edificio Torre KLM Bogotá, Colombia. TEL: (57 1) 2863051
www.brlatina.com

2405360_1 (GHMatters)



COLOMBIA

BR

soluciones legales

3
29

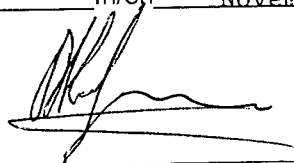
suplente reemplazará al principal en caso de ausencia o impedimento temporal o definitivo de aquél. Si alguno de los nombrados faltare definitivamente, el suplente tomará su lugar. Cuando cesare la ausencia o impedimento del representante principal, o del suplente, en su caso, podrán ejercer la representación, en su orden, uno u otro según el caso, asumiéndola por el solo hecho de ejercerla, cesando en ese momento el ejercicio de la representación por el suplente en su caso. Además, confiero (conferimos) poder a los abogados arriba nombrados, para obtener la protección de mi (nuestra) propiedad intelectual, propiedad industrial y contra la competencia desleal, a cuyo efecto autorizo (amos) a los dichos apoderados para que me (nos) representen ante cualesquiera entidades o personas, ejerzan o no jurisdicción, especialmente ante las del orden administrativo, contencioso-administrativo y judicial, así como los tribunales de arbitramento, en todo lo concerniente a los siguientes asuntos: a) Obtención de patentes de invención, modelos de utilidad y diseños industriales; el registro de marcas de fábrica, colectivas, defensivas, de servicio, lemas comerciales, nombres comerciales, enseñas, nombres de dominio, variedades vegetales y denominaciones de origen; su renovación, traspaso, cambio de nombre o domicilio, cancelación voluntaria; y el registro de licencias de uso de esos derechos; b) Las acciones de competencia desleal, protección del consumidor, oposiciones u observaciones, cancelación administrativa o judicial, nulidad, medidas cautelares, concesión de licencias, la tutela, la protección de secretos industriales, y en general los juicios civiles, penales, administrativos o contencioso-administrativos relacionados con estos derechos; acciones y procesos que promovamos o se nos promuevan. c) Obtención de un número de identificación tributaria y el registro ante la cámara de comercio competente; d) Solicitud de inscripción de obras y demás actos relacionados con derechos de autor ante la Dirección Nacional de Derechos de Autor o la entidad competente. e) Obtención y demás actos relacionados con registros sanitarios ante la autoridad nacional competente. Y para que en todos los asuntos arriba determinados, puedan sustituir este mandato, transigir, conciliar, admitir los hechos del proceso, desistir, cancelar, recibir, renunciar, solicitar la revocatoria y ratificar los actos de agentes oficiosos.

absence or of temporal or definitive impediment. If any of the appointees were to be definitely absent, the alternate shall take his place. When the absence or impediment of the principal representative, or of the alternate in their turn ceases, the representation can be taken again in their sequence, by the principal or the alternate depending on case, and the mere fact or its exercise will suffice. The exercise of the representation by the alternates in their turn shall end at such time. In addition, we grant a Power of Attorney in favour of the above-named attorneys-at-law so that they may obtain the protection of my (our) intellectual property, industrial property and against the unfair competition, for which purpose I (we) authorise the said attorneys to represent me (us) before any authorities or persons, with or without jurisdiction, specially those administrative, administrative contentious and judicial, as well as before Arbitration Court, in all matters concerning the following: a) Obtainment of patents, utility models and industrial designs; the registration of trademarks, collective, defensive and service marks, slogans, commercial names, trade emblems, domain names, vegetal varieties and denominations of origin; its renewal, assignment, change of name or domicile, voluntary cancellation; and the registration of licenses of use of the above rights; b) Actions of unfair competition, protection to the consumer, oppositions or observations, administrative or Court cancellation, nullity, infringement, granting of licenses, the action for writ mandamus, the protection of trade secrets, and in general the civil, penal, and administrative suits relating to those rights; actions and suits instituted by me (us) or against me (us). c) Obtainment of a tax identification number and the register before the competent chamber of commerce; d) Registration and other related acts of copyrights before the competent authority. e) Obtainment and other related acts of health registrations before the competent authority. And that in all the above matters they may substitute this Power of Attorney, compromise, conciliate, admit the facts of the case, desist, cancel, receive, resign, ask for revocation and ratify acts done by representatives without a power of attorney.

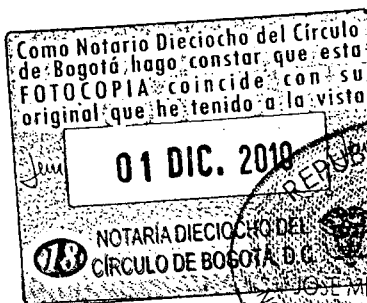
Given and signed this / Dado y firmado

hoy 24th In/en November 2010

Signature/Firma



Cedente/Assignor David J. Hampson



Calle 26 4A-45 Piso 11 Edificio Torre KLM Bogotá, Colombia TEL: (57 1) 2864051
www.brlatina.com

4
260

COLOMBIA

Given and signed this / Dado y firmado

hoy 24th In/en November 2010

Signature/Firma

Cedente/Assignor Tom La

Given and signed this / Dado y firmado

hoy 24th In/en November 2010

Signature/Firma

Cedente/Assignor Matthew I. Bellgard

Given and signed this / Dado y firmado

hoy 24th In/en November 2010

Signature/Firma

Cedente/Assignor Nyree D. Phillips

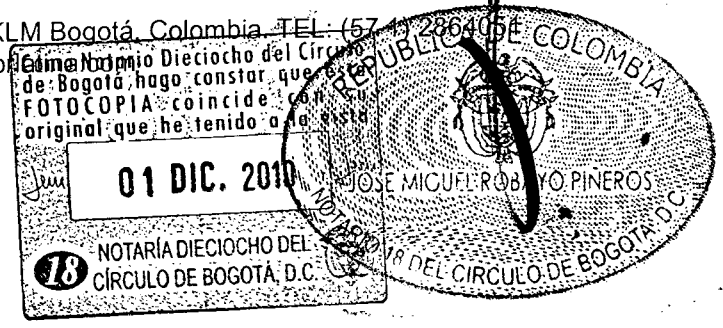
Given and signed this / Dado y firmado

hoy 24th In/en November 2010

Signature/Firma

Cesionario/Assignee

Name: ALISTAIR IAN MURDOCH
Capacity: Chief Executive Officer



5
261

COLOMBIA

CERTIFICACIÓN NOTARIAL

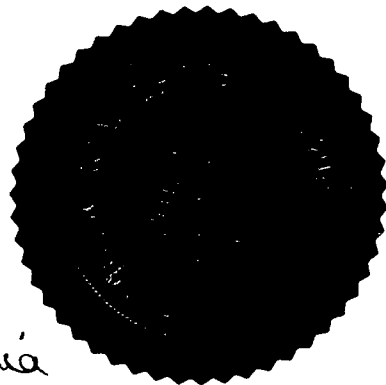
El señor Notario certifica (1) la existencia legal de la compañía que otorga el poder, (2) que ésta ejerce su objeto social, (3) que las personas que otorgan el poder están autorizadas para darlo.

NOTARIAL CERTIFICATION

The notary public certifies (1) the legal existence of the company which grants the Power of Attorney, (2) that it is in actual exercise of its company purposes, and (3) that the persons who execute the Power of Attorney is authorized to do so

I confirm that I have cross referenced the signatures of the Assignors and Assignees against their specimen signatures and the signatures are the same

David Lewis
David Lewis
Notary Public
Perth
Western Australia
24 November 2010



APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

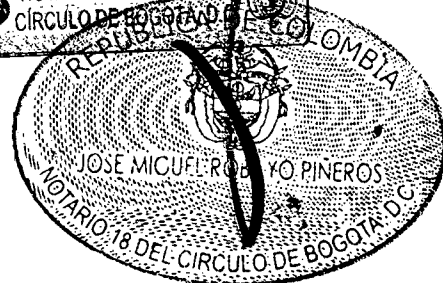
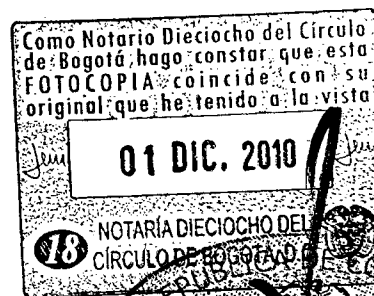
- Country: Australia
- This public document
- has been signed by **DAVID LEWIS**
- acting in the capacity of **NOTARY PUBLIC**
- bears the seal/stamp of **DAVID MORGAN LEWIS NOTARY PUBLIC**

Certified

- at **MELBOURNE** 6. **25-11-2010**
- by **VICKI KEAY**
- No. **MO0054365**
- Seal/Stamp:

10. Signature

Keay



Calle 26 4A-45 Piso 11 Edificio Torre KLM Bogotá, Colombia. TEL: (57 1) 2864051
www.brlatina.com

6
262

GRIFFITH HACK
ANASTASIA KARAKOUSSIS
Level 3
509 St Kilda Road
MELBOURNE VIC 3004

Certificate of the Registration of a Company

Corporations Act 2001 Paragraph 1274 (2) (b)

This is to certify that

SPIROGENE PTY. LTD.

Australian Company Number 126 864 846

is a registered company under the Corporations Act 2001
and is taken to be registered in Western Australia.

The company is **limited by shares**.

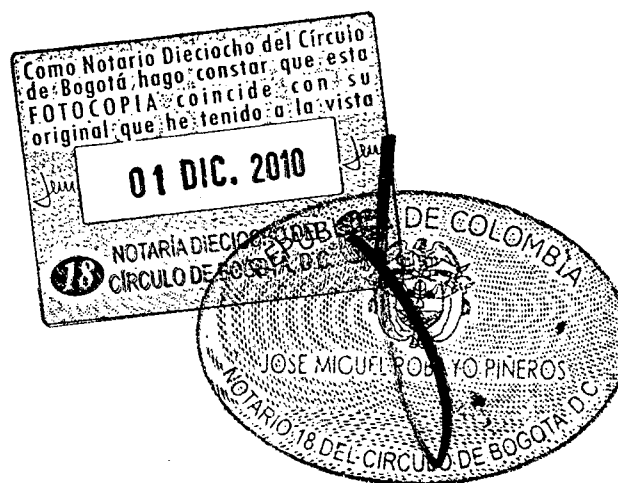
The company is a **proprietary** company.

The day of commencement of registration is
the second day of August 2007.

Issued by the
Australian Securities and Investments Commission
on this eighteenth day of May, 2010.

Micela Mathew

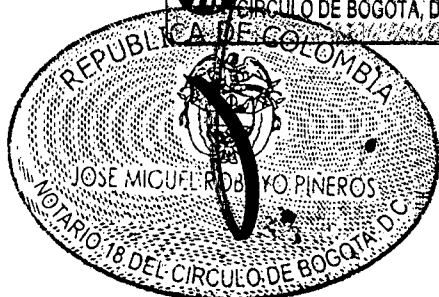
A delegate of the Australian Securities and Investments Commission



Como Notario Dieciocho del Circulo de Bogotá, hago constar que esta FOTOCOPIA coincide con su original que he tenido a la vista

01 DIC. 2010

18 NOTARÍA DIECIOCHO DEL CÍRCULO DE BOGOTÁ, D.C.



APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

Country: Australia

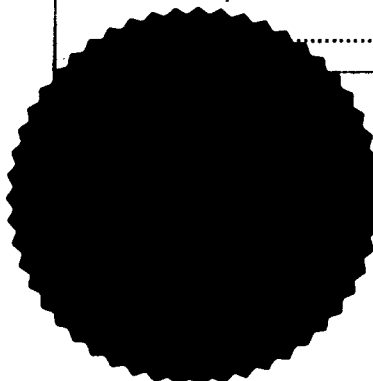
This public document

- has been signed by M. MATTHEWS
- acting in the capacity of AUTHORISED OFFICER
- bears the seal/stamp of AUSTRALIAN SECURITIES AND INVESTMENTS COMMISSION

- Certified
- at MELBOURNE 6. 20/5/2010
 - by ANTHEA KORTLANG
 - No. MOOO47055

9. Seal/Stamp:

10. Signature



GRIFFITH HACK
ANASTASIA KARAKOUSSIS
Piso 3
509 St Kilda Road
MELBOURNE VIC 3004

Certificado de Registro de Empresa

Ley de Sociedades Anónimas de 2001 Parágrafo 1274 (2) (b)

La presente el para certificar que

SPIROGENE PTY. LTD.

Empresa australiana Número 126 864 846

Es una empresa registrada bajo la Ley de Sociedades Anónimas de 2001 y se considera registrada en Australia Occidental.

Es una **Compañía En comandita por acciones**

Es una **empresa propia**

La fecha de inicio del registro es el **segundo día de Agosto de 2007.**

Expedido por la Comisión de Valores
e Inversiones de Australia a los dieciocho días
de Mayo de 2010

(Firma ilegible)

Delegado de la Comisión de Valores
e Inversiones de Australia

2020
Bogotá D.C.,

Doctor(a)
BONILLA CASTRO MARTHA
Apoderado(a) y/o Representante de
SPIROGENE PTY LTD

REFERENCIA	Radicación No.	10 118506
	Solicitud internacional	PCT/AU2009/000248
	Fecha inicio fase nacional	28/09/2010
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	416
	Oficio No.	13180
	Folios	1

Teniendo en cuenta que la solicitud de privilegio de patente que se tramita bajo el expediente indicado en la referencia, reúne los requisitos de forma establecidos en la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, el Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), el Reglamento y la Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se envía el extracto de la solicitud a la Oficina de Comunicaciones para efecto de su publicación en la Gaceta de Propiedad Industrial.

Cúmplase
Dado en Bogotá DC,

10 9 MAYO 2011



JOSE LUIS SALAZAR LOPEZ
Director de Nuevas Creaciones (C)

mcarri

Al contestar favor indique el número
de radicación consignado en el rótulo

Sede Centro: Carrera 13 No. 27-00 pisos 2, 5, 7 y 10 PBX: 5870000
Sede CAN: Av. Carrera 50 No. 26 - 55 int.2. Tel 5880070
Call Center 6513240. Línea 01800-910165
Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co
Bogotá D.C. Colombia