

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 263 317**

21 Número de solicitud: 200302869

51 Int. Cl.:
C12N 15/30 (2006.01)
C07K 14/44 (2006.01)
G01N 33/569 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN PREVIO

B2

22 Fecha de presentación: **04.12.2003**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **01.12.2006**

Fecha de la concesión: **10.09.2007**

45 Fecha de anuncio de la concesión: **01.10.2007**

45 Fecha de publicación del folleto de la patente:
01.10.2007

73 Titular/es: **Universidad Complutense de Madrid
Rectorado - Avenida de Séneca, 2
28040 Madrid, ES**

72 Inventor/es: **Ortega Mora, Luis Miguel y
Fernández García, Aurora**

74 Agente: **No consta**

54 Título: **Uso del gen NcSAG4 para el diagnóstico y prevención de la neosporosis, y como marcador para el análisis de la patogenia.**

57 Resumen:

Uso del gen NcSAG4 para el diagnóstico y prevención de la neosporosis, y como marcador para el análisis de la patogenia.

La invención se refiere al empleo del gen NcSAG4, su RNA mensajero, los oligonucleótidos diseñados en función de su secuencia nucleotídica, o cualquiera de sus fragmentos, así como la proteína NcSAG4 que codifica, o cualquiera de sus formas recombinantes, los vectores de expresión, así como las células hospedadoras que los contengan, para el diagnóstico y la vacunación para la prevención de la neosporosis, así como su uso como marcador específico de la fase de bradizoíto de *N. caninum*, para el análisis de la patogenia o de la eficacia de las vacunas frente al establecimiento de la infección crónica en el hospedador intermediario.

ES 2 263 317 B2

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

DESCRIPCIÓN

Uso del gen NcSAG4 para el diagnóstico y prevención de la neosporosis, y como marcador para el análisis de la patogenicidad

Objeto de la invención

La presente invención se establece en el campo de la sanidad animal y se refiere, según se expresa en el enunciado de esta memoria descriptiva, al diagnóstico, análisis de la patogenicidad y la prevención de la enfermedad producida por el parásito protozoo *Neospora caninum*. De forma más concreta la invención se relaciona con la molécula polinucleotídica correspondiente al gen NcSAG4 de *N. caninum*, su RNA mensajero y el antígeno que codifica, NcSAG4, siendo éste una proteína específica del estadio de bradizoíto, así como los oligonucleótidos, los vectores recombinantes, las células hospedadoras transformadas, y las proteínas expresadas de forma recombinante, el uso de éstos como reactivos para el diagnóstico de la enfermedad, su aplicación al desarrollo de técnicas moleculares que permitan estudiar la patogenicidad de la enfermedad, además de su utilidad para la producción de vacunas.

Antecedentes

La neosporosis

N. caninum es un parásito protozoo perteneciente al phylum Apicomplexa que incluye otros parásitos patógenos importantes como *Toxoplasma gondii* con el que guarda mucha relación. *N. caninum* está descrito desde 1989 como agente productor de aborto y mortalidad neonatal en el ganado bovino (Thilsted and Dubey. 1989. J. Vet. Diagn. Invest. 1, 205-209), aunque es capaz de infectar a un amplio espectro de especies de mamíferos (Buxton *et al.* 2002. Trends Parasitol. 18, 546-552).

La neosporosis bovina está considerada como una enfermedad parasitaria de distribución cosmopolita y una de las causas más frecuentes de fallo reproductivo en los diversos países donde se ha estudiado (Trees *et al.* 1999. Int. J. Parasitol. 29, 1195-1200; Anderson *et al.* 2000, Anim. Reprod. Sci. 60-61, 417-431), incluido España (González *et al.* 1999. Vet. Rec. 144, 145-150; Pereira-Bueno *et al.* 2003. Vet. Parasitol. 111, 143-152). La manifestación clínica más importante de la infección en las hembras gestantes es el aborto y generalmente tiene lugar entre el tercer y noveno mes de gestación, siendo más frecuente en tomo a los 5-6 meses. Los terneros afectados que nacen vivos pueden presentar problemas neuromusculares, apareciendo los primeros signos clínicos a los 4-5 días post-parto, aunque estos se pueden retrasar hasta dos semanas. Sin embargo, lo más frecuente es el nacimiento de terneros clínicamente sanos, pero crónicamente infectados (Dubey and Lindsay. 1996. Vet. Parasitol. 67, 1-59). Así mismo la neosporosis puede afectar a los perros, su hospedador definitivo, donde produce polimiositis, encefalitis, parálisis y puede causar a la muerte (Lindsay and Dubey. 1989. J. Parasitol. 75, 163-165; Buxton *et al.* 2002. Trends Parasitol. 18, 546-552).

Como *T. gondii*, *N. caninum* tiene un ciclo de vida que comprende tres estadios. Los esporozoítos, que infectan al hospedador intermediario por ingestión de los ooquistes eliminados por el hospedador definitivo. Por otro lado, los taquizoítos, la forma de replicación rápida, responsables de la fase aguda de la infección, cuya misión es la diseminación a través de los tejidos del hospedador. Este proceso finaliza cuando el hospedador desarrolla inmunidad y se establece entonces una fase crónica, con una multiplicación lenta del parásito, formándose quistes tisulares con bradizoítos en su interior, los cuales se han observado tanto en el tejido nervioso de diversas especies con infecciones naturales y experimentales (Dubey *et al.*, 1988, J. Am. Vet. Med. Assoc. 193, 1259-1263; Dubey *et al.* 1990. J. Am. Vet. Med. Assoc. 197: 1043-1044; Barr *et al.* 1992. J. Vet. Diagn. Invest. 4, 365-367; Kobayashi *et al.* 2001. J. Parasitol. 87: 434-436), como en el tejido muscular esquelético del perro y de la vaca con infecciones naturales (Peters *et al.* 2001. Int. J. Parasitol. 31, 1144-1148). Estos bradizoítos permanecen latentes en los quistes de los tejidos hasta su reactivación (Antony and Williamson. 2001. New Zeal. Vet. J. 49, 42-47; Buxton *et al.* 2002. Trends Parasitol. 18, 546-552). Hoy en día no se conocen los mecanismos que determinan el paso de taquizoíto a bradizoíto y viceversa en los parásitos del grupo Apicomplexa como *T. gondii* o *N. caninum*, pero se ha sugerido que la respuesta inmune puede estar influyendo en la latencia y la reactivación de la infección en animales infectados de forma crónica (Lyons *et al.*, 2002, Trends Parasitol. 18, 198-201).

En relación con la transmisión de la enfermedad, los estudios más recientes indican la importancia relativamente escasa de la transmisión postnatal y la persistencia, durante toda la vida, de la infección congénita (Davison *et al.* 1999. Int. J. Parasitol. 29, 1683-1689; Hietala and Thurmond. 1999. Int. J. Parasitol. 29, 1669-1676). La transmisión congénita tiene un papel prominente con porcentajes que oscilan entre el 50% y el 95% (Wouda *et al.* 1998. Theriogenology 49, 1311-1316; Pereira-Bueno *et al.* 2000. in: Hemphill and Gottstein (Eds.) Int. J. Parasitol. 30, 906-909) y parece jugar un papel relevante en la propagación y mantenimiento de la enfermedad (Björkman *et al.* 1996. J. Am. Vet. Med. Assoc. 208, 1441-1444; Paré *et al.* 1996. Can. J. Vet. Res. 60, 133-139; Anderson *et al.* 1997. J. Am. Vet. Med. Assoc. 210, 1169-1172; Schares *et al.* 1998. Vet. Parasitol. 80, 87-98).

Antígenos de N. caninum

En lo que se refiere a la comparación de la composición antigénica entre el taquizoíto y el bradizoíto de *N. caninum*, la información disponible hasta el momento es escasa, ya que tan solo se ha realizado un estudio en el que se identificaron antígenos específicos del taquizoíto o compartidos por ambos estadios (Fuchs *et al.* 1998. J. Parasitol. 84,

753-758), hecho que contrasta con los estudios realizados en *T. gondii*, donde son varios los antígenos específicos de estadio identificados y caracterizados. Entre los antígenos de *N. caninum*, se han descrito dos proteínas de superficie, NcSAG1 (Hemphill *et al.* 1997. Parasitology, 115, 371-380), específica de taquizoíto, cuyo gen fue clonado por Howe *et al.* (1998. Infect. Immun., 66, 5322-5328) y NcSRS2 (Hemphill *et al.* 1996. Parasitol. Res. 82, 497-504), que se expresa de forma conjunta en los taquizoítos y en los bradizoítos. Estas dos proteínas de superficie de *N. caninum* han sido ensayadas recientemente como vacunas de subunidades en un modelo murino (Cannas *et al.* 2003a. Parasitology 126 (Pt. 4), 303-312). Recientemente, se han identificado dos proteínas de micronemas, NcMIC3 (Sonda *et al.* 2000. Mol. Biochem. Parasitol. 108, 39-51) y NcMIC1 (Keller *et al.* 2002. Infect. Immun. 70, 3187-3198), que se expresan en ambos estadios del parásito. Así mismo, se han incluido en el banco de genes dos secuencias de Neospora denominadas NcMIC10 y NcMIC11, que podrían codificar dos proteínas de micronemas, ya que sus secuencias presentan una homología elevada con las secuencias que codifican las proteínas de *T. gondii* TgMIC10 y TgMIC11, respectivamente. Otros genes que han sido clonados son NcGRA6 y NcGRA7, que codifican proteínas de gránulos densos del taquizoíto de *N. caninum*, en base a las cuales se ha desarrollado un ELISA para el diagnóstico de la enfermedad (Lally *et al.* 1996. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 3, 275-279). Además de estas proteínas, otras de gránulos densos de 29 y 67 kDa, denominadas NcNTPasa-I (Asai *et al.* 1998. Exp. Parasitol. 90, 277-285) y NcGRA2 (Ellis *et al.* 2000. Parasitology 120 (Pt 4), 383-390), respectivamente, han sido identificadas y caracterizadas. Por otro lado, la proteína NcMIC3, localizada en los micronemas de taquizoítos intracelulares (Naguleswaran *et al.* 2001. Infect. Immun. 69, 6483-6494), cuyo gen ha sido clonado, ha sido expresada como proteína recombinante para ser utilizada con fines vacunales (Carenas *et al.* 2003b. J. Parasitol. 89 (Pt.1) 44-50).

Finalmente, NcSUB1 es el único gen clonado de *N. caninum*, que expresa un enzima. NcSUB 1 es una serin-proteasa de 65 kDa (Louie and Conrad. 1999. Mol. Biochem. Parasitol. 103, 211-223; Louie *et al.* 2002. J. Parasitol. 88, 1113-1119), localizada en los micronemas del taquizoíto, la cual presenta una elevada identidad aminoacídica con la proteína de *T. gondii* denominada TgSUB1.

En relación a los antígenos específicos del bradizoíto de *Neospora* no se ha identificado ninguno hasta el momento, debido a la dificultad de obtener quistes con bradizoítos tanto *in vitro* como *in vivo*. Sin embargo en *T. gondii* sí se han descrito antígenos específicos de bradizoíto entre los cuales se ha descrito un antígeno de superficie (SAG4/p18) que es reconocido por un anticuerpo monoclonal (T83B1) dirigido frente a una proteína de 18 kDa (Tomavo *et al.* 1991. Infect. Immun. 59, 3750-3753). El gen TgSAG4 que codifica esta proteína en *T. gondii* ha sido clonado y caracterizado por Ödberg-Ferragut *et al.* (1996, Mol. Biochem. Parasitol. 82, 237-244).

El antígeno TgSAG4 *T. gondii* es una proteína de membrana anclada por fosfatidil-inositol-glicanos (PI-G). La detección de este antígeno específico del estadio de crecimiento lento, asociado a la infección crónica por *T. gondii*, tiene un valor diagnóstico importante como han puesto de manifiesto recientemente Cultrera *et al.* (2002, Mol. Cell. Probes 16, 31-39). Estos autores han desarrollado una RT-PCR para la detección de la infección por *T. gondii*, basada en la detección del mRNA del gen TgSAG4 en líquido cefalorraquídeo de enfermos de SIDA, en los que *T. gondii* puede producir una encefalopatía fatal.

Diagnóstico y prevención de la neosporosis

Así pues, debido a que la transmisión vertical de la enfermedad parece ser el mejor método de establecimiento de la enfermedad de forma persistente en las explotaciones y a que la neosporosis es una de las principales causas de abortos y mortalidad neonatal en el ganado bovino, con las subsiguientes pérdidas económicas, el control debe ir encaminado, fundamentalmente, a reducir la prevalencia de la infección en las explotaciones, estableciendo medidas de desecho y reposición selectivas para reducir el efectivo infectado.

El diagnóstico etiológico del aborto en el ganado bovino es complejo y laborioso. En aquellos casos en los que se llega a un diagnóstico etiológico, más del 90% corresponden a agentes infecciosos y parasitarios entre los que, actualmente, ocupa un lugar destacado *N. caninum*. En cuanto al diagnóstico de la infección por *N. caninum*, es imprescindible la realización del diagnóstico laboratorial para confirmar la etiología del aborto, ocupando un lugar destacado las técnicas de diagnóstico serológico, las cuales proporcionan una información inicial acerca de la magnitud del problema. En adultos, el diagnóstico laboratorial se realiza mediante la detección de anticuerpos específicos en el suero, lo cual es muy útil a la hora de establecer medidas eficaces para el control de la infección ya que este tipo de estudios proporciona información muy valiosa sobre la distribución y frecuencia de la infección en las explotaciones (seroprevalencia de rebaño) y sobre el riesgo de aborto por neosporosis en los rebaños infectados (seroprevalencia intra-rebaño) (Thurmond and Hietala. 1995. Parasitol. 81, 364-367; Paré *et al.* 1996. Can. J. Vet. Res. 60, 133-139).

Por lo tanto, el perfeccionamiento del diagnóstico es de suma importancia para determinar de forma precisa el estado sanitario de los animales. En este sentido se han llevado a cabo una serie de estudios con el objetivo de validar las técnicas serológicas que se utilizan en la actualidad, esclareciendo algunos aspectos controvertidos, como la elección del punto de corte en función de la edad del animal y la técnica utilizada (Alvarez-García *et al.* 2003. Vet. Res. 34, 341-352).

Puesto que en la actualidad se están utilizando diversas técnicas de diagnóstico frente a *N. caninum* (Ferre *et al.* 2003. Res. Adv. Microbiol. 3, 157-167), pero ninguna de éstas permite distinguir entre una infección reciente y una crónica, la identificación de antígenos específicos de taquizoíto y bradizoíto, respectivamente, permite desarrollar técnicas de diagnóstico que aportan más información sobre el futuro de la explotación respecto a los abortos y

mejoran el control de la enfermedad. La expresión de estos antígenos como proteínas recombinantes y su utilización para el diagnóstico serológico de la neosporosis, aportan una herramienta novedosa muy valiosa. En este sentido, se han desarrollado métodos de diagnóstico como el ELISA, basados en diversas proteínas de *N. caninum* producidas en diferentes tipos de sistemas de expresión heterólogos (Lally *et al.* 1996. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 3, 275-279; Louis *et al.* 1997. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 4 (6), 692-699), pero hasta el momento ninguno basado en antígenos específicos de bradizoíto. Del mismo modo el desarrollo de anticuerpos monoclonales y sueros policlonales mono-específicos frente a los antígenos específicos de estadio, representa una alternativa para el diagnóstico mediante el desarrollo de un ELISA de competición, como el que se ha realizado frente a una proteína de 65 kDa del taquizoíto de *N. caninum* (Baszler *et al.* 1996. J. Clin. Microbiol. 34 (6), 1423-1428).

Por otro lado, el control farmacológico de la neosporosis en el ganado bovino es inviable en la actualidad, no se tiene experiencia en el tratamiento farmacológico de la enfermedad en bovinos y los datos de que se dispone son poco alentadores. Sin embargo, los elevados costes de un posible tratamiento, la aparición de posibles resistencias y los residuos en carne o leche, limitan la quimioterapia como medida de control. De esta forma a las medidas de manejo del rebaño habría que añadir la inmunoprofilaxis.

En este sentido, las investigaciones llevadas a cabo en los últimos años para la elaboración de una vacuna frente a *N. caninum* han incluido la evaluación de vacunas muertas con resultados variables, encontrando en algunos protección contra la transmisión vertical en un modelo murino (Liddell *et al.*, 1999, J. Parasitol. 85: 1072-1075), pero no en un modelo bovino (Andrianarivo *et al.*, 1999, Int. J. Parasitol. 30: 985-990). También se ha utilizado la inmunización con vacunas vivas, basadas en aislados menos virulentos (Atkinson *et al.* 1999. Parasitology 118: 363-370) o mutantes sensibles a la temperatura (Lindsay *et al.* 1999. J. Parasitol. 85: 64-67), en ensayos de vacunación en ratones con el objetivo de estimular una respuesta inmune protectora frente a una infección letal por *N. caninum*, obteniendo resultados prometedores pero no definitivos, presentando el problema de originar animales persistentemente infectados. Por otro lado, las vacunas de subunidades presentan una serie de ventajas respecto a las vacunas tradicionales (Jenkins. 2001. Vet. Parasitol. 101, 291-310), entre ellas la seguridad y la estabilidad relativa de las proteínas recombinantes, comparadas con los parásitos vivos, la flexibilidad de incorporar sólo aquellos antígenos que inducen una respuesta inmune protectora, así como la capacidad de establecer una producción a gran escala. El desarrollo de vacunas de subunidades para la prevención de la infección, el aborto o la transmisión vertical de la infección, basadas en los antígenos de *N. caninum*, aporta un instrumento nuevo para el control de la misma. Por el momento, son escasos los trabajos realizados en este sentido. Se han utilizado tan sólo antígenos de taquizoíto o compartidos por ambos estadios, como proteínas recombinantes expresadas y purificadas a partir de un sistema procariota, entre ellos NcMIC3 que indujo inmunidad protectora frente a la neosporosis cerebral en un modelo murino (Cannas *et al.* 2003. J. Parasitol. 89 (1), 44-50), así como NcSAG1 y NcSRS2, dos proteínas de superficie del taquizoíto, inoculadas en el mismo modelo de forma combinada como antígenos recombinantes y vacunas de DNA (Cannas *et al.* 2003. Parasitology 126, 303-312), obteniendo buenos resultados. Recientemente se han utilizado plásmidos que expresan la proteína NcGRA7 o la proteína NcHSP33, como vacunas de DNA en un modelo murino, obteniendo una protección parcial frente a la transmisión congénita de la infección (Liddell *et al.* 2003. J. Parasitol. 89 (3), 496-500). Sin embargo, hasta el momento actual el desarrollo de estas vacunas no se ha basado en antígenos específicos del estadio de bradizoíto, puesto que el primero que se describe en *N. caninum* es el producido por el gen NcSAG4 tal y como se expone en la descripción de la invención de esta memoria.

Según lo expuesto en estos antecedentes, el aislamiento de genes que se expresan de forma específica en cada estadio es de gran interés para el estudio de esta enfermedad y de los mecanismos moleculares que determinan el establecimiento de la infección crónica, así como la reactivación de la infección, mejorando el conocimiento y control de esta enfermedad. En este sentido, el aislamiento del gen NcSAG4 en *N. caninum*, homólogo del gen TgSAG4, que codifica una proteína específica del estadio de bradizoíto en *T. gondii*, su clonación y la expresión del antígeno específico de estadio NcSAG4 como proteína recombinante, según se expone en la descripción de la invención de esta memoria, aporta una solución de gran utilidad para el diagnóstico de la neosporosis, así como para el análisis de la patogenia de la enfermedad, y su uso vacunal representa una alternativa para el control de la misma.

Descripción de la invención

Uso del gen NcSAG4 para el diagnóstico y la prevención de la neosporosis, y como marcador para el análisis de la patogenia.

La invención tiene por objeto proporcionar un reactivo de utilidad para su empleo con fines diagnósticos y vacunales frente a *N. caninum*. Además, facilita un marcador para el análisis de la patogenia de la neosporosis, principalmente para el estudio del establecimiento de la fase crónica de la infección, así como de la reactivación de la misma. De esta forma se describe una tecnología molecular que ha permitido la identificación, aislamiento y caracterización del gen NcSAG4 de *N. caninum*, siendo éste el primer gen específico del estadio de bradizoíto que se describe en este parásito. Para ello se amplifican por PCR varios fragmentos de DNA del gen NcSAG4, utilizando una combinación de cuatro oligonucleótidos degenerados, diseñados en base a la secuencia de aminoácidos de la proteína TgSAG4 de *T. gondii*, uno de los cuales (SEQ ID NO: 1) se describe por Ödberg-Ferragut *et al.* (1996, Mol. Biochem. Parasitol. 82, 237-244). Los otros tres oligonucleótidos diseñados se denominaron SAG4-2, SAG4-3 y SAG4-4 siendo identificados en la lista de secuencias como SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4, respectivamente. A partir de la secuencia obtenida se diseñan otros cuatro oligonucleótidos para completar la secuencia del gen, mediante la técnica del paseo cromosómico. Así, los oligonucleótidos 1R5SAG4 (SEQ ID NO: 5) y 2R5SAG4 (SEQ ID NO: 6) se utilizaron para

ES 2 263 317 B2

completar el gen en sentido 5'. Los oligonucleótidos 1F3SAG4 (SEQ ID NO: 7) y 2F3SAG4 (SEQ ID NO: 8) se utilizaron para completar el gen en sentido 3'.

La presente invención describe un método de clonación del gen *NcSAG4*, mediante su amplificación por PCR, utilizando oligonucleótidos especialmente diseñados para ello y su posterior digestión con enzimas de restricción. Esta clonación se realiza en dos tipos de plásmidos, pRSET y pcDNA3.1/His (ambos de Invitrogen), para la expresión en un sistema procarionota y eucariota, respectivamente. En el plásmido pRSET se inserta una parte del gen *NcSAG4*, que codifica desde el aminoácido 29 al 148 incluidos, correspondiente a la secuencia de la proteína *NcSAG4* madura, excluyendo las regiones del péptido señal del extremo amino de la proteína, así como del posible péptido señal del extremo carboxilo de la misma. Para ello se amplifica por PCR la región correspondiente del gen *NcSAG4* a partir de DNA genómico de *N. caninum*, utilizando los oligonucleótidos diseñados a tal fin denominados F85NcSAG4 (SEQ ID NO: 13) y Re444NcSAG4 (SEQ ID NO: 14). En este sistema, la proteína recombinante pRNcSAG4 se expresa bajo la dirección del promotor de la RNA polimerasa del fago T7, como proteína de fusión, unida en su extremo amino a un bloque de histidinas que facilita su purificación por cromatografía de afinidad. Para producir la proteína recombinante pRNcSAG4, se utilizan células de la cepa rosetta(DE3)pLysS de *E. coli* (Novagen), que expresan de forma inducida la RNA polimerasa del fago T7, por adición de IPTG al medio de cultivo, permitiendo la expresión de las proteínas recombinantes. El uso de esta proteína recombinante para diagnóstico serológico de la neosporosis, aporta una herramienta novedosa muy valiosa para el diagnóstico diferencial de las diferentes fases, aguda y crónica, de la infección, mediante ELISA, radioinmunoanálisis (RIA), o cualquier otro método basado en la capacidad antigénica de dichos polipéptidos, como se demuestra en el desarrollo de esta invención, mediante la técnica de "western blot" que se describe. De esta forma se detectan anticuerpos frente a la proteína pRNcSAG4, separada mediante electroforesis en condiciones desnaturalizantes en geles de acrilamida-DATD al 15%, en sueros de fetos y terneros congénitamente infectados de forma natural por *N. caninum*. Esto indica la utilidad de esta proteína no sólo desde el punto de vista del diagnóstico diferencial de la infección aguda y crónica por *N. caninum*, sino también desde la perspectiva de la prevención, mediante su utilización como vacuna.

Del mismo modo el desarrollo de anticuerpos monoclonales y sueros policlonales monoespecíficos frente a la proteína recombinante pRNcSAG4, representa una alternativa para el diagnóstico mediante el desarrollo de un ELISA de competición basado en estos. Así mismo estos anticuerpos monoclonales o sueros policlonales específicos frente a los polipéptidos descritos en esta invención, se utilizan para el diagnóstico de la infección crónica por *N. caninum* en los tejidos de los animales mediante inmunohistoquímica, inmunofluorescencia o cualquier otro método basado en la detección del parásito por el citado suero.

Un objetivo de la presente invención es el de proporcionar vacunas frente a la neosporosis, la transmisión vertical y el establecimiento de la infección crónica. El sistema de expresión de genes heterólogos en procarionotas, presenta la ventaja de poder producir a gran escala el antígeno recombinante, utilizándolo como vacuna de subunidades. Estas vacunas tienen otra ventaja y es la de ser utilizadas como vacunas marcadas, siendo la respuesta inmune que producen fácilmente distinguible de la producida por el parásito en los animales infectados, lo que es de vital importancia en las campañas de erradicación de las enfermedades. Además estas vacunas son seguras, lo que representa un beneficio respecto de las vacunas basadas en vectores recombinantes como los víricos. Estos últimos sin embargo presentan la ventaja de su replicación lo que permite la inmunización con baja dosis.

Sin embargo, este tipo de proteínas recombinantes utilizadas como vacuna de subunidades, inducen una respuesta inmune principalmente de tipo humoral. Así, para dirigir la respuesta inmune también hacia una respuesta de base celular, se utilizan adyuvantes que orienten esta respuesta. Por otro lado, para orientar la respuesta de base celular y asegurar el plegamiento adecuado de las proteínas, se utilizan las vacunas de DNA.

La presente invención describe una vacuna de DNA basada en la proteína *NcSAG4*, que se utiliza o no en combinación con la proteína recombinante pRNcSAG4, producida en el sistema procarionota descrito anteriormente. Para ello, la región codificante completa del gen *NcSAG4* se amplifica por PCR mediante la utilización de los oligonucleótidos diseñados a tal fin denominados FNcSAG4 (SEQ ID NO: 11) y ReNcSAG4 (SEQ ID NO: 12), y se inserta en un vector de expresión para células de mamífero, el plásmido pcDNA3.1/His, en los sitios de restricción *Bam* HI y *Eco* RI, obteniendo el plásmido recombinante al que se ha denominado pCDA10, que se utiliza como vacuna de DNA.

Por otro lado, la presente invención describe la utilización del gen *NcSAG4* como marcador de la fase de bradizoíto de *N. caninum*, asociada a la infección crónica. Este gen es utilizado como marcador mediante el uso de las moléculas nucleotídicas descritas en esta invención para el diagnóstico de la infección crónica por *N. caninum* a partir de tejidos o fluidos de los animales infectados mediante PCR o RT-PCR, hibridación *in situ* con sondas de DNA, o cualquier otro método de detección basado en los ácidos nucleicos del parásito. Se detalla un método de detección de la expresión del gen *NcSAG4* en el parásito, mediante RT-PCR, basada en los oligonucleótidos diseñados para el aislamiento del gen denominados 1F3SAG4 (SEQ ID NO: 7) y 1R5SAG4 (SEQ ID NO: 5). Esta RT-PCR permite la utilización del gen *NcSAG4* como marcador del cambio de estadio de *N. caninum*, en el hospedador intermediario, siendo una herramienta necesaria para el análisis de los mecanismos que determinan el establecimiento de la infección crónica, así como aquellos que están implicados en la reactivación de la infección, en los animales persistentemente infectados, y de los factores que influyen en estos procesos, así como para determinar la eficiencia de los productos vacunales frente a *N. caninum*, en cuanto a la protección frente al establecimiento de la infección crónica y la reactivación. Del mismo modo el uso del promotor del gen *NcSAG4* para expresar genes heterólogos en células de *N. caninum* transfectadas gracias

a construcciones genéticas elaboradas con el citado promotor, permite el análisis de los mecanismos moleculares que determinan la conversión de estadio de taquizoíto a bradizoíto y a la inversa, tanto en sistemas de expresión *in vitro* como *in vivo*, en cultivos celulares o en animales de experimentación.

5 Descripción de los dibujos

Para complementar la descripción y con objeto de ayudar a una mejor comprensión de las características de la invención, se acompaña a la presente memoria descriptiva, como parte integrante de la misma, un juego de dibujos en donde con carácter ilustrativo y no limitativo, se ha representado lo siguiente:

10 Figura 1

Representa la amplificación de las secuencias Nc175 y Nc312 del genoma de *N. caninum*, según se explica en el ejemplo 1 de esta memoria.

15 Figura 2

Representa el esquema del paseo cromosómico o “genome walking”, según se explica en el ejemplo 1 de esta memoria.

20 Figura 3

Representa la inserción del gen NcSAG4 en plásmidos de expresión. Panel A. PcDNA3.1/His. Panel B: pRSET, según se explica en el ejemplo 2 de esta memoria y el esquema de la proteína recombinante pRNcSAG4 (Panel C), según se explica en el ejemplo 2 de esta memoria.

Figura 4

30 La figura muestra la selección de los plásmidos recombinantes por digestión con enzimas de restricción, según se explica en el ejemplo 2 de esta memoria.

Siendo WM “Molecular weight standards, low range (Bio-rad)”.

35 Figura 5

Expresión de la proteína recombinante pRNcSAG4 en *E. coli*, según se explica en el ejemplo 2 de esta memoria.

Figura 6

40 Caracterización de la inmunogenicidad de la proteína recombinante pRNcSAG4, según se explica en el ejemplo 3 de esta memoria.

Figura 7

45 Detección de la transcripción del gen NcSAG4 en el estadio de bradizoíto de *N. caninum* por RT-PCR, según se explica en el ejemplo 4 de esta memoria.

Modo de realización de la invención

50 La presente invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos, los cuales no son limitativos de su alcance, que viene definido exclusivamente por la nota reivindicatoria adjunta.

Ejemplo 1

55 *Aislamiento y caracterización del gen NcSAG4*

Para el aislamiento del gen NcSAG4 de *N. caninum* se utilizó el método denominado paseo cromosómico o “genome-walking”, que permite amplificar por PCR fragmentos de DNA cuya secuencia se desconoce pero que flanquean regiones de DNA conocidas.

60 Para amplificar la secuencia conocida, se utilizaron cuatro oligonucleótidos degenerados mejorando los descritos para clonar el gen TgSAG4 de *T. gondii* (Ödberg-Ferragut *et al.*, *Mol. Biochem. Parasitol.* 82 (1996) 237-244). Uno de los oligonucleótidos directos usado fue el oligo la (SEQ ID NO 1), descrito por estos autores, siendo diseñados los otros tres en base a las secuencias de aminoácidos codificadas por el gen TgSAG4 de *T. gondii* presentes en las bases de datos de las siguientes cepas: RH (AF340224.1), PLK (Z69373.1), Prugniaud (AF340225.1) y CEP (AF340226.1). Así se diseñó un oligonucleótido directo, al que se denominó SAG4-2 (SEQ ID NO: 2) y dos oligonucleótidos inversos a los que se denominó SAG4-3 (SEQ ID NO: 3) y SAG4-4 (SEQ ID NO: 4).

ES 2 263 317 B2

Para realizar la PCR se utilizaron 0,4 µg de DNA genómico, aislado a partir de taquizoítos de *N. caninum*. Para el aislamiento del DNA genómico se utilizó un kit comercial, siguiendo las indicaciones de uso (*GenomicPrep Cells and Tissue DNA Isolation kit*, Amersham Biosciences). Como testigo positivo se utilizó DNA genómico de *T. gondii* aislado de la misma forma. Como DNA polimerasa se utilizó el enzima *EcoTaq* (Ecogen) a 2.5 U por reacción, en el tampón correspondiente, en presencia de Cl₂Mg (4 mM), dNTPs (200 µM) y 40 pmol de cada oligonucleótido degenerado. Las condiciones de la PCR fueron: 5 minutos de desnaturalización a 94°C, seguido de 40 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto de anillamiento en el que se hizo un gradiente de temperatura, desde 43°C hasta 56°C (figura 1, carriles 4-9), 1 minuto a 72°C, aumentando la elongación un segundo en cada ciclo, y finalmente una elongación de 10 minutos a 72°C. Como testigo negativo se utilizó la mezcla de reacción sin DNA (figura 1, carril 1) o bien DNA genómico procedente de células MARC-145 sin infectar (figura 1, carriles 2 y 3).

Como resultado de la PCR se amplificaron varios fragmentos al utilizar la temperatura de anillamiento de 56°C, que fueron separados mediante electroforesis en un gel de agarosa al 2% en TBE al 1x (figura 1), tanto a partir del DNA genómico de *N. caninum* (figura 1, carril 9) como de *T. gondii* (figura 1, carril 12). De estos fragmentos dos se correspondían con el tamaño esperado para la combinación de los oligonucleótidos la y SAG4-3 de 175 pb (Nc175), y la con SAG4-4 de 312 pb (Nc312). Estos fragmentos de DNA fueron purificados a partir de un gel de agarosa al 2% en tampón TBE 1x, utilizando un kit comercial (GenomeGENECLEAN® Turbo nucleic acid purification kit, Q-BIOgene) siguiendo las indicaciones del fabricante y secuenciados con el oligonucleótido 1a (Servicio de secuenciación del Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols”, CSIC-UAM). La secuencia de nucleótidos resultante se comparó con las existentes en las bases de datos (BLASTN-nr, www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/) presentando una similitud del 82% con la secuencia del gen TgSAG4 de tres cepas de *T. gondii*, en 64 pb del fragmento. Así mismo, al traducir la secuencia Nc175 a las diferentes fases de lectura posibles, y compararla con la base de datos de *T. gondii* (TgGI: TIGR *Toxoplasma gondii* gene index, www.tigr.org/tdb/tgi/tggi), mostró una similitud del 68% con un grupo de secuencias descrito como proteína de superficie (TC2754), que coincide con las proteínas que codifican las secuencias del gen TgSAG4 de las cepas anteriormente citadas (RH, PKL, Prugniaud y CEP) y con un EST descrito a partir de una genoteca de bradizoítos de la cepa ME49 (*Toxoplasma gondii* v3, Parasite Consensus EST Data bases). Por último se comparó la secuencia Nc175 con la base de datos de *N. caninum* (NcGI: TIGR *Nespora caninum* gene index, www.tigr.org/tdb/tgi) y no presentó similitud alguna con las secuencias descritas hasta el momento.

Una vez aislada la secuencia Nc175 se identificó el gen NcSAG4 utilizando el método del paseo cromosómico o “genome walking”, en sentido 5’ y 3’ a partir de la secuencia Nc175, a partir del DNA genómico de *N. caninum*, utilizando un kit comercial (Universal Genome Walker™ kit, BD Biosciences Clontech). El primer paso para llevar a cabo esta técnica es la digestión (figura 2, paso 1) del DNA genómico con cuatro enzimas de restricción distintas que producen extremos romos: *EcoRV* (1), *DraI* (2), *PvuII* (3) y *StuI* (4), y su posterior ligación a unos adaptadores (figura 2, paso 2), siguiendo las instrucciones de la casa comercial. A continuación, con cada una de las genotecas así obtenidas se realiza una PCR doble utilizando unos oligonucleótidos que se unen al adaptador (AP1 y AP2) y los oligonucleótidos específicos del gen, diseñados en función de la secuencia genómica conocida (figura 2, paso 3). Los oligonucleótidos diseñados a partir de la secuencia Nc 175 para realizar el paseo cromosómico en sentido 5’ se denominaron 1R5SAG4 (SEQ ID NO: 5) y 2R5SAG4 (SEQ ID NO: 6) y los diseñados para realizar el paseo cromosómico en sentido 3’ se denominaron 1F3SAG4 (SEQ ID NO: 7) y 2F3SAG4 (SEQ ID NO: 8). La primera PCR se realizó con cada una de las “genotecas de DNA genómico” utilizando los oligonucleótidos AP1 y 1R5SAG4 ó 1F3SAG4, para realizar el paseo cromosómico en sentido 5’ o 3’, respectivamente, siguiendo las instrucciones de la casa comercial, utilizando una DNA polimerasa termoestable de larga distancia (Advantage® Genomic PCR kit, BD Biosciences Clontech). Las condiciones en las que se realizó la PCR fueron 7 ciclos de 25 segundos a 94° y 3 minutos a 68°C seguidos de 32 ciclos de 25 segundos a 94°C y 3 minutos a 64°C, con una elongación final a 64°C durante 7 minutos. La segunda PCR se llevó a cabo a partir de una dilución 1:50 de los productos de la primera PCR y se realizó con los oligonucleótidos AP2 y 2R5SAG4 ó 2F3SAG4, para realizar el paseo cromosómico en sentido 5’ ó 3’ respectivamente. Las condiciones en que se realizó la segunda PCR fueron: 5 ciclos de 25 segundos a 94°C y 6 minutos a 68°C, seguidos de 20 ciclos de 25 segundos a 94°C y 6 minutos a 64°C con una elongación final a 64°C durante 10 minutos. Los fragmentos de DNA obtenidos mediante el paseo cromosómico se purificaron como se ha descrito anteriormente y se secuenciaron (figura 2, paso 4).

De esta forma, al comparar las secuencias de los diferentes fragmentos amplificados se pudo determinar una secuencia de 601 nucleótidos (SEQ ID NO: 9). Esta secuencia se denominó NcSAG4, por su homología con la del gen TgSAG4 de *T. gondii*, que codifica una proteína específica de la fase de bradizoíto. Así mismo, se comprobó la existencia de una fase de lectura abierta (ORF) de 522 pb, de un tamaño similar a su homóloga en *T. gondii*, que codifica una proteína de 173 aminoácidos (SEQ ID NO: 10). Al hacer la comparación de la secuencia de aminoácidos que codifica esta ORF, con las secuencias existentes en las bases de datos (BLASTx, www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/), se encontró una similitud del 69% con las de la proteína TgSAG4 de las diferentes cepas de *T. gondii*.

Ejemplo 2

Expresión del antígeno NcSAG4 como proteína recombinante

Una vez identificado el gen NcSAG4, se insertó la región codificante en vectores de expresión para producir el antígeno NcSAG4 como proteína recombinante en un sistema heterólogo. Para el sistema eucariota se eligió el plásmido de expresión pcDNA3.1/His[®]-C (Invitrogen) (figura 3, panel A) y para el sistema procariota el plásmido de expresión pRSET-C (Invitrogen) (figura 3, panel B). En el plásmido pcDNA3.1/His[®]-C se insertó la región codificante com-

ES 2 263 317 B2

pleta del gen *NcSAG4* en los sitios *Bam*HI y *Eco*RI. Para ello se realizó una PCR a partir del DNA genómico de *N. caninum*, utilizando oligonucleótidos diseñados para este fin (OligoANALYZER 1.0.2.). El oligonucleótido directo se denominó F*NcSAG4* (SEQ ID NO: 11), en cuyo extremo 5' se incluyó un sitio específico de reconocimiento para *Bam*HI, seguido de un sitio *Nco*I, anterior a una secuencia idéntica al extremo 5' de la ORF del gen *NcSAG4*. El oligonucleótido inverso se denominó R*NcSAG4* (SEQ ID NO: 12), en cuyo extremo 5' se incluyó un sitio específico de reconocimiento para *Eco*RI, seguido de una secuencia inversa complementaria al extremo 3' de la ORF del gen *NcSAG4*.

Para la expresión en procariotas se insertó una parte del gen *NcSAG4*, que codifica una forma truncada de la proteína, desde el aminoácido 29 al 148 incluidos, en los sitios *Bam*HI y *Eco*RI del plásmido pRSET-C. Para ello se diseñaron dos oligonucleótidos utilizando el programa de ordenador (OligoANALYZER 1.0.2.). El oligonucleótido directo se denominó F85*NcSAG4* (SEQ ID NO: 13), en cuyo extremo 5' se incluyó un sitio específico de reconocimiento para *Bam*HI, seguido de una secuencia idéntica a la ORF del gen *NcSAG4* desde el nucleótido 83 al 100. El oligonucleótido inverso se denominó R444*NcSAG4* (SEQ ID NO: 14), en cuyo extremo 5' se incluyó un sitio específico de reconocimiento para *Eco*RI, seguido de un triplete de terminación (TAA) y a continuación la secuencia inversa complementaria de la ORF del gen *NcSAG4*, desde el nucleótido 328 al 444.

Para realizar la PCR en ambos casos, se utilizaron 0,1 μ g de DNA genómico por reacción, aislado a partir de taquizoítos de *N. caninum*. Como DNA polimerasa se utilizó *EcoStart* (Ecogen), 1,25 U por reacción, en un volumen final de 25 μ l en el tampón correspondiente, en presencia de 2,5 mM de Cl_2Mg , dNTPs (200 μ M) y 40 pmol de cada oligonucleótido. Las condiciones de la PCR fueron 7 minutos de desnaturalización a 95°C, seguido de 40 ciclos de 30 segundos a 95°C, 1 minuto a 53°C, 4 minutos a 72°C, aumentando la elongación un segundo en cada ciclo, y finalmente una elongación de 10 minutos a 72°C. Los productos de la PCR fueron visualizados en un gel de agarosa al 1,5% en tampón TAE 1x, teñido con bromuro de etidio (BrEt), observando un tamaño de 542 pb, correspondiente al esperado para la ORF del gen *NcSAG4*, y de 385 pb para el gen truncado. Posteriormente, estos fragmentos de DNA fueron purificados y digeridos con los enzimas de restricción *Bam*HI (5U) y *Eco*RI (6U) en el tampón adecuado (tampón B, Roche) en un volumen final de 50 μ l, durante cuatro horas a 37°C en un baño de agua. Al mismo tiempo y en idénticas condiciones fue digerido cada vector plasmídico. Estos plásmidos fueron tratados al final de la digestión con 2 U del enzima fosfatasa alcalina de gamba (SAP) durante 30 minutos en la misma reacción de digestión a 37°C. Posteriormente se inactivó el enzima SAP durante 20 minutos a 65°C, en presencia de EDTA 10 mM. Una vez realizada la digestión, tanto el DNA plasmídico como los productos de PCR fueron visualizados en un gel de agarosa de bajo punto de fusión al 1,5% en tampón TAE 1x teñido con BrEt, y posteriormente purificados a partir del mismo.

Para la manipulación de los plásmidos se siguió básicamente la metodología descrita por Sambrook y cols. (1989). Una vez purificado cada fragmento de DNA digerido fue ligado a 50 ng del vector correspondiente, siendo el p*CDNA3.1/His*[®]-C (Invitrogen) para la ORF completa del gen *NcSAG4* y el plásmido pRSET-C para el gen truncado, en una proporción 1:3 vector:inserto, en presencia de 1U del enzima T4DNA ligasa, en el tampón adecuado y en un volumen final de 15 μ l. La ligación se realizó en tubos de 0,5 ml (*M* μ lti[™], Sorenson BioScience), en un termociclador durante 18 horas a 12°C, siendo conservada posteriormente a -20°C hasta su uso.

Una vez realizada la ligación ésta fue utilizada para transformar células de la cepa DH5 α de *E. coli* competentes congeladas, mediante electroporación. Para transformar las bacterias por electroporación se siguieron básicamente las indicaciones de la casa comercial del electroporador (GenePulser[™], Bio-rad). Se utilizaron cubetas de electroporación de 2 mm (Equibio) previamente enfriadas en hielo. Las bacterias competentes se descongelaron y se mantuvieron en hielo, hasta añadir 5 μ l de la ligación. Una vez transcurrido un minuto en hielo se sometieron a un pulso de 2,5 kV a 25 μ FD y 200 Ohm, durante 4-5 segundos. Inmediatamente las bacterias transformadas se resuspendieron en 500 μ l de medio SOC ($MgSO_4$ 10 mM, $MgCl_2$ 10 mM y glucosa 20 mM añadidos a medio SOB: bacto triptona 2%, extracto de levadura al 0,5%, NaCl 10 mM y KCl 2,5 mM) y se crecieron durante una hora a 37°C y finalmente 200 μ l de la suspensión celular fueron plaqueados en medio LB-agar (1,5% de agar noble) en presencia de 100 μ g/ml de Ampicilina, antibiótico frente al que presentan resistencia los plásmidos utilizados. Las bacterias transformadas con los plásmidos fueron seleccionadas tras su crecimiento en las placas con el medio adecuado, durante 18 horas a 37°C. Se seleccionaron 10 clones de cada una y se crecieron toda la noche a 37°C en 3 ml de medio LB líquido con 100 μ g/de Ampicilina, para el posterior aislamiento del DNA plasmídico. Este DNA fue obtenido por el método de lisis alcalina y posteriormente visualizado en un gel de agarosa al 0,8% en tampón TAE 1x, para seleccionar aquellos clones con el plásmido del tamaño esperado. Los plásmidos de interés se denominaron pCDA, numerado del 1 al 10 según el clon, al plásmido construido por inserción de la ORF completa del gen *NcSAG4* en el plásmido p*CDNA3.1/His*[®]-C, cuyo tamaño esperado era de 6.028 pb. El plásmido obtenido por inserción de la forma truncada del gen *NcSAG4*, del nucleótido 83 al 444, en el pRSET-C (3.235 pb), se denominó pRC, del 1 al 10, según el clon. Según el tamaño observado se seleccionaron cuatro clones de cada uno para su caracterización por enzimas de restricción (figura 4). Así se digirieron los plásmidos obtenidos con los enzimas de restricción *Bam*HI (5U) y *Eco*RI (6U) en el tampón adecuado (tampón B, Roche) en un volumen final de 20 μ l, durante dos horas a 37°C en un baño de agua. El DNA plasmídico digerido se separó en un gel de agarosa al 0,8% en tampón TBE 0,5%, observando la liberación de un fragmento del tamaño adecuado en cada uno de los plásmidos construidos. Así, los plásmidos pCDA5, pCDA6, pCDA9 y pCDA10 liberaron un fragmento de 528 pb (figura 4, panel A, carriles 1 al 4 respectivamente), siendo el fragmento de 371 pb en los plásmidos pRC6, pRC7, pRC9 y pRC10 (figura 4, panel B, carriles 3 al 6 respectivamente). Además, se cortaron los vectores p*CDNA3.1/His*[®]-C (figura 4, panel A, carril 5 y 6) y pRSET-C (figura 4, panel B, carril 1) y se utilizaron como testigos de la digestión. En el gel de agarosa se cargó también el plásmido pRSET-C (figura 4, panel

ES 2 263 317 B2

B, carril 2) sin digerir. Los plásmidos pCDA10 y pRC10 fueron secuenciados utilizando el oligonucleótido comercial T7, confirmado la inserción de los fragmentos en el vector de expresión de forma correcta.

5 La proteína recombinante pRNcSAG4 (SEQ ID NO: 15) comprende desde el aminoácido 29 hasta el 148, codificados por la ORF del gen *NcSAG4*, descrita en esta invención y se corresponde con la secuencia aminoacídica de la posible proteína *NcSAG4* madura, en la que faltarían el péptido señal del extremo amino así como el posible péptido señal del extremo carboxilo, según los criterios revisados por Gerber *et al.* (1992. JBC 267. 12168-12173), unido en el extremo amino a un bloque de aminoácidos que incluye 6 histidinas, lo que permite su purificación por cromatografía de afinidad, el péptido T7-tag así como una zona de reconocimiento de la enteroquinasa. En la figura 3, panel C se presenta un esquema de la proteína recombinante pRNcSAG4.

15 Para expresar la proteína recombinante en el sistema procariota, células de la cepa Rosetta(DE3)pLysS de *E. coli* (Novagen) fueron transformadas con el plásmido pRC10, siguiendo las indicaciones de la casa comercial. Las células transformadas con el plásmido pRC10, fueron plaqueadas en medio LB-agar con ampicilina (100 $\mu\text{g/ml}$) y cloranfenicol (34 $\mu\text{g/ml}$) y crecidas toda la noche a 37°C. Al día siguiente se seleccionaron 6 colonias de las placas y se crecieron durante la noche a 37°C en 3 ml del mismo medio líquido de selección. Al día siguiente se diluyó el cultivo 1:10 en el mismo medio de crecimiento y se mantuvo en idénticas condiciones hasta alcanzar una A_{600} de 0,9 OD. A continuación, se indujo la expresión de la proteína recombinante en presencia de IPTG 1 mM, durante 4 horas en agitación a 250 rpm y 37°C. Finalmente las células fueron recogidas por centrifugación a 3.500 xg durante 20 15 minutos. Una vez retirado el sobrenadante los sedimentos fueron conservados a -80°C hasta su uso.

25 Para caracterizar la expresión de las proteínas recombinantes, los sedimentos celulares, recogidos anteriormente, se lisaron en una solución de rotura comercial denominada BugBuster (Novagen), al 1x en Tris 20 mM pH 7,98 a una concentración de 5 ml/lgr de sedimento celular. Se incubaron en agitación suave y temperatura ambiente, en presencia del enzima Benzonasa (Novagen, 1U/ml de Bugbuster 1x), durante 40 min. A continuación se separó la fracción soluble del sedimento, donde se encuentran los cuerpos de inclusión, por centrifugación a 20.000 xg durante 15 minutos para determinar la localización de la proteína de interés. Posteriormente se lavaron los cuerpos de inclusión según las indicaciones de la casa comercial. Finalmente se separaron las proteínas, solubilizadas en tampón de carga de Laemmli 1x (Laemmli. 1970. Nature 227, 680-685), en una proporción de 50 $\mu\text{l/ml}$ de cultivo original, mediante electroforesis en condiciones desnaturalizantes en geles de acrilamida-DADT al 15% (figura 5). Se separaron las proteínas tanto de un extracto total de las bacterias recogidas antes de la inducción (Figura 5, carril 1), como después de la inducción (Figura 5, carril 2), así como el sobrenadante (Figura 5, carril 3) y el sedimento, recogidos anteriormente (Figura 5, carril 4), y también los cuerpos de inclusión tras los lavados (figura 5, carril 5). De esta forma se confirmó la expresión de la proteína recombinante pRNcSAG4 en las células Rosetta(DE3)pLysS de *E. coli* (Novagen), con la masa molecular aparente esperada de 17,2 kDa y su localización en cuerpos de inclusión.

Ejemplo 3

Determinación de la inmunogenicidad de la proteína pRNcSAG4

40 Se determinó la inmunogenicidad de la proteína recombinante pRNcSAG4 mediante “western blot” (figura 6), utilizando sueros de origen bovino procedentes de animales infectados de forma natural con *N. caninum*. La infección de estos sueros había sido diagnosticada previamente por la técnica de ELISA e inmunofluorescencia indirecta (IFI), presentando títulos de anticuerpos específicos elevados. Se realizaron tres lavados de los cuerpos de inclusión donde se localiza la proteína pRNcSAG4, utilizando una solución BugBuster al 0,1x, según indica la casa comercial. A continuación se separaron las proteínas en geles de acrilamida-DATD al 15%, mediante electroforesis en condiciones desnaturalizantes, y finalmente se realizó la electrotransferencia a una membrana de nitrocelulosa de 0,2 μm (Bio.rad), a 400 mA durante una hora sumergida en tampón de transferencia enfriado previamente (Tris 25 mM, glicina 192 mM pH 8,5 y metanol al 20%). Los sueros de origen bovino que se utilizaron fueron de diferentes orígenes. Así se utilizaron sueros de animales en los que posiblemente se esté instaurando la infección crónica, desarrollando bradizoítos, como aquellos procedentes de animales nacidos con una infección congénita, que muestran seropositividad precalostral, o aquellos fluidos corporales procedentes de fetos abortados durante el último tercio de gestación. Por otro lado se usaron sueros procedentes de vacas que habían abortado, representativos de una posible reactivación de la infección por *N. caninum*, que motiva el aborto. Así, se utilizaron los sueros precalostrales de tres terneros (figura 6, paneles A y B, carriles 1, 2 y 3), con títulos elevados frente a *N. caninum* por IFI. Del mismo modo se utilizó líquido abdominal, con título de anticuerpos frente a *N. caninum* elevados por IFI, de fetos abortados durante el segundo (figura 6, paneles A y B, carril 4) y tercer tercio de gestación (figura 6, paneles A y B, carriles 5 y 6) procedentes de vacas que habían abortado, seropositivas a *N. caninum* (Figura 6, paneles A y B, carriles 7 y 8). Por último se utilizó el suero de otras dos vacas que habían abortado (Figura 6, paneles A y B, carriles 9 y 10), seropositivas a *N. caninum* por IFI, con un título de anticuerpos elevado.

65 Como testigo de la técnica, se realizó el “western blot” en paralelo con los mismos sueros, en una membrana a la que se transfirió un extracto soluble procedente de taquizoítos de *N. caninum* producidos “*in vitro*”, utilizando los mismos sueros. Para producir el extracto soluble, así como para realizar el “western blot”, se siguió básicamente el protocolo descrito anteriormente (Álvarez *et al.* 2002. Vet. Parasitol. 107, 17-27). Así, se bloquearon las membranas con BSA al 3% en Tween-20 al 0,05% (TBS-T) durante una hora en agitación a temperatura ambiente. A continuación se incubaron las membranas con los sueros de origen bovino, a una dilución 1:20 en TBS-T con BSA al 0,3%, durante dos horas en agitación a 37°C. Tras tres lavados rápidos con TBS-T, seguidos de uno de 15 minutos y

dos de 5 minutos, las membranas se incubaron con un anticuerpo monoclonal de ratón anti-IgG de bovino conjugado con peroxidasa (Hipra), a una dilución 1:200 en TBS-T con BSA al 0,3%, durante una hora en agitación a 37°C. Tras otra serie de lavados en las condiciones anteriores, se reveló con una solución de sustrato preparada inmediatamente antes de su uso (60 mg de 4-Cloro-1-Naphtol disuelto en 20 ml de metanol, 100 ml de TBS y 0,060 ml de peróxido de hidrógeno), durante 15 minutos a temperatura ambiente en oscuridad y en agitación.

Mediante el “western blot” se detectó una respuesta evidente frente a la proteína recombinante en aquellos sueros precalostrales procedentes de los terneros infectados congénitamente por *N. caninum* (figura 6, panel A, carriles 1, 2 y 3), así como en el líquido abdominal de un feto abortado durante el último tercio de la gestación (figura 6, panel A, carril 6). Estos animales mostraron una respuesta evidente frente a los antígenos inmunodominantes del estadio de taquizoíto (figura 6, panel B, carriles 1-3 y 6), a excepción de dos de los fetos abortados (figura 6, panel B, carriles 4 y 5). Sin embargo no se detectó una respuesta evidente en las vacas que habían abortado (figura 6, panel A, carriles 7-10), en las que sin embargo hubo una respuesta evidente frente a los antígenos inmunodominantes del estadio de taquizoíto (figura 6, panel B, carriles 7-10).

Estos resultados confirman la existencia de una respuesta frente a la proteína NcSAG4, en el animal infectado de forma natural, en aquellos casos en los que se puede estar instaurando la forma crónica de la infección, es decir aquellos casos en los que se produce la transformación del taquizoíto al bradizoíto, lo que confirma la especificidad de la proteína NcSAG4 de esta fase de crecimiento lento del parásito, como ocurre con su homóloga en *T. gondii* (TgSAG4). La falta de respuesta frente a la pRNcSAG4 en aquellos animales con infección aguda, en los que es característico el estadio de taquizoíto, que sin embargo presentan una respuesta evidente frente al extracto de taquizoíto, confirma nuevamente la especificidad de la proteína NcSAG4 del estadio de bradizoíto.

Ejemplo 4

Determinación de la transcripción del gen *NcSAG4* en la fase de bradizoíto de *N. caninum* por RT-PCR

Para determinar la especificidad de estadio de la transcripción del gen *NcSAG4* de *N. caninum*, se ha desarrollado una RT-PCR realizada a partir del RNA total extraído de bradizoítos cultivados *in vitro*. Para la producción de los bradizoítos en cultivos celulares se siguió el método descrito por Risco-Castillo *et al.* (2003) J. Parasitol., enviado para publicar). Para ello se utilizaron taquizoítos de *N. caninum* (Barber *et al.* 1995. Parasitol. 111, 563-568), para infectar monocapas de células MARC-145 (Kim *et al.* 1993. Arch. Virol. 133, 477-483), a una dosis hospedador-parásito de 2:1. Los cultivos celulares infectados se mantuvieron en DMEM suplementado con suero fetal bovino al 10% en presencia de Hepes (pH 7.2) 15 mM, glutamina (2 mM), penicilina (10 U/ml), estreptomycin (10 µg/ml), fungizona (25 ng/ml) e incubadas a 37°C y 5% CO₂.

Para inducir la conversión de estadio, se trataron los cultivos infectados con nitroprusiato sódico (SNP) a una concentración de 70 µM en el medio de cultivo durante 7 días tras la infección, siendo reemplazado cada dos días. Como testigo negativo, se mantuvieron los cultivos infectados sin tratamiento con SNP, para la producción de taquizoítos. Una mezcla de taquizoítos y bradizoítos fue recogida por raspado del tapiz celular infectado y tratado con SNP, centrifugando a 1350 xg durante 15 min a 4°C. Los taquizoítos producidos en los cultivos infectados sin tratar con SNP se recogieron de la misma forma. Tras dos lavados en PBS en las mismas condiciones, los zoítos se resuspendieron utilizando una aguja de 25G y se purificaron utilizando columnas de sephadex™ G25 (PD-10, Amersham Biosciences), para eliminar los restos celulares. Para ello, tras equilibrar la columna con 5 ml de PBS, se dejó fluir por gravedad la suspensión de zoítos en 5 ml de PBS. Tras dos lavados con el mismo volumen de PBS, se recogieron los zoítos por centrifugación a 1350 xg durante 15 min. a 4°C. Los zoítos recogidos se mantuvieron congelados a -80°C hasta su uso.

Para la extracción del RNA total se utilizaron sedimentos de 10⁷ taquizoítos o una mezcla de taquizoítos y bradizoítos, producidos según se describe anteriormente. Para ello se utilizó el kit comercial NucleoSpin RNA II (BD Biosciences Clontech), siguiendo las indicaciones de la casa comercial. El RNA total obtenido se separó mediante electroforesis en un gel de agarosa al 0,8% en tampón TAE1x, para comprobar su calidad.

Para llevar a cabo la RT-PCR en un solo tubo, se emplearon 100 ng del RNA total de cada origen, taquizoíto o bradizoíto, y se utilizó un kit comercial denominado “Qiagen® One-step RT-PCR kit” (Qiagen), siguiendo las indicaciones de la casa comercial (figura 7). Para ello se emplearon los oligonucleótidos denominados 1R5SAG4 (SEQ ID NO: 5) y 1F3SAG4 (SEQ ID NO: 7). La RT se llevó a cabo a 50°C durante 30 minutos. Las condiciones de la PCR fueron 15 minutos de desnaturalización a 95°C, seguido de 40 ciclos de 30 segundos a 94°C, 1 minuto a 61°C, 1 minuto a 72°C y finalmente una elongación de 10 minutos a 72°C. Los productos de la PCR fueron visualizados en un gel de agarosa de alta resolución al 3% en tampón TBE 0,5x, teñido con bromuro de etidio (BrEt). Como resultado de la RT-PCR se confirmó la ausencia de transcripción del RNA mensajero (mRNA) de *NcSAG4* en los taquizoítos (Figura 7, carril 2) y la presencia del citado mRNA en los bradizoítos (Figura 7, carril 3). Como testigo positivo de la PCR se utilizaron 100 ng de DNA genómico obtenido a partir de taquizoítos de *N. caninum* (Figura 7, carril 4) y como control negativo de la PCR se utilizó agua ultrapura, en lugar de muestra (Figura 7, carril 1). De esta forma se confirma la especificidad de la transcripción del gen *NcSAG4*, del estadio de bradizoíto de *N. caninum*, al igual que sucede en su homólogo TgSAG4 de *T. gondii*.

REIVINDICACIONES

1. Molécula polinucleotídica de 601 nucleótidos aislada de *Neospora caninum* y **caracterizada** por SEQ ID NO: 9, correspondiente al gen NcSAG4, que comprende una ORF de 522 nucleótidos que codifica la proteína antigénica NcSAG4 de 173 aminoácidos y caracterizada por SEQ ID NO: 10.
2. Molécula polinucleotídica que comprende la secuencia de la ORF del gen NcSAG4 según reivindicación 1, incluida en un vector de expresión, y preferentemente el plásmido pcDNA3.1-His-C (Invitrogen), por inserción de la misma amplificada por PCR utilizando los oligonucleótidos FNcSAG4 y ReNcSAG4 **caracterizados** por SEQ ID NO: 11 y SEQ ID NO: 12 respectivamente.
3. Molécula polinucleotídica que comprende la secuencia que incluye desde el nucleótido 83 hasta el 444 de la ORF del gen NcSAG4 descrita en la reivindicación 1, incluida en un vector de expresión, y preferentemente el plásmido pRSET-C, por inserción de la misma amplificada por PCR utilizando los oligonucleótidos F85NcSAG4 y Re444NcSAG4, **caracterizados** por SEQ ID NO: 13 y SEQ ID NO: 14, respectivamente.
4. Molécula polinucleotídica seleccionada del conjunto de secuencias constituido por el gen NcSAG4 de *Neospora caninum*, **caracterizado** por SEQ ID NO: 9, por secuencias homólogas a NcSAG4 (SEQ ID NO: 9) que codifican el antígeno NcSAG4 y por fragmentos de NcSAG4 (SEQ ID NO: 9) que codifican polipéptidos que conservan las características antigénicas de NcSAG4.
5. El uso de los oligonucleótidos: SAG4-2, SAG4-3, SAG4-4, 1R5SAG4, 2R5SAG4, 1F3SAG4 y 2F3SAG4, FNcSAG4, ReNcSAG4, F85NcSAG4, Re444NcSAG4 **caracterizados** por SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 11, 12, 13 y 14, para la detección de *N. caninum* por PCR o RT-PCR, para su utilización como sondas de DNA, o para la amplificación por PCR de cualquier fragmento de la secuencia descrita en la reivindicación 1.
6. Un vector recombinante que comprenda la secuencia nucleotídica **caracterizada** por SEQ ID NO: 9 según reivindicaciones 1 a 4.
7. Las células eucariotas hospedadoras transfectadas con los vectores recombinantes de la reivindicación 6.
8. Las células procariotas hospedadoras transformadas con los vectores recombinantes de la reivindicación 6.
9. Un polipéptido sustancialmente purificado o aislado seleccionado de (a) la proteína antigénica NcSAG4 de *N. caninum*, **caracterizada** por SEQ ID NO: 10 según reivindicación 1; (b) secuencias modificadas química o enzimáticamente derivadas de homólogas a la proteína NcSAG4 (SEQ ID NO: 10) que conservan sus características antigénicas; (c) polipéptidos derivados de NcSAG4 (SEQ ID NO: 10) que conservan sus características antigénicas; o (d) proteínas recombinantes que incluyen NcSAG4 (SEQ ID NO: 10) o incluyen polipéptidos derivados de NcSAG4 (SEQ ID NO: 10) que conservan sus características antigénicas.
10. El uso del promotor del gen NcSAG4 para expresar genes heterólogos en células de *N. caninum* transfectadas por construcciones genéticas elaboradas con el citado promotor.
11. Uso de las moléculas polinucleotídicas descritas en las reivindicaciones 1 a 5 para el diagnóstico de la infección crónica por *N. caninum* a partir de tejidos o fluidos de los animales infectados mediante PCR o RT-PCR, hibridación *in situ* con sondas de DNA o cualquier otro método de detección basado en los ácidos nucleicos del parásito.
12. Uso de los polipéptidos descritos en la reivindicación 9 para el diagnóstico serológico de la infección crónica por *N. caninum* mediante enzoinmunoanálisis (ELISA), radioinmunoanálisis (RIA), inmunoblot o cualquier otro método basado en la capacidad antigénica de dichos polipéptidos.
13. Uso de anticuerpos monoclonales o suero policlonal específico frente a los polipéptidos descritos en la reivindicación 9, para el diagnóstico serológico de la infección crónica por *N. caninum* mediante un ELISA de competición.
14. Uso de anticuerpos monoclonales o suero policlonal específico frente a los polipéptidos descritos en la reivindicación 9, para el diagnóstico de la infección crónica por *N. caninum* en los tejidos de los animales mediante inmunohistoquímica, inmunofluorescencia o cualquier otro método basado en la detección del parásito por el citado suero.
15. Una composición inmunogénica que comprenda: (a) un polipéptido descrito en la reivindicación 9; (b) una molécula polinucleotídica según reivindicaciones 1 a 4; (c) un vector recombinante como el descrito en la reivindicación 6; (d) las células hospedadoras transfectadas según reivindicación 7; o (e) las células hospedadoras transformadas según reivindicación 8, formulada como vacuna contra la neosporosis.
16. Una composición inmunogénica según la reivindicación 15, que comprenda un adyuvante o una o varias citoquinas.

ES 2 263 317 B2

17. Un método de preparación de una composición inmunogénica que comprenda una combinación: (a) un polipéptido según la reivindicación 9; (b) una molécula polinucleotídica que contenga una secuencia que codifique el polipéptido de la reivindicación 9; (c) un vector recombinante como los descritos en las reivindicación 6; (d) las células hospedadoras transfectadas según reivindicación 7; (e) las células hospedadoras transformadas según reivindicación 8, formulada como vacuna contra la neosporosis.

5

18. Un kit de vacunación para mamíferos contra la neosporosis que comprenda un contenedor que incluya una composición inmunogénica formulada como vacuna según reivindicaciones 15, 16 y 17.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Figura 1

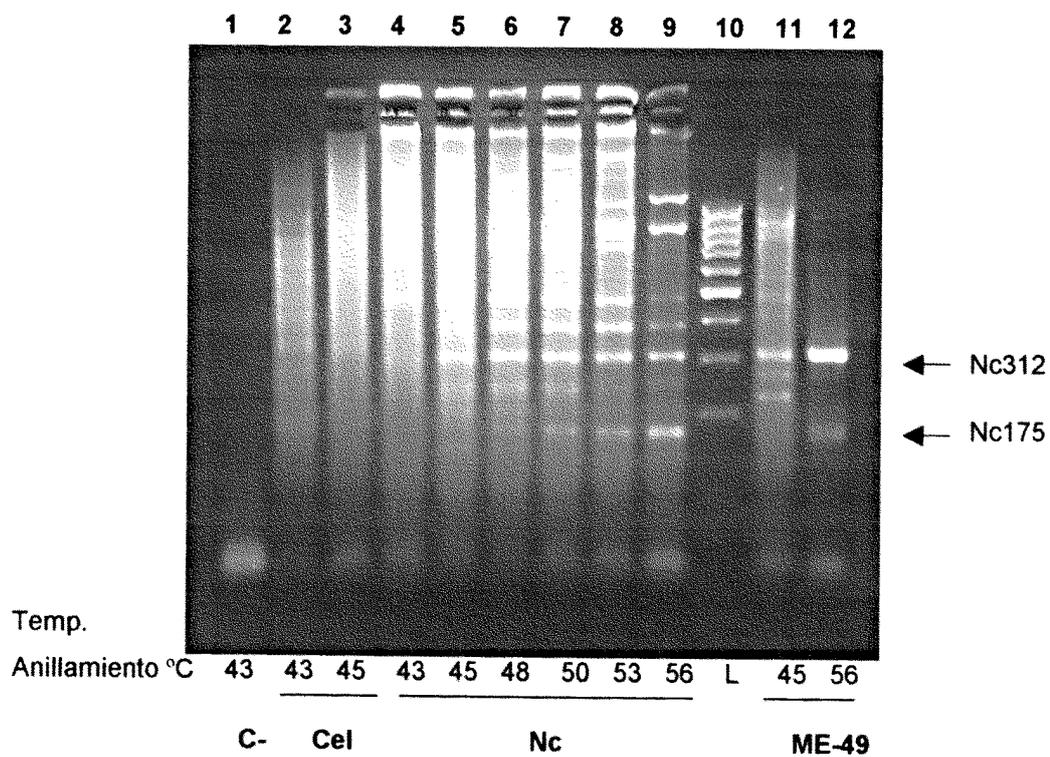


Figura 2

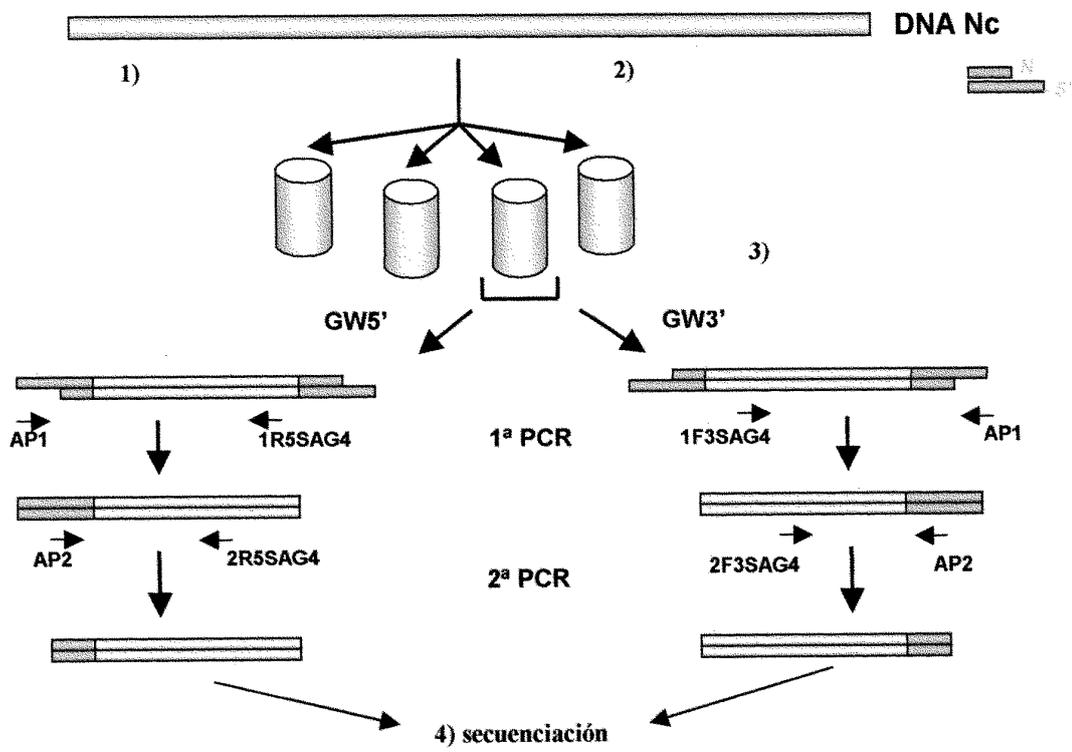
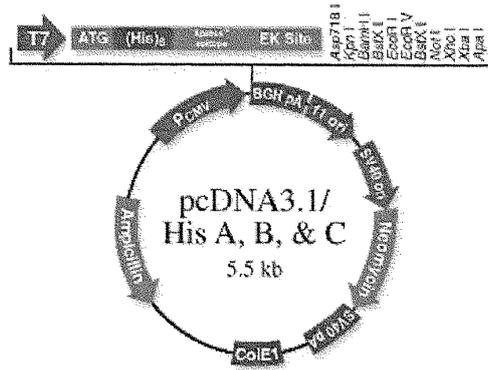
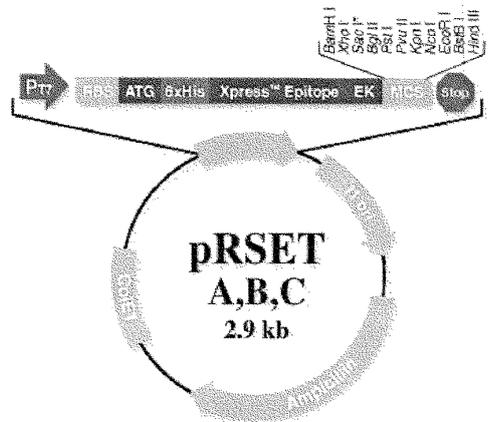


Figura 3

Panel A



Panel B



Panel C

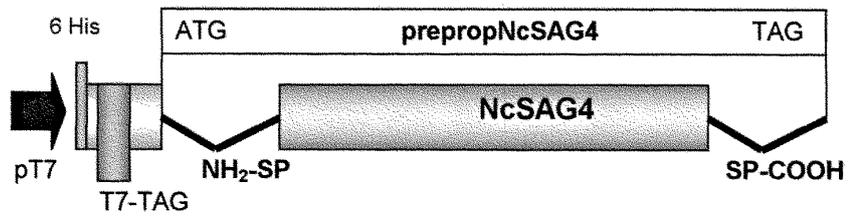


Figura 4

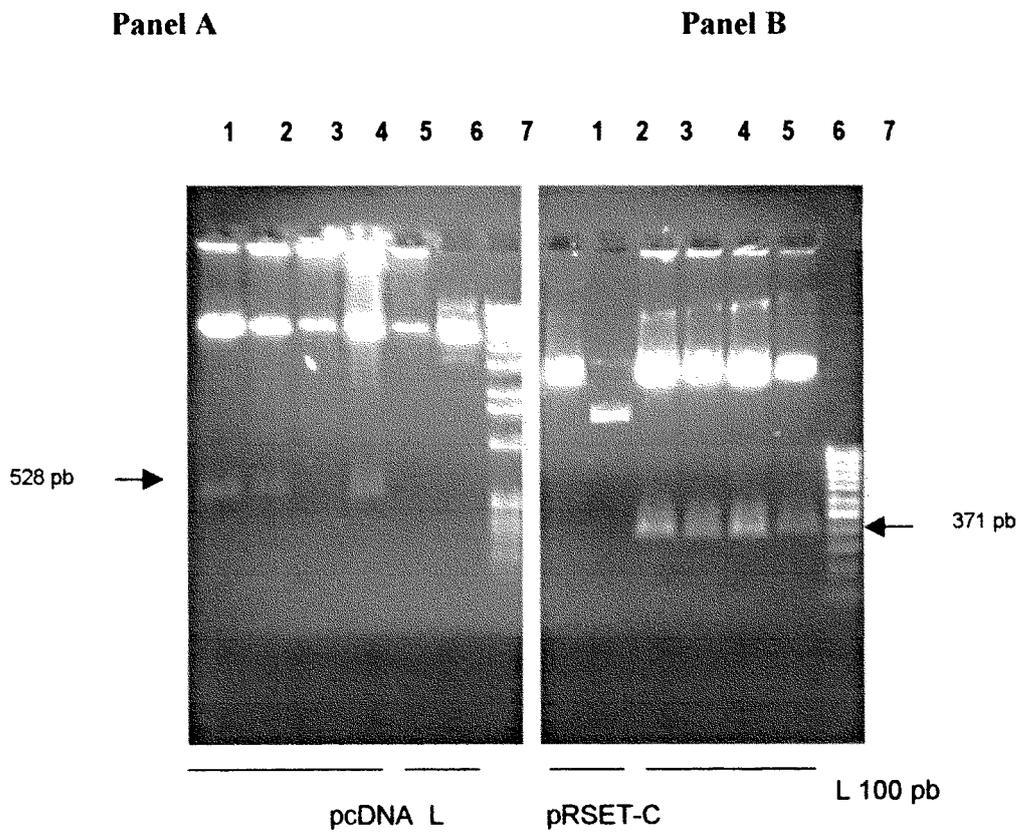


Figura 5

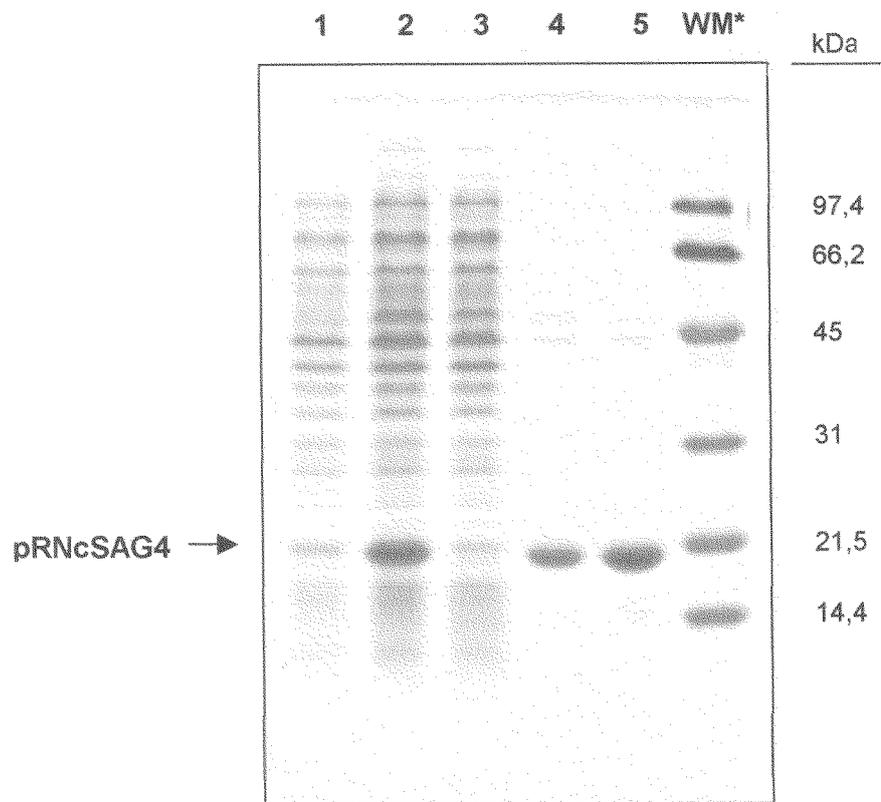


Figura 6

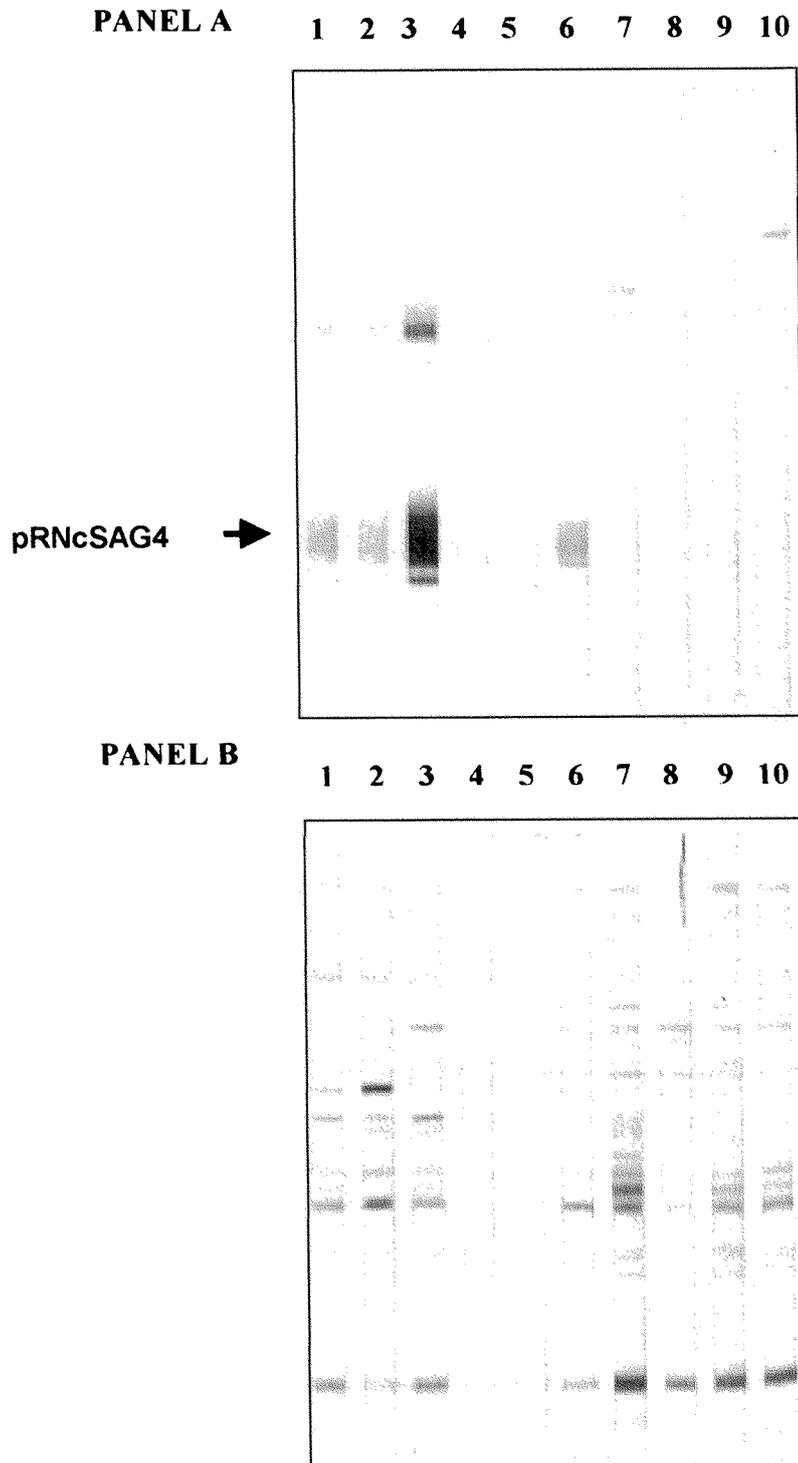
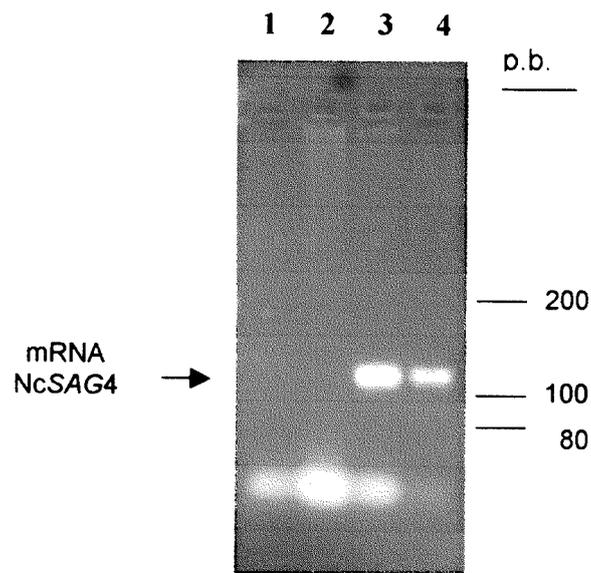


Figura 7



ES 2 263 317 B2

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> Universidad Complutense de Madrid
- 5 <120> Uso del gen *NcSAG4* para el diagnóstico y la prevención de la neosporosis, y como marcador para el análisis de la patogenia.
- <160> 15
- 10 <210> 1
<211> 23
<212> DNA
- 15 <213> *Neospora caninum*
- <220>
<221> modified_base
- 20 <222> 6
<223> i
- 25 <400> 1
tggacntayg aytyaaraa rgc 23
- <210> 2
- 30 <211> 23
<212> DNA
<213> *Neospora caninum*
- 35 <220>
<221> modified_base
<222> 12
- 40 <223> i
- <220>
<221> modified_base
- 45 <222> 15
<223> i
- <220>
- 50 <221> modified_base
<222> 18
<223> i
- 55 <220>
<221> modified_base
<222> 21
- 60 <223> i
- <400> 2
- 65 aaraargara tnatnaccc ngg 23
- <210> 3

ES 2 263 317 B2

	<211> 23	
	<212> DNA	
	<213> <i>Neospora caninum</i>	
5	<220>	
	<221> modified_base	
	<222> 3	
10	<223> i	
	<400> 3	
15	acnggytcrct cyttrcartg rtc	23
	<210> 4	
	<211> 24	
20	<212> DNA	
	<213> <i>Neospora caninum</i>	
	<220>	
25	<221> modified_base	
	<222> 22	
	<223> i	
30	<400> 4	
	rtcyttnacy ttraarcara angg	24
35	<210> 5	
	<211> 20	
	<212> DNA	
40	<213> <i>Neospora caninum</i>	
	<400> 5	
45	ccgacgaagc cctgagaact	20
	<210> 6	
	<211> 19	
50	<212> DNA	
	<213> <i>Neospora caninum</i>	
	<400> 6	
55	tgctgcctgt tgggttgta	19
	<210> 7	
60	<211> 24	
	<212> DNA	
	<213> <i>Neospora caninum</i>	
65	<400> 7	
	gaaacaagaa aagagactat ctca	24

ES 2 263 317 B2

```

<210> 8
<211> 20
<212> DNA
5 <213> Neospora caninum

<400> 8

10      ccagtgaga gtgttcgat                                     20

<210> 9
<211> 601
15 <212> DNA
<213> Neospora caninum

<400> 9
20      1
      ggcaacacgt cgcagcgtac tctcatcttt ttcgtggggtt tgcagcc atg gag aaa 56
                                          Met Glu Lys
                                          1
25      agc gcc ttc ttt ccc agg gtg gtg ctc tgt ttc gtc gta gtt ttg tcc 104
      Ser Ala Phe Phe Pro Arg Val Val Leu Cys Phe Val Val Val Leu Ser
           5                10                15

30      gcg tgc tcg gcg tgg cga gtg gaa ggg aag aac tgg tcg tac gat ttc 152
      Ala Cys Ser Ala Trp Arg Val Glu Gly Lys Asn Trp Ser Tyr Asp Phe
           20                25                30                35

35      aag aag ccg ctg gac agc gat gaa aca aga aaa gag act atc tca cca 200
      Lys Lys Pro Leu Asp Ser Asp Glu Thr Arg Lys Glu Thr Ile Ser Pro
                               40                45                50

40      ggt gag agt gtt tcg ata caa aat tct ggg agc att acg ctg gcg tac 248
      Gly Glu Ser Val Ser Ile Gln Asn Ser Gly Ser Ile Thr Leu Ala Tyr
                               55                60                65

45      aac cca aca ggc gac aca caa gtt ctc agg gct tcg tcg gga gac agc 296
      Asn Pro Thr Gly Asp Thr Gln Val Leu Arg Ala Ser Ser Gly Asp Ser
                               70                75                80

50      tgc agg gat gag cca atc gaa ctt gcg act tta ttc cca gca gcc acg 344
      Cys Arg Asp Glu Pro Ile Glu Leu Ala Thr Leu Phe Pro Ala Ala Thr
           85                90                95

55      ccg gcg ccc acg tgg atg caa act ggt agc acg aga acc tta gcg ttt 392
      Pro Ala Pro Thr Trp Met Gln Thr Gly Ser Thr Arg Thr Leu Ala Phe
      100                105                110                115

60      cct acc aac gca gta ccc gcg aag cag acc acg ccg ttc tgt ttt aaa 440
      Pro Thr Asn Ala Val Pro Ala Lys Gln Thr Thr Pro Phe Cys Phe Lys
                               120                125                130

65      gtc acg gat acg cag aag aac aaa act ctg aca gcg ata atc aag gtc 488
      Val Thr Asp Thr Gln Lys Asn Lys Thr Leu Thr Ala Ile Ile Lys Val
                               135                140                145

70      gcc ggt gcc caa ggc ttg tct gct gct ctg ggg gtc tcc att gga ata 536
      Ala Gly Ala Gln Gly Leu Ser Ala Ala Leu Gly Val Ser Ile Gly Ile
           150                155                160

75      cca gct ctt gct ttt gca ctg agt tcg ata taa gggcatgcaa acgaataaat 589
      Pro Ala Leu Ala Phe Ala Leu Ser Ser Ile Ter
           165                170

      gaggcgactg at 601
  
```

ES 2 263 317 B2

<210> 10

<211> 173

<212> proteína

5 <213> *Neospora caninum*

<400> 10

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

<210> 11

<211> 26

50 <212> DNA

<213> *Neospora caninum*

<400> 11

55 gccaggatcc atggagaaaa ggcct

26

<210> 12

60 <211> 31

<212> DNA

<213> *Neospora caninum*

65 <400> 12

ttcgaattcc ttatatcgaa ctcaagtcaa a

31



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 263 317

② Nº de solicitud: 200302869

③ Fecha de presentación de la solicitud: **04.12.2003**

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: Ver hoja adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	US 2003180785 A (KRISHNAN et al.) 25.09.2003, todo el documento.	1-18
A	SCHARES, G. et al., "Neospora caninum: identification of 19-, 38-, and 40-kDa surface antigens and a 33-kDa dense granule antigen using monoclonal antibodies.", EXP. PARASITOL., 1999, Vol. 92, No. 2, páginas 109-119. Todo el documento.	1-18
A	FUCHS, N. et al., "Differential expression of cell surface- and dense granule-associated Neospora caninum proteins in tachyzoites and bradyzoites.", J. PARASITOL., 1998, Vol. 84, No. 4, páginas 753-758. Todo el documento.	1-18
A	ÖDBERG-FERRAGUT, C. et al., "Molecular cloning of the Toxoplasma gondii SAG4 gene encoding a 18kDa bradyzoite-specific surface protein.", MOL. BIOCHEM. PARASITOL., 1996, Vol. 82, No. 2, páginas 237-244. Todo el documento.	1-18
A	BOHNE, W. et al., "Bradyzoite-specific genes.", CURR. TOP. MICROBIOL. IMMUNOL., 1996, Vol. 219, páginas 81-91. Todo el documento.	1-18

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe 13.11.2006	Examinador J.L. Vizán Arroyo	Página 1/2
---	--	----------------------

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

C12N 15/30 (2006.01)

C07K 14/44 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)