

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2005-532804

(P2005-532804A)

(43) 公表日 平成17年11月4日(2005.11.4)

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)	
<b>C 1 2 N 15/09</b>	C 1 2 N 15/00	Z N A A	4 B O 2 4
<b>A 6 1 K 39/02</b>	A 6 1 K 39/02		4 B O 6 5
<b>A 6 1 K 39/108</b>	A 6 1 K 39/108		4 C O 8 5
<b>A 6 1 K 39/112</b>	A 6 1 K 39/112		4 H O 4 5
<b>A 6 1 K 39/12</b>	A 6 1 K 39/12		
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 35 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号	特願2004-520623 (P2004-520623)	(71) 出願人	394010986
(86) (22) 出願日	平成15年7月11日 (2003. 7. 11)		アクゾ・ノベル・エヌ・ベー
(85) 翻訳文提出日	平成17年3月7日 (2005. 3. 7)		オランダ国、6824・ベー・エム・アー
(86) 国際出願番号	PCT/EP2003/007611		ネム、フエルペルウエヒ・76
(87) 国際公開番号	W02004/007726	(74) 代理人	100062007
(87) 国際公開日	平成16年1月22日 (2004. 1. 22)		弁理士 川口 義雄
(31) 優先権主張番号	02077882.5	(74) 代理人	100114188
(32) 優先日	平成14年7月17日 (2002. 7. 17)		弁理士 小野 誠
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)	(74) 代理人	100103920
			弁理士 大崎 勝真
		(74) 代理人	100124855
			弁理士 坪倉 道明

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ブラキスピラ・ヒオジセンテリアエワクチン

## (57) 【要約】

本発明は、61kD及び20kDのBrachyspirahyodysenteriaeリポタンパク質をコードする核酸配列及びそのようなりポタンパク質の免疫原性フラグメントをコードするそのような核酸配列の部分、及びそのような核酸配列又はそのような部分を含むDNAフラグメント、組換えDNA分子、生組換え担体及び宿主細胞に関する。本発明はまた、そのような配列によってコードされる61kD及び20kDのBrachyspirahyodysenteriaeリポタンパク質及びその免疫原性部分に関する。さらに、本発明は、そのような核酸配列及びその部分、そのような核酸配列又はそのような部分を含むDNAフラグメント、組換えDNA分子、生組換え担体及び宿主細胞、リポタンパク質又はその免疫原性部分及びそのようなりポタンパク質又はその免疫原性部分に対する抗体を含有するワクチンに関する。また、本発明は、ワクチン中での及びワクチンの製造のための、前記リポタンパク質の使用に関する。さらに、本発明は、診断又はワクチン接種のための前記核酸配列、リポタンパク質又は抗体の使用に関する。最後に本発明は、そのような核酸、リポタンパク質又はそのようなりポタンパク質に対する抗体を含む診断キットに関する。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

配列番号 1 に記載の *Brachyspira hyodysenteriae* リポタンパク質遺伝子の核酸配列と少なくとも 70% の同一性を有する、61 kD の *Brachyspira hyodysenteriae* リポタンパク質をコードする核酸配列又は前記リポタンパク質の免疫原性フラグメントをコードする前記核酸配列の部分。

## 【請求項 2】

配列番号 1 に記載の *Brachyspira hyodysenteriae* リポタンパク質遺伝子の核酸配列と少なくとも 80%、好ましくは 90%、より好ましくは 95% の同一性を有することを特徴とする、請求項 1 に記載の核酸配列又はその部分。

10

## 【請求項 3】

配列番号 3 に記載の *Brachyspira hyodysenteriae* リポタンパク質遺伝子の核酸配列と少なくとも 70% の同一性を有する、20 kD の *Brachyspira hyodysenteriae* リポタンパク質をコードする核酸配列又は前記リポタンパク質の免疫原性フラグメントをコードする前記核酸配列の部分。

## 【請求項 4】

配列番号 3 に記載の *Brachyspira hyodysenteriae* リポタンパク質遺伝子の核酸配列と少なくとも 80%、好ましくは 90%、より好ましくは 95% の同一性を有することを特徴とする、請求項 3 に記載の核酸配列又はその部分。

## 【請求項 5】

請求項 1 から 4 の記載の核酸配列を含む DNA フラグメント。

20

## 【請求項 6】

機能的に連結されたプロモーターの制御下で、請求項 1 から 4 に記載の核酸配列又は請求項 5 に記載の DNA フラグメントを含む組換え DNA 分子。

## 【請求項 7】

請求項 1 から 4 に記載の核酸配列、請求項 5 に記載の DNA フラグメント又は請求項 6 に記載の組換え DNA 分子を含む生組換え担体。

## 【請求項 8】

請求項 1 から 4 に記載の核酸配列、請求項 5 に記載の DNA フラグメント、請求項 6 に記載の組換え DNA 分子又は請求項 7 に記載の生組換え担体を含む宿主細胞。

30

## 【請求項 9】

配列番号 2 に記載のアミノ酸配列と少なくとも 70% のアミノ酸配列同一性を有する、61 kD の *Brachyspira hyodysenteriae* リポタンパク質又は前記リポタンパク質の免疫原性フラグメント。

## 【請求項 10】

配列番号 2 に記載のアミノ酸配列と少なくとも 80%、好ましくは 90%、より好ましくは 95% のアミノ酸配列同一性を有する、請求項 9 に記載の、61 kD の *Brachyspira hyodysenteriae* リポタンパク質又は前記リポタンパク質の免疫原性フラグメント。

## 【請求項 11】

請求項 1 又は 2 に記載の核酸配列によってコードされることを特徴とする、61 kD の *Brachyspira hyodysenteriae* リポタンパク質又はその免疫原性フラグメント。

40

## 【請求項 12】

配列番号 4 に記載のアミノ酸配列と少なくとも 70% のアミノ酸配列同一性を有する、20 kD の *Brachyspira hyodysenteriae* リポタンパク質又は前記リポタンパク質の免疫原性フラグメント。

## 【請求項 13】

配列番号 4 に記載のアミノ酸配列と少なくとも 80%、好ましくは 90%、より好ましくは 95% のアミノ酸配列同一性を有する、請求項 12 に記載の、20 kD の *Brach*

50

*Brachyspirahyodysentertiae* リポタンパク質又は前記リポタンパク質の免疫原性フラグメント。

【請求項14】

請求項3又は4に記載の核酸配列によってコードされることを特徴とする、20kDの*Brachyspirahyodysentertiae* リポタンパク質又はその免疫原性フラグメント。

【請求項15】

ワクチンにおける使用のための、請求項9から11に記載の、61kDの*Brachyspirahyodysentertiae* リポタンパク質又はその免疫原性フラグメント。

【請求項16】

ワクチンにおける使用のための、請求項12から14に記載の、20kDの*Brachyspirahyodysentertiae* リポタンパク質又はその免疫原性フラグメント。

【請求項17】

*Brachyspirahyodysentertiae* 感染を制御するためのワクチンの製造のための、請求項1から4に記載の核酸配列、請求項5に記載のDNAフラグメント、請求項6に記載の組換えDNA分子、請求項7に記載の生組換え担体、請求項8に記載の宿主細胞又は請求項9から14に記載のリポタンパク質又はその免疫原性フラグメントの使用。

【請求項18】

請求項1から4に記載の核酸配列、請求項5に記載のDNAフラグメント、請求項6に記載の組換えDNA分子、請求項7に記載の生組換え担体、請求項8に記載の宿主細胞又は請求項9から14に記載のリポタンパク質又はその免疫原性フラグメント、及び医薬適合性の担体を含むことを特徴とする、*Brachyspirahyodysentertiae* 感染を制御するためのワクチン。

【請求項19】

請求項9から14に記載のリポタンパク質又は前記リポタンパク質の免疫原性フラグメント、及び医薬適合性の担体を含むことを特徴とする、*Brachyspirahyodysentertiae* 感染を制御するためのワクチン。

【請求項20】

アジュバントを含むことを特徴とする、請求項19に記載のワクチン。

【請求項21】

ブタに対して病原性のウイルス又は微生物に由来する付加的な抗原、そのような抗原に対する抗体又は前記抗原をコードする遺伝情報を含むことを特徴とする、請求項19又は20に記載のワクチン。

【請求項22】

前記のブタに対して病原性のウイルス又は微生物が、仮性狂犬病ウイルス、ブタインフルエンザウイルス、ブタパルボウイルス、ブタ伝染性胃腸炎ウイルス、ロタウイルス、大腸菌 (*Escherichia coli*)、ブタ丹毒菌 (*Erysipelothrix rhusiopathiae*)、気管支敗血症菌 (*Bordetella bronchiseptica*)、ブタコレラ菌 (*Salmonella choleraesuis*)、*Haemophilus parasuis*、*Pasteurella multocida*、*Streptococcus suis*、*Mycoplasma hyopneumoniae* 及び *Actinobacillus pleuropneumoniae* の群から選択されることを特徴とする、請求項21に記載のワクチン。

【請求項23】

請求項1から4に記載の核酸配列、請求項5に記載のDNAフラグメント、請求項6に記載の組換えDNA分子、請求項7に記載の生組換え担体、請求項8に記載の宿主細胞、請求項9から14に記載のリポタンパク質又は請求項9から14に記載のリポタンパク質

10

20

30

40

50

に対する抗体、及び医薬適合性の担体を混合することを含む、請求項 18 - 22 に記載のワクチンの製造のための方法。

【請求項 24】

適切な検出手段及び請求項 1 から 4 に記載の核酸配列又はそのプライマー、又は請求項 9 から 14 に記載のリポタンパク質又はその免疫原性フラグメント、又は請求項 9 から 14 に記載のリポタンパク質と反応性である抗体を含む診断キット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、*Brachyospira hyodysenteriae* リポタンパク質をコードする核酸配列及びそのようなリポタンパク質の免疫原性フラグメントをコードするそのような核酸配列の部分、及びそのような核酸配列又はそのような核酸配列のそのような部分を含む DNA フラグメント、組換え DNA 分子、生組換え担体及び宿主細胞に関する。本発明はまた、そのような配列によってコードされる *Brachyospira hyodysenteriae* リポタンパク質及びその免疫原性部分に関する。さらに、本発明は、そのような核酸配列及びその部分、そのような核酸配列又はそのような核酸配列のそのような部分を含む DNA フラグメント、組換え DNA 分子、生組換え担体及び宿主細胞、リポタンパク質又はその免疫原性部分、及びそのようなリポタンパク質又はその免疫原性部分に対する抗体を含有するワクチンに関する。また、本発明は、ワクチンにおける及びワクチンの製造のための前記リポタンパク質の使用に関する。さらに、本発明は、診断又はワクチン接種を目的とする前記核酸配列、リポタンパク質又は抗体の使用に関する。最後に本発明は、そのような核酸、リポタンパク質又はそのようなリポタンパク質に対する抗体を含む診断キットに関する。

【背景技術】

【0002】

*Brachyospira hyodysenteriae* は、強い溶血性である、嫌気性、酸素耐性、グラム陰性スピロヘータである。過去には、*Brachyospira hyodysenteriae* は *Treponema hyodysenteriae* 及び *Serpulina hyodysenteriae* としても知られた。離乳後のブタの粘液出血性下痢疾患であるブタの赤痢の起因菌である。この細菌によるブタの感染は抗菌剤で抑制することができる。しかし、最近では動物試料における抗生物質の使用が制限されていることから、抗菌剤の使用に代るものとしてワクチン抗原候補物質の特定が急がれている。

【0003】

ブタの赤痢 (SD) は離乳後のブタの粘液出血性下痢疾患である。SD は世界的に重大の経済的影響を及ぼす。症状の重症度は個体間及び群れの間で様々である。感染の最初の徴候は、黄色から灰色の軟便、食欲不振及び一部の動物では高い直腸温度を含む。これに続いて、便が血液の斑点及び粘液栓を含み始める。疾患が進行すると共に、水様便となり、長期的な下痢は脱水によって死を導くこともある。*B. hyodysenteriae* を含む便が感受性のあるブタに摂取され、その後菌は胃の酸性条件の通過に耐えて生存し、大腸に達する。実験での証拠は、この細菌が粘膜に対する走化性応答を有しており、それによって結腸粘膜へと誘導されて、結腸陰窩に侵入することを示唆している。大腸はブタにおける水及び電解質吸収の主要部位である；大腸への損傷は、それゆえ、結腸吸収不全と脱水を生じさせる。

【0004】

SD の診断は、臨床徴候、群れの履歴及び選択培地での *B. hyodysenteriae* の単離に基づく。*B. hyodysenteriae* は、増殖が遅いこと、及び試料の保存や輸送の劣悪さによって増悪される問題である、嫌気性条件の必要性のために、しばしば単離が困難である。単離が可能なときでも、単離物の生化学試験は、*B. hyodysenteriae* と非病原性腸内スピロヘータ、*B. innocens* を識別するこ

とができない。ブタ又は適切な動物モデル（マウス、モルモット及びニワトリなど）における腸病原性試験の費用と時間のかかる性質は、定期的診断のためのこのアプローチをあらかじめ排除してしまう。

【0005】

*B. hyodysenteriae*のいくつかのビルレンス因子が特定され、ブタの赤痢の病因におけるそれらの役割が検討されている。例えば、*B. hyodysenteriae*による結腸の初期コロニー形成は、粘膜へのその走化性応答によって促進される（Kennedy, M. J., D. K. Rosnick, R. G. Ulrich及びR. J. Yancey. 1988, *J. Gen. Microbiol.* 134: 1565 - 1576）。（Kennedy, M. J.とR. J. Yancey. 1996, *Vet. Microbiol.* 49: 21 - 30）。 10

【0006】

走化性の重要性は、二重鞭毛突然変異体がマウスモデルにおいて著しく弱毒化されることを示した、Rosey（Rosey, E. L., M. J. Kennedy及びR. J. Yancey, Jr. 1996, *Infect. Immun.* 64: 4154 - 4162）によって明らかにされた。

【0007】

ひとたびブタ盲腸のコロニー形成が確立されれば、NADHオキシダーゼが*Brachyspira*を酸素毒性から保護すると思われる。（Stanton, T. B.とN. S. Jense. 1993, *J. Bacteriol.* 175: 2980 - 2987）。（Stanton, T. B.とR. Sellwood. 1999, *Anaerobe* 5: 539 - 546）。この仮説は、NADHオキシダーゼ突然変異体はブタ盲腸のコロニー形成の低下を示すという所見によって裏付けられる。慢性感染ブタの病理学的検査で明らかな盲腸病変を*B. hyodysenteriae*溶血素含有抽出物の投与によって誘発することができる。最初に、3個の異なる推定上の溶血素遺伝子、*tlyA*、*tlyB*及び*tlyC*がクローン化され、配列決定された（Muir, S., M. B. Koopman, S. J. Libby, L. A. Joens, F. Heffron及びJ. G. Kusters. 1992, *Infect. Immun.* 60: 529 - 535）。（ter Huurne, A. A., S. Muir, M. van Houten, B. A. van der Zeijst, W. Gaastra及びJ. G. Kusters. 1994, *Microb. Pathog.* 16: 269 - 282）。Hsuらによる最近の報告は、*tly*遺伝子が実際に溶血素をコードするのかどうかに関して疑問を投げかけ、もう1つ別の遺伝子*hlyA*を溶血素産生に関係づけた（Hsu, T., D. L. Hutto, F. C. Minion, R. L. Zuerner及びM. J. Wannemuehler. 2001, *Infect. Immun.* 69: 706 - 711）。 20 30

【0008】

防御免疫応答を誘発する抗原についての検索において、*B. hyodysenteriae*の外膜に局在するいくつかのタンパク質が特定された。プロテイナーゼK感受性の16 kDa抗原が外膜に局在した。その後この抗原をコードする遺伝子、*smpA*がクローン化され、インピボでは発現されることが認められた（Thomas, W., R. Sellwood及びR. J. Lyons. 1992, *Infect. Immun.* 60: 3111 - 3116）。（Sellwood, R., F. Walton, W. Thomas, M. R. Burrows及びJ. Chesham. 1995, *Vet. Microbiol.* 44: 25 - 35）。細胞質外39 kDa抗原、Vsp39は、表面ヨウ素化によって*B. hyodysenteriae*の主要表面成分として特定された（Gabe, J. D., R. E. Chang, R. J. Slomiany, W. H. Andrews及びM. T. McCaman. 1995, *Infect. Immun.* 63: 142 - 148）。Vsp39をコードする遺伝子はクローン化されていないが、83 - 90%の同一性を有する39 kDaタンパク質をコードする一連の関連縦列パラログス遺伝子が特定された（Gabe, J. D., E. Dragon, R. J. Chang及びM. T. McC 40 50

aman, 1998, Identification of a linked set of genes in *Serpulina hyodysenteriae* (B204) predicted to encode closely related 39-kilodalton extracytoplasmic proteins. *J. Bacteriol.* 180: 444-448). (McCaman, M. T., K. Auer, W. Foley 及び J. D. Gabe, 1999, *Vet. Microbiol.* 68: 273-283)。推定上の30kDaリポタンパク質、BmpBは、回復期のブタ血清と反応することが認められた。しかしながら、このタンパク質についてのさらなるデータは公表されていない (Lee, B. J., T. La, A. S. Mikosza 及び D. J. Hampson, 2000, *Vet. Microbiol.* 76: 245-257)。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

それ故、新しい有効なワクチン、特に広い防御を提供するワクチンが求められていることは明らかである。

【0010】

*Brachyspira hyodysenteriae* 感染を制御するための新規ワクチンを提供することが本発明の目的である。

【課題を解決するための手段】

【0011】

今や驚くべきことに、新規表面発現細菌リポタンパク質をコードすると思われる、2個の新規遺伝子が発見された。これらのリポタンパク質、BlpBとBlpCは、*Brachyspira hyodysenteriae* 感染を制御するためのワクチンにおいて、単独で及び特に互いの組合せで、適切なワクチン成分であることが判明する。今や両方の遺伝子がクローン化され、配列決定された。それらの配列を配列番号1 (BlpB) 及び配列番号3 (BlpC) に示す。最初のORF、blpBは、61kDの分子量を有する537アミノ酸のリポタンパク質をコードする (配列番号2に示す)。第二のORF、blpCは、20kDの分子量を有する179アミノ酸のリポタンパク質をコードする (配列番号4に示す)。

【発明を実施するための最良の形態】

【0012】

多くの異なる核酸配列が全く同一のタンパク質をコードしうることは当技術分野において周知である。この現象は一般に、アミノ酸をコードする各々のトリプレットの第二及び特に第三塩基のゆらぎとして知られる。この現象は、まだ同じタンパク質をコードする2個の核酸配列について約30%の非相同性をもたらしうる。それ故、約70%の配列相同性を有する2個の核酸配列は、まだ同一のタンパク質をコードすることがありうる。

【0013】

そこで、1つの実施態様は、配列番号1に記載の*Brachyspira hyodysenteriae* リポタンパク質遺伝子の核酸配列と少なくとも70%の相同性を有する、61kDの*Brachyspira hyodysenteriae* リポタンパク質をコードする核酸配列又は前記リポタンパク質の免疫原性フラグメントをコードする前記核酸配列の部分に関する。

【0014】

61の分子量は、ポリアクリルアミドゲルでのゲル電気泳動において決定される。当技術分野でしばしば遭遇する分子量決定のわずかな変動性の故に、前記分子量は56から66kDの間で変化しうる。それ故、本発明に従ったリポタンパク質の分子量は61 +/- 5kDと解釈されるべきである。

【0015】

好ましくは、この61*Brachyspira hyodysenteriae* リポタ

ンパク質をコードする本発明に従った核酸配列又は前記リポタンパク質の免疫原性フラグメントをコードする前記核酸配列の部分は、配列番号1に記載の *Brachyspirahyodysentertiae* リポタンパク質遺伝子の核酸配列と少なくとも80%、好ましくは90%、より好ましくは95%の同一性を有する。

【0016】

98%、99%又はさらに100%の同一性レベルがより一層好ましい。

【0017】

ヌクレオチド同一性のレベルは、[www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/bl2.html](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/bl2.html) に認められるサブプログラム「BLASTN」を選択することにより、コンピュータプログラム「BLAST 2 SEQUENCES」で決定することができる。

【0018】

このプログラムについての参考文献は、Tatiana A. Tatusova, Thomas L. Madden FEMS Microbiol. Letters 174: 247-250 (1999) である。使用するパラメータはデフォルトパラメータである：

マッチについてのリワード：+1。ミスマッチについてのペナルティ：-2。オープンギャップ：5。伸長ギャップ：2。ギャップ×\_ドロップオフ：50。

【0019】

もう1つの実施態様は、配列番号3に記載の *Brachyspirahyodysentertiae* リポタンパク質遺伝子の核酸配列と少なくとも70%の同一性を有する、20kDの *Brachyspirahyodysentertiae* リポタンパク質をコードする核酸配列又は前記リポタンパク質の免疫原性フラグメントをコードする前記核酸配列の部分に関する。

【0020】

20kDの分子量は、ポリアクリルアミドゲルでのゲル電気泳動において決定される。当技術分野でしばしば遭遇する分子量決定のわずかな変動性の故に、前記分子量は15から25kDの間で変化しうる。それ故、本発明に従ったリポタンパク質の分子量は20+/-5kDと解釈されるべきである。

【0021】

好ましくは、この20kD *Brachyspirahyodysentertiae* リポタンパク質をコードする本発明に従った核酸配列又は前記リポタンパク質の免疫原性フラグメントをコードする前記核酸配列の部分は、配列番号3に記載の *Brachyspirahyodysentertiae* リポタンパク質遺伝子の核酸配列と少なくとも80%、好ましくは90%、より好ましくは95%の同一性を有する。

【0022】

98%、99%又はさらに100%の同一性レベルがより一層好ましい。

【0023】

配列番号1又は配列番号3に記載の配列に相補的なヌクレオチド配列又は本発明に従った配列の縦列を含むヌクレオチド配列も本発明の範囲内である。

【0024】

本発明は、新規61kD及び20kD *Brachyspirahyodysentertiae* リポタンパク質をコードする核酸配列を開示するので、今や初めて、これらのタンパク質を十分な量で入手することが可能となる。これは、例えば、前記タンパク質又はその免疫原性フラグメントをコードする遺伝子の全体又は部分を発現する発現系を用いることによって実施しうる。

【0025】

それ故、この実施態様のより好ましい形態では、本発明は、本発明に従った核酸配列を含むDNAフラグメントに関する。DNAフラグメントは、本発明に従った核酸配列のための担体として機能する一続きのヌクレオチドである。そのようなDNAフラグメントは

10

20

30

40

50

、例えば、本発明に従った核酸配列がその中にクローン化されたプラスミドでありうる。そのようなDNAフラグメントは、例えば、下記で述べるように、プライマーとして使用するため及び本発明に従った核酸配列の発現のためのDNAの量を高めるために有用である。

【0026】

核酸配列の発現のための基本的必要条件は、その核酸配列がプロモーターの制御下にあるように、核酸配列に機能的に連結された適切なプロモーターである。プロモーターの選択が、タンパク質発現のための宿主細胞として使用される細胞において遺伝子の転写を指令することができるあらゆる真核生物、原核生物又はウイルスプロモーターに及ぶことは当業者には明白である。

10

【0027】

それ故、この実施態様のさらに一層好ましい形態は、本発明に従った核酸配列が機能的に連結されたプロモーターの制御下に置かれている、本発明に従ったDNAフラグメント及び/又は核酸配列を含む組換えDNA分子に関する。これは、例えば標準分子生物学手法によって入手できる(Maniatis/Sambrook (Sambrook, J. Molecular cloning: a laboratory manual, 1989. ISBN 0-87969-309-6))。

【0028】

機能的に連結されたプロモーターとは、それらが連結されている核酸配列の転写を制御することができるプロモーターである。そのようなプロモーターは、そのプロモーターが発現のために使用される細胞において機能性であることを条件として、Brachyspiraの新規遺伝子の天然プロモーター又はもう1つ別のプロモーターでありうる。また、異種プロモーターであってもよい。宿主細胞が細菌であるとき、使用しうる有用な発現制御配列は、Trpプロモーター及びオペレーター(Goeddelら、Nucl. Acids Res., 8, 4057, 1980); lacプロモーター及びオペレーター(Changら、Nature, 275, 615, 1978); 外膜タンパク質プロモーター(Nakamura, K.とInouge, M., EMBO J., 1, 771-775, 1982); バクテリオファージプロモーター及びオペレーター(Remaut, E.ら、Nucl. Acids Res., 11, 4677-4688, 1983); アミラーゼ(枯草菌(B. subtilis))プロモーター及びオペレーター、終結配列及び選択宿主細胞と適合性である他の発現促進及び制御配列を含む。

20

30

【0029】

宿主細胞が酵母であるとき、有用な発現制御配列は、例えば接合因子を含む。昆虫細胞については、バキュロウイルスのポリヘドリン又はp10プロモーターが使用できる(Smith, G. E.ら、Mol. Cell. Biol. 3, 2156-65, 1983)。宿主細胞が脊椎動物由来であるとき、有用な発現制御配列の例は、(ヒト)サイトメガロウイルス前初期プロモーター(Seed, B.ら、Nature 329, 840-842, 1987; Fynan, E. F.ら、PNAS 90, 11478-11482, 1993; Ulmer, J. B.ら、Science 259, 1745-1748, 1993)、ラウス肉腫ウイルスLTR(RSV、Gorman, C. M.ら、PNAS 79, 6777-6781, 1982; Fynanら、前出; Ulmerら、前出)、MPSV LTR(Staceyら、J. Virology 50, 725-732, 1984)、SV40前初期プロモーター(Sprague J.ら、J. Virology 45, 773, 1983)、SV40プロモーター(Berman, P. W.ら、Science, 222, 524-527, 1983)、メタロチオネインプロモーター(Brinster, R. L.ら、Nature 296, 39-42, 1982)、熱ショックプロモーター(Voellmyら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 4949-53, 1985)、Ad2の主要後期プロモーター及びアクチンプロモーター(Tangら、Nature 356, 152-154, 1992)を含む。調節配列はまた、ターミネーター及びポリアデニル化配列を含みうる。使用できる配列

40

50

の中には、周知のウシ成長ホルモンポリアデニル化配列、SV40ポリアデニル化配列、ヒトサイトメガロウイルス(hCMV)ターミネーター及びポリアデニル化配列がある。

【0030】

細菌、酵母、真菌、昆虫及び脊椎動物発現系は非常に頻繁に使用される系である。そのような系は当技術分野において周知であって、一般に入手可能であり、例えばClontech Laboratories, Inc. 4030 Fabian Way, Palo Alto, California 94303-4607, USAを通して市販されている。これらの発現系に次いで、寄生生物に基づく発現系が魅力的な発現系である。そのような系は、例えばフランス特許出願公開第2714074号及び米国特許出願公開NTIS第US08/043109号(Hoffman, S.とRogers, W.: 1993年12月1日公開)に述べられている。

10

【0031】

本発明のこの実施態様のさらに一層好ましい形態は、本発明に従った61kD及び/又は20kD Brachyspira hyodysenteriaeリポタンパク質又はその免疫原性フラグメントをコードする核酸配列、本発明に従ったDNAフラグメント又は本発明に従った組換えDNA分子を含む生組換え担体(LRC)に関する。これらのLRCは、その中に付加的な遺伝情報、この場合は本発明に従った61kD及び/又は20kD Brachyspira hyodysenteriaeリポタンパク質又はその免疫原性フラグメントをコードする核酸配列がクローン化されている微生物又はウイルスである。そのようなLRCに感染したブタは、その担体の免疫原に対してのみならず、それについての遺伝暗号が前記LRC内に付加的にクローン化されているタンパク質の免疫原性部分、例えば本発明に従った新規61kD及び/又は20kD Brachyspira hyodysenteriaeリポタンパク質遺伝子に対しても免疫応答を生じる。

20

【0032】

細菌LRCの一例として、当技術分野で既知の弱毒化サルモネラ(Salmonella)菌株が非常に魅力的に使用できる。

【0033】

また、生組換え担体寄生生物は、中でも、Vermeulen, A.N. (Int. J. Journ. Parasitol. 28: 1121-1130 (1998))によって記述されている。

30

【0034】

さらに、LRCウイルスは、核酸配列を標的細胞内に輸送する手段として使用しうる。生組換え担体ウイルスはベクターウイルスとも呼ばれる。ベクターとしてしばしば使用されるウイルスは、ワクシニアウイルス(Panicaliら; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79: 4927 (1982)、ヘルペスウイルス(欧州特許出願第0473210A2号)及びレトロウイルス(Valerio, D.ら; Baum, S.J., Dicke, K.A., Lotzova, E.及びPluznik, D.H. (編集)、Experimental Haematology today - 1988. Springer Verlag, New York: p. 92-99 (1989))である。

40

【0035】

当技術分野で周知の、インビボでの相同的組換えの手法を使用して、宿主動物において本発明に従った挿入核酸配列の発現を誘導することができる、選択細菌、寄生生物又はウイルスのゲノム内に組換え核酸配列を導入することができる。

【0036】

最後に、本発明のこの実施態様のもう1つの形態は、本発明の従ったタンパク質をコードする核酸配列、そのような核酸配列を含むDNAフラグメント又は機能的に連結されたプロモーターの制御下のそのような核酸配列を含む組換えDNA分子を含む宿主細胞に関する。この形態はまた、本発明に従った61kD及び/又は20kD Brachysp

50

*ira hyodysenteria* eリポタンパク質又はその免疫原性フラグメントをコードする核酸分子を含む生組換え担体を含む宿主細胞に関する。

【0037】

宿主細胞は、pBR322などの細菌ベースのプラスミド又はpGEXなどの細菌発現ベクター又はバクテリオファージと組み合わせた、細菌由来の細胞、例えば大腸菌、枯草菌及び*Lactobacillus*種でありうる。宿主細胞はまた、真核生物由来、例えば酵母特異的ベクター分子と組み合わせた酵母細胞、又はベクター又は組換えバキュロウイルスと組み合わせた昆虫細胞のような高等真核細胞(Luckowら; *Bio-technology* 6:47-55(1988))、例えばTi-プラスミドに基づくベクター又は植物ウイルスベクターと組み合わせた植物細胞(Barton, K.A.ら; *Cell* 32:1033(1983))、やはり適切なベクター又は組換えウイルスと組み合わせた、HeLa細胞、チャイニーズハムスター卵巣細胞(CHO)又はCrandellネコ腎臓細胞のような哺乳類細胞でありうる。

10

【0038】

本発明のもう1つの実施態様は、本発明に従った新規61kD及び/又は20kD *Brachyspira hyodysenteria* eリポタンパク質及びその免疫原性フラグメントに関する。

【0039】

免疫原性フラグメントの概念は下記で定義する。

【0040】

この実施態様の1つの形態は、配列番号2に記載のアミノ酸配列と少なくとも70%のアミノ酸配列相同性を有する、61kDの*Brachyspira hyodysenteria* eリポタンパク質及びその免疫原性フラグメントに関する。

20

【0041】

好ましい形態では、この実施態様は、配列番号2に記載のアミノ酸配列と少なくとも80%の配列相同性、好ましくは90%、より好ましくは95%の相同性を有する、そのような*Brachyspira* リポタンパク質及びその免疫原性フラグメントに関する。

【0042】

98%、99%又はさらに100%の相同性レベルがより一層好ましい。

【0043】

この実施態様のもう1つの形態は、配列番号4に記載のアミノ酸配列と少なくとも70%のアミノ酸配列相同性を有する、20kDの*Brachyspira hyodysenteria* eリポタンパク質及びその免疫原性フラグメントに関する。

30

【0044】

好ましい形態では、この実施態様は、配列番号4に記載のアミノ酸配列と少なくとも80%の配列相同性、好ましくは90%、より好ましくは95%の相同性を有する、そのような*Brachyspira* リポタンパク質及びその免疫原性フラグメントに関する。

【0045】

98%、99%又はさらに100%の相同性レベルがより一層好ましい。

【0046】

この実施態様のもう1つの形態は、本発明に従った核酸配列によってコードされる61kD及び/又は20kDの*Brachyspira hyodysenteria* eリポタンパク質及び前記タンパク質の免疫原性フラグメントに関する。

40

【0047】

タンパク質相同性のレベルは、[www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/bl2.html](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/bl2.html)に認められるサブプログラム「BLASTP」を選択することにより、コンピュータプログラム「BLAST 2 SEQUENCES」で決定することができる。

【0048】

このプログラムについての参考文献は、Tatiana A. Tatusova, Th

50

omas L. Madden FEMS Microbiol. Letters 174 : 247 - 250 (1999)である。使用する行列：「blossum62」。使用するパラメータはデフォルトパラメータである：

オープンギャップ：11。伸長ギャップ：1。ギャップx\_\_ドロップオフ：50。

【0049】

ここに包含される個々のタンパク質に関して、個々のBrachyspira菌株の間で自然の変異が存在しうることが了解される。これらの変異は、全体配列中のアミノ酸の相違によって又は前記配列中のアミノ酸の欠失、置換、挿入、逆位又は付加によって明らかにされう。生物学的及び免疫学的活性を基本的に変化させないアミノ酸置換は、「The Proteins」Academic Press New York (1979)の中でNeurathらによって述べられている。関連アミノ酸の間でのアミノ酸置換又は進化の過程でしばしば発生した置換は、中でも特に、Ser/Ala、Ser/Gly、Asp/Gly、Asp/Asn、Ile/Val (Dayhof, M.D., Atlas of protein sequence and structure, Nat. Biomed. Res. Found., Washington D.C., 1978、第5巻、補遺3参照)である。他のアミノ酸置換は、Asp/Glu、Thr/Ser、Ala/Gly、Ala/Thr、Ser/Asn、Ala/Val、Thr/Phe、Ala/Pro、Lys/Arg、Leu/Ile、Leu/Val及びAla/Gluを含む。この情報に基づき、LipmanとPearsonは、迅速で感受性のあるタンパク質比較 (Science, 227, 1435 - 1441, 1985) 及び相同タンパク質の間での機能的類似性を決定するための方法を開発した。本発明の例示的实施態様のそのようなアミノ酸置換、ならびに欠失及び/又は挿入を有する変異は、生じるタンパク質がそれらの免疫反応性を保持している限り、本発明の範囲内である。これは、なぜ本発明に従ったBrachyspiraリポタンパク質が、異なる圃場単離物から単離したとき、まだ同じ免疫学的特徴を備えた同じタンパク質でありながら、約70%の相同性レベルを有する場合があるかを説明する。

【0050】

まだBrachyspira hyodysenteriaeによる感染に対して又は少なくとも前記感染の臨床症状に対して免疫応答を誘導することができるタンパク質を提供する、本発明に従ったある種のタンパク質のアミノ酸配列におけるそれらの変異は、「本質的に免疫原性に影響を及ぼさない」とみなされる。

【0051】

タンパク質を、例えばワクチン接種のため又は抗体を惹起するために使用するとき、必ずしもタンパク質全体を使用する必要はない。それ自体で又は例えばKLHなどの担体に結合して、そのタンパク質に対する免疫応答を誘導することができるそのタンパク質のフラグメント、いわゆる免疫原性フラグメントを使用することも可能である。「免疫原性フラグメント」は、脊椎動物宿主において免疫応答を誘導するその能力をまだ保持する完全長タンパク質のフラグメントと理解され、例えばB又はT細胞エピトープを含む。簡単に言えば、免疫原性フラグメントは、本発明に従った61又は20 Brachyspira hyodysenteriaeリポタンパク質に対する抗原応答を誘導することができるフラグメントである。現在、抗原性フラグメント(決定基)をコードするDNAフラグメントを容易に特定するための様々な手法が使用可能である。Geysenら(国際公開広報第WO84/03564号、国際公開広報第WO86/06487号、米国特許第4,833,092号、Proc. Natl. Acad. Sci. 81:3998-4002 (1984)、J. Imm. Meth. 102, 259-274 (1987))が述べた方法、いわゆるPEPSCAN法は、免疫学的に重要なタンパク質の領域である、エピトープの検出のための実施しやすく、迅速で、広く確立された方法である。この方法は世界中で使用されており、それ自体が当業者に周知である。この(経験的)方法は、B細胞エピトープの検出に特に適する。また、何らかのタンパク質をコードする遺伝子の配列を与えると、コンピュータアルゴリズムは、現在既知であるエピトープとのそれらの配列

10

20

30

40

50

及び/又は構造上の一致に基づいて特定タンパク質フラグメントを免疫学的に重要なエピトープとして指定することができる。これらの領域の決定は、HoppとWoods (Proc. Natl. Acad. Sci. 78: 38248-3828 (1981)) に従った親水性基準と、ChouとFasman (Advances in Enzymology 47: 45-148 (1987)) 及び米国特許第4,554,101号) に従った二次構造局面の組合せに基づく。T細胞エピトープは、同様にBerzofskyの両親媒性基準 (Science 235, 1059-1062 (1987)) 及び米国特許出願NTIS第US07/005,885号) を用いてコンピュータによってその配列から予測することができる。簡潔な概要は：一般的原理に関してはShan Lu; Tibbtech 9: 238-242 (1991)、マラリアエピトープに関してはGoodら、Science 235: 1059-1062 (1987)、総説についてはLu; Vaccine 10: 3-7 (1992)、HIVエピトープに関してはBerzofsky; The FASEB Journal 5: 2412-2418 (1991) に認められる。免疫原性フラグメントは、通常、8アミノ酸の最小長、好ましくは9、10、12、15又はさらに20アミノ酸などの9アミノ酸以上の最小長を有する。それ故、そのようなフラグメントをコードする核酸配列は少なくとも24核酸の長さ、好ましくは27、30、36、45又はさらに60核酸の長さを有する。

#### 【0052】

それ故、本発明のさらにもう1つの実施態様の1つの形態は、医薬適合性の担体と共に、上述したような本発明に従った61kD及び/又は20kDのBrachyspira hyodysenteriaeタンパク質又はその免疫原性フラグメントを含む、Brachyspira hyodysenteriae感染を制御するためのワクチンに関する。

#### 【0053】

本発明のさらにもう1つの実施態様は、ワクチンにおける使用のための、本発明に従った61kD及び/又は20kDのBrachyspira hyodysenteriaeタンパク質又はその免疫原性フラグメントに関する。

#### 【0054】

本発明のさらにもう1つの実施態様は、Brachyspira hyodysenteriae感染を制御するためのワクチンの製造のための、本発明に従った核酸配列、DNAフラグメント、組換えDNA分子、生組換え担体、宿主細胞あるいはリポタンパク質又はその免疫原性フラグメントの使用に関する。

#### 【0055】

本発明に従ったワクチンを製造する1つの方法は、細菌を増殖させ、次にその細菌から61kD及び/又は20kDのBrachyspira hyodysenteriaeリポタンパク質又はその免疫原性フラグメントを生化学的に精製することによる。これは、しかしながら、非常に時間のかかるワクチン製造方法である。

#### 【0056】

それ故、ワクチンにおいて61kD及び/又は20kDのBrachyspira hyodysenteriaeタンパク質又はその免疫原性フラグメントをコードする遺伝子の発現産物を使用することははるかに簡便である。61kD及び20kDリポタンパク質をコードする遺伝子の核酸配列が本発明において提供されるので、これが今や初めて可能となる。

#### 【0057】

これらの遺伝子の発現産物に基づくワクチンは、下記に述べるように、本発明に従ったタンパク質又は本発明に従ったその免疫原性フラグメントを医薬適合性の担体と混合することによって容易に製造できる。

#### 【0058】

あるいは、本発明に従ったワクチンは、本発明に従ったタンパク質又はその免疫原性フラグメントを発現することができる、上述したような生組換え担体を含みうる。例えばサ

ルモネラ菌担体又はウイルス担体、例えばヘルペスウイルスベクターに基づくそのようなワクチンは、サブユニットワクチンに比べて、*Brachyspira hyodysenteriae*の自然の感染方法をより良好に模倣するという利点を有する。さらに、それらの自己増殖は、免疫のためにごく少量の組換え担体しか必要としないので、好都合である。

【0059】

ワクチンはまた、本発明に従ったタンパク質又はその免疫原性フラグメントを含む、上述したような宿主細胞に基づきうる。

【0060】

上述したすべてのワクチンが能動ワクチン接種に寄与する、すなわち宿主の防御系の引き金となる。

【0061】

あるいは、例えばウサギにおいて抗体を惹起するか又は上述したような抗体産生細胞系から抗体を入手することができる。そのような抗体を、その後、ブタに投与することができる。このワクチン接種方法、受動ワクチン接種法は、動物が既に感染していて、自然の免疫応答を開始させるための時間がないときの選択ワクチン接種法である。また、突然高い感染圧にかかりやすい動物にワクチン接種するための好ましい方法でもある。投与された本発明に従ったタンパク質又はその免疫原性フラグメントに対する抗体は、これらの場合は、直接*Brachyspira hyodysenteriae*に結合することができる。これは、*Brachyspira hyodysenteriae*の増殖を低下又は停止させるという利点を有する。

【0062】

それ故、本発明のこの実施態様の1つの形態は、本発明に従った*Brachyspira hyodysenteriae*タンパク質又は前記タンパク質の免疫原性フラグメントに対する抗体、及び医薬適合性の担体を含む、*Brachyspira hyodysenteriae*感染を制御するためのワクチンに関する。

【0063】

本発明のさらにもう1つの実施態様は、本発明に従った*Brachyspira hyodysenteriae*タンパク質又は前記タンパク質の免疫原性フラグメントに対する抗体に関する。

【0064】

本発明に従った抗体の大量生産のための方法も当技術分野において既知である。そのような方法は、ファージディスプレイのための線維状ファージにおける、本発明に従ったタンパク質をコードする遺伝情報(のフラグメント)のクローニングに基づく。そのような手法は、中でも特に、<http://axim1.imt.uni-marburg.de/~rek/aepphage.html>の「線維状ファージディスプレイ」の中の「Antibody Engineering Page」において、及びCortese, R.ら(1994) Trends Biotechnol. 12: 262-267、Clackson, T.とWells, J.A.(1994) Trends Biotechnol. 12: 173-183、Marks, J.D.ら(1992) J. Biol. Chem. 267: 16007-16010、Winter, G.ら(1994) Annu. Rev. Immunol. 12: 433-455、及びLittle, M.ら(1994) Biotechnol. Adv. 12: 539-555による総説論文の中で述べられている。前記ファージは、その後、カメルイド(camelid)重鎖抗体を発現するカメルイド発現ライブラリーをスクリーニングするために使用される。(Muyldermans, S.とLauwereys, M., Journ. Molec. Recogn. 12: 131-140(1999)及びGhahroudi, M.A.ら、FEBS Letters 414: 512-526(1997))。所望抗体を発現するライブラリーからの細胞を複製し、その後抗体の大規模発現のために使用することができる。

【0065】

10

20

30

40

50

さらにもう1つの実施態様は、本発明に従った抗体と医薬適合性の担体を混合することを含む、本発明に従ったワクチンの製造のための方法に関する。

【0066】

代替的な効率のよいワクチン接種方法は、適切な抗原をコードするDNAによる直接ワクチン接種である。タンパク質をコードするDNAによる直接ワクチン接種は、多くの異なるタンパク質に関して成功を収めている（例えばDonnellyら、*The Immunologist* 2:20-26(1993)において総説されている）。このワクチン接種方法はまた、*Brachyspira hyodysenteriae*感染に対するブタのワクチン接種についても魅力的である。それ故、本発明のこの実施態様のさらなる他の形態は、本発明に従ったタンパク質又はその免疫原性フラグメントをコードする核酸配列、そのような核酸配列を含むDNAフラグメント、又は本発明に従った組換えDNA分子、及び医薬適合性の担体を含有するワクチンに関する。

10

【0067】

本発明に従ったDNAワクチン中での使用に適するDNAプラスミドの例は、細菌、真核生物及び酵母宿主細胞のための従来クローニング又は発現プラスミドであり、前記プラスミドの多くが市販されている。そのようなプラスミドの周知の例は、pBR322及びpcDNA3(Invitrogen)である。本発明に従ったDNAフラグメント又は組換えDNA分子は、ヌクレオチドのタンパク質発現を誘導することができるべきである。前記DNAフラグメント又は組換えDNA分子は、本発明に従った1個以上のヌクレオチド配列を含みうる。さらに、前記DNAフラグメント又は組換えDNA分子は、非メチル化CpGジヌクレオチドを有する免疫刺激性オリゴヌクレオチド、又は他の抗原タンパク質又はアジュバントサイトカインをコードするヌクレオチド配列などの他のヌクレオチド配列を含みうる。

20

【0068】

本発明に従ったワクチンにおいて使用される、好ましくは転写調節配列に作動可能に連結された、本発明に従ったヌクレオチド配列又は本発明に従ったヌクレオチド配列を含むDNAプラスミドは、裸であってもよく、又は送達システムにパッケージングされうる。適切な送達システムは、すべて当技術分野において周知の、脂質小胞、iscam、denromer、niosome、多糖マトリックス等（さらに下記参照）である。上述したような、サルモネラ属菌種などの弱毒化生菌及びヘルペスウイルスなどの弱毒化生ウイルスも送達システムとして非常に適する。

30

【0069】

この実施態様のさらなる他の形態は、本発明に従った組換えDNA分子を含むワクチンに関する。

【0070】

DNAワクチンは、例えば無針注射器を使用することなどの皮内適用を通して容易に投与することができる。この投与方法は、ワクチン接種する動物の細胞内にDNAを直接送達する。10pgから1000µgの範囲内のDNAの量が良好な結果を与える。好ましくは、1から100µgのマイクログラム範囲内の量を使用する。

【0071】

さらなる実施態様では、本発明に従ったワクチンは、ブタの病原体及びウイルスに由来する1個以上の抗原、それらの抗原に対する抗体又はそのような抗原をコードする遺伝情報を付加的に含む。

40

【0072】

言うまでもなく、そのような抗原は、例えば他の*Brachyspira hyodysenteriae*でありうる。また、別のブタ病原体又はウイルスから選択される抗原でもよい。そのような病原体及びウイルスは、好ましくは仮性狂犬病ウイルス、ブタインフルエンザウイルス、ブタパルボウイルス、ブタ伝染性胃腸炎ウイルス、ロタウイルス、大腸菌、ブタ丹毒菌(*Erysipelothrix rhusiopathiae*)、気管支敗血症菌(*Bordetella bronchiseptica*)、ブタコレラ菌(*Sal*

50

monella cholerae suis)、Haemophilus parasuis、Pasteurella multocida、Streptococcus suis、Mycoplasma hyopneumoniae及びActinobacillus pleuropneumoniaeの群から選択される。

【0073】

61kD及び/又は20kD Brachyspira hyodysenteriaeリポタンパク質に基づくワクチンはまた、マーカーワクチンとして非常に適する。マーカーワクチンは、例えば野生型感染によって誘発される抗体パネルとは異なる、特徴的な抗体パネルに基づいて、ワクチン接種ブタと圃場感染ブタを識別することを可能にするワクチンである。異なる抗体パネルは、例えば野生型細菌上に存在する免疫原性タンパク質がワクチン中に存在しないときに誘発される：その場合宿主は、ワクチン接種後、そのタンパク質に対する抗体を産生しない。それ故、本発明に従った61kD及び/又は20kD Brachyspira hyodysenteriaeリポタンパク質に基づくワクチンは61kD及び/又は20kDリポタンパク質に対する抗体だけを誘発し、一方、生野生型、生弱毒化又は不活性化全Brachyspira hyodysenteriaeに基づくワクチンはすべて又は大部分の細菌タンパク質に対する抗体を誘発する。

10

【0074】

例えば精製組換え核タンパク質を含むウエルと精製61kD及び/又は20kD Brachyspira hyodysenteriaeリポタンパク質だけを含むウエルを備える簡単なELISA試験は、ブタからの血清を試験し、そのブタが61kD及び/又は20kDリポタンパク質ワクチンを接種されているか又はBrachyspiraに圃場感染しているかを明らかにするのに十分である。

20

【0075】

本発明に従ったすべてのワクチンは、医薬適合性の担体を含む。医薬適合性の担体は、例えば滅菌水又は滅菌生理食塩水でありうる。より複雑な形態では、前記担体は、例えば緩衝液でありうる。

【0076】

ワクチンの製造のための方法は、本発明に従ったタンパク質又はその免疫原性フラグメント、及び/又は前記タンパク質又はその免疫原性フラグメントに対する抗体、本発明に従った核酸配列及び/又はDNAフラグメント、組換えDNA分子、生組換え担体又は宿主細胞と、医薬適合性の担体を混合することを含む。

30

【0077】

本発明に従ったワクチンは、好ましい形態では、免疫刺激性物質、いわゆるアジュバントも含みうる。一般にアジュバントは、非特異的に宿主の免疫応答を促進する物質を含む。いくつもの異なるアジュバントが当技術分野で知られている。ブタワクチンにおいてしばしば使用されるアジュバントの例は、ムラミルジペプチド、リポ多糖、いくつかのグルカン及びグリカン、及びCarbopol（登録商標）（ホモポリマー）である。

【0078】

前記ワクチンはまた、いわゆる「ビヒクル」も含みうる。ビヒクルとは、タンパク質が、それに共有結合することなく付着する化合物である。そのようなビヒクルは、中でも特に、すべて当技術分野で周知の、バイオマイクロカプセル、マイクロアルギネート、リポソーム及びマクロゾルである。

40

【0079】

抗原が部分的にビヒクルに包埋されている、そのようなビヒクルの特殊な形態が、いわゆるISCOM（欧州特許第109,942号、欧州特許第180,564号、欧州特許第242,380号）である。さらに、ビヒクルは1個以上の表面活性化合物又は乳化剤、例えばSpan又はTweenを含みうる。

【0080】

しばしば、ワクチンは、例えば分解しやすいタンパク質を分解から保護するため、ワクチンの貯蔵寿命を高めるため、又は凍結乾燥効率を改善するために、安定剤と混合される

50

。有用な安定剤は、中でも特に、S P G A ( B o v a r n i k 氏 ; J . B a c t e r i o l o g y 59 : 509 ( 1950 ) )、糖質、例えばソルビトール、マンニトール、トレハロース、デンプン、スクロース、デキストラン又はグルコース、アルブミン又はカゼイン又はその分解産物などのタンパク質、及びアルカリ金属リン酸塩などの緩衝剤である。さらに、ワクチンは生理的に許容される希釈剤に懸濁しうる。

【0081】

免疫増強、ビヒクル化合物又は希釈剤の添加、タンパク質の乳化又は安定化の他の方法も本発明に包含されることは言うまでもない。

【0082】

本発明に従ったタンパク質又はその免疫原性フラグメントに基づく、本発明に従ったワクチンは、動物当たりタンパク質1から100 $\mu$ gの範囲の量で非常に適切に投与することができるが、より低い量は原則として使用できる。100 $\mu$ gを越える用量は、免疫学的には非常に適切であるが、商業的理由からあまり魅力的ではない。

10

【0083】

上述したL R C ウイルス及び細菌などの生弱毒化組換え担体に基づくワクチンは、感染の間にそれら自体で増殖するので、はるかに低い用量で投与することができる。それ故、非常に適切な量は、それぞれ細菌及びウイルスについて10<sup>3</sup>から10<sup>9</sup> C F U / P F U の範囲である。

【0084】

本発明に従ったワクチンは、例えば皮内、皮下、筋肉内、腹腔内、静脈内経路、あるいは経口又は鼻内経路などの粘膜表面で投与することができる。

20

【0085】

疾患に対する有効な防御のためには、B r a c h y s p i r a 感染の迅速で正確な診断が重要である。

【0086】

それ故、B r a c h y s p i r a 感染の検出に適する診断ツールを提供することが本発明のもう1つの目的である。

【0087】

本発明に従った核酸配列、タンパク質及び抗体はまた、診断における使用にも適する。

【0088】

それ故、本発明のもう1つの実施態様は、診断における使用のための本発明に従った核酸配列、タンパク質及び抗体に関する。

30

【0089】

本発明に従った核酸配列又はそのフラグメントは、ブタにおいてB r a c h y s p i r a の存在を検出するために使用できる。B r a c h y s p i r a に感染したブタから採取した試料は、本発明に従ったタンパク質をコードする核酸配列を含む、前記細菌に由来する核酸物質を含む。これらの核酸配列は本発明に従った核酸配列とハイブリダイズする。本発明の核酸配列と反応性である核酸配列の検出のための適切な方法は、P C R 手法及びN A S B A 手法を含むがこれらに限定されないハイブリダイゼーション手法を包含する。そこで、本発明に従った核酸配列、特に配列番号1及び/又は配列番号3に記載の配列を使用して、P C R 及び/又はN A S B A 手法において使用するためのプローブ及びプライマーを作製することができる。

40

【0090】

B r a c h y s p i r a h y o d y s e n t e r i a e の検出のための診断試験キットは、例えば、試験するブタから単離した細菌核酸とそれらのツールとの反応を可能にするツールを含みうる。そのようなツールは、例えば、本発明に従った核酸配列に基づく、プライマーフラグメントとも称される特異的プローブ又は(P C R ) プライマーである。B . h y o d y s e n t e r i a e の遺伝物質がその動物中に存在する場合、これは、例えば特異的P C R プライマーに特異的に結合し、例えばc D N A 合成後、P C R 反応においてその後増幅される。次に、そのP C R 反応産物をD N A ゲル電気泳動において容易に

50

検出することができる。

【0091】

標準PCR教本は、*Brachyspira hyodysenteriae* DNAに関する選択的PCR反応のためのプライマーの長さを決定する方法を教示する。少なくとも12ヌクレオチドのヌクレオチド配列を有するプライマーフラグメントがしばしば使用されるが、15ヌクレオチド以上、より好ましくは18ヌクレオチド以上のプライマーは幾分より選択である。特に、少なくとも20、好ましくは少なくとも30ヌクレオチドの長さを有するプライマーが非常に一般的に適用されうる。PCR手法は、Dieffenbach & Drexler; PCR primers, a laboratory manual. ISBN 0-87969-447-5 (1995) に広く記述されている。 10

【0092】

核酸配列又はその部分が配列番号1及び/又は配列番号3に記載の核酸配列と少なくとも70%の同一性を有する、本発明に従った核酸配列あるいは少なくとも12、好ましくは15、より好ましくは18、さらに一層好ましくは、好ましい順に20、22、25、30、35又は40ヌクレオチドの長さを有するそれらの核酸配列のプライマーも、それ故、本発明の一部である。プライマーは、少なくとも12ヌクレオチドの長さ及び配列番号1又は配列番号3に記載の核酸配列と少なくとも70%、より好ましくは、好ましい順に80%、85%、90%、95%、98%、99%又はさらに100%の同一性を有することが了解される。そのような核酸配列は、それらがコードするDNAの量を高めるためのPCR反応において又はハイブリダイゼーション反応において、プライマーフラグメントとして使用することができる。これは、迅速な増幅及び、例えば上述した*Brachyspira hyodysenteriae*の検出のための診断ツールとして使用するための特定ヌクレオチド配列のプロットでの検出を可能にする。 20

【0093】

遺伝物質に関するもう1つの試験は、例えば綿棒から採取した遺伝物質の増殖、次に古典的DNA精製、及びそれに続く放射性又は色標識プライマーフラグメントとの古典的ハイブリダイゼーションに基づく。色標識及び放射性標識フラグメントは一般に検出手段と呼ばれる。PCR反応及びハイブリダイゼーション反応の両方が当技術分野において周知であり、中でも特に、Maniatis/Sambrook (Sambrook, J.ら 30、Molecular cloning: a laboratory manual. ISBN 0-87969-309-6) に述べられている。

【0094】

そこで、本発明の1つの実施態様は、*Brachyspira hyodysenteriae*核酸配列の検出のための診断試験キットに関する。そのような試験は、本発明に従った核酸配列又はそのプライマーフラグメントを含む。

【0095】

特異的*Brachyspira hyodysenteriae*の61kD及び/又は20kDリポタンパク質の抗原物質の検出に基づく、及びそれ故*Brachyspira hyodysenteriae*感染の検出に適する診断試験キットは、中でも特に、標準ELISA試験を含みうる。そのような試験の一例では、ELISAプレートのウエルの壁を前記61kD及び/又は20kDリポタンパク質に対する抗体で被覆する。試験物質と共にインキュベートした後、標識抗*Brachyspira hyodysenteriae*抗体をウエルに加える。その後、呈色反応によって*Brachyspira hyodysenteriae*からの抗原物質の存在を明らかにする。 40

【0096】

それ故、本発明のさらにもう1つの実施態様は、*Brachyspira hyodysenteriae*の抗原物質の検出のための診断試験キットに関する。そのような試験キットは、本発明に従った61kD及び/又は20kDリポタンパク質又はそのフラグメントに対する抗体を含む。

## 【0097】

血清における *Brachyspira hyodysenteriae* の 61 kD 及び / 又は 20 kD リポタンパク質に対する抗体の検出に基づく、及びそれ故 *Brachyspira hyodysenteriae* 感染の検出に適する診断試験キットは、中でも特に、標準 ELISA 試験を含みうる。そのような試験では、例えば ELISA プレートのウエルの壁を前記 61 kD 又は 20 kD リポタンパク質で被覆することができる。試験物質と共にインキュベートした後、標識抗 61 kD 又は 20 kD 抗体をウエルに加える。その後、呈色反応がないことは *Brachyspira hyodysenteriae* に対する抗体の存在を明らかにする。

## 【0098】

それ故、本発明のさらにもう 1 つの実施態様は、*Brachyspira hyodysenteriae* に対する抗体の検出のための診断試験キットに関する。そのような試験キットは、本発明に従った 61 kD 及び / 又は 20 kD の *Brachyspira hyodysenteriae* リポタンパク質又はそのフラグメントを含む。

## 【0099】

免疫測定法のデザインは変化させうる。例えば、免疫測定法は競合又は直接反応に基づきうる。さらに、プロトコールは、固体保持体又は細胞物質を使用しうる。抗体 - 抗原複合体の検出は標識抗体の使用を含みうる；前記標識は、例えば酵素、蛍光分子、化学発光分子、放射性分子又は染料分子でありうる。

## 【0100】

試料中の、本発明に従ったタンパク質と反応性の抗体の検出のための適切な方法は、酵素結合イムノソルベント検定法 (ELISA)、免疫蛍光試験 (IFT) 及びウエスタンブロット分析を包含する。

## 【0101】

例えば上述したように発現される、本発明に従ったタンパク質又はその免疫原性フラグメントは、ポリクローナル、単一特異性又はモノクローナル (又はその誘導体) でありうる、抗体を作製するために使用できる。ポリクローナル抗体を所望する場合、ポリクローナル血清を生産し、処理するための手法は当技術分野において周知である (例えば Mayer と Walter 編集、*Immunochemical Methods in Cell and Molecular Biology*, Academic Press, London, 1987)。

## 【0102】

本発明に従ったタンパク質又は本発明に従ったその免疫原性フラグメントに対して反応性のモノクローナル抗体は、やはり当技術分野で既知の手法により (Kohler と Milstein, *Nature*, 256, 495 - 497, 1975)、近交系マウスを免疫することによって作製できる。

## 【実施例 1】

## 【0103】

細菌株及び培地。 *B. hyodysenteriae* B204<sup>T</sup> を本試験において使用した。0.1% 酵母抽出物を加えた 5% 脱線維素ウマ血液を含むトリプチケースソイ寒天で、嫌氣的に 37 で 48 時間 *Brachyspira* を増殖させた。 *B. hyodysenteriae* のプロス培養は Wannemuehler ら (Wannemuehler, M. J., R. D. Hubbard 及び J. M. Greer, 1988. *Characterization of the major outer membrane antigens of Treponema hyodysenteriae*. *Infect. Immun.* 56: 3032 - 3039) が述べたように調製した。大腸菌 DH5 をクローニング及び遺伝子ライブラリーの構築のために使用した。ブルーハ口表現型についてのプラスミドインサートを調べるために大腸菌 KSS330r<sup>-</sup> [F<sup>-</sup> (ara-leu) 7697 galE galK lacX74 rpsL (Str<sup>r</sup>) degP4::Tn5 Ipp5508] (Strauch, K. L. と J. Beckw

10

20

30

40

50

ith. 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 1576 - 1580)を使用した。大腸菌株は、Luria-Bertani (LB) ブロス中又は 1.5% LB 寒天上で、37 で一晩培養した。

#### 【0104】

DNA操作。B. hyodysenteriaeからの染色体DNAは、臭化セチルトリメチルアンモニウム沈殿法 (Ausubel, F. A., R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith及びK. Struhl. 1991, Current protocols in molecular biology. Greene Publishing and Wiley Interscience, New York)を用いて作製し、プラスミドDNAは、BirnboimとDoly (Birnboim, H. C.とJ. Doly. 1979, Nucleic Acids Res. 7: 1513 - 1523)が述べたように単離した。

10

#### 【0105】

分子生物学における標準方法は、基本的にSambrookら (Sambrook, J., E. F. Fritsch及びT. Maniatis. 1989, Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, N. Y.)が述べたように実施した。ヌクレオチド配列決定は、the BigDye Dye Deoxy Terminatorサイクルシーケンシングキット (The Perkin-Elmer Corp., Norwalk, CN.)及びApplied Biosystems Inc. 373A自動シーケンサーを用いて実施した。

20

#### 【0106】

ブルーハロアッセイ。シグナルペプチド欠損アルカリホスファターゼベクターpMGを使用してB. hyodysenteriaeのゲノムライブラリーを構築し、先に述べられているように分析した (Blanco, D. R., M. Giladi, C. I. Champion, D. A. Haake, G. K. Chikami, J. N. Miller及びM. A. Lovett. 1991, Mol. Microbiol. 5: 2405 - 2415)、(Giladi, M., Champion, C. I., Haake, D. A., Blanco, D. R., Miller, J. F.及びLovett, M. A. (1993). Use of the 「blue halo」 assay in the identification of genes encoding exported proteins with cleavable signal peptides: Cloning of a Borrelia burgdorferi gene with a signal peptide. Journal of Bacteriology 175, 4129 - 4136)。

30

#### 【0107】

pBluescript IISKにおけるゲノムライブラリーの構築。

#### 【0108】

B. hyodysenteriae菌株B204からの染色体DNAを標準方法によって単離し、製造者の指示に従ってHindIIIで消化した。フェノール抽出とエタノール沈殿によって制限酵素を除去した。消化した染色体DNA 5 µgをHindIII消化したpBluescript IISK (Stratagene Co.) 0.1 µgと混合した。この混合物にT4 DNAリガーゼ (Gibco-BRL) 5単位を加え、14 で18時間インキュベートした。大腸菌株DH5 をコンピテントにし (Hanahan)、連結混合物10 µlで形質転換して、Luria Bertaniブロス中37 で1時間回収した後、その混合物を、アンピシリン100 µg/mlを加えたLuria Bertani平板に植え付けた。合計 > 4000コロニーを得た。得られたHindIIIライブラリーからの合計4000コロニーを、アンピシリン100 µg/ml

40

50

を加えたLB平板に植え付け、37℃で18時間増殖させた。コロニーをニトロセルロースフィルター上に置き、クロロホルム蒸気中で固定して、その後標準方法(Sambrookら)を用いてSDSで溶解した。得られたフィルターを、*B. hyodysenteriae* 感染したブタからの血清と共にインキュベートした。そのコロニーブロットをウサギ抗ブタアルカリホスファターゼ複合二次抗体で展開した。回復期血清と反応するコロニーを精製し、アンピシリン100 µg/mlを加えたLB培地で増殖させた培養物からプラスミドDNAを抽出した。

#### 【0109】

クローンHBA3は、1.8 kb HindIIIインサートを含むことを示し、そのインサートから配列を決定した。BlpB(配列番号2)と称するリポタンパク質をコードする1614 bpのORF(配列番号1)を特定した。そのリポタンパク質は60.8 kDの算定分子量を有する。

10

#### 【0110】

##### ブルーハロライブラリーの構築とスクリーニング

シグナルペプチド欠損アルカリホスファターゼベクターpMG(Giladiら、1993)を使用して*B. hyodysenteriae*(B204)のゲノムライブラリーを構築した。pMG 1c、2.7及び3.29ベクターの混合物を、3つの読み枠すべてにおいてクローニングを可能にするためにSmaIで消化した。ゲノムDNAのアリコートにAluI及びRsaIで完全に消化し、アルカリホスファターゼ処理したベクターに連結した。

20

#### 【0111】

エレクトロコンピテント大腸菌DH5細胞を連結混合物で形質転換し、振とうしながら37℃で1時間インキュベートして発現させ、その後アンピシリン、1 mM IPTG及び40 µg/ml XP(5-プロモ-4-クロロ-3-インドイルホスフェート)を含むLB寒天に接種して、膜及び核外輸送タンパク質を部分的にコードするインサートを含む、青色コロニーを特定した。約1700個の組換え体を得、そのうち23個が青色表現型を示した。23個の青色コロニーからのプラスミドDNAを大腸菌KSS330r<sup>-</sup>に形質転換し、1 mM IPTG及び200 µg/ml XP培地に接種して、ブルーハロ表現型を発現する5個のコロニーを生じた。ブルーハロ表現型を発現するコロニーからプラスミドDNAを単離し、プラスミドインサートの大きさを決定するために、ポリリンカーに隣接するベクタープライマーによるPCRにおける鋳型として使用した。得られたプラスミド上のベクタープライマーの1個に関する配列分析により、blpC遺伝子の5'末端を得た。遺伝子配列の残りの部分はSSP-PCR(Shyamala & Ames, Gene 84, 1-8, 1989)によって得た。BlpC(配列番号4)と称するリポタンパク質をコードする537 bpのORF(配列番号3)を特定した。そのリポタンパク質は20 kDの算定分子量を有する。

30

#### 【実施例2】

#### 【0112】

##### 大腸菌におけるBlpB及びBlpCの発現

最終産物中にユニーク制限エンドヌクラーゼ部位を導入するために設計されたプライマーを用いて、成熟長タンパク質BlpB及びBlpCをコードする遺伝子をPCRによって増幅した。5'プライマーはNdeI部位又はBamHI部位のいずれかを含む。3'プライマーはBamHI部位又はNdeI部位を含む。PCR産物のアリコートをアガロースゲルで視覚化し、残りの部分を製造者の指示に従ってBamHI(Roché)及び/又はNdeI(Roché)で消化した。制限エンドヌクラーゼをフェノール抽出によって不活性化し、消化したPCR産物をエタノール沈殿によって精製した。pET-15bベクターを消化し、PCR産物と同様に精製して、アルカリホスファターゼで処理した。消化したPCR産物150 µgを、製造者の指示に従ってT4 DNAリガーゼ(Roché)を用いて、消化したpET15b 80 ngに連結した。連結産物を大腸菌DH5に形質転換した。単一インサートを含むクローンを、ベクター:5'-TAA-

40

50

T A C - G A C - T C A - C T A - T A G - G - 3 ' 及び 5 ' - G G A - A A C - A G C - T A T - G A C - C A T - G - 3 ' のマルチクローニングサイトに隣接するように設計されたプライマーによるコロニーPCRを用いて特定した。各々の連結について、それらのクローンの1個のインサートを二本鎖DNA塩基配列決定によって調べた。プラスミドDNAを陽性クローンから単離し、発現のために大腸菌株BL21(DE3)pLysSに形質転換した。組換えタンパク質の発現を調べるために、発現クローンの誘導培養物の全細胞溶解産物を、インサートを含まない、pET15bプラスミドを内包する発現菌株と比較した。全細胞溶解産物をSDS-PAGEによって分離し(先に述べたように)、クマシーブリリアントブルー(CBB)で染色した。BlpBを除いて、すべての組換えタンパク質の予想分子量に相当するバンドを認めた。blpB、pET15b構築物のCodonPlusRIL(Stratagene)菌株への形質転換により、その分子量に相当するバンドも認められた。

10

#### 【0113】

組換えBlpsの回復期血清との反応

前記組換えタンパク質が回復期血清によって認識されるかどうかを調べるために、BlpB及びBlpCを発現するクローンの誘導培養物の全細胞溶解産物を、インサートを含まない、pET15bプラスミドを内包する発現菌株と共にSDS-PAGEによって分離した。次にタンパク質を、Trans-Blot(登録商標)Electrophoretic transfer Cell(Bio-Rad)により、製造者の指示に従って100Vで1時間、Immobilon-P膜(Millipore)に移した。タンパク質の転移後、膜を5%脱脂乳緩衝液[TBS-Tween20(0.15M NaCl、0.05M Tris-HCl、pH7.4、0.05% Tween20)中5%(w/v)脱脂粉乳]に1時間浸して遮断した。B. hyodysenteriaeに感染したブタから得た血清を脱脂乳緩衝液中で1/100に希釈し、一晚インキュベートした。TBS-Tween中で5分間ずつ3回洗った後、二次抗体[ホースラディッシュペルオキシダーゼ(HRP)複合ウサギ抗ブタIgG(Sigma)の1/400希釈]と共に膜をインキュベートした。前記二次抗体を脱脂乳緩衝液中で希釈し、振とうしながら膜と共に37℃で2時間インキュベートして、その後上記のように5分間ずつ3回洗い、さらに最後に5分間TBS中で洗った。HRP基質[4-クロロ-1-ナフトール(Merck)、100%メタノール、30%(w/v)H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、TBS]を用いて膜を展開した。

20

30

#### 【0114】

BlpB及びBlpCの予想分子量に相当するバンドが、それらのそれぞれの発現クローンの各々について認められた(図1)。

#### 【0115】

組換えBlpsに対する抗血清の生産

組換えBlpCを発現する菌株の培養物を600nmで0.6の光学密度に増殖させ、10mMイソプロピルチオ-D-ガラクトシド(IPTG; Sigma)で4時間誘導した。フレンチプレス細胞破碎機を用いて培養物を溶解し、Talon樹脂(Clontech)を製造者の指示に従って使用して、固定化金属親和性クロマトグラフィー(IMAC)によって組換えタンパク質を精製した。カラム溶出液をプールし、リン酸緩衝食塩水に対して一晚透析して、Centicon-10(Millipore)濃縮器を用いて0.5mL容量に濃縮した。試料の濃度をBradfordアッセイによって測定した。フロイント不完全アジュバントを前記組換えタンパク質の各々100µgと等容量で混合した。2匹のニュージーランド白色ウサギに精製組換えタンパク質50µgを皮下注射した。4週間後、前記ウサギにさらなる精製組換えタンパク質50µgを皮内注射した。さらに1週間後、ウサギを心臓穿刺によって放血致死させた。ウサギ抗血清は、1/2000希釈でウエスタンブロット実験において組換えタンパク質と反応することを示した。

40

#### 【図面の簡単な説明】

50

【 0 1 1 6 】

【 図 1 】 ブタ血清 ( 1 / 1 0 0 希釈 ) と反応性の誘導 b l p B 及び b l p C 発現クローンからの全細胞溶解産物のウエスタンブロット。

【 配列表 】

## SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; AKZO Nobel N.V.

<120> novel *Brachyspira hyodysenteriae* vaccine

10

&lt;130&gt; Bhyovaccine

&lt;160&gt; 4

&lt;170&gt; PatentIn version 3.1

&lt;210&gt; 1

20

&lt;211&gt; 1614

&lt;212&gt; DNA

<213> *Brachyspira hyodysenteria*

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(1611)

30

&lt;223&gt;

&lt;400&gt; 1

atg aaa aaa cta tat tca tta ttt ata ttt ata gct gta att tta ttt 48  
Met Lys Lys Leu Tyr Ser Leu Phe Ile Phe Ile Ala Val Ile Leu Phe  
1 5 10 15

att tat tca tgc gga agt tat ttt aat cct aaa tac tat ttt ttt aaa 96  
Ile Tyr Ser Cys Gly Ser Tyr Phe Asn Pro Lys Tyr Tyr Phe Phe Lys  
20 25 30

agt aaa gta gag aat aat gga agt tct gga agc tca ggc ggt aat tca 144  
Ser Lys Val Glu Asn Asn Gly Ser Ser Gly Ser Ser Gly Gly Asn Ser  
35 40 45

40

gga ata tat ata cag cct ggt gaa gat gaa gat cct ttt aca gca cct Gly Ile Tyr Ile Gln Pro Gly Glu Asp Glu Asp Pro Phe Thr Ala Pro 50 55 60	192	
aaa tat gca tct gag tgg tgg aat gat cct aat aat ggt gga ttt gat Lys Tyr Ala Ser Glu Trp Trp Asn Asp Pro Asn Asn Gly Gly Phe Asp 65 70 75 80	240	
gct tcg gat ata gat aaa tgg ttt ttg aaa gtt gaa ttt tta gca aat Ala Ser Asp Ile Asp Lys Trp Phe Leu Lys Val Glu Phe Leu Ala Asn 85 90 95	288	
gat tat cca agt tac aga ttt tta aca aaa agc gga aga aaa gca gga Asp Tyr Pro Ser Tyr Arg Phe Leu Thr Lys Ser Gly Arg Lys Ala Gly 100 105 110	336	10
cat gtt tgg gta gtt tct aat gaa caa tct cag gca tat tta gat caa His Val Trp Val Val Ser Asn Glu Gln Ser Gln Ala Tyr Leu Asp Gln 115 120 125	384	
gga gaa gta tgc aat act aca gca gtt acc ggg gta tct ata aaa cca Gly Glu Val Cys Asn Thr Thr Ala Val Thr Gly Val Ser Ile Lys Pro 130 135 140	432	
gta gca aat gta aca gga gta aca tat aca aaa tat aag gga ttg aat Val Ala Asn Val Thr Gly Val Thr Tyr Thr Lys Tyr Lys Gly Leu Asn 145 150 155 160	480	
gca aga ttt ttc act cat gac gga gat tat cat aat gta tat cct gga Ala Arg Phe Phe Thr His Asp Gly Asp Tyr His Asn Val Tyr Pro Gly 165 170 175	528	20
aaa gat aag ata agc aga ttc tat ttt tat tat ttt aca ggt act ccg Lys Asp Lys Ile Ser Arg Phe Tyr Phe Tyr Tyr Phe Thr Gly Thr Pro 180 185 190	576	
gaa atg gct aaa ttt tta gaa aat tgc tta ata gct gta gac aca tac Glu Met Ala Lys Phe Leu Glu Asn Cys Leu Ile Ala Val Asp Thr Tyr 195 200 205	624	
tca aaa cta tta ttt tac tat gga aga cct caa agc gat tat cca aat Ser Lys Leu Leu Phe Tyr Tyr Gly Arg Pro Gln Ser Asp Tyr Pro Asn 210 215 220	672	
cct cca agc tgg cag aag cct agt aat ttg gtt gat aaa tac tct cct Pro Pro Ser Trp Gln Lys Pro Ser Asn Leu Val Asp Lys Tyr Ser Pro 225 230 235 240	720	30
aca ggt tat tgg ata tct ata gat gaa ggt ata aat gat aag ggg cag Thr Gly Tyr Trp Ile Ser Ile Asp Glu Gly Ile Asn Asp Lys Gly Gln 245 250 255	768	
aat tat cct ttt tat gaa tat gat cct gta gga tat gta aaa agc gat Asn Tyr Pro Phe Tyr Glu Tyr Asp Pro Val Gly Tyr Val Lys Ser Asp 260 265 270	816	
ggt aca gtt gtt ata ttt gat tgg ttt gca aac aga tta aga gga aat	864	

Gly Thr Val Val Ile Phe Asp Trp Phe Ala Asn Arg Leu Arg Gly Asn	
275 280 285	
cat aat aat gat cct ata aaa agt gat cct aaa gga gct att gtt cct	912
His Asn Asn Asp Pro Ile Lys Ser Asp Pro Lys Gly Ala Ile Val Pro	
290 295 300	
aat cct aat act aat cct tct gct tca act aca gga cgt tct cct tat	960
Asn Pro Asn Thr Asn Pro Ser Ala Ser Thr Thr Thr Gly Arg Ser Pro Tyr	
305 310 315 320	
gca ttc tat tcg cct tta gca caa aaa gat aaa act aaa ata act ata	1008
Ala Phe Tyr Ser Pro Leu Ala Gln Lys Asp Lys Thr Lys Ile Thr Ile	
325 330 335	
agt act aca aaa tta ata aat tat aca gtt ttc agt tat aaa tac agt	1056
Ser Thr Thr Lys Leu Ile Asn Tyr Thr Val Phe Ser Tyr Lys Tyr Ser	
340 345 350	
ata caa ata ttt ccg cct agt atg aaa gaa gaa aaa ctt cct tat gct	1104
Ile Gln Ile Phe Pro Pro Ser Met Lys Glu Glu Lys Leu Pro Tyr Ala	
355 360 365	
tat att gca tat gct tcc tat ggt gca gct tat caa aat gaa agc agc	1152
Tyr Ile Ala Tyr Ala Ser Tyr Gly Ala Ala Tyr Gln Asn Glu Ser Ser	
370 375 380	
aaa tct gta gag atg ata tct gat ata aat aaa gga gag cat tac gga	1200
Lys Ser Val Glu Met Ile Ser Asp Ile Asn Lys Gly Glu His Tyr Gly	
385 390 395 400	
agt att aca aga ata agc act gta cct aaa ata gat aaa gac gga gga	1248
Ser Ile Thr Arg Ile Ser Thr Val Pro Lys Ile Asp Lys Asp Gly Gly	
405 410 415	
gag ttg gta aaa gaa gga tct aag tct ttt gaa tta tat ggt att gat	1296
Glu Leu Val Lys Glu Gly Ser Lys Ser Phe Glu Leu Tyr Gly Ile Asp	
420 425 430	
act aaa gat aca ttt ata gaa tta agt tta aaa cta att aaa aat gat	1344
Thr Lys Asp Thr Phe Ile Glu Leu Ser Leu Lys Leu Ile Lys Asn Asp	
435 440 445	
gaa aat aca gaa ttt gtt gat caa gga aca gca ggt act ggt cct tta	1392
Glu Asn Thr Glu Phe Val Asp Gln Gly Thr Ala Gly Thr Gly Pro Leu	
450 455 460	
gta tac ttt gat aaa aca gat cct ata ctt gta tta aaa tat gat aaa	1440
Val Tyr Phe Asp Lys Thr Asp Pro Ile Leu Val Leu Lys Tyr Asp Lys	
465 470 475 480	
tct tct gac agc ttc aaa tac agc agt gta aaa gga aac aag caa ata	1488
Ser Ser Asp Ser Phe Lys Tyr Ser Ser Val Lys Gly Asn Lys Gln Ile	
485 490 495	
gaa gtt gac agc aat tta tca att aaa aga gga gag aat aaa gag ttt	1536
Glu Val Asp Ser Asn Leu Ser Ile Lys Arg Gly Glu Asn Lys Glu Phe	

10

20

30

500 505 510  
 aca gtt aaa ttt aaa gat cca aat aat gga aat gag ttt ggg gtt gta 1584  
 Thr Val Lys Phe Lys Asp Pro Asn Asn Gly Asn Glu Phe Gly Val Val  
 515 520 525

ttt aaa ata gat ttt gaa aaa ata tca tga 1614  
 Phe Lys Ile Asp Phe Glu Lys Ile Ser  
 530 535

<210> 2

<211> 537

<212> PRT

<213> *Brachyspira hyodysenteria*

<400> 2

Met Lys Lys Leu Tyr Ser Leu Phe Ile Phe Ile Ala Val Ile Leu Phe  
 1 5 10 15

Ile Tyr Ser Cys Gly Ser Tyr Phe Asn Pro Lys Tyr Tyr Phe Phe Lys  
 20 25 30

Ser Lys Val Glu Asn Asn Gly Ser Ser Gly Ser Ser Gly Gly Asn Ser  
 35 40 45

Gly Ile Tyr Ile Gln Pro Gly Glu Asp Glu Asp Pro Phe Thr Ala Pro  
 50 55 60

Lys Tyr Ala Ser Glu Trp Trp Asn Asp Pro Asn Asn Gly Gly Phe Asp  
 65 70 75 80

Ala Ser Asp Ile Asp Lys Trp Phe Leu Lys Val Glu Phe Leu Ala Asn  
 85 90 95

Asp Tyr Pro Ser Tyr Arg Phe Leu Thr Lys Ser Gly Arg Lys Ala Gly  
 100 105 110

His Val Trp Val Val Ser Asn Glu Gln Ser Gln Ala Tyr Leu Asp Gln  
 115 120 125

Gly Glu Val Cys Asn Thr Thr Ala Val Thr Gly Val Ser Ile Lys Pro  
 130 135 140

10

20

30

Val Ala Asn Val Thr Gly Val Thr Tyr Thr Lys Tyr Lys Gly Leu Asn  
145 150 155 160

Ala Arg Phe Phe Thr His Asp Gly Asp Tyr His Asn Val Tyr Pro Gly  
165 170 175

Lys Asp Lys Ile Ser Arg Phe Tyr Phe Tyr Tyr Phe Thr Gly Thr Pro  
180 185 190

Glu Met Ala Lys Phe Leu Glu Asn Cys Leu Ile Ala Val Asp Thr Tyr  
195 200 205

10

Ser Lys Leu Leu Phe Tyr Tyr Gly Arg Pro Gln Ser Asp Tyr Pro Asn  
210 215 220

Pro Pro Ser Trp Gln Lys Pro Ser Asn Leu Val Asp Lys Tyr Ser Pro  
225 230 235 240

Thr Gly Tyr Trp Ile Ser Ile Asp Glu Gly Ile Asn Asp Lys Gly Gln  
245 250 255

Asn Tyr Pro Phe Tyr Glu Tyr Asp Pro Val Gly Tyr Val Lys Ser Asp  
260 265 270

20

Gly Thr Val Val Ile Phe Asp Trp Phe Ala Asn Arg Leu Arg Gly Asn  
275 280 285

His Asn Asn Asp Pro Ile Lys Ser Asp Pro Lys Gly Ala Ile Val Pro  
290 295 300

Asn Pro Asn Thr Asn Pro Ser Ala Ser Thr Thr Gly Arg Ser Pro Tyr  
305 310 315 320

Ala Phe Tyr Ser Pro Leu Ala Gln Lys Asp Lys Thr Lys Ile Thr Ile  
325 330 335

30

Ser Thr Thr Lys Leu Ile Asn Tyr Thr Val Phe Ser Tyr Lys Tyr Ser  
340 345 350

Ile Gln Ile Phe Pro Pro Ser Met Lys Glu Glu Lys Leu Pro Tyr Ala  
355 360 365

Tyr Ile Ala Tyr Ala Ser Tyr Gly Ala Ala Tyr Gln Asn Glu Ser Ser  
 370 375 380

Lys Ser Val Glu Met Ile Ser Asp Ile Asn Lys Gly Glu His Tyr Gly  
 385 390 395 400

Ser Ile Thr Arg Ile Ser Thr Val Pro Lys Ile Asp Lys Asp Gly Gly  
 405 410 415

Glu Leu Val Lys Glu Gly Ser Lys Ser Phe Glu Leu Tyr Gly Ile Asp  
 420 425 430

10

Thr Lys Asp Thr Phe Ile Glu Leu Ser Leu Lys Leu Ile Lys Asn Asp  
 435 440 445

Glu Asn Thr Glu Phe Val Asp Gln Gly Thr Ala Gly Thr Gly Pro Leu  
 450 455 460

Val Tyr Phe Asp Lys Thr Asp Pro Ile Leu Val Leu Lys Tyr Asp Lys  
 465 470 475 480

Ser Ser Asp Ser Phe Lys Tyr Ser Ser Val Lys Gly Asn Lys Gln Ile  
 485 490 495

20

Glu Val Asp Ser Asn Leu Ser Ile Lys Arg Gly Glu Asn Lys Glu Phe  
 500 505 510

Thr Val Lys Phe Lys Asp Pro Asn Asn Gly Asn Glu Phe Gly Val Val  
 515 520 525

Phe Lys Ile Asp Phe Glu Lys Ile Ser  
 530 535

<210> 3

30

<211> 540

<212> DNA

<213> Brachyspira hyodysenteria

<220>

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(537)

&lt;223&gt;

&lt;400&gt; 3

atg ttt aag aaa ctt ttt att gtt gtg ggt ttg atg agt gtg ctt gct 48  
 Met Phe Lys Lys Leu Phe Ile Val Val Gly Leu Met Ser Val Leu Ala  
 1 5 10 15

gga tgt gaa act atg cag cct aaa aat aat gat aca att gta aaa aat 96  
 Gly Cys Glu Thr Met Gln Pro Lys Asn Asn Asp Thr Ile Val Lys Asn  
 20 25 30

10

gat aat tca tct aat gaa gat aaa aaa gaa gaa act ata act aga gaa 144  
 Asp Asn Ser Ser Asn Glu Asp Lys Lys Glu Glu Thr Ile Thr Arg Glu  
 35 40 45

gat aca cca aaa atg aaa gtt aca gtt tat gga gca gat aaa gaa att 192  
 Asp Thr Pro Lys Met Lys Val Thr Val Tyr Gly Ala Asp Lys Glu Ile  
 50 55 60

caa gct gtg gaa ata aat gat aaa act tat tat gta ata ggc gga aaa 240  
 Gln Ala Val Glu Ile Asn Asp Lys Thr Tyr Tyr Val Ile Gly Gly Lys  
 65 70 75 80

gat gtt gag aat atg aca gaa gct gat ata aaa aaa tca tct tta gta 288  
 Asp Val Glu Asn Met Thr Glu Ala Asp Ile Lys Lys Ser Ser Leu Val  
 85 90 95

20

gca cct tta aaa gtt aca gaa gaa act gtt aat ggt aca aga ggt ata 336  
 Ala Pro Leu Lys Val Thr Glu Glu Thr Val Asn Gly Thr Arg Gly Ile  
 100 105 110

gtt gtt aca tat tat gat gta aaa gta ttc ttg ggt aaa aga aca gga 384  
 Val Val Thr Tyr Tyr Asp Val Lys Val Phe Leu Gly Lys Arg Thr Gly  
 115 120 125

aca gga act atc gta gga ata ttc gag cct cag aaa aat gat tgg act 432  
 Thr Gly Thr Ile Val Gly Ile Phe Glu Pro Gln Lys Asn Asp Trp Thr  
 130 135 140

aca gga aat gat ttg gat aga agt tta tct att caa ata aaa tta tct 480  
 Thr Gly Asn Asp Leu Asp Arg Ser Leu Ser Ile Gln Ile Lys Leu Ser  
 145 150 155 160

30

aga aat ata gca ggt cct ata gat ata aaa aga gga agc ata tct tta 528  
 Arg Asn Ile Ala Gly Pro Ile Asp Ile Lys Arg Gly Ser Ile Ser Leu  
 165 170 175

gca ttt aat taa 540  
 Ala Phe Asn

<210> 4

<211> 179

<212> PRT

<213> Brachyspira hyodysenteria

<400> 4

Met Phe Lys Lys Leu Phe Ile Val Val Gly Leu Met Ser Val Leu Ala  
 1 5 10 15

10

Gly Cys Glu Thr Met Gln Pro Lys Asn Asn Asp Thr Ile Val Lys Asn  
 20 25 30

Asp Asn Ser Ser Asn Glu Asp Lys Lys Glu Glu Thr Ile Thr Arg Glu  
 35 40 45

Asp Thr Pro Lys Met Lys Val Thr Val Tyr Gly Ala Asp Lys Glu Ile  
 50 55 60

Gln Ala Val Glu Ile Asn Asp Lys Thr Tyr Tyr Val Ile Gly Gly Lys  
 65 70 75 80

20

Asp Val Glu Asn Met Thr Glu Ala Asp Ile Lys Lys Ser Ser Leu Val  
 85 90 95

Ala Pro Leu Lys Val Thr Glu Glu Thr Val Asn Gly Thr Arg Gly Ile  
 100 105 110

Val Val Thr Tyr Tyr Asp Val Lys Val Phe Leu Gly Lys Arg Thr Gly  
 115 120 125

Thr Gly Thr Ile Val Gly Ile Phe Glu Pro Gln Lys Asn Asp Trp Thr  
 130 135 140

30

Thr Gly Asn Asp Leu Asp Arg Ser Leu Ser Ile Gln Ile Lys Leu Ser  
 145 150 155 160

Arg Asn Ile Ala Gly Pro Ile Asp Ile Lys Arg Gly Ser Ile Ser Leu  
 165 170 175

Ala Phe Asn

40

【 图 1 】

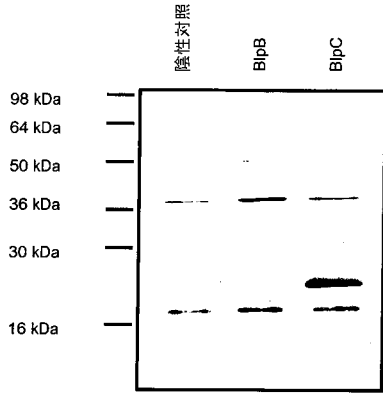


Figure 1.

## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT						International Application No. PCT/EP 03/07611
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER						
IPC 7	C12N15/31 A61K39/02	C12N15/63 A61K39/40	C12N1/21 C12Q1/68	C07K14/20 G01N33/569	A61K48/00	
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)						
IPC 7 C12N C07K A61K C12Q G01N						
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched						
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)						
EPO-Internal, WPI Data, EMBL, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE						
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT						
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages					Relevant to claim No.
A	B. J. LEE ET AL.: "Identification of the gene encoding BmpB, a 30 kDa outer envelope lipoprotein of Brachyspira (Serpulina) hyodysenteriae, and immunogenicity of recombinant BmpB in mice and pigs" VETERINARY MICROBIOLOGY, vol. 76, 2000, pages 245-257, XP002231425 abstract page 250, paragraph 4 -page 255, last paragraph --- -/--					1-24
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.						
* Special categories of cited documents:						
*A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance			*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			
*E* earlier document but published on or after the international filing date			*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			
*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)			*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.			
*O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means			*&* document member of the same patent family			
*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				Date of mailing of the international search report		
9 December 2003				19. 12. 2003		
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentplein 2 NL - 2200 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3018				Authorized officer  Montero Lopez, B		

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International Application No  
 PCT/EP 03/07611

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>DIEGO R ET AL: "Serpulina hyodysenteriae challenge of fattening pigs vaccinated with an adjuvanted bivalent bacterin against swine dysentery"            VACCINE, BUTTERWORTH SCIENTIFIC.            GUILDFORD, GB,            vol. 13, no. 7, 1995, pages 663-667,            XP004057591            ISSN: 0264-410X            page 663, right-hand column, paragraph 1            page 666, left-hand column, paragraph 3.            -page 667, left-hand column, paragraph 3</p>	1-24
A	<p>DARREN J. TROTT ET AL.: "The search for Brachyspira outer membrane proteins that interact with the host"            ANIMAL HEALTH RESEARCH REVIEWS,            vol. 2, no. 1, June 2001 (2001-06), pages 19-30, XP001135000            abstract            page 21, left-hand column, paragraph 3            -page 28, left-hand column, paragraph 2;            tables 1,2</p>	1-24
A	<p>MICHAEL J. WANNEMUEHLER ET AL.:            "Characterization of the major outer membrane antigens of Treponema hyodysenteriae"            INFECTION AND IMMUNITY,            vol. 56, no. 12, December 1988 (1988-12),            pages 3032-3039, XP001109677            the whole document</p>	1-24
A	<p>STEVEN N. CHATFIELD ET AL.:            "Identification of the major antigens of Treponema hyodysenteriae and comparison with those of Treponema innocens"            INFECTION AND IMMUNITY,            vol. 56, no. 5, May 1988 (1988-05), pages 1070-1075, XP001109676            the whole document</p>	1-24

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/EP 03/07611**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)**

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
  
3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
  
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
  
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
  
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/EP 03 07611

## FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. Claims: 1, 2, 9-11, 15 and partially 5-8, 17-24

61 kDa *Brachyspira hyodysenteriae* lipoprotein and nucleic acid encoding the same; host cell comprising it and use thereof in vaccination and diagnostic

2. Claims: 3, 4, 12-14, 16 and partially 5-8, 17-24

20 kDa *Brachyspira hyodysenteriae* lipoprotein and nucleic acid encoding the same; host cell comprising it and use thereof in vaccination and diagnostic

## フロントページの続き

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 39/15	A 6 1 K 39/15	
A 6 1 K 39/187	A 6 1 K 39/187	
A 6 1 K 39/205	A 6 1 K 39/205	
A 6 1 K 39/225	A 6 1 K 39/225	
A 6 1 K 39/23	A 6 1 K 39/23	
A 6 1 P 1/00	A 6 1 P 1/00	1 7 1
A 6 1 P 31/04	A 6 1 P 31/04	1 7 1
A 6 1 P 31/12	A 6 1 P 31/12	1 7 1
A 6 1 P 43/00	A 6 1 P 43/00	1 2 1
C 0 7 K 14/195	C 0 7 K 14/195	
C 1 2 N 1/15	C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 1/19	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/21	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 5/10	G 0 1 N 33/53	W
G 0 1 N 33/53	C 1 2 N 5/00	A

(81) 指定国 AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

- (72) 発明者 アドラー, ベン  
オーストラリア国、ビクトリア・3 1 4 9、マウント・ウエパリー、ローレンス・ロード・2 2 1
- (72) 発明者 カレン, ポール・アントニー  
オーストラリア国、ビクトリア・3 1 6 3、マランビーナ、マランビーナ・ロード・1 0 / 1 1
- (72) 発明者 カウツ, スコット・アダム・ジェイムズ  
オーストラリア国、ビクトリア・3 1 3 6、クロイドン、ヌーラ・コート・2
- (72) 発明者 ブラッチ, デイター・マーク  
オーストラリア国、ビクトリア・3 1 6 8、ノツティング・ヒル、ピングリー・アベニュー・1 8
- (72) 発明者 セーヘルス, ルード・フィリップ・アントーン・マリア  
オランダ国、エヌ・エル - 5 8 3 1・エム・ゼット・ボツクスメール、フローエンリング・3

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA65 CA03 DA06 EA04  
4B065 AA01Y AA26X AB01 BA02 CA24 CA45 CA46  
4C085 AA03 AA04 BA21 BA24 BA46 BA51 BA56 BA64 BA73 BA75  
BB13 CC07 DD22 DD62 DD86 EE01 EE03 EE06 FF24  
4H045 AA10 AA11 AA30 BA10 CA11 DA86 EA31 EA50 FA74

专利名称(译)	Brachyspira·Hyodysenteriae疫苗		
公开(公告)号	<a href="#">JP2005532804A</a>	公开(公告)日	2005-11-04
申请号	JP2004520623	申请日	2003-07-11
[标]申请(专利权)人(译)	阿克佐诺贝尔公司		
申请(专利权)人(译)	阿克苏诺贝尔的基础		
[标]发明人	アドラーベン カレンポールアントニー カウツスコットアダムジエイムズ ブラッチディーターマーク セーヘルスルードフィリツプアントーンマリア		
发明人	アドラー,ベン カレン,ポール・アントニー カウツ,スコット・アダム・ジエイムズ ブラッチ,ディーター・マーク セーヘルス,ルード・フィリツプ・アントーン・マリア		
IPC分类号	G01N33/53 A61K39/00 A61K39/02 A61K39/108 A61K39/112 A61K39/12 A61K39/15 A61K39/187 A61K39/205 A61K39/225 A61K39/23 A61K39/40 A61K48/00 A61P1/00 A61P31/04 A61P31/12 A61P43 /00 C07K14/195 C07K14/20 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/09 C12N15/31 C12N15/63 C12Q1/68 G01N33/569		
CPC分类号	A61K39/00 A61K2039/505 A61K2039/523 A61K2039/53 A61P1/00 A61P31/04 A61P31/12 A61P43/00 C07K14/20		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A61K39/02 A61K39/108 A61K39/112 A61K39/12 A61K39/15 A61K39/187 A61K39 /205 A61K39/225 A61K39/23 A61P1/00.171 A61P31/04.171 A61P31/12.171 A61P43/00.121 C07K14 /195 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 G01N33/53.W C12N5/00.A		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA65 4B024/CA03 4B024/DA06 4B024/EA04 4B065/AA01Y 4B065 /AA26X 4B065/AB01 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA45 4B065/CA46 4C085/AA03 4C085/AA04 4C085/BA21 4C085/BA24 4C085/BA46 4C085/BA51 4C085/BA56 4C085/BA64 4C085/BA73 4C085 /BA75 4C085/BB13 4C085/CC07 4C085/DD22 4C085/DD62 4C085/DD86 4C085/EE01 4C085/EE03 4C085/EE06 4C085/FF24 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA11 4H045 /DA86 4H045/EA31 4H045/EA50 4H045/FA74		
代理人(译)	小野 诚 Masarushin大崎		
优先权	2002077882 2002-07-17 EP		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

#### 摘要(译)

本发明涉及编码61kD和20kD短螺旋体猪痢疾短螺旋体脂蛋白的核酸序列，并且涉及编码此类脂蛋白的免疫原性片段的此类核酸序列的部分，并且涉及DNA片段，重组DNA分子，活重组载体和宿主。包含此类核酸序列或其此类部分的细胞。本发明还涉及61kD和20kD的猪痢疾短螺旋体脂蛋白及其由这些序列编码的免疫原性部分。此外，本发明涉及包含此类核酸序列及其部分，DNA片段，重组DNA分子，活重组载体和包含此类核酸序列或其部分，脂蛋白或其免疫原性部分以及针对此类脂蛋白的抗体的宿主细胞的疫苗。或其免疫原性部分。而且，本发明涉及所述脂蛋白在疫苗中的用途以及在疫苗的生产中的用途。此外，本发明涉及所述核酸序列，脂蛋白或抗体用于诊断或疫苗接种目的的用途。最后，本发明涉及诊断试剂盒，其包含此类核酸，脂蛋白或针对此类脂蛋白的抗体。

