



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① Número de publicación: **2 325 701**

② Número de solicitud: 200601262

⑤ Int. Cl.:
C12N 15/30 (2006.01)
C07K 14/44 (2006.01)
G01N 33/569 (2006.01)

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

⑫ Fecha de presentación: **17.05.2006**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **14.09.2009**

Fecha de la concesión: **28.05.2010**

⑮ Fecha de anuncio de la concesión: **17.06.2010**

⑯ Fecha de publicación del folleto de la patente:
17.06.2010

⑰ Titular/es: **Universidad Complutense de Madrid
Rectorado - Avenida de Séneca, 2
28040 Madrid, ES**

⑱ Inventor/es: **Ortega Mora, Luis Miguel;
Risco Castillo, Verónica;
Fernández García, Aurora y
Aguado Martínez, Adriana**

⑳ Agente: **No consta**

⑳ Título: **Uso del gen NcBSR4 para el diagnóstico y prevención de la neosporosis y como marcador para el análisis de la patogenia.**

㉑ Resumen:

Uso del gen NcBSR4 para el diagnóstico y prevención de la neosporosis y como marcador para el análisis de la patogenia.

La presente invención se refiere al uso del gen NcBSR4 y la proteína NcBSR4, los vectores de expresión y las células hospedadoras que los contengan, para el diagnóstico y la prevención de la neosporosis y, 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. También se refiere al uso del promotor del gen NcBSR4 para la expresión de genes heterólogos que permite el estudio de los mecanismos moleculares que determinan la conversión de estadio de taquizoíto a bradizoíto y a la inversa.

Además, la presente invención se refiere al desarrollo de anticuerpos monoclonales y sueros policlonales mono-específicos frente a la proteína NcBSR4 y su forma recombinante, que representan una alternativa para el diagnóstico serológico de la neosporosis y de la infección crónica por *N. caninum* en los tejidos animales.

ES 2 325 701 B1

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

DESCRIPCIÓN

Uso del gen *NcBSR4* para el diagnóstico y prevención de la neosporosis, y como marcador para el análisis de la patogenicidad.

5 **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 *NcBSR4* de *N. caninum*, su RNA mensajero y el antígeno que codifica, *NcBSR4*, 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

20 *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 (Dubey J. P. 2003. Korean J Parasitol. 41, 1-16; Moore D. P. 2005. Vet. Parasitol. 127, 87-97).

La neosporosis bovina está considerada como una enfermedad parasitaria de distribución cosmopolita y una de las causas más frecuentes de fallo reproductivo (Dubey J. P. 2003. J. Parasitol. 89, S42-S56). 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 torno a los 5-6 meses. Los terneros congénitamente infectados que nacen vivos pueden presentar problemas neuromusculares, aunque lo más frecuente es el nacimiento de terneros clínicamente sanos (Buxton *et al.* 2002. Trends Parasitol. 18, 546-552). Así mismo, la neosporosis puede afectar a los perros, hospedadores definitivos, aunque pueden actuar también como hospedadores intermedios, donde produce poliomiositis, encefalitis, parálisis y puede causar 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 (Dubey and Lindsay 1996. Vet. Parasitol. 67, 1-59; Basso *et al.* 2001. J. Parasitol. 87, 612-618). Los esporozoítos infectan al hospedador intermediario por ingestión de los oquistes eliminados por el hospedador definitivo que esporulan en el medio ambiente. En el hospedador intermediario se desarrollan dos fases intracelulares distintas: los taquizoítos, de replicación rápida y responsables de la fase aguda de la infección, y los bradizoítos, la forma de multiplicación lenta del parásito dando lugar a quistes tisulares localizados fundamentalmente en el sistema nervioso central. 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). Diversos estudios en *T. gondii* y *N. caninum* indican que la diferenciación de taquizoíto a bradizoíto en estos parásitos es un fenómeno inducido por estrés, aunque no se conocen con exactitud los mecanismos moleculares que determinan el paso de una fase del ciclo a otra. Así mismo, se ha sugerido una implicación de la respuesta inmune en la latencia y la reactivación de la infección en animales infectados de forma crónica (Lyons *et al.*, 2002, Trends Parasitol. 18, 198-201).

50 *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, hecho que contrasta con los estudios realizados en *T. gondii*, donde son varios los antígenos específicos de estadio identificados y caracterizados.

55 En *N. caninum* se han identificado antígenos específicos del taquizoíto o compartidos por ambos estadios (Fuchs *et al.* 1998. J. Parasitol. 84, 753-758; Lee *et al.* 2004. J. Vet. Sci. 5, 139-145; Shin *et al.* 2004. Proteomics 4, 3600-3609; Shin *et al.* 2005. Vet. Parasitol. 134, 41-52). Entre estos antígenos 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. Se han identificado tres proteínas de micronemas, *NcMIC3* (Sonda *et al.* 2000. Mol. Biochem. Parasitol. 108, 39-51), *NcMIC1* (Keller *et al.* 2002. Infect. Immun. 70, 3187-3198), presentes en ambos estadios, y *NcMIC4* (Keller *et al.* Infect. Immun. 2004. 72, 4791-4800), identificada a partir de taquizoítos. 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 donados son *NcGRA6* y *NcGRA7*, que codifican proteínas de gránulos densos del taquizoíto de *N. caninum* (Lally *et al.* 1996. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 3, 275-279). Además de estas proteínas de gránulos densos, se han

ES 2 325 701 B1

descrito otras denominadas NcNTPasa-I (Asai *et al.* 1998. Exp. Parasitol. 90, 277-285), NcGRA2 (Ellis *et al.* 2000. Parasitology 120 (Pt 4), 383-390) y NcGRA1 (Lee *et al.* 2003. Proteomics 3, 2339-2350). Las proteínas NcGRA1, NcGRA2, y NcGRA7 se localizan no sólo en la fase de taquizoíto sino en la pared de los quistes producidos *in vitro* (Vonlaufen *et al.* 2004. 72, 576-83). Así mismo, se ha descrito recientemente un antígeno de 56 kDa presente en el complejo apical de varios estadios de desarrollo del parásito (Jenkins *et al.* 2004. J. Parasitol. 90, 660-663). En base a varios de estos antígenos se han desarrollado diversos ELISAs recombinantes para el diagnóstico de la infección por *N. caninum* (revisado en: Ortega-Mora *et al.* 2006. Acta Parasitol. 51, 1-14).

Finalmente, se han clonado tres genes que expresan enzimas en *N. caninum*: NcSUB1 que expresa una serinoproteasa de 65 kDa, localizada en los micronemas del taquizoíto (Louie and Conrad. 1999. Mol. Biochem. Parasitol. 103, 211-223; Louie *et al.* 2002. J. Parasitol. 88, 1113-1119); un gen que codifica una superóxido dismutasa (Fe-SOD) que se expresa en ambos estadios del parásito, taquizoítos y bradizoítos (Cho *et al.* 2004. J. Parasitol. 90, 278-85) y el gen que codifica una disulfuro isomerasa (NcPDI) específica del taquizoíto e implicada en la interacción del parásito con la célula hospedadora (Naguleswaran *et al.* 2005. Int J Parasitol. 35, 1459-1472).

En relación con los antígenos específicos del bradizoíto de *N. caninum* tan sólo el gen NcSAG4 ha sido identificado, clonado y caracterizado recientemente (WO2005053505). Sin embargo, en *T. gondii* sí se han descrito diversos genes que expresan antígenos específicos de bradizoíto entre los cuales destacan varios de superficie como TgSAG4 (Ödberg-Ferragut *et al.* 1996. Mol. Biochem. Parasitol. 82, 237-244) y TgBSR4 (Knoll LJ, Boothroyd JC. 1998. Mol. Cell. Biol. 18, 807-814).

Diagnóstico de la neosporosis

Para el diagnóstico de la neosporosis bovina los datos epidemiológicos y la historia clínica son muy importantes y pueden orientar, pero siempre es necesaria la confirmación mediante el diagnóstico laboratorial (Anderson *et al.* 2000. Anim Reprod Sci. 60-61,417-431). Para ello es recomendable tanto el examen del feto abortado como la serología materna. En este sentido se plantean dos problemas principales en el diagnóstico de la neosporosis bovina: el criterio diagnóstico y las técnicas utilizadas en el feto abortado y, por otro lado, el diagnóstico de la infección y/o enfermedad en el animal vivo, debido a la ausencia de signos clínicos en el animal infectado de forma crónica.

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*. El diagnóstico fetal del aborto por *N. caninum* se realiza fundamentalmente por la observación de lesiones compatibles mediante técnicas histológicas, examinando la severidad y la extensión de las mismas, y la detección del parásito por PCR o inmunohistoquímica, principalmente en el SNC.

En cuanto al diagnóstico *in vivo* de la infección por *N. caninum*, el diagnóstico laboratorial se realiza principalmente mediante la detección de anticuerpos específicos en el suero o en la leche, tanto a nivel individual como de explotación, habiéndose desarrollado diversas técnicas a lo largo de los últimos años (revisado en: Ortega-Mora *et al.* 2006. Acta Parasitol. 51, 1-14). Esta técnicas son unas herramientas muy valiosas para estudiar la relación entre la infección por *N. caninum* y el aborto, la ruta predominante de transmisión en la explotación y para la instauración de medidas básicas de control en las explotaciones (Ortega-Mora *et al.* 2006. Acta Parasitol. 51, 1-14).

De este modo, el perfeccionamiento del diagnóstico es de suma importancia para determinar de forma precisa el estado sanitario de los animales. En este sentido en los últimos años 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; Blumroder *et al.* 2004. Vet. Parasitol. 120, 11-22). Así mismo, se han desarrollado técnicas como las de avidéz (Björkman *et al.* 1999. J Vet Diagn Invest. 11, 41-44; Aguado-Martínez *et al.* 2005. J Vet Diagn Invest. 17, 442-450), que permiten distinguir entre una infección reciente y una crónica, y nos da información sobre la ruta de transmisión predominante en la explotación. Por otro lado, se ha aplicado el uso de la técnica de ELISA en tanque de leche (Chanlun *et al.* 2002. Vet. Parasitol. 110, 35-44) que permite conocer el estado de la explotación en una primera aproximación o bien se puede utilizar para el seguimiento de programas de control. Así mismo, se han desarrollado diversos ELISAs basados en el uso de antígenos recombinantes (revisado en: Ortega-Mora *et al.* 2006. Acta Parasitol. 51, 1-14), aunque hasta el momento ninguna de las técnicas de diagnóstico utilizadas frente a *N. caninum* permite distinguir entre una infección crónica y una reactivación de la infección o una reinfección.

Prevención de la neosporosis

En cuanto al control de la enfermedad, debido a que la transmisión vertical de la enfermedad parece ser la vía principal 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. Además, dado que se ha demostrado que la infección postnatal por ingestión de ooquistes puede tener lugar en las explotaciones, hay que aplicar medidas de manejo como el control del acceso de los perros a la explotación, que actúan como hospedadores definitivos, y la ingestión por su parte de placentas y otros tejidos fetales (Reichel and Ellis. 2002. N Z Vet J. 50, 86-92).

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 o reducción de la transmisión vertical en un modelo murino (Liddell *et al.*, 1999, J. Parasitol. 85: 1072-1075; Miller *et al.* 2005. Int J Parasitol. 35, 821-8), pero no en un modelo bovino (Andrianarivo *et al.*, 1999, Int. J. Parasitol. 30: 985-990), aunque en la actualidad se comercializa una denominada Bovilis-NeoGuard (Intervet) con un efecto razonable sobre la tasa de abortos (Romero *et al.* 2004. Vet. Parasitol. 123 (3-4), 149-59). 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, 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, 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 (Jenkins. 2001. Vet. Parasitol. 101, 291-310). 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 (Innes *et al.* 2002. Trends Parasitol. 18, 497-504; Nishikawa *et al.* 2002. J. vet. Med. Sci. 64, 1-5). Por el momento, son escasos los trabajos realizados en este sentido, y se han utilizado tan sólo antígenos de taquizoíto o compartidos por ambos estadios, inoculados como proteínas recombinantes, como vacunas DNA o como combinación de ambos sistemas. Los ensayos realizados hasta el momento han utilizado modelos murinos, algunos de ellos gestantes para medir la transmisión congénita. Así se han utilizado las siguientes proteínas: NcMIC3 (Cannas *et al.* 2003. J. Parasitol. 89 (1), 44-50), NcMIC1 (Alaeddine *et al.* 2005. J. Parasitol. 91, 657-65), NcGRA7 (Liddell *et al.* 2003. J. Parasitol. 89, 496-500; Jenkins *et al.* 2004. Infect Immun. 72, 1817-9), NcSRS2 (Liddell *et al.* 2003. J. Parasitol. 89, 496-500), NcSAG1 (Cannas *et al.* 2003. Parasitology 126, 303-312) y NcSRS2 (Cannas *et al.* 2003. Parasitology 126, 303-312; Pinitkiatisakul *et al.* 2005. Vet Parasitol. 129, 25-34), estas dos últimas proteínas de la superficie del taquizoíto, obteniendo buenos resultados. En un trabajo reciente se ha utilizado una combinación de antígenos recombinantes (NcSAG1, NcSRS2, NcGRA6 y NcGRA7) obteniendo los mejores resultados de protección *in vitro* e *in vivo* con la combinación de NcSRS2 y NcGRA7 (Cho *et al.* 2005. Korean J Parasitol. 43, 19-25). Por otro lado se ha ensayado un virus "vaccinia" recombinante para expresar NcSRS2 en la prevención de la transmisión vertical de *N. caninum* en un modelo murino (Nishikawa *et al.* 2001. Vaccine 19, 1710-1716).

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 ha descrito en *N. caninum* es el producido por el gen NcSAG4 (WO2005053505) y el que se expone en la descripción de la invención de esta memoria (NcBSR4) es el segundo.

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 NcBSR4 en *N. caninum*, ortólogo del gen TgBSR4, que codifica una proteína específica del estadio de, bradizoíto en *T. gondii*, su clonación y la expresión del antígeno específico de estadio NcBSR4 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.

50 Descripción de la invención

Uso del gen NcBSR4 para el diagnóstico y la prevención de la neosporosis, y como marcador para el análisis de la patogenia.

55 La invención proporciona 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.

Se describe una tecnología molecular que ha permitido la identificación, aislamiento y caracterización del gen NcBSR4 de *N. caninum* (descrito en SEQ ID NO:13), siendo éste el segundo en específico del estadio de bradizoíto que se describe en este parásito. Para ello se ha utilizado la técnica del paseo cromosómico que permite obtener la secuencia completa del gen, diseñando cuatro oligonucleótidos basados en una secuencia de *N. caninum* (NcEST3c28hO2.y1) que comparte una identidad del 44% con el gen TgBSR4, previamente existente en las bases de datos. Así, los oligonucleótidos R1BSR4 (SEQ ID NO: 1) y R2BSR4 (SEQ ID NO: 2) se utilizaron para completar el gen en sentido 5'. Los oligonucleótidos F1BSR4 (SEQ ID NO: 3) y F2BSR4 (SEQ ID NO: 4) se utilizaron para completar el gen en sentido 3'. Para completar y confirmar la secuencia interna se utilizaron dos parejas de oligonucleótidos más: NcESTF (SEQ ID NO: 5), NcESTR (SEQ ID NO: 6), FNCEST5 (SEQ ID NO: 7) y RNCEST3 (SEQ ID NO: 8).

Un aspecto de la presente invención se refiere a un método de donación del gen *NcBSR4*, mediante su amplificación por PCR, utilizando oligonucleótidos especialmente diseñados para ello y su posterior digestión con enzimas de restricción. Esta clonación se realiza en un plásmido para la expresión en un sistema procariota en el que se inserta el gen *NcBSR4* o una parte del mismo. Preferentemente se utiliza el plásmido pRSET (Invitrogen) y, también preferentemente, se inserta en él el fragmento del gen *NcBSR4* que codifica desde el aminoácido 40 al 408 incluidos, correspondiente a la secuencia de la proteína *NcBSR4* excluyendo la región del péptido señal del extremo amino de la misma. Para ello se amplifica por PCR el gen *NcBSR4*, o la región correspondiente que se quiere clonar, a partir de DNA genómico de *N. caninum*, utilizando los oligonucleótidos diseñados a tal fin denominados FBamHNcBSR4 (SEQ ID NO: 9) y RHindIIINcBSR4 (SEQ ID NO: 10). Se utilizan sistemas en los que la propia expresión de la proteína recombinante rNcBSR4 facilita su purificación mediante métodos habituales. Para producir la proteína recombinante rNcBSR4, se utilizan células que permiten la expresión de las proteínas recombinantes y, preferentemente, células que inducen dicha expresión. Preferentemente se utiliza la cepa rosetta(DE3)pLysS de *E. coli* (Novagen), que expresa de forma inducida la RNA polimerasa del fago T7, e induce la expresión de la proteína recombinante rNcBSR4 por adición de IPTG al medio de cultivo. 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. Con este fin pueden utilizarse también secuencias modificadas química o enzimáticamente derivadas de homólogas a la proteína *NcBSR4*, polipéptidos derivados de *NcBSR4* o proteínas recombinantes que incluyan *NcBSR4* o incluyan polipéptidos derivados de *NcBSR4*, siempre que conserven las características antigénicas de esta proteína. Por ejemplo, mediante la técnica de "western blot", se detectan anticuerpos frente a la proteína rNcBSR4, separada mediante electroforesis en condiciones desnaturalizantes en geles de acrilamida-DATD al 15%, en sueros de bovinos con infección natural crónica por *N. caninum*. Esto demuestra la inmunogenicidad de esta proteína y por tanto su utilidad para el diagnóstico y la prevención de la enfermedad mediante su utilización como vacuna.

Del mismo modo, el desarrollo de anticuerpos monoclonales y sueros policlonales monoespecíficos frente a la proteína recombinante rNcBSR4 representa una alternativa para el diagnóstico mediante el desarrollo de técnicas basadas en estos, como es el caso del ELISA de competición. 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.

Otro aspecto de la presente invención es el de proporcionar vacunas y kits de vacunación frente a la neosporosis, la transmisión vertical de la infección el establecimiento de la infección crónica. El sistema de expresión de genes heterólogos en procariotas, 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 otros vectores recombinantes como los víricos.

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 de base celular se utilizan adyuvantes que la orientan en este sentido, entre ellos diversas citoquinas en solitario o junto a otros adyuvantes, preferiblemente particulados. Así mismo, para orientar la respuesta de base celular y asegurar el plegamiento adecuado de las proteínas, se utilizan las vacunas de DNA.

Por otro lado, la presente invención incluye la utilización del gen *NcBSR4* como marcador de la fase de bradizofo de *N. caninum* asociada a la infección crónica. Este gen se utiliza 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 *NcBSR4* en el parásito, mediante una RT-PCR cuantitativa en tiempo real, utilizando dos oligonucleótidos diseñados para tal efecto, denominados NcBSR4F3 (SEQ ID NO: 11) y NcBSR4R3 (SEQ ID NO: 12). Esta RT-PCR permite la utilización del gen *NcBSR4* como marcador del cambio de estadio de *N. caninum*, en el hospedador intermediario. Se trata de una herramienta necesaria para el análisis de los mecanismos que determinan el establecimiento de la infección crónica, de los mecanismos implicados en la reactivación de la infección en los animales persistentemente infectados, y de los factores que influyen en estos procesos. Asimismo, esta herramienta sirve 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 *NcBSR4* 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 taquizofo a bradizofo y a la inversa, tanto en sistemas de expresión *in vitro* como *in vivo*, en cultivos celulares o en animales de experimentación.

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:

Figura 1

Panel A: Representa el plásmido de expresión que lleva inserto la región codificante correspondiente del gen *NcBSR4*, según se explica en el ejemplo 2 de esta memoria. Panel B: el esquema de la proteína recombinante rNcBSR4, según se explica en el ejemplo 2 de esta memoria.

Figura 2

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. Los plásmidos recombinantes pBSR4.5 (carril 1) y pBSR4.7 (carril 3) liberaron un fragmento del tamaño esperado (1122 pb) y los plásmidos sin digerir se visualizaron en el mismo gel (carriles 2 y 4, respectivamente). Además, se digirió el vector pRSET-C como control de la digestión (carril 5). Como marcador molecular (L) se utilizó “1Kb Plus DNA ladder (Invitrogen)”.

Figura 3

Panel A: Expresión de la proteína recombinante rNcBSR4 en *E. coli*, según se explica en el ejemplo 2 de esta memoria, siendo PP “Precision Plus Protein Standards (Bio-rad)”. Panel B: rNcBSR4 purificada por cromatografía de afinidad (IMAC), siendo MW “Molecular weight standards, low range (Bio-rad)”.

Figura 4

Caracterización de la inmunogenicidad de la proteína recombinante rNcBSR4, según se explica en el ejemplo 4 de esta memoria. La figura muestra la reacción de un suero policlonal de conejo específico producido frente a la proteína rNcBSR4, con un extracto mixto de bradizoítos y taquizoítos de *N. caninum* producidos *in vitro* (B) mediante “western blot” (carril 3). Como control se utilizó un extracto de taquizoítos producidos *in vitro* (T) en el que no fue reconocida ninguna proteína (carril 4). Como marcador de bradizoítos se utilizó otro suero policlonal de conejo dirigido frente a la proteína rNcSAG4, que reconoció la proteína NcSAG4, específica de la fase de bradizoíto, en el extracto de bradizoítos (B) y no en el de taquizoítos (T) (figura 4, carriles 1 y 2, respectivamente).

Figura 5

Regulación de la transcripción del gen *NcBSR4* en el estadio de bradizoíto de *N. caninum* medida por RT-PCR en tiempo real, según se explica en el ejemplo 5 de esta memoria. En la figura se representa la variación en los niveles de RNA mensajero (expresados como n-veces de inducción y representados en el eje de ordenadas) de los diversos genes analizados: NcSAG1 (SAG1), NcSAG4 (SAG4) y NcBSR4 (BSR4), a lo largo del ensayo de conversión los días 1, 2, 3, 5 y 7 (carriles 1,2,3, 5 y 7, respectivamente).

Modo de realización de la invención

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

Aislamiento y caracterización del gen NcBSR4

Para el aislamiento del gen *NcBSR4* 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.

Para diseñar los oligonucleótidos necesarios para el paseo cromosómico se utilizó la secuencia NcEST3c28h02.y1 de *N. caninum* presente en las bases de datos (NcGI: TIGR *Nespora caninum* gene index, www.tigr.org/tdb/tgi) que presentaba una identidad del 44% con el gen TgBSR4 que expresa un antígeno específico de la fase de bradizoíto de *T. gondii*. Para realizar el paseo cromosómico en sentido 5' y 3' a partir de esta secuencia se utilizó el 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 consistió en la digestión del DNA genómico con cuatro enzimas de restricción distintas que producen extremos romos: *EcoRV*, *DraI*, *PvuII* y *StuI*, y su posterior ligación a unos adaptadores, siguiendo las instrucciones de la casa comercial. A continuación, con cada una de las genotecas así obtenidas se realizó 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. Los oligonucleótidos diseñados para realizar el paseo cromosómico en sentido 5' se denominaron R1BSR4 (SEQ ID NO: 1) y R2BSR4 (SEQ ID NO: 2) y los diseñados para realizar el paseo cromosómico en sentido 3' se denominaron F1BSR4 (SEQ ID NO: 3) y F2BSR4 (SEQ ID NO: 4). La amplificación se realizó mediante una PCR anidada, utilizando una DNA polimerasa termoestable de larga distancia (Ecotaq Plus, Ecogen), en el tampón correspondiente, en presencia de Cl₂Mg (2 mM), 200 μM de cada dNTP y 10 μM de cada oligonucleótido, en un volumen de reacción de 50 μl. La primera PCR se realizó con cada una de las “genotecas de DNA genómico” utilizando los oligonucleótidos AP1 y R1BSR4 ó F1BSR4, para realizar el paseo

ES 2 325 701 B1

cromosómico en sentido 5' o 3', respectivamente, siguiendo las instrucciones de la casa comercial. Las condiciones en las que se realizó la PCR fueron 7 ciclos de 25 segundos a 94°C y 3 minutos a 72°C seguidos de 32 ciclos de 25 segundos a 94°C y 3 minutos a 67°C, con una elongación final a 67°C durante 7 minutos. La segunda PCR se llevó a cabo a partir de 1 µl de una dilución 1:50 de los productos de la primera PCR y se realizó con los oligonucleótidos AP2 y R2BSR4 ó F2BSR4, 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 3 minutos a 72°C, seguidos de 20 ciclos de 25 segundos a 94°C y 3 minutos a 67°C con una elongación final a 67°C durante 7 minutos. Finalmente, para confirmar la secuencia interna por PCR y secuenciación, se diseñaron dos parejas de oligonucleótidos denominados: NcESTF (SEQ ID NO: 5) y NcESTR (SEQ ID NO: 6); FNCEST5 (SEQ ID NO: 7) y RNCEST3 (SEQ ID NO: 8). La PCR se realizó utilizando un enzima de alta fidelidad (Expand High Fidelity Plus PCR System, Roche), siguiendo las indicaciones de la casa comercial, utilizando las siguientes condiciones: una desnaturalización inicial de 2 minutos a 94°C seguida de 10 ciclos de 15 segundos a 94°C, 30 segundos 60°C y 1 minuto a 72°C, seguidos de 20 ciclos de 15 segundos a 94°C y 30 segundos 60°C y 1 minuto a 72°C incrementando 5 segundos en cada ciclo, con una elongación final a 72°C durante 7 minutos. Los fragmentos de DNA obtenidos mediante el paseo cromosómico se purificaron utilizando un kit comercial (GENECLEAN Turbo nucleic acid purification kit, Q-BIOgene) y se secuenciaron.

De esta forma, al comparar las secuencias de los diferentes fragmentos amplificados se pudo determinar una secuencia de 2676 nucleótidos (SEQ ID NO: 13). Esta secuencia se denominó NcBSR4, por su homología con la del gen TgBSR4 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 1227 pb, que codifica una proteína de 408 aminoácidos (SEQ ID NO: 14). Al hacer la comparación de la secuencia de aminoácidos que codifica esta ORF, se encontró una similitud de hasta el 66%, con un total de 273 residuos similares, con las secuencias de la proteína TgBSR4 de las diferentes cepas de *T. gondii* existentes en las bases de datos (BLASTP, www.toxodb.org).

Ejemplo 2

Expresión del antígeno NcBSR4 como proteína recombinante y su purificación

Una vez identificado el gen NcBSR4, para su expresión en procariontes se insertó una parte del gen (desde el nucleótido 1084 hasta el 2195) que codifica una forma truncada de la proteína, desde el aminoácido 40 al 408, en los sitios BamHI y HindIII del plásmido pRSET-C (Invitrogen) (figura 1). Para ello se realizó una PCR a partir del DNA genómico de *N. caninum*, utilizando oligonucleótidos diseñados para este fin: FBamHNCBSR4 (SEQ ID NO: 9), el oligonucleótido directo, en cuyo extremo 5' se incluyó un sitio específico de reconocimiento para BamHI seguido de una secuencia idéntica a la del gen NcBSR4 desde el nucleótido 1084 al 1106, y RHindIIINCBSR4 (SEQ ID NO: 10), el oligonucleótido inverso, en cuyo extremo 5' se incluyó un sitio específico de reconocimiento para HindIII seguido de la secuencia inversa complementaria del extremo 3' de la ORF del gen NcBSR4, desde el nucleótido 2174 hasta el 2195 del gen.

Para realizar la PCR, se utilizaron 0,1 µg de DNA genómico por reacción, aislado a partir de taquizoítos de *N. caninum*, utilizando un enzima de alta fidelidad (Expand High Fidelity Plus PCR System, Roche), siguiendo las indicaciones de la casa comercial, en las condiciones previamente descritas en el ejemplo 1 de esta memoria descriptiva. El DNA amplificado fue purificado (GENECLEAN Turbo nucleic acid purification kit, Q-BIOgene) y digerido con los enzimas BamHI (5U) y HindIII (5U) en el tampón adecuado durante toda una noche. Al mismo tiempo y en idénticas condiciones fue digerido el vector plasmídico pRSET-C. Finalmente se purificaron los productos de la digestión (GENECLEAN Turbo nucleic acid purification kit, Q-BIOgene). Una vez purificado el fragmento de DNA digerido fue ligado a 50 ng del vector plasmídico linearizado 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 µl. La ligación se realizó en tubos de 0,5 ml (Multi™, Sorenson BioScience), en un termociclador durante 18 horas a 12°C, siendo conservada posteriormente a -20°C hasta su uso.

Para la manipulación de los plásmidos se siguió básicamente la metodología descrita por Sambrook y cols. (1989). Una vez realizada la ligación ésta fue utilizada para transformar células de la cepa NovaBlue (Novagen) químicamente competentes congeladas, mediante choque térmico en las condiciones indicadas por la casa comercial. Las bacterias competentes se descongelaron y se mantuvieron en hielo, hasta añadir 1 µl de la ligación. Una vez transcurridos 5 minutos en hielo se calentaron a 42°C en baño de agua durante 30 segundos y se colocaron inmediatamente en hielo durante 2 minutos. Inmediatamente las bacterias transformadas se resuspendieron en 250 µl de medio SOC (MgSO₄ 10 mM, MgCl₂ 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), se incubaron durante una hora a 37°C y, finalmente, 50 µl de la suspensión celular fueron plaqueados en medio LB-agar (1,5% de agar noble) en presencia de 100 µg/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 incubaron toda la noche a 37°C en 3 ml de medio LB líquido con 100 µg/l 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 pBSR4, numerados del 1 al 10 según el clon. Según el tamaño observado se seleccionaron dos clones (pBSR4.5 y pBSR4.7) para su caracterización por enzimas de restricción. Así se digirieron los plásmidos obtenidos con los enzimas de restricción BamHI (5U) y HindIII (5U) en el tampón adecuado, en un vo-

ES 2 325 701 B1

lumen 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 TAE al 1%, observando la liberación de un fragmento del tamaño adecuado (1122 pb) en cada uno de los plásmidos construidos pBSR4.5 y pBSR4.7 (figura 2, carriles 1 y 3 respectivamente). Los plásmidos sin digerir se visualizaron en el mismo gel (figura 2, carriles 2 y 4). Además, se digirió el vector pRSET-C (figura 2, carril 5) y se utilizó como control de la digestión. El plásmido pBSR4.5 fue secuenciado utilizando el oligonucleótido comercial T7, confirmando la inserción correcta del fragmento del gen *NcBSR4* en el vector de expresión. La secuenciación mostró una mutación silenciosa en el nucleótido 1824 del gen (SEQ ID NO: 13) sustituyendo una adenina (A) de la secuencia original del gen *NcBSR4*, por una guanina (G), que se traduce en el aminoácido 282 en una glutamina (E) tal y como ocurre en la secuencia original de *NcBSR4* (SEQ ID NO: 14).

La secuencia clonada en el plásmido pRSETC fue expresada como proteína recombinante en las células Rosetta (DE3) pLysS de *Escherichia coli* (Novagen) y se denominó rNcBSR4 (SEQ ID NO: 15). La proteína recombinante rNcBSR4 comprende desde el aminoácido 40 hasta el 408 de la proteína *NcBSR4*, y se corresponde con la secuencia aminoacídica de la misma en la que faltaría el péptido señal del extremo amino. La rNcBSR4 es una proteína de fusión unida en su extremo amino a un bloque de aminoácidos provenientes del vector que incluyen: 6 histidinas, lo que permite su purificación por cromatografía de afinidad, el péptido T7-tag así como una zona de reconocimiento de la enterocinas. En la figura 1, panel B se presenta un esquema de la proteína recombinante rNcBSR4.

Para expresar la proteína recombinante en el sistema procariota, se transformaron células de la cepa Rosetta(DE3) pLysS de *E. coli* (Novagen) con el plásmido pBSR4.5, siguiendo las indicaciones de la casa comercial. Las células transformadas con el plásmido, fueron plaqueadas en medio LB-agar con un 1% de glucosa, ampicilina (100 μ g/ml) y cloranfenicol (34 μ g/ml) y crecidas toda la noche a 37°C. Al día siguiente se seleccionaron 10 colonias de las placas y se crecieron durante la noche a 250 rpm y 37°C en 3 ml del mismo medio líquido de selección. Al día siguiente se diluyó el cultivo iniciador 1:10 en el mismo medio de crecimiento y se mantuvo en idénticas condiciones hasta alcanzar una A_{600} de 0,8-0,9 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 15 minutos. Una vez retirado el sobrenadante los sedimentos fueron conservados a -80°C hasta su uso. Finalmente se separaron las proteínas, solubilizadas en tampón de carga de Laemmli 1x (Laemmli. 1970. Nature 227, 680-685), en una proporción de 50 μ l/ml de cultivo original, mediante electroforesis en condiciones desnaturizantes en geles de acrilamida-DADT al 15% y se tiñeron con tinción de azul Commassie. Se separaron las proteínas tanto de un extracto total de las bacterias recogidas antes de la inducción (figura 3, panel A, carril 1), como después de la inducción (figura 3, panel A, carril 2) de cada clon, eligiendo el uno de ellos para la inducción a mayor escala (pBSR4.5.9) cuya expresión se muestra en la figura 3.

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/gr de sedimento celular, en presencia del enzima benzonasa (1U/ml de muestra, Novagen) y lisozima (1 KU/ml de muestra), incubando en agitación suave y temperatura ambiente durante 1 hora. A continuación se separó la fracción soluble del sedimento, donde se encuentran los cuerpos de inclusión, por centrifugación a 16.000 xg durante 20 minutos para determinar la localización de la proteína de interés. Posteriormente se lavaron los cuerpos de inclusión en la solución de BugBuster y lisozima cuatro veces y se resuspendieron en solución de BugBuster 0.1x, según las indicaciones de la casa comercial. Finalmente se separaron las proteínas en las condiciones descritas anteriormente. De esta forma se confirmó la expresión de la proteína recombinante rNcBSR4 en las células Rosetta (DE3)pLysS de *E. coli* (Novagen) y su localización en cuerpos de inclusión.

Para la purificación de la proteína rNcBSR4 por cromatografía de afinidad (IMAC) se creció el clon pBSR4.5.9 en las condiciones descritas anteriormente en cantidades mayores (volumen final de inducción de 1 litro). Para la solubilización de la proteína, los cuerpos de inclusión lavados se solubilizaron en condiciones desnaturizantes en 40 ml de un tampón que contenía sales de fosfato sódico (20 mM), cloruro sódico (500 mM), imidazol (40 mM) y urea (8M), en agitación suave y temperatura ambiente durante 2 horas. Finalmente se centrifugaron a 12.000xg durante 15 minutos a 4°C y el sobrenadante se conservó a -80°C hasta su uso.

Para la purificación por IMAC se utilizaron las columnas HisTrap HP de 1 ml (GE Healthcare) en el sistema Akta Prime (GE Healthcare), siguiendo las indicaciones de la casa comercial. Para ello se pincharon los 40 ml descritos anteriormente en la columna, tras un equilibrado inicial, y se eluyó la proteína mediante un gradiente creciente de imidazol manteniendo las condiciones desnaturizantes (8M urea) hasta alcanzar 500 mM, concentración a la que la proteína fue eluida. La proteína obtenida se separó mediante electroforesis en las condiciones descritas anteriormente (figura 3, panel B, carril 2), y su concentración se determinó por densitometría, utilizando un patrón de diferentes concentraciones de BSA en el mismo gel.

Con el fin de confirmar la secuencia aminoacídica de la proteína rNcBSR4 una vez purificada, fue analizada por espectrofotometría de masas. Para el análisis MALDI-TOF y la secuenciación *de novo* se utilizó el 4700 Proteomic Analyzer (Applied Biosystems) del servicio de proteómica de la Universidad Complutense de Madrid.

Ejemplo 3

Producción de sueros policlonales

5 Para la obtención de sueros policlonales se utilizaron conejos de la raza New Zealand hembras de 2,5 Kg de peso vivo. Los conejos se mantuvieron en el animalario de la Universidad Complutense de Madrid, con comida y agua *ad libitum* en jaulas individuales. La primera inmunización se realizó por vía intradérmica, inoculando en total 1 ml en 20 puntos (0,05 ml/punto de inmunización) por conejo. El inóculo se preparó en un volumen final de 1 ml (v/v), con 200 µg de la proteína rNcBSR4 purificada según se describe en el ejemplo 2 de esta memoria, en el adyuvante completo de Freund (Difco Laboratories, USA), emulsionando la mezcla mediante sonicación y siguiendo la metodología habitual. A continuación se realizaron 5 inmunizaciones a intervalos de 3 semanas, por vía intramuscular con 0,5 ml de inóculo. En este caso se utilizaron 100 µg de proteína en adyuvante incompleto (v/v) de Freund (Difco Laboratories, USA). El suero de los animales fue recogido a las 18 semanas tras la primera inmunización y se denominó anti-NcBSR4.

15

Ejemplo 4

Determinación de la inmunogenicidad de la proteína rNcBSR4

20

Se determinó la inmunogenicidad de la proteína recombinante rNcSAG4 mediante “western blot”, 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. Para ello se utilizó la proteína rNcBSR4 purificada por IMAC a una concentración de 10 µg en minigeles 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%). Para realizar el “western blot” se siguió básicamente el protocolo descrito anteriormente (Alvarez *et al.* 2002. *Vet. Parasitol.* 107, 17-27). Así, se bloquearon las membranas con BSA al 3% en TBS con 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 1 hora 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. Los sueros de origen bovino que se utilizaron fueron procedentes de animales en los que había instaurada una infección crónica, que reconocieron la proteína rNcBSR4. Además el suero negativo utilizado como control no mostró reacción como era de esperar.

40

Así mismo, se llevó a cabo un “western blot” con el suero policlonal de conejo producido frente a la proteína rNcBSR4, utilizando como antígeno un extracto de bradizoítos (B) y taquizoítos (T) producidos “*in vitro*” (figura 4, carriles 3 y 4), para confirmar la especificidad de estadio de la proteína NcBSR4 así como su antigenicidad. Para producir y purificar los taquizoítos y bradizoítos se siguió básicamente el protocolo descrito previamente por Fernández-García *et al.* (2006. *Mol. Biochem. Parasitol.* 146, 89- 97). 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.

55

Para llevar a cabo el “western blot” se utilizaron geles de acrilamida-DATD al 15%, en condiciones desnaturalizantes, utilizando un extracto total de zoítos a una concentración de 10⁷ por carril en el extracto de taquizoítos (T) y 5x10⁶ en el extracto mixto de taquizoítos y bradizoítos (B), solubilizados en 50 µl de una solución de rotura de Laemmli 1 x (Laemmli U. K. 1970. *Nature* 227, 680-685), mediante su agitación vigorosa, hervido y sonicación en baño durante 15 min a 15°C. A continuación se realizó el “western blot” tal y como se ha descrito anteriormente utilizando una dilución 1:200 del suero policlonal de conejo anti-rNcBSR4 y como conjugado un anti-IgG de conejo unido a peroxidasa (Sigma) a una dilución 1:1000. El revelado se llevó a cabo mediante quimioluminiscencia, utilizando el sistema ECL (Amersham Biosciences). Como control se utilizó un suero policlonal de conejo dirigido frente *N. caninum* (anti-TAQUI), específico de la fase de taquizoíto. El suero policlonal anti-rNcBSR4 reconoció la proteína NcBSR4 en el extracto de bradizoítos (B) (figura 4, carril 3) y no reconoció ninguna proteína en el extracto de taquizoítos (T) (figura 4, carril 4), confirmando la especificidad de estadio de esta proteína y su capacidad antigénica. Como marcador de bradizoítos se utilizó otro suero policlonal de conejo dirigido frente a la proteína rNcSAG4, que reconoció la proteína

65

ES 2 325 701 B1

NcSAG4, específica de la fase de bradizoíto, en el extracto de bradizoítos (B) y no en el de taquizoítos (T) (figura 4, carriles 1 y 2, respectivamente).

Estos resultados confirman la existencia de una respuesta frente a la proteína NcBSR4 en el animal crónicamente infectado de forma natural. Así mismo, se confirma la especificidad de la proteína NcBSR4 de la fase de bradizoíto, como ocurre con su homóloga en *T. gondii* (TgBSR4), puesto que existe un reconocimiento de la proteína nativa en bradizoítos producidos *in vitro* por parte de un suero policlonal producido frente a la proteína recombinante rNcBSR4.

10 Ejemplo 5

Determinación de la transcripción del gen NcBSR4 en la fase de bradizoíto de N. caninum por RT-PCR

Para estudiar la regulación de la expresión del gen *NcBSR4*, se llevó a cabo un análisis de la evolución de la transcripción del gen, mediante la medida de la producción de su RNA mensajero por RT-PCR cuantitativa, en un ensayo de conversión realizado a lo largo de varios días. Para ello se siguió básicamente el protocolo descrito por Fernández-García *et al.* (2006. Mol. Biochem. Parasitol. 146, 89- 97), diseñando unos oligonucleótidos específicos para el gen *NcBSR4* a los que se denominó NcBSR4F3 (SEQ ID NO: 11) y NcBSR4R3 (SEQ ID NO: 12). Como control se utilizaron los oligonucleótidos descritos previamente para amplificar parte del gen *NcSAG4*, específico de la fase de bradizoíto y del gen *NcSAG1*, específico de la fase de taquizoíto. Como normalizador se utilizó el gen ribosómico 18S de *N. caninum* (*Nc18sR*), utilizando unos oligonucleótidos previamente descritos, Nc18sF (SEQ ID NO: 16) y Nc18sR (SEQ ID NO: 17). Para el gen *NcSAG4* se utilizaron los oligonucleótidos NcSAG4F (SEQ ID NO: 18) y NcSAG4R (SEQ ID NO: 19). Para el gen *NcSAG1* se utilizaron los oligonucleótidos NcSAG1F (SEQ ID NO: 20) y NcSAG1R (SEQ ID NO: 21).

Para el ensayo de conversión se siguió el protocolo descrito previamente en el ejemplo 4 de esta memoria descriptiva. Los zoítos se recogieron los días 0 (antes del estrés) 3, 5 y 7 post-estrés y se purificaron tal y como se ha descrito previamente, pero utilizando todos los reactivos preparados para manejar RNA, es decir libres de RNAsas, y siguiendo las medidas de manejo adecuadas para ello. Para la extracción del RNA total se utilizaron sedimentos de 10^7 taquizoítos o una mezcla de taquizoítos y bradizoítos. 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 TAE 1x, para comprobar su calidad. La concentración del RNA total obtenido se midió en un espectrofotómetro.

El cDNA fue sintetizado utilizando 50 ng de RNA total utilizando 2 U de un enzima denominada Superscript II RNase H minus Reverse Transcriptase (Invitrogen), 12,5 nM de “random hexamers” (Applied Biosystems) y 40 U de un inhibidor de RNAsas (RNase inhibitor, Ambion) por reacción, en 20 μ l de volumen final, siguiendo las indicaciones de la casa comercial (Invitrogen). A continuación, para cuantificar la cantidad de RNA mensajero de cada gen con respecto al normalizador en cada punto del ensayo, se utilizó una dilución 1:10 obtenida a partir del cDNA sintetizado previamente de cada muestra. La PCR cuantitativa se llevó a cabo realizando triplicados para cada gen a amplificar, con 2 μ l en cada pocillo de la dilución de cada muestra, utilizando un kit comercial que utiliza una Taq polimerasa y SYBR Green (Platinum SYBR Green qPCR SuperMix UDG, Invitrogen), siguiendo las indicaciones de la casa comercial, en el ABI Prism 7000 Sequence Detector (Applied Biosystems). La mezcla de PCR contenía una concentración final de 1,5 U de enzima (Platinum Taq DNA polymerase, Invitrogen), 3 mM de MgCl₂, 200 μ M de cada dNTP, 1 U de UDG y 200 nM de cada oligonucleótidos en 25 μ l de volumen final. Las condiciones de amplificación fueron: un ciclo de 50°C durante 2 minutos seguido de 10 minutos a 95°C y a continuación 40 ciclos de 95°C durante 15 segundos y 60°C durante 1 minuto. Para la amplificación, adquisición de datos y el análisis de los mismos se utilizó el programa “Sequence Selection System Software v.1.6.” (Applied Biosystems). Los resultados se expresaron como n-veces de inducción para cada gen en cada muestra, calculadas mediante la fórmula del $2^{\Delta\Delta C_t}$. Para ello se obtuvo inicialmente la media de los valores de ciclo umbral (C_t) de los productos de amplificación de cada triplicado en cada muestra (de cada día del ensayo). A continuación se calculó la diferencia (ΔC_t) entre el valor medio de C_t de los productos de amplificación de los genes objeto de estudio (*NcBSR4*, *NcSAG4* o *NcSAG1*) y el valor medio de C_t del producto de amplificación del gen *Nc18sR*, utilizado como normalizador, para cada muestra. Se obtuvo de la misma forma el ΔC_t de la muestra utilizada como línea base, que son los parásitos no estresados recogidos el día 0 antes del estrés, para cada gen. Posteriormente para calcular el $\Delta\Delta C_t$, se sustrajo el ΔC_t de la muestra utilizada como línea base del valor ΔC_t de cada muestra, para cada gen. La ausencia de DNA contaminante se confirmó mediante PCR a partir del RNA total de cada muestra, utilizando los oligonucleótidos específicos para amplificar el gen *Nc18sR*.

Así se analizaron los niveles de RNA mensajero de los genes *NcBSR4*, *NcSAG4* y *NcSAG1* en los zoítos de *N. caninum* obtenidos a lo largo del ensayo de conversión los días 1, 2, 3, 5 y 7, con respecto a los niveles basales obtenidos el día 0, antes del estrés (figura 5). De este modo se pudo observar un aumento de la transcripción del gen *NcBSR4* a lo largo del ensayo de conversión, a medida que se da la transformación a bradizoítos, alcanzando un nivel 15,1 veces superior respecto del nivel basal el día 7 post-estrés. Así mismo, se observó el aumento esperado en el gen *NcSAG4*, que se utilizó como control de conversión a bradizoíto, hasta 381,8 veces superior con respecto al nivel basal el día 7 post-estrés, y una ligera disminución de los niveles de *NcSAG1*, que se utilizó como control de taquizoíto, como se había descrito previamente (Fernández-García *et al.* 2006. Mol. Biochem. Parasitol. 146, 89- 97).

ES 2 325 701 B1

REIVINDICACIONES

- 5 1. Molécula polinucleotídica **caracterizada** por la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 13 que contiene el gen NcBSR4 de *Neospora caninum*.
2. Molécula polinucleotídica según reivindicación 1 **caracterizada** porque codifica la proteína antigénica NcBSR4 de *Neospora caninum* (SEQ ID NO: 14).
- 10 3. Molécula polinucleotídica según reivindicación 1 **caracterizada** por la secuencia comprendida entre el nucleótido 1084 y el 2195 de la secuencia SEQ ID NO: 13.
- 15 4. Molécula polinucleotídica seleccionada del conjunto de secuencias constituido por (a) el gen NcBSR4 de *Neospora caninum*, **caracterizado** por SEQ ID NO: 13, (b) secuencias homólogas al gen NcBSR4 que codifican el antígeno NcBSR4 y (c) fragmentos del gen NcBSR4 que codifican polipéptidos que conservan las características antigénicas de NcBSR4.
- 20 5. Procedimiento para el diagnóstico *in vitro* de la infección crónica por *N. caninum* a partir de tejidos o fluidos de animales infectados **caracterizado** por la detección de las moléculas polinucleotídicas según las reivindicaciones 1 a 4 mediante su amplificación enzimática basada en la reacción PCT o RT-PCR, su hibridación *in situ* con sondas de DNA o cualquier otro método de detección de los ácidos nucleicos.
- 25 6. Procedimiento para el diagnóstico de la infección crónica por *N. caninum* según la reivindicación 5 **caracterizado** por el uso de oligonucleótidos-cebadores y/o sondas elegidos del conjunto constituido por las secuencias SEQ ID NO: 1 (R1BSR4), SEQ ID NO: 2 (R2BSR4), SEQ ID NO: 3 (F1BSR4), SEQ ID NO: 4 (F2BSR4), SEQ ID NO: 5 (NcESTF), SEQ ID NO: 6 (NcESTR), SEQ ID NO: 7 (FNCEST5), SEQ ID NO: 8 (RNCEST3), SEQ ID NO: 9 (FBamHNcBSR4), SEQ ID NO: 10 (RHindIIIcBSR4), SEQ ID NO: 11 (NcBSR4F3) y SEQ ID NO: 12 (NcBSR4R3).
- 30 7. Vector recombinante **caracterizado** porque comprende una secuencia de nucleótidos definida según las reivindicaciones 1 a 4.
8. Vector recombinante **caracterizado** porque comprende la molécula polinucleotídica según la reivindicación 3 y el plásmido pRSET-C.
- 35 9. Células eucariotas hospedadoras transfectadas con los vectores recombinantes de la reivindicación 7.
10. Células procariotas hospedadoras transformadas con los vectores recombinantes de la reivindicación 7 u 8.
- 40 11. Un polipéptido purificado o aislado seleccionado de (a) la proteína antigénica NcBSR4 de *N. caninum*, **caracterizada** por la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 14; (b) secuencias modificadas química o enzimáticamente derivadas de secuencias homólogas a la de la proteína NcBSR4 (SEQ ID NO: 14) que conservan sus características antigénicas; (c) polipéptidos derivados de NcBSR4 (SEQ ID NO: 14) que conservan sus características antigénicas; o (d) proteínas recombinantes que comprenden la proteína NcBSR4 (SEQ ID NO: 14) o polipéptidos derivados de NcBSR4 (SEQ ID NO: 14) que conservan sus características antigénicas.
- 45 12. Procedimiento para el diagnóstico serológico de la infección crónica por *N. caninum* **caracterizado** por el uso de anticuerpos monoclonales o suero policlonal específico frente a proteínas y/o polipéptidos según la reivindicación 11 mediante inmunohistoquímica, inmunofluorescencia o cualquier otro método basado en la detección de dichas proteínas y/o polipéptidos por el citado suero.
- 50 13. Procedimiento para el diagnóstico serológico de la infección crónica por *N. caninum* **caracterizado** por la detección de las proteínas y/o polipéptidos según la reivindicación 11 mediante enzimoanálisis (ELISA), radioinmunoanálisis (RIA), inmunoblot o cualquier otro método basado en la capacidad antigénica de dichos polipéptidos.
- 55 14. Procedimiento para el diagnóstico serológico de la infección crónica por *N. caninum* según la reivindicación 13 **caracterizado** por la detección de las proteínas y/o polipéptidos según la reivindicación 11 mediante un ELISA de competición.
- 60 15. Una composición inmunogénica que comprenda: (a) un polipéptido según la reivindicación 11, (b) una molécula polinucleotídica según las reivindicaciones 1 a 4; (c) un vector recombinante según la reivindicación 7; (d) unas células hospedadoras transfectadas según las reivindicaciones 9; (e) unas células hospedadoras transformadas según las reivindicaciones 10, formulada como vacuna contra la neosporosis.
- 65 16. Una composición inmunogénica según la reivindicación 15, que comprenda un adyuvante o una o varias citoquinas.

ES 2 325 701 B1

17. Un método de preparación de una composición inmunogénica que comprenda una combinación de (a) un polipéptido según la reivindicación 11; (b) una molécula polinucleotídica que contenga una secuencia que codifique un polipéptido según la reivindicación 11; (c) un vector recombinante según la reivindicación 7; (d) unas células hospedadoras transfectadas según las reivindicaciones 9; (e) unas células hospedadoras transformadas según las reivindicaciones 10, formulada como vacuna contra la neosporosis.

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

10

15

20

25

30

35

40

45

50

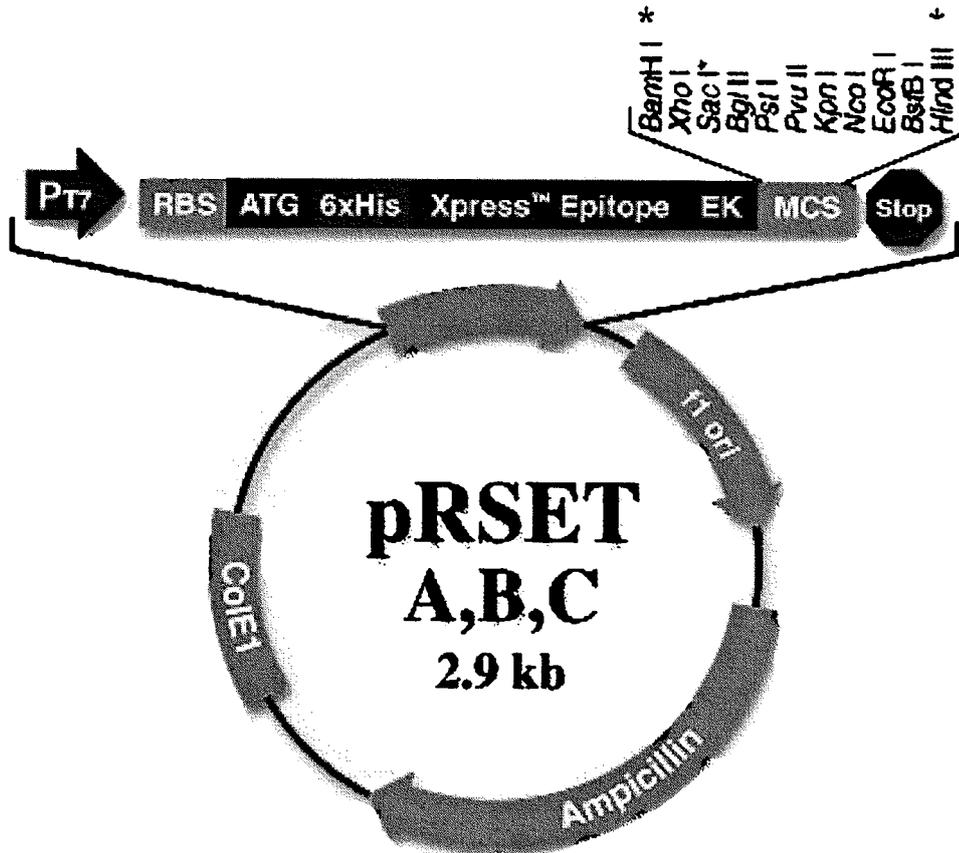
55

60

65

Fig. 1

A



B

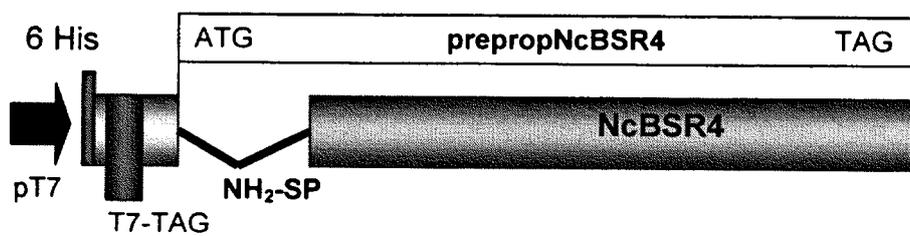


Fig. 2

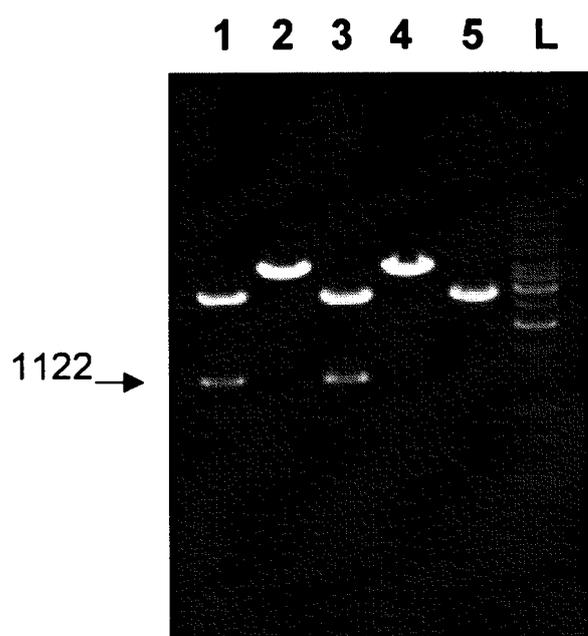
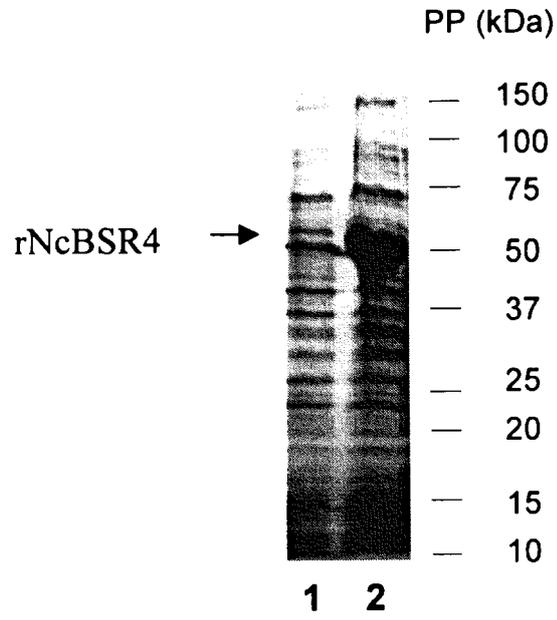


Fig. 3

A



B

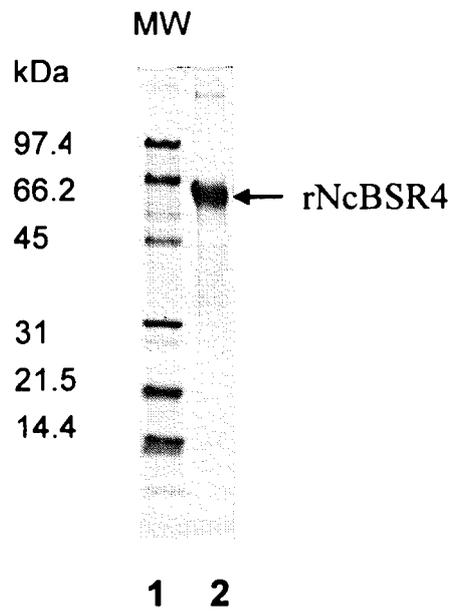


Fig. 4

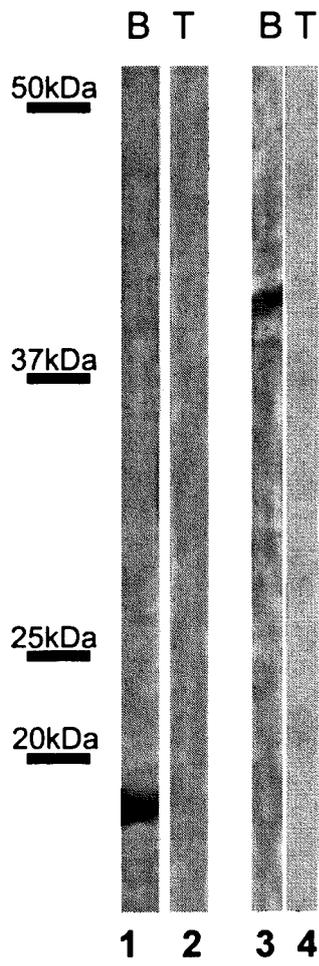
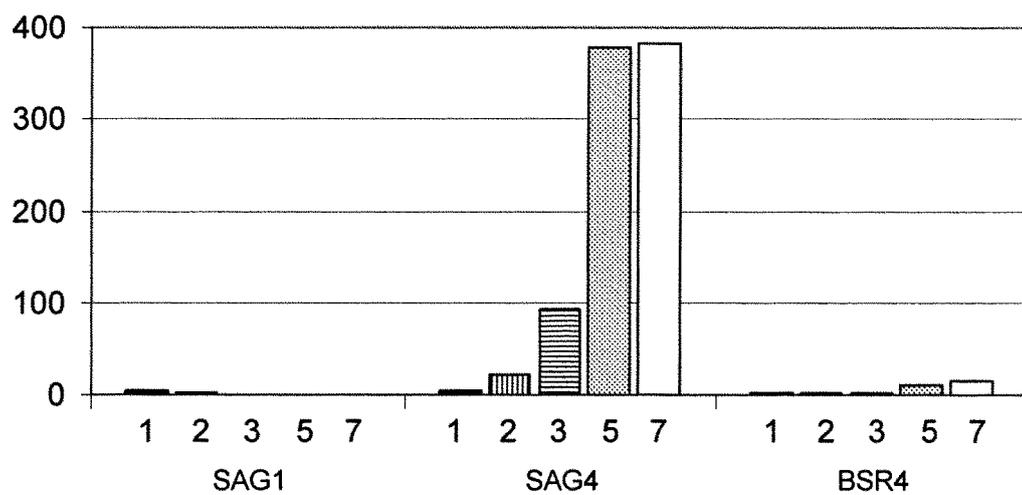


Fig. 5



ES 2 325 701 B1

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> Universidad Complutense de Madrid
- 5 <120> Uso del gen *NcBSR4* para el diagnóstico y la prevención de la neosporosis, y como marcador para el análisis de la patogenicidad.
- <160> 21
- 10 <210> 1
<211> 24
<212> DNA
- 15 <213> *Neospora caninum*
- <400> 1
- 20 aaccacgatt ctggagtcct tcat 24
- <210> 2
- 25 <211> 20
<212> DNA
<213> *Neospora caninum*
- 30 <400> 2
- aactccaacc acgccaactg 20
- 35 <210> 3
<211> 21
<212> DNA
- 40 <213> *Neospora caninum*
- <400> 3
- 45 tcggcacaga aacagagctg a 21
- <210> 4
- 50 <211> 19
<212> DNA
<213> *Neospora caninum*
- 55 <400> 4
- aagggttcag cgcaaacga 19
- 60 <210> 5
<211> 20
<212> DNA
- 65 <213> *Neospora caninum*

ES 2 325 701 B1

	<400> 5	
5	gtgccgcttg aggagattga	20
	<210> 6	
	<211> 23	
10	<212> DNA	
	<213> <i>Neospora caninum</i>	
	<400> 6	
15	aagtcgtacg gaaagtcgga aga	23
	<210> 7	
20	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> <i>Neospora caninum</i>	
25	<400> 7	
30	agacaatcgc gaacctccaa	20
	<210> 8	
	<211> 20	
35	<212> DNA	
	<213> <i>Neospora caninum</i>	
	<400> 8	
40	gttgtgccgg tgactgacag	20
	<210> 9	
45	<211> 33	
	<212> DNA	
	<213> <i>Neospora caninum</i>	
50	<400> 9	
55	tataggatcc cagatgatct ccatgaagga ctc	33
	<210> 10	
	<211> 32	
60	<212> DNA	
	<213> <i>Neospora caninum</i>	
	<400> 10	
65	acttaagctt ttacaaggag ccaacaatga gc	32

ES 2 325 701 B1

<210> 11

<211> 21

<212> DNA

5 <213> *Neospora caninum*

<400> 11

10 ccatgaagga ctccagaatc g 21

<210> 12

15 <211> 20

<212> DNA

<213> *Neospora caninum*

20 <400> 12

tcgctggaaa cgcacattta 20

25 <210> 13

<211> 2676

<212> DNA

30 <213> *Neospora caninum*

<400> 13

35 1
gcaaaaaaat tgaagggcaa cgtgattcgg tgcgatacat gattaggaat gtggagtcca 60
gctacttttt ttctgctttt cttacttgtc catgccccaa aacgtctcgc gccttctttc 120
40 atctgttttt ctagaaaatg cacattccct acaatattca ttgctaactc ggatcgtatg 180
ctggcatcgc tacgcttgtc ttctgttcgc ccgctgatt cactccttcg gtctcctcga 240
tgtcacaccg gccgaattct gtgcccttcc gtcggtcaat ggtcctcaag tcagtgtgga 300
45 atgcaaactg aacgctcaaa gaaaccactg agcgggtgg agttgctact gcgtctccaa 360
catatacagg agggcaacac tcatttctct cattgcttgt agcagaggcc aagaaaaaat 420
50 cccttattgt gttcgcggtc atgtgagacc acttcagtgt tcctttcact tcctcacaag 480
aaatgtacga cgaaaacaac tgtgagaatg gagaggtcag acaatcgca acctccaaca 540

55

60

65

ES 2 325 701 B1

```

gagaagaata agtggtcacg ttcgtcctct gcttccaggt gtcccagcac cgatcttggg 600
5  ggaagacaca ggaatgaggg cgaaatgacc gcagtcagtc cattcctgct acctttgagt 660
   ttttggtttt tgttttcctg gcatctttgc ttctgatttt cggtgagttc gatgtggtgc 720
   cgggagtcac cttggtctca ccggtcttca tccgcacgcg cgtttttccc ggcaacgaaa 780
10  ccgagggagc tcgtgtcgtg aggtgccgct tgaggagatt gaggcgttga cgacggtcaa 840
   cagacttttt gtacagtttg tgaattttta tggctgattt gttcggtgag ctctccattc 900
15  actgacttct ttccttttgc ttttactcgt ccccagagttt cgtggaagtt gttatgagtc 960
   tcaacatc atg gcg aga tca ggg agc atc cgg caa cga cat gga ggg ttg 1010
   Met Ala Arg Ser Gly Ser Ile Arg Gln Arg His Gly Gly Leu
   1 5 10
20  ggg tcc aag gcc cgc aag ctc gcg gca gtt ggc gtg gtt gga gtt ttg 1058
   Gly Ser Lys Ala Arg Lys Leu Ala Ala Val Gly Val Val Gly Val Leu
   15 20 25 30
25  ctc ttc tcc agg gga caa gcg gtt gca gat gat ctc cat gaa gga ctc 1106
   Leu Phe Ser Arg Gly Gln Ala Val Ala Asp Asp Leu His Glu Gly Leu
   35 40 45
30  cag aat cgt ggt ttg cag gcg cag caa aag gtc acg act gtt gcg ctg 1154
   Gln Asn Arg Gly Leu Gln Ala Gln Gln Lys Val Thr Thr Val Ala Leu
   50 55 60
35  tca gtc acc ggt aca acc gct aaa tgt gcg ttt cca gcg aca cgc gaa 1202
   Ser Val Thr Gly Thr Thr Ala Lys Cys Ala Phe Pro Ala Thr Arg Glu
   65 70 75
40  gca ggc gaa cca ggc gaa gca gac acc gcc ccc gca agt ggc agc gtg 1250
   Ala Gly Glu Pro Gly Glu Ala Asp Thr Ala Pro Ala Ser Gly Ser Val
   80 85 90
45  acg ctg tcg aaa gga att cta acg gcc act ttg cag tgt tcc agt caa 1298
   Thr Leu Ser Lys Gly Ile Leu Thr Ala Thr Leu Gln Cys Ser Ser Gln
   95 100 105 110
50  agt gct gag acc ctc tcg acg ata ccg aca aat ctg gct cat aaa gtt 1346
   Ser Ala Glu Thr Leu Ser Thr Ile Pro Thr Asn Leu Ala His Lys Val
   115 120 125
55  tgt ggt cca aaa cag gga cac tca cca gaa gcc ggt agc tgc acg gtt 1394
   Cys Gly Pro Lys Gln Gly His Ser Pro Glu Ala Gly Ser Cys Thr Val
   130 135 140
60  acg ggc agc tcg tta gtc ggc aca gaa aca gag ctg aaa caa ctc ctc 1442
   Thr Gly Ser Ser Leu Val Gly Thr Glu Thr Glu Leu Lys Gln Leu Leu
   145 150 155
65  ggg aca acc cgt gag atc aag tgg ata aaa gac cag agc ccc gat gtg 1490
   Gly Thr Thr Arg Glu Ile Lys Trp Ile Lys Asp Gln Ser Pro Asp Val
   160 165 170
   aga ccc aac aca caa tgg agc ttg gcc ctc cag gag tca gac ctg cct 1538
   Arg Pro Asn Thr Gln Trp Ser Leu Ala Leu Gln Glu Ser Asp Leu Pro
   175 180 185 190

```

ES 2 325 701 B1

5	cta tca gag aag acc ttc ttc gtc ggc tgt cag cag acg cag aca cag Leu Ser Glu Lys Thr Phe Phe Val Gly Cys Gln Gln Thr Gln Thr Gln <div style="display: flex; justify-content: space-between; width: 100%; font-size: small;"> 195 200 205 </div>	1586
10	aat aag aag ggt tca gcg caa acg aag tcg aca tgt act gta aca gta Asn Lys Lys Gly Ser Ala Gln Thr Lys Ser Thr Cys Thr Val Thr Val <div style="display: flex; justify-content: space-between; width: 100%; font-size: small;"> 210 215 220 </div>	1634
15	aac gtc gaa gcc aga gct tct tct gtt ggg gag aat aac gtg gtc acc Asn Val Glu Ala Arg Ala Ser Ser Val Gly Glu Asn Asn Val Val Thr <div style="display: flex; justify-content: space-between; width: 100%; font-size: small;"> 225 230 235 </div>	1682
20	tgc gct tac ggc aaa aac agc aac cct aag ccc ttg gag gtc gac atg Cys Ala Tyr Gly Lys Asn Ser Asn Pro Lys Pro Leu Glu Val Asp Met <div style="display: flex; justify-content: space-between; width: 100%; font-size: small;"> 240 245 250 </div>	1730
25	aca aca gcg aac aac acc ctg acc att gac tgc ggt tcc gag ggt tct Thr Thr Ala Asn Asn Thr Leu Thr Ile Asp Cys Gly Ser Glu Gly Ser <div style="display: flex; justify-content: space-between; width: 100%; font-size: small;"> 255 260 265 270 </div>	1778
30	ctc aat ccg gcg tca tat gag act cag ttt tgc gat cct cag gaa aaa Leu Asn Pro Ala Ser Tyr Glu Thr Gln Phe Cys Asp Pro Gln Glu Lys <div style="display: flex; justify-content: space-between; width: 100%; font-size: small;"> 275 280 285 </div>	1826
35	gat ttg aaa aac tgc gcc aag aag gat tat gtt gat att ctt ccg act Asp Leu Lys Asn Cys Ala Lys Lys Asp Tyr Val Asp Ile Leu Pro Thr <div style="display: flex; justify-content: space-between; width: 100%; font-size: small;"> 290 295 300 </div>	1874
40	ttc cgt acg act tgg tgg aca aca gag aat gaa ggt agt tcg gtg aag Phe Arg Thr Thr Trp Trp Thr Thr Glu Asn Glu Gly Ser Ser Val Lys <div style="display: flex; justify-content: space-between; width: 100%; font-size: small;"> 305 310 315 </div>	1922
45	ctg aca atc ccg gag acg gag ttt ccg gaa tca gaa caa cag ttc cga Leu Thr Ile Pro Glu Thr Glu Phe Pro Glu Ser Glu Gln Gln Phe Arg <div style="display: flex; justify-content: space-between; width: 100%; font-size: small;"> 320 325 330 </div>	1970
50	ttg ggc tgc gta cca gtg acg act act tcg aat ggc gcc aca aac gag Leu Gly Cys Val Pro Val Thr Thr Thr Ser Asn Gly Ala Thr Asn Glu <div style="display: flex; justify-content: space-between; width: 100%; font-size: small;"> 335 340 345 350 </div>	2018
55	aat aac aag ttg cat gaa gac gag gag ggt ggt gca gag act gtt aca Asn Asn Lys Leu His Glu Asp Glu Glu Gly Gly Ala Glu Thr Val Thr <div style="display: flex; justify-content: space-between; width: 100%; font-size: small;"> 355 360 365 </div>	2066
60	tca acg agc tgc aat gtg ttg gtg act atc aag acc agc gcc gct tcg Ser Thr Ser Cys Asn Val Leu Val Thr Ile Lys Thr Ser Ala Ala Ser <div style="display: flex; justify-content: space-between; width: 100%; font-size: small;"> 370 375 380 </div>	2114
65	tat gcg tca cac act atg caa atg ctg aca gca gcc tcg gga gcg gcc Tyr Ala Ser His Thr Met Gln Met Leu Thr Ala Ala Ser Gly Ala Ala <div style="display: flex; justify-content: space-between; width: 100%; font-size: small;"> 385 390 395 </div>	2162
70	gca gtg aca ggg ctc att gtt ggc tcc ttg taa ggaggccggt gatcctgtgc Ala Val Thr Gly Leu Ile Val Gly Ser Leu Ter <div style="display: flex; justify-content: space-between; width: 100%; font-size: small;"> 400 405 </div>	2215
75	ctaccccaga gtccagtgtc tcagcgtgcc gcctagttt ccgccatttt gctgttgtgg agaggctctc tttcccacca cattcagecc tcgcttcgag gtaggtttct tcggatttcg gagaccgcat ctcattttgt ccaaattgata cgtagatgct tggaccgtgg catgctggaa ggtaagggc gttgtggtat gtgcaccagg acaaattgtc acgtcgacca cagcatctat	2275 2335 2395 2455

ES 2 325 701 B1

```

ctttttctgc tttcgatgga agcgtttttg atacgtgtgt gataaatgca tataaaggga 2515
aggcacgcgt gcattagcga acccgccctg atgtgcttgg actggagaag acgttgtcat 2575
5  ggttcttcgc ggatataccc tcgatgtgag cgtgatgaaa ggcgtgagct ccggtttcga 2635
aacacagatc aatgcgctgc tgtccatcaa tcgacaacag c 2676

```

10 <210> 14

<211> 408

<212> PRT

15 <213> *Neospora caninum*

<400> 14

```

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

```


ES 2 325 701 B1

Ser Thr Ile Pro Thr Asn Leu Ala His Lys Val Cys Gly Pro Lys Gln
 115 120 125
 5 Gly His Ser Pro Glu Ala Gly Ser Cys Thr Val Thr Gly Ser Ser Leu
 130 135 140
 Val Gly Thr Glu Thr Glu Leu Lys Gln Leu Leu Gly Thr Thr Arg Glu
 10 145 150 155 160
 Ile Lys Trp Ile Lys Asp Gln Ser Pro Asp Val Arg Pro Asn Thr Gln
 165 170 175
 15 Trp Ser Leu Ala Leu Gln Glu Ser Asp Leu Pro Leu Ser Glu Lys Thr
 180 185 190
 Phe Phe Val Gly Cys Gln Gln Thr Gln Thr Gln Asn Lys Lys Gly Ser
 195 200 205
 20 Ala Gln Thr Lys Ser Thr Cys Thr Val Thr Val Asn Val Glu Ala Arg
 210 215 220
 Ala Ser Ser Val Gly Glu Asn Asn Val Val Thr Cys Ala Tyr Gly Lys
 25 225 230 235 240
 Asn Ser Asn Pro Lys Pro Leu Glu Val Asp Met Thr Thr Ala Asn Asn
 245 250 255
 30 Thr Leu Thr Ile Asp Cys Gly Ser Glu Gly Ser Leu Asn Pro Ala Ser
 260 265 270
 Tyr Glu Thr Gln Phe Cys Asp Pro Gln Glu Lys Asp Leu Lys Asn Cys
 275 280 285
 35 Ala Lys Lys Asp Tyr Val Asp Ile Leu Pro Thr Phe Arg Thr Thr Trp
 290 295 300
 Trp Thr Thr Glu Asn Glu Gly Ser Ser Val Lys Leu Thr Ile Pro Glu
 40 305 310 315 320
 Thr Glu Phe Pro Glu Ser Glu Gln Gln Phe Arg Leu Gly Cys Val Pro
 325 330 335
 45 Val Thr Thr Thr Ser Asn Gly Ala Thr Asn Glu Asn Asn Lys Leu His
 340 345 350
 Glu Asp Glu Glu Gly Gly Ala Glu Thr Val Thr Ser Thr Ser Cys Asn
 50 355 360 365
 Val Leu Val Thr Ile Lys Thr Ser Ala Ala Ser Tyr Ala Ser His Thr
 370 375 380
 55 Met Gln Met Leu Thr Ala Ala Ser Gly Ala Ala Ala Val Thr Gly Leu
 385 390 395 400
 Ile Val Gly Ser Leu
 405

<210> 16

<211> 23

<212> DNA

<213> *Neospora caninum*

ES 2 325 701 B1

<400> 16
 gatacagaac caaccacct tcc 23
 5 <210> 17
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> *Neospora caninum*
 10 <400> 17
 agaccgaagt caaacgcat c 21
 15 <210> 18
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> *Neospora caninum*
 20 <400> 18
 gatttcaaga agccgctgga 20
 25 <210> 19
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> *Neospora caninum*
 30 <400> 19
 tgagaacttg tgtgtgcct gtt 23
 35 <210> 20
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> *Neospora caninum*
 40 <400> 20
 cggtgtcgca atgtgctctt 20
 45 <210> 21
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> *Neospora caninum*
 50 <400> 21
 55 acggtcgtcc cagaacaaac 20

60

65



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 325 701

② N° de solicitud: 200601262

③ Fecha de presentación de la solicitud: 17.05.2006

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: Ver hoja adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	WO 2005053505 A1 (UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID) 16.06.2005, todo el documento.	1-18
A	KNOLL, L.J. et al., "Isolation of developmentally regulated genes from <i>Toxoplasma gondii</i> by a gene trap with the positive and negative selectable marker hypoxanthine-xanthine-guanine phosphoribosyltransferase.", MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY, 1998, Vol. 18, No. 2, páginas 807-814, todo el documento.	1-18
A	TOMAVO, S. et al., "Characterization of bradyzoite-specific antigens of <i>Toxoplasma gondii</i> .", INFECTION AND IMMUNITY, 1991, Vol. 59, No. 10, páginas 3750-3753, todo el documento.	1-18
A	ÖDBERG-FERRAGUT, C. et al., "Molecular cloning of the <i>Toxoplasma gondii</i> SAG4 gene encoding a 18 kDa bradyzoite-specific surface protein.", MOL. BIOCHEM. PARASITOL., 1996, Vol. 82, No. 2, páginas 237-244, 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
28.08.2009

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)