

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 388 416**

21 Número de solicitud: 201001593

51 Int. Cl.:

C12N 15/30 (2006.01)

A61K 39/002 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación:

20.12.2010

43 Fecha de publicación de la solicitud:

15.10.2012

Fecha de la concesión:

17.09.2013

45 Fecha de publicación de la concesión:

27.09.2013

73 Titular/es:

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
(100.0%)**

**Avenida de Séneca, 2
28040 Madrid (Madrid) ES**

72 Inventor/es:

**ORTEGA MORA, Luis Miguel;
RISCO CASTILLO, Verónica;
MARUGÁN HERNÁNDEZ, Virginia;
AGUADO MARTÍNEZ, Adriana y
JIMÉNEZ RUIZ, Elena**

74 Agente/Representante:

ACEBAL SARABIA, Carmen

54 Título: **USO DEL GEN NcSRS9 Y LA PROTEÍNA NcSRS9 PARA LA PREVENCIÓN Y EL DIAGNÓSTICO DE LA NEOSPOROSIS.**

57 Resumen:

Uso del gen NcSRS9 y la proteína NcSRS9 para la prevención y el diagnóstico de la neosporosis. La presente invención se refiere a la molécula polinucleotídica correspondiente al gen NcSRS9 de Neospora caninum y el antígeno que codifica, NcSRS9, proteína expresada durante el estadio de bradizoíto; así mismo, se refiere a los cebadores, los vectores recombinantes, las células hospedadoras transformadas o transfectadas y las proteínas expresadas de forma recombinante que derivan de dicho gen, así como al uso de estos productos y los anticuerpos específicos producidos frente a ellos como reactivos para técnicas de detección directa del parásito, a partir de muestras de los animales infectados, y para la producción de vacunas frente a la enfermedad.

ES 2 388 416 B1

DESCRIPCIÓN

USO DEL GEN NcSRS9 Y LA PROTEÍNA NcSRS9 PARA LA PREVENCIÓN Y EL DIAGNÓSTICO DE LA NEOSPOROSIS

5 **RESUMEN**

Uso del gen NcSRS9 y la proteína NcSRS9 para la prevención y el diagnóstico de la neosporosis. La presente invención se refiere a la molécula polinucleotídica correspondiente al gen NcSRS9 de *Neospora caninum* y el antígeno que codifica,
10 NcSRS9, proteína expresada durante el estadio de bradizoíto; así mismo, se refiere a los cebadores, los vectores recombinantes, las células hospedadoras transformadas o transfectadas y las proteínas expresadas de forma recombinante que derivan de dicho gen, así como al uso de estos productos y los anticuerpos específicos producidos frente a ellos como reactivos para técnicas de detección directa del parásito, a partir de
15 muestras de los animales infectados, y para la producción de vacunas frente a la enfermedad.

OBJETO DE LA INVENCION

La presente invención se establece en el campo de la sanidad animal y se refiere,
20 según se expresa en el enunciado de esta memoria descriptiva, a la prevención y el diagnóstico de la enfermedad producida por el protozoo parásito *Neospora caninum*. De forma más concreta, la invención se relaciona con la molécula polinucleotídica correspondiente al gen NcSRS9 de *N. caninum* y el antígeno que codifica, NcSRS9, proteína expresada durante el estadio de bradizoíto, así como los oligonucleótidos, los
25 vectores recombinantes, las células hospedadoras transformadas y las proteínas expresadas de forma recombinante, así como el uso de estos reactivos para técnicas de detección directa del parásito en los animales infectados y para la producción de vacunas frente a la enfermedad.

ANTECEDENTES

La neosporosis

Neospora caninum es un parásito protozoo perteneciente al phylum Apicomplexa que incluye otros parásitos patógenos importantes como *Toxoplasma gondii*. *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 también es capaz de infectar a un amplio espectro de especies de mamíferos (Dubey, 2003. Korean J. Parasitol. 41, 1-16; Gondim *et al.*, 2004. J. Parasitol. 90, 1361-1365; Moore, 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 *et al.*, 2007. Clin. Microbio. Rev. 20, 323-367). La manifestación clínica más importante de la infección en las hembras gestantes es el aborto, que puede ocurrir 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 infectados pero clínicamente sanos (Buxton *et al.*, 2002. Trends Parasitol. 18, 546-552). Asimismo, la neosporosis puede afectar a los perros, hospedadores definitivos, aunque pueden actuar también como hospedadores intermediarios, ocasionando polimiositis, encefalitis, parálisis e inclusive la muerte (Lindsay and Dubey, 1989. J. Parasitol. 75, 163-165; Buxton *et al.*, 2002. Trends Parasitol. 18, 546-552).

N. caninum presenta un ciclo de vida que comprende tres estadios infectantes (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 ooquistes eliminados en las heces del hospedador definitivo y 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, que se acantonan dentro de los quistes tisulares localizados fundamentalmente en el

sistema nervioso central y que son responsables de la fase crónica de la infección. Estos bradizoítos permanecen latentes en los quistes hasta su reactivación y conversión a taquizoítos pudiendo desencadenar la recrudescencia de la enfermedad (Antony and Williamson, 2001. *New Zeal. Vet. J.* 49, 42-47; Buxton *et al.*, 2002. Trends Parasitol. 18, 546-552).

Diversos estudios en *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 (Risco-Castillo *et al.*, 2004. *J. Parasitol.* 32, 1253-1265; Eastick and Elsheikha, 2010. *Parasitol. Res.* 106, 1009-1014). Asimismo, se ha sugerido una implicación de la respuesta inmune del hospedador en la latencia y la reactivación de la infección en animales infectados de forma crónica (Hemphill and Gottstein, 2006. *Acta Parasitologica.* 51, 15-25; Eastick and Elsheikha, 2010. *Parasitol. Res.* 106, 1009-1014).

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.

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; Kang *et al.*, 2008. *Parasitol. Res.* 103, 1011-1018). 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.

También se han identificado seis 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 NcMIC2 (Lovett *et al.*, 2000. Mol. Biochem. Parasitol. 107, 33-43), NcMIC4 (Keller *et al.*, 2004. Infect. Immun. 72, 4791-4800), NcMIC10 (Atkinson *et al.*, 2001. Int. J. Parasitol. 31, 67-71), así como NcAMA1 (Zhang *et al.*, 2007. Mol. Biochem. Parasito. 151, 205-212) 5 identificadas a partir de taquizoítos. Asimismo, se ha incluido en el banco de genes una secuencia de *N. caninum* denominada NcMIC11 (AF539703), que podría codificar una proteína de micronemas ya que su secuencia presenta una homología elevada con la secuencia que codifica la proteína de *T. gondii* TgMIC11.

10 Respecto a proteínas de roprias, hasta el momento tan sólo se ha identificado y clonado la proteína NcROP2, implicada en el proceso de invasión celular por los taquizoítos (Debache *et al.*, 2008. Int. J. Parasito. 38, 1455-1463).

Otros genes que han sido clonados son NcGRA6 y NcGRA7, que codifican proteínas 15 de gránulos densos del taquizoíto de *N. caninum* (Lally *et al.*, 1996. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 3, 275-279) y las denominadas 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 el estadio de taquizoíto sino también en la pared de los quistes producidos *in vitro* (Vonlaufen *et al.*, 2004. 72, 576-83). 20

Con base en varios de estos antígenos se han desarrollado diversos ELISAs recombinantes para el diagnóstico de la infección por *N. caninum* y se ha probado la utilidad de diversas vacunas de subunidades basadas en algunas de estas proteínas en 25 modelos murinos de infección (revisado en: Dubey and Schares *et al.*, 2006. Vet. Parasitol. 140, 1-34; Ellis *et al.*, 2009. Int. J. Parasitol. 39, 1173-1187).

Finalmente, se han clonado genes que expresan enzimas en *N. caninum*: el gen que codifica para la NcNTPasa-I, localizada en los gránulos densos (Asai *et al.*, 1998. 30 Exp. Parasitol. 90, 277-285); NcSUB1, que expresa una serin-proteasa 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 tanto en el estadio de taquizoíto como en el de bradizoíto (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 los genes NcSAG4 (ES2263317B2) y NcBSR4 (ES2325701B1) han sido identificados, clonados y caracterizados, siendo el primero de expresión temprana y el segundo de expresión tardía en el estadio de bradizoíto (Fernández-García *et al.*, 2006. Mol. Biochem. Parasitol. 146, 89-97; Risco-Castillo *et al.*, 2007. Int. J. Parasitol. 37, 887-896). Por otro lado, recientemente se han identificado diversas proteínas reguladas durante el proceso de diferenciación de taquizoíto a bradizoíto mediante un abordaje proteómico, destacando la detección de enzimas implicadas en metabolismo energético así como proteínas de choque térmico, entre otras (Marugán-Hernández *et al.*, 2010. Proteomics, 10, 1740-1750).

Diagnóstico de la neosporosis

El diagnóstico de la infección por *N. caninum* así como del aborto por neosporosis en el ganado bovino es complejo y laborioso. Además de los datos epidemiológicos y clínicos de la explotación (historial y patrón de abortos, principalmente), se emplean diversas técnicas de diagnóstico laboratorial (Dubey *et al.*, Clin. Microbiol. Rev. 203, 23-367; Ortega-Mora *et al.*, Acta Parasitol. 51, 1-14; Álvarez-García *et al.*, 2007. In Ortega-Mora *et al.* (Eds.). Oxfordshire, UK, pp 89-122).

En el caso del diagnóstico del aborto por *N. caninum*, en el feto se aplican las técnicas histológicas, para la observación de lesiones compatibles con neosporosis, examinando la severidad y la extensión de las mismas, y las técnicas de detección del parásito por PCR o inmunohistoquímica, principalmente en el sistema nervioso central (SNC). Este diagnóstico directo debe ir acompañado del análisis serológico tanto fetal como maternal.

En cuanto al diagnóstico de la infección por *N. caninum* en el bovino tras el nacimiento, el diagnóstico de laboratorio se realiza principalmente mediante la detección de anticuerpos específicos en el suero sanguíneo o en la leche, tanto a nivel individual como de explotación, habiéndose desarrollado diversas técnicas serológicas a lo largo de los últimos años entre las que destacan la inmunofluorescencia indirecta y el ELISA (revisado en Dubey and Schares, 2006. *Vet.Parasitol.* 140, 1-34).

Las técnicas de ELISA más comúnmente utilizadas son las que emplean como antígeno un extracto de proteínas solubles o un extracto completo de los taquizoítos de *N. caninum*. Estos ELISAs son herramientas muy valiosas para conocer el estatus infectivo a nivel individual (infectado/no infectado) así como para estudios de prevalencia de la infección y de relación de la misma con el aborto (Ortega-Mora *et al.* 2006. *Acta Parasitol.* 51, 1-14; Dubey *et al.*, 2007. *Clin. Microbiol. Rev.* 20, 323-367; Álvarez-García *et al.*, 2007. In Ortega-Mora *et al.* (Eds.). Oxfordshire, UK, pp 89-122).

Asimismo, como variante al ELISA convencional basado en un extracto de proteínas de los taquizoítos o en la proteína purificada por afinidad p38, se ha desarrollado el ELISA de avidéz, que permite diferenciar animales con una primo-infección de animales con una infección crónica y nos orienta sobre la ruta de transmisión predominante en la explotación (Björkman *et al.* 1999. *J. Vet. Diagn. Invest.* 11, 41-44; Aguado-Martínez *et al.*, 2005. *J. Vet. Diagn. Invest.* 17, 442-450; Björkman *et al.*, 2006. *Vet. Parasitol.* 140, 273-280; Schares *et al.*, 2002. *Vet. Parasitol.* 106, 293-305).

Por otro lado, el ELISA convencional se ha estandarizado también para su aplicación a muestras de leche obteniéndose correlaciones muy buenas con las muestras de suero (Bjorkman *et al.*, 1997. *Vet. Parasitol.* 68, 251-260; Schares *et al.*, 2005. *J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health.* 52, 45-48). Del mismo modo, se ha aplicado a muestras de tanque de leche en las cuales, si bien la sensibilidad de esta técnica es menor (detección de anticuerpos en tanque a partir de prevalencia intra-rebaños del 10%), es útil para el seguimiento serológico de las explotaciones seropositivas sometidas a programas de control (Schaes *et al.*, 2004. *Parasitology.* 129, 301-309;

Wapenaar *et al.*, 2007. *Can. Vet J.* 48, 493-499; Chanlun *et al.*, 2006. *Vet. Parasitol.* 136, 3-4; Bartels *et al.*, 2007. *Prev. Vet. Med.* 81, 265-273).

En los últimos años, y como alternativa a los ELISAs convencionales, se han desarrollado diversos ELISAs basados en el uso de antígenos recombinantes (revisado en: Ortega-Mora *et al.* 2006. *Acta Parasitol.* 51, 1-14; Dubey and Schares, 2006. *Vet. Parasitol.* 140, 1-34), y se han descrito recientemente técnicas de diagnóstico basadas en la detección de anticuerpos anti-rNcGRA7 y anti-rNcSAG4, que permitirían diferenciar animales con infección aguda de aquellos con infección crónica, sugiriéndose que la detección de ambos anticuerpos sería indicativa de una recrudescencia o re-infección asociadas con aborto y/o transmisión transplacentaria en explotaciones con un patrón endémico de abortos asociados a *N. caninum*, mientras que la detección de anticuerpos anti-rNcGRA7 y la no detección de anticuerpos anti-rNcSAG4 sería indicativo de aborto epidémico, muy claro a nivel de rebaño (Aguado-Martínez *et al.*, 2008. *Vet. Parasitol.* 157, 182-195).

Prevención de la neosporosis

En cuanto al control de la enfermedad, las medidas deben ir encaminadas, fundamentalmente, a reducir la prevalencia de la infección en las explotaciones ya que la neosporosis es una de las principales causas de aborto y mortalidad neonatal en el ganado bovino. Así, el establecimiento de un programa adecuado de desvieje y reposición selectivas para reducir el efectivo infectado evitaría la transmisión vertical de la enfermedad, que parece ser la vía principal de establecimiento de la enfermedad de forma persistente en las explotaciones. Además, dado que se ha demostrado que la infección postnatal por ingestión de ooquistes puede tener lugar en las explotaciones (Dijkstra *et al.*, 2001. *Int. J. Parasitol.* 31, 209-215; Schares *et al.*, 2002. *Vet. Parasitol.* 106, 293-305), se deberían aplicar también medidas de bioseguridad 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; Dubey *et al.* 2007. *Clin. Microbiol.* 20, 323-367).

Por otro lado, el control farmacológico de la neosporosis en el ganado bovino es inviable en la actualidad, tanto porque no se tiene experiencia de su tratamiento en

bovinos como porque los datos disponibles son poco alentadores. Cabe señalar que 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, medida considerada económicamente viable (Innes *et al.* 2002. Trends Parasitol. 18, 497-504; Nishikawa *et al.* 2002. J. Vet. Med. Sci. 64, 1-5; Moore *et al.*, 2005. Rev. Argent. Microbiol. 37, 217-228; Ellis *et al.*, 2006. Vet. Parasitol. 142, 23-34).

En la actualidad, sólo hay disponible una vacuna comercial en algunos países basada en taquizoítos inactivados (NeoGuard de Intervet) sin embargo sólo protege del aborto en el 50% de los casos (Romero *et al.*, 2004. Vet. Parasitol. 123, 149-59). Por lo general, las vacunas vivas han mostrado los mejores resultados respecto a la protección frente a la neosporosis, tanto en ensayos realizados en modelos murinos como bovinos (Reichel y Ellis, 2009. Int. J. Parasitol. 39, 1173-87). Se ha observado que dosis subletales con taquizoítos vivos de *N. caninum* son capaces de conferir inmunidad protectora frente a la neosporosis murina (Lunden *et al.*, 2002. Int. J. Parasitol. 32, 867-76), aunque por otro lado el empleo de aislados vivos puede conllevar problemas de seguridad debido al posible acantonamiento del aislado vacunal y su posterior reactivación durante la gestación. Por ello, se ha propuesto como una estrategia interesante el empleo de aislados de baja virulencia, capaces de generar una respuesta inmune protectora pero cuya persistencia en el hospedador quede seriamente comprometida. Entre los aislados de baja virulencia cabe destacar el papel de aquellos atenuados naturalmente, cuya transmisión en ratón o en bovinos se ha visto reducida de manera importante (Nc-Nowra y Nc-Spain 1H; Miller *et al.*, 2002. Aust. Vet. J. 80, 620-5; Rojo-Montejo *et al.*, 2009a. Vet. Parasitol. 159, 7-16; Rojo-Montejo *et al.*, 2009b. Vet. Res. 40, 49, respectivamente) y que han mostrado protección frente a la transmisión vertical del parásito en modelos murinos (Nc-SweB1 y Nc-Nowra; Atkinson *et al.*, 1999. Parasitology 118, 363-370; Miller *et al.*, 2005. Int. J. Parasitol. 35, 821-828, respectivamente) así como en modelos bovinos (Nc-Nowra; Williams *et al.*, 2007. Infect Immun. 75, 1343-1348). Conforme a esto, otros métodos de atenuación del parásito han sido llevados a cabo, presentando también resultados prometedores al ser utilizados como vacuna. Así es el caso del

empleo de mutantes vivos sensibles a temperatura, incapaces de persistir o crear patología en ratones (Lindsay et al., 1999. *J. Parasitol.* 85, 64-67), parásitos vivos cuya multiplicación ha sido suprimida mediante el empleo de irradiación γ (Ramamoorthy y col, 2006. *J. Eukaryot. Microbiol.* 53, 151-6) y atenuación mediante mantenimiento prolongado en cultivo celular (Bartley et al., 2008. *Parasitology.* 135 (Pt 1), 13-21; Bartley *et al.*, 2009. *Parasite Immunol* 31, 392-401).

Por otro lado, diversas investigaciones proponen nuevas estrategias para el desarrollo de vacunas de nueva generación frente a la neosporosis, tales como las vacunas de proteínas recombinantes y las vacunas ADN, junto con nuevas técnicas de adyuvantación que incrementarían la capacidad protectora del inmunógeno. Las vacunas de nueva generación 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).

Hasta el momento, la mayoría de ensayos vacunales frente a la neosporosis se han realizado con antígenos de taquizoíto o compartidos por ambos estadios, inoculados como proteínas recombinantes, como vacunas ADN o como combinación de ambos sistemas (Reichel y Ellis, 2009. *Int. J. Parasitol.* 39, 1173-87). Los ensayos realizados hasta el momento han utilizado modelos murinos, algunos de ellos gestantes para medir la transmisión congénita. Se han utilizado las siguientes proteínas recombinantes con resultados muy variables: NcMIC3 (Cannas *et al.*, 2003a. *J. Parasitol.* 89, 44-50; Debache *et al.*, 2009. *Int. J. Parasitol.* 39, 1373-1384), NcMIC1 (Alaeddine *et al.*, 2005. *J. Parasitol.* 91, 657-65; Debache *et al.*, 2009. *Int. J. Parasitol.* 39, 1373-1384), NcMIC4 (Srinivasan *et al.*, 2007. *J. Parasitol.* 93, 1046-1055), NcROP2 (Debache *et al.*, 2008. *Int. J. Parasitol.* 38, 1455-1463; Debache *et al.*, 2009. *Int. J. Parasitol.* 39, 1373-1384 ; Debache *et al.*, 2010. *Parasitology.* 137, 229-240), NcGRA1 y NcGRA2 (Ellis *et al.*, 2008. *Vaccine.* 26, 5989-5996), NcGRA6 (Cho *et al.*, 2005. *Korean J. Parasitol.* 43, 19-25), NcGRA7 (Liddell *et al.* 2003. *J. Parasitol.*

89, 496-500; Jenkins *et al.*, 2004. *Infect. Immun.* 72, 1817-9 ; Nishikawa *et al.*, 2009. *Clin Vaccine Immunol.* 16, 792-797), NcsHSP33 (Liddell *et al.*, 2003. *J. Parasitol.* 89, 496-500), NcPDI y NcMAG1 (Debache *et al.*, 2010. *Parasitology.* 137, 229-240), NcAMA1 (Zhang *et al.*, 2010. *Exp. Parasitol.* 125, 130-136), NcSAG1 (Cannas *et al.*, 5 2003b. *Parasitology* 126, 303-312; Cho *et al.* 2005. *Korean J. Parasitol.* 43, 19-25) y NcSRS2 (Cannas *et al.*, 2003b. *Parasitology* 126, 303-312; Pinitkiatisakul *et al.*, 2007. *Vaccine.* 25, 3658-3668; Zhao *et al.*, 2009. *Acta Vet. Hung* 57:51-62). Estas dos últimas proteínas de la superficie del taquizoíto junto con rNcROP2 son con las que se han obtenido mejores resultados de inmunoprotección. Trabajos recientes han

10 utilizado diversas combinaciones de antígenos recombinantes, observándose mayor protección *in vitro* e *in vivo* con la combinación NcSRS2/ NcGRA7 que con la combinación NcSAG1/NcSRS2/NcGRA6/NcGRA7 (Cho *et al.* 2005. *Korean J. Parasitol.* 43, 19-25), y lográndose la inducción de una protección parcial con la combinación MIC10/p24B respecto a la combinación de las proteínas recombinantes

15 de NcGRA1, NcGRA2, NcMIC10, y p24B (Ellis *et al.*, 2008. *Vaccine.* 26,5989-5996). Además, la expresión de NcSRS2 pero no de NcGRA7 utilizando la cepa recombinante RB51 de *Brucella abortus* también ha mostrado conferir cierta protección frente a la infección cerebral por *N. caninum* en ratón (Vemulapalli *et al.*, 2007. *Vet. Parasitol.* 148,219-230). Por otro lado, se ha ensayado un virus “vaccinia”

20 recombinante para expresar NcSAG1 y NcSRS2 en la prevención de la neosporosis cerebral y de la transmisión vertical de *N. caninum* en un modelo murino obteniéndose resultados esperanzadores (Nishikawa *et al.*, 2001a. *Vaccine* 19, 1381-1390; Nishikawa *et al.*, 2001b. *Vaccine* 19, 1710-1716).

25 Los únicos genes que se han descrito en *N. caninum* hasta la fecha que codifican proteínas específicas del estadio de bradizoíto son NcSAG4 (ES2263317B2) y NcBSR4 (ES2325701B1). Recientemente, la proteína recombinante rNcSAG4 ha sido evaluada en una prueba vacunal en el modelo murino gestante en el que, si bien indujo un ligero retraso de la mortalidad de las crías, no mostró resultados significativos de

30 inmunoprotección (Aguado-Martínez *et al.*, 2009b. *Vaccine.* 27, 7331-7338).

En este sentido, el aislamiento del gen *NcSRS9* de *N. caninum*, su clonación y expresión como proteína recombinante, según se expone en la descripción de la invención de esta memoria, aporta una solución de gran utilidad para el desarrollo de vacunas frente a la neosporosis. La inmunización con la proteína recombinante rNcSRS9 da lugar a la producción de anticuerpos específicos que, además, se relacionaron con un retraso de la mortalidad en las crías de los ratones infectados con *N. caninum*. Ambos hechos convierten a este gen y la proteína que codifica en candidatos ideales para ser incorporados en preparaciones vacunales y composiciones inmunogénicas por su potencial acción inmunoprotectora.

10

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

Uso del gen *NcSRS9* y la proteína *NcSRS9* para la prevención y el diagnóstico de la neosporosis.

15

La invención proporciona un reactivo de utilidad para su empleo con fines vacunales o inmunogénicos frente a *N. caninum*. Ensayos vacunales en ratones gestantes con la proteína recombinante rNcSRS9 muestran la inducción de una respuesta inmune humoral asociada a un retraso de la mortalidad en las crías de los ratones vacunados e infectados con *N. caninum*. Estos hechos convierten al gen *NcSRS9* y a la proteína codificada por él, en su forma nativa o recombinante, en buenas herramientas para ser incorporadas en preparaciones vacunales o inmunogénicas por la potencial capacidad inmunoprotectora de la forma recombinante.

20

Se describe una tecnología molecular que ha permitido la identificación, aislamiento y caracterización del gen *NcSRS9* de *N. caninum* (SEQ ID NO: 13, incluido en SEQ ID NO: 14) y que codifica la proteína *NcSRS9* de *N. caninum* (SEQ ID NO: 15). Para ello se ha utilizado la técnica del paseo cromosómico que permitió obtener una secuencia polinucleotídica localizada a 1.867 bases del extremo 3' de la región codificante de *NcBSR4* y que codifica una proteína que presentó un 43% de identidad con la proteína codificada por el gen *TgSRS9* de *Toxoplasma gondii*, previamente existente (gen TGGT1_121100, ToxoDB 4.3, USA) en bases de datos (BLASTX

30

v.2.2.19, NCBI, USA; BLASTX v. 2.0, ToxoDB 4.3, USA). Así, los oligonucleótidos F3.2BSR4 (SEQ ID NO: 1), F4.2BSR4 (SEQ ID NO: 2), SECF1 (SEQ ID NO: 3), SECF2 (SEQ ID NO: 4), F5BSR4 (SEQ ID NO: 5), F6BSR4 (SEQ ID NO: 6), F7BSR4 (SEQ ID NO: 7) y F8BSR4 (SEQ ID NO: 8) se utilizaron para completar y
5 confirmar el gen en sentido 3'. Los oligonucleótidos adaptadores AP1y AP2, proporcionados por el *Universal Genome Walker kit* de Clontech, se utilizaron para completar y confirmar el gen en sentido 5'. Asimismo, se confirmó la conservación de este gen mediante su amplificación por PCR usando los oligonucleótidos NcSRS9F (SEQ ID NO: 9) y NcSRS9R2 (SEQ ID NO: 10) en ADN extraído de varios aislados
10 de *N. caninum*, entre los que no se observó la existencia de polimorfismos.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a la clonación del gen NcSRS9, mediante su amplificación por PCR, utilizando oligonucleótidos especialmente diseñados para ello y la posterior digestión con enzimas de restricción de los
15 productos de la PCR. Esta clonación se realiza en un plásmido de expresión en un sistema procariota en el que se inserta el gen NcSRS9 o una parte del mismo. Preferentemente se utilizan sistemas en los que la propia expresión de la proteína recombinante rNcSRS9, bajo el control del promotor T7, facilita su purificación mediante métodos habituales, como es el caso del plásmido pET-45b(+). Otra opción
20 es insertar en el plásmido seleccionado el fragmento del gen NcSRS9 que codifica desde el aminoácido 40 al 375 incluidos, correspondiente a la secuencia de la proteína madura NcSRS9, excluyendo la región del péptido señal del extremo amino de la misma y la región correspondiente al anclaje de glicosil-fosfatidil-inositol (gpi) de su extremo carboxilo. Para ello se amplifica por PCR la región codificante del gen
25 NcSRS9, o la región correspondiente que se quiere clonar, a partir de ADN genómico de *N. caninum*, puesto que dicho gen carece de intrones, utilizando los oligonucleótidos diseñados a tal fin que, en el caso del fragmento que codifica la secuencia correspondiente a la proteína madura, fueron los denominados FoSRS9KpnI (SEQ ID NO: 11) y ReSRS9SacI (SEQ ID NO: 12).

30

Para producir la proteína recombinante rNcSRS9 (SEQ ID NO: 16), se utilizan células que permiten la expresión de las proteínas recombinantes y que inducen dicha

- expresión. Preferentemente se utiliza la cepa rosetta(DE3)pLysS de *E. coli* (Novagen), que expresa de forma inducida la ARN polimerasa del fago T7, e induce la expresión de la proteína recombinante rNcSRS9 por adición de IPTG al medio de cultivo. Pueden utilizarse también formas truncadas de la proteína NcSRS9, así como
- 5 proteínas recombinantes que incluyan NcSRS9, proteínas homólogas a NcSRS9, proteínas homólogas a NcSRS9 con modificaciones químicas o enzimáticas, o proteínas codificadas por moléculas polinucleotídicas homólogas al gen *NcSRS9*, siempre que conserven las características antigénicas de esta proteína.
- 10 En la presente invención, se entiende por proteínas homólogas y moléculas polinucleotídicas homólogas aquellas que presentan un porcentaje de identidad igual o superior al 90% con respecto a la proteína NcSRS9, o formas truncadas de la misma que mantienen la antigenicidad de NcSRS9, y un porcentaje de identidad igual o superior al 95% con respecto al gen *NcSRS9*, respectivamente. Por ejemplo, en el caso
- 15 de la proteína NcSRS9 madura sin el péptido señal del extremo amino terminal ni la secuencia correspondiente al anclaje gpi del extremo carboxi, tal y como se describe en el ejemplo 2, se consideran proteínas homólogas aquellas que presentan un porcentaje de identidad igual o superior al 90% con dicho fragmento de la proteína NcSRS9. El algoritmo utilizado para calcular el porcentaje de identidad ha sido el
- 20 BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) desarrollado por Gish, W. (1996-2006) (<http://blast.wustl.edu>).

- Por otro lado, en la presente invención también se describe la detección de
- N. caninum*, en tejidos animales infectados, mediante amplificación por PCR del gen
- 25 NcSRS9 de *N. caninum* previamente descrito en esta invención. Igualmente, se describe el desarrollo de sueros policlonales monoespecíficos frente a la proteína recombinante rNcSRS9 así como su aplicación efectiva en inmunofluorescencia sobre cultivos celulares infectados con *N. caninum* o en inmunohistoquímica sobre tejidos animales infectados con dicho parásito, demostrándose su interés como reactivos para
- 30 su empleo en cualquier otra técnica basada en la detección serológica o en técnicas para la detección directa de *N. caninum* en los tejidos de los animales.

La presente invención proporciona, igualmente, un reactivo de gran utilidad para el desarrollo de composiciones inmunogénicas y formulaciones vacunales frente a la neosporosis, la transmisión vertical de la infección y el establecimiento de la infección crónica. Por un lado, se demuestra mediante la técnica de *western blot*, basado en la

5 proteína recombinante rNcSRS9, el desarrollo de anticuerpos específicos frente a NcSRS9 en bovinos naturalmente infectados por *N. caninum*, lo cual sugiere la naturaleza inmunogénica de la proteína nativa NcSRS9. Por otro lado, el sistema de expresión de genes heterólogos en procariontes presenta la ventaja de poder producir a gran escala el antígeno recombinante, utilizándolo así en preparaciones

10 inmunogénicas o vacunales. Este tipo de vacunas son muy 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

15 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 como, por ejemplo, diversas citoquinas en solitario o junto a otros adyuvantes, partículas no infecciosas similares a la cápside vírica (VLP; *Virus-Like Particles*) o la encapsulación de la proteína en biopolímeros, como la poly-epsilon-caprolactona (PCL), con propiedades bioadhesivas, biodegradables y biocompatibles,

20 capaces de mejorar la presentación del antígeno a los componentes del sistema inmune, permitir su liberación lenta en el organismo y potenciar la respuesta inmune celular (Eldridge *et al.*, 1991. *Mol Immunol.* 28:287–290; Aguilar *et al.*, 2007. *Vaccine.* 25: 3752–62; Murillo *et al.*, 2001. *Vaccine.* 19:4099-4106; Florindo *et al.*, 2009. *Biomaterials.* 30, 879-891; Da Costa Martins *et al.*, 2009. *Vaccine.* Epub ahead of

25 print). En este sentido, se describe en la presente memoria la incorporación de la proteína recombinante rNcSRS9 a un adyuvante nanoparticulado basado en la PCL, comprobándose el mantenimiento de la integridad y antigenicidad propia de rNcSRS9 tras la encapsulación. La inmunización de ratones BALB/c con estas nanopartículas

30 genera una respuesta inmune humoral específica frente a rNcSRS9, detectable mediante *western blot*, y se observa un ligero incremento de la supervivencia de las crías nacidas de las ratonas inmunizadas y desafiadas con un aislado virulento de

N. caninum durante la gestación en comparación con las hembras no inmunizadas e infectadas.

5

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

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 figuras en donde, con carácter
10 ilustrativo y no limitativo, se ha representado lo siguiente:

Figura 1.

Panel A: Representa el esquema de clonación de *NcSRS9* en el plásmido de expresión, según se explica en el ejemplo 2 de esta memoria. Panel B: Representa el esquema de
15 la proteína recombinante *rNcSRS9*, 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
20 plásmidos recombinantes *pSRS9.9* (carril 2) y *pSRS9.11* (carril 3) liberaron un fragmento del tamaño esperado (1017 pb). El plásmido sin digerir de *pSRS9.11* se visualizó en el mismo gel (carril 4). Además, se digirió el vector *pET-45b(+)* como control de la digestión (carril 5). El carril 1 muestra un plásmido digerido en el que el
25 fragmento de interés no llegó a insertarse. Como marcador del tamaño molecular (L) se utilizó “1Kb Plus DNA ladder” (Invitrogen).

Figura 3.

Panel A: Expresión de la proteína recombinante *rNcSRS9* en *E. coli* (clon *pSRS9.11.3*), según se explica en el ejemplo 2 de esta memoria. Sobrenadante
30 (carriles 1-3) y cuerpos de inclusión (carriles 4-6) de 3 lotes diferentes de *rNcSRS9*, siendo K “Precision Plus Protein Standards Kaleidoscope (Bio-rad)”.

Panel B: Fracciones 4, 5 y 6 de rNcSRS9 purificada (carriles 1-3) por cromatografía de afinidad (IMAC) a partir de los cuerpos de inclusión desnaturalizados (carril 4), según se explica en el ejemplo 2 de esta memoria, siendo K “Precision Plus Protein Standards Kaleidoscope” (Bio-rad) y carriles 5-7 una curva estándar de albúmina sérica bovina.

Figura 4.

Panel A: Caracterización de la proteína NcSRS9 mediante inmunofluorescencia (IF), según se explica en el ejemplo 4 de esta memoria. La figura muestra un cultivo *in vitro* de *N. caninum* con taquizoítos transformados en bradizoítos tras 7 días de estrés, que reaccionan por IF doble, en verde frente a un suero policlonal de conejo específico producido frente a la proteína rNcSRS9 (Figuras B y C del panel B, en verde) y en rojo frente a la proteína NcSAG1 específica del estadio de taquizoíto (Figuras A y C del panel B, en rojo).

Panel B: Reactividad del suero policlonal de conejo anti-rNcSRS9 mediante inmunohistoquímica (IHQ) frente a bradizoítos producidos *in vivo*, según se explica en el ejemplo 4 de esta memoria. En la figura podemos observar un quiste tisular conteniendo bradizoítos de *N. caninum* que, tras haber sido sometidos a una tinción por IHQ, han reaccionado frente al suero anti-rNcSRS9 producido en conejo, observándose el inmunomarcado específico de la superficie de los parásitos.

Panel C: Reactividad de muestras de 8 sueros de vacas reproductoras con infección natural (carriles 1-8) y de 11 terneros precalostrales con infección congénita por *N. caninum* (carriles 9-19) mediante *western blot* utilizando la proteína rNcSRS9, según se explica en el ejemplo 4 de esta memoria. Como control se llevó a cabo otro *western blot* utilizando la proteína rNcBSR4 enfrentada a los mismos sueros para confirmar su inmunoreactividad frente a una proteína específica de bradizoítos de expresión tardía.

Figura 5.

Panel A: Reactividad de muestras de suero de vacas infectadas naturalmente con *N. caninum* mediante *western blot* utilizando la proteína rNcSRS9 nanoencapsulada

según se explica en el ejemplo 6 de esta memoria. Los pesos moleculares (kDa) se indican a la izquierda. La flecha indica la proteína rNcSRS9.

Panel B: Immunoblot de rNcSRS9 con muestras de suero de ratones inmunizados con rNcSRS9 nanoencapsulada (G3) y ratones sin inmunizar (G1). Los pesos moleculares (kDa) se indican a la derecha.

Panel C: Curvas de supervivencia Kaplan-Meier de neonatos nacidos de madres inmunizadas con rNcSRS9 nanoencapsulada (G3) y del grupo testigo no inmunizado-infectado (G2) durante los 10 primeros días postparto.

10 MODO DE REALIZACIÓN DE LA INVENCION

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.

15 Ejemplo 1: aislamiento y caracterización del gen NcSRS9

Para el aislamiento del gen NcSRS9 de *N. caninum* se utilizó el método denominado paseo cromosómico o *genome-walking*, que permite amplificar mediante PCR fragmentos de ADN cuya secuencia se desconoce pero que flanquean regiones de ADN conocidas.

20

Para diseñar los oligonucleótidos necesarios para el paseo cromosómico se utilizó la secuencia correspondiente a NcBSR4 que expresa un antígeno específico de la fase de bradizoíto de *N. caninum*. Se utilizó el ADN genómico de *N. caninum* y un kit comercial (Universal Genome Walker™ kit, BD Biosciences Clontech) para realizar el paseo cromosómico en sentido 3' a partir de esta secuencia. El primer paso para llevar a cabo esta técnica consistió en la digestión del ADN genómico con cuatro enzimas de restricción distintas que producen extremos romos: *EcoRV*, *DraI*, *PvuII* y *StuI*, y su posterior ligación a unos oligonucleótidos 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, respectivamente) y al oligonucleótido específico del gen, diseñado en función de la secuencia genómica conocida.

25
30

Los oligonucleótidos diseñados para realizar el paseo cromosómico en el extremo 3' a partir del gen *NcBSR4* se denominaron: F3.2BSR4 (SEQ ID NO: 1), F4.2BSR4 (SEQ ID NO: 2), SECF1 (SEQ ID NO: 3), SECF2 (SEQ ID NO: 4), F5BSR4 (SEQ ID NO: 5), F6BSR4 (SEQ ID NO: 6), F7BSR4 (SEQ ID NO: 7) y F8BSR4 (SEQ ID NO: 8). La amplificación se realizó mediante una PCR anidada, utilizando una ADN polimerasa termoestable de largo recorrido (Ecotaq Plus, Ecogen), en el tampón correspondiente, en presencia de Cl_2Mg (2 mM), 200 μM de cada dNTP y 10 μM de cada oligonucleótido junto con su oligonucleótido complementario (AP1 ó AP2, según corresponda), en un volumen de reacción de 50 μl .

La primera PCR se realizó con cada una de las genotecas de ADN genómico utilizando los oligonucleótidos F3.2BSR4, SECF1, F5BSR4 ó F7BSR4, junto con el adaptador AP1, 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 F4.2BSR4, SECF2, F6BSR4 ó F8BSR4, junto con el adaptador AP2, para continuar el paseo cromosómico. 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.

Los fragmentos de ADN obtenidos mediante el paseo cromosómico se purificaron utilizando un kit comercial (GENECLEAN Turbo nucleic acid purification kit, Q-BIOgene) y se secuenciaron empleando el analizador de DNA 3730 (Applied Biosystems). Finalmente, para confirmar la secuencia interna por PCR y secuenciación, se diseñaron dos parejas de oligonucleótidos denominados: *NcSRS9F* (SEQ ID NO: 9) y *NcSRS9R2* (SEQ ID NO: 10). 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 58°C y 1 minuto a 72°C, seguidos de 20 ciclos de 15 segundos a 94°C y 30 segundos 58°C y 1 minuto a 72°C incrementando 5 segundos en cada ciclo, con una elongación final a 72°C durante 7 minutos.

5

De esta forma, al comparar las secuencias de los diferentes fragmentos amplificados se pudo determinar una secuencia de 6411 nucleótidos (SEQ ID NO: 14), y dentro de ella se comprobó la existencia de una fase de lectura abierta (ORF) de 1191 pb (SEQ ID NO: 13), que codifica una preproteína de 396 aminoácidos, denominada
 10 NcSRS9 y expresada en la fase de bradizoíto (SEQ ID NO: 15). Al hacer la comparación de la secuencia de aminoácidos que codifica esta ORF, se encontró una similitud del 43%, con un total de 160 residuos similares, con la proteína TgSRS9 de *T. gondii*, codificada por el gen *TgSRS9* (gen TGGT1_121100), existente en la base de datos del ToxoDB 4.3 (USA) (BLASTP y BLASTX); asimismo, se observó una
 15 similitud de hasta el 63% con secuencias que, de acuerdo a diversas bases de datos tales como ToxoDB y TIGR (BLASTX), se encuentran dentro del locus SRS9 de *T. gondii* y flanquean el gen *TgBSR4* en su extremo 3'.

Ejemplo 2: expresión de la proteína NcSRS9 como proteína recombinante y su purificación.

20

Una vez identificado el gen *NcSRS9*, para su expresión en procariontes se insertó una parte del gen (desde el nucleótido 118 hasta el 1125) que codifica la proteína madura sin el péptido señal ni la región correspondiente al anclaje GPI, desde el aminoácido 40 al 375, en los sitios *KpnI* y *SacI* del plásmido pET-45b(+) (Novagen, EMD
 25 Biosciences) (Figura 1A). Para ello se realizó una PCR a partir del ADN genómico de *N. caninum*, utilizando oligonucleótidos diseñados para este fin: FoSRS9KpnI (SEQ ID NO: 11), el oligonucleótido directo, localizado desde el nucleótido 1976 al 1999 de SEQ ID NO:14, en cuyo extremo 5' se incluyó un sitio específico de reconocimiento para la enzima de restricción *KpnI* entre los nucleótidos 4 y 10, seguido de una
 30 secuencia idéntica a la del gen *NcSRS9*; y ReSRS9SacI (SEQ ID NO: 12), el oligonucleótido inverso y, por lo tanto, diseñado como secuencia inversa complementaria de SEQ ID NO: 14, localizado desde el nucleótido 2979 al 3000 de

SEQ ID NO:14, en cuyo extremo 5' se incluyó un sitio específico de reconocimiento para la enzima de restricción *SacI* entre los nucleótidos 4 y 9, seguido del triplete tta para la terminación de la traducción de la proteína recombinante y, a continuación, del extremo 3' de la ORF del gen *NcSRS9*.

5

Para realizar la PCR, se utilizaron 0,1 µg de ADN 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
10 descriptiva. El ADN amplificado fue purificado (GENECLEAN Turbo nucleic acid purification kit, Q-BIOgene) y digerido con los enzimas *KpnI* (20U) y *SacI* (20U) en el tampón adecuado durante 14 horas. Al mismo tiempo y en idénticas condiciones fue digerido el vector plasmídico pET-45b(+). Finalmente se purificaron ambos productos de la digestión (GENECLEAN Turbo nucleic acid purification kit, Q-BIOgene). Una
15 vez purificado el fragmento de ADN digerido fue ligado a 50ng del vector plasmídico linearizado en una proporción 1:3 vector:inserto, en presencia de 1U del enzima T4ADN ligasa, en el tampón adecuado y en un volumen final de 20 µl. La ligación se realizó en tubos de 0,5ml (Multi™, Sorenson BioScience), en un termociclador durante 16 horas a 16°C, siendo conservada posteriormente a -20°C hasta su uso.

20

Para la manipulación del plásmido se siguió básicamente la metodología recomendada por la casa comercial (Invitrogen). Una vez realizada la ligación ésta fue utilizada para transformar células de la cepa NovaBlue (Novagen, EMD Biosciences) químicamente competentes, mediante choque térmico en las condiciones indicadas por la casa
25 comercial. Las bacterias competentes se descongelaron y se mantuvieron en hielo hasta su utilización, momento en el que se añadió 1 µl de la ligación. Una vez transcurridos 5 minutos en hielo se incubaron a 42°C en baño de agua durante 30 segundos y se colocaron inmediatamente en hielo durante 2 minutos.

30 Inmediatamente las bacterias transformadas se resuspendieron en 250 µl de medio SOC (bactotriptona 2%, extracto de levadura 0,5%, NaCl 10 mM, KCl 2,5mM, MgSO₄ 10 mM, MgCl₂ 10 mM y glucosa 20 mM), y se cultivaron 50 µl de la

suspensión celular en medio LB-agar (1,5% de agar noble) en presencia de 100 µg/ml de ampicilina, antibiótico frente al que presentan resistencia las bacterias en las que el plásmido utilizado se ha insertado. Después de 18 horas de incubación a 37° C, se seleccionaron 16 colonias (clones) y se incubaron en 3 ml de medio LB líquido con
 5 100 µg/ de ampicilina durante toda la noche a 37°C, para el posterior aislamiento del ADN plasmídico. Este ADN fue obtenido mediante un kit de miniprep (Quiagen) 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.

10 Los plásmidos de interés se denominaron pSRS9, numerados del 1 al 16. Sobre todos ellos se realizó un análisis de restricción con las enzimas de restricción *KpnI* (5U) y *SacI* (5U) en el tampón adecuado, en un volumen final de 20 µl, durante dos horas a 37°C en un baño de agua. El ADN plasmídico digerido se separó en un gel de agarosa al 0,8% en tampón TAE al 1% (Figura 2, carriles 2 y 3 respectivamente). De entre
 15 aquellos plásmidos que liberaron un inserto del tamaño esperado se seleccionaron dos clones (pSRS9.7 y pSRS9.11) para llevar a cabo la secuenciación de dicho inserto. Únicamente el plásmido pSRS9.11 integró un inserto con la secuencia correcta del gen *NcSRS9*. El plásmido pSRS9.11 sin digerir se visualizó en el mismo gel (Figura 2, carril 4). Además, se digirió el vector pET-45b(+) (Figura 2, carril 5) y se utilizó como
 20 control de la digestión.

La secuencia clonada en el plásmido pET-45b(+) fue expresada como proteína recombinante en las células Rosetta (DE3) pLysS de *Escherichia coli* (Novagen, EMD Biosciences) y se denominó rNcSRS9 (SEQ ID NO: 16). La proteína recombinante
 25 rNcSRS9 comprende desde el aminoácido 40 hasta el 375 de la proteína NcSRS9, y se corresponde con la secuencia aminoacídica de la misma carente del péptido señal en el extremo amino y del anclaje de GPI en el extremo carboxilo. La rNcSRS9 es una proteína de fusión unida en su extremo amino a un bloque de aminoácidos provenientes del vector que incluye seis histidinas, lo que permite su purificación por
 30 cromatografía de afinidad. El plásmido presenta además el promotor *T7/lac* que controla más eficientemente la transcripción del gen, y un sitio de unión a ribosoma (rbs) que promueve una traducción más eficiente y exacta del ARN mensajero en

procariotas. En la figura 1, panel B se presenta un esquema de la proteína recombinante rNcSRS9.

Para expresar la proteína recombinante en el sistema procariota, se transformaron
5 células de la cepa Rosetta(DE3)pLysS de *E. coli* (Novagen, EMD Biosciences) con el
plásmido pSRS9.11, siguiendo las indicaciones de la casa comercial. Las células
transformadas con el plásmido, fueron cultivadas en medio LB-agar con un 1% de
glucosa, ampicilina (100 µg/ml) y cloranfenicol (34 µg/ml) e incubadas toda la noche
a 37°C. Al día siguiente se seleccionaron 5 colonias (numeradas de 11.1 a 11.5) de las
10 placas y se incubaron durante 5 horas a 250 rpm y 37°C en 3 ml del mismo medio
líquido de selección. A continuación, se diluyó el cultivo iniciador 1:10 en el mismo
medio de crecimiento y se mantuvo en idénticas condiciones hasta alcanzar una A_{600}
mayor a 0,6 OD. Posteriormente, se indujo la expresión de la proteína recombinante
en presencia de IPTG 1mM, durante toda la noche en agitación a 250 rpm y 20°C.
15 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, las proteínas contenidas en el extracto bacteriano fueron solubilizadas en
20 tampón de carga de Laemmli 1x (Laemmli. 1970. Nature 227, 680-685) en una
proporción de 50 µl por ml de cultivo original, fueron separadas mediante
electroforesis en condiciones desnaturalizantes en geles de acrilamida-DADT al 15 %
y se tiñeron con tinción de azul Coomassie. Se compararon las proteínas de un
extracto total de las bacterias recogidas antes y después de su inducción. El clon
25 rNcSRS9.11.3 fue seleccionado en base a una mayor abundancia de rNcSRS9
visualizada en el gel. Se procedió, a continuación, a la lisis de los sedimentos celulares
de dicho clon, mediante resuspensión en un tampón de lisis (tampón fosfato
conteniendo 40 mM de imidazol, 5% de glicerol y 0,5% de Triton-X100) a una
concentración de 15 ml por gramo de sedimento celular, en presencia de la enzima
30 benzonasa (1U/ml de muestra, Novagen), lisozima (1 KU/ ml de muestra) e
inhibidores de proteasas (Calbiochem, 1 ml/ 20 g de bacterias). Posteriormente, la
suspensión fue incubada en agitación suave (100 rpm) a 20°C durante toda la noche y,

finalmente, fue sonicada. Más tarde, se separaron la fracción soluble de aquella donde se encuentran los cuerpos de inclusión, mediante centrifugación a 16.000 xg y 4°C durante 20 minutos, para determinar la localización de la proteína de interés.

- 5 Posteriormente, se lavaron los cuerpos de inclusión en un tampón de lavado (tampón fosfato conteniendo 0,5% de Triton-X100) cuatro veces. Finalmente, se separaron las proteínas en las condiciones descritas anteriormente. De esta forma se confirmó la expresión de la proteína recombinante rNcSRS9 en las células Rosetta(DE3)pLysS y su localización en cuerpos de inclusión (Figura 3, panel A, carril 4-6).

10

Para la purificación de la proteína rNcSRS9 por cromatografía de afinidad por metales inmovilizados (IMAC) se cultivó el clon pSRS9.11.3 en un mayor volumen y en las condiciones descritas anteriormente (volumen final de inducción de 500 ml). Para la solubilización de la proteína, los cuerpos de inclusión lavados se solubilizaron en 40 ml de un tampón de desnaturalización (pH 7,4) que contenía sales de fosfato sódico (20 mM), cloruro sódico (500 mM), imidazol (40 mM) y urea (8M), en agitación suave (250 rpm) y temperatura ambiente durante toda la noche. Finalmente, se centrifugaron a 12.000 xg durante 15 minutos a 4°C y el sobrenadante se conservó a -80°C hasta su uso.

20

La purificación por IMAC se llevó a cabo utilizando las columnas HisTrap HP de 1 ml (GE Healthcare) en el sistema Akta Prime Plus (GE Healthcare), siguiendo las indicaciones de la casa comercial. Para ello se prepararon 4 lotes a partir de los 40 ml descritos anteriormente y se inyectaron 10 ml en la columna tras un equilibrado inicial con el tampón de desnaturalización, a continuación se renaturalizó la proteína adherida a la columna utilizando un gradiente decreciente de urea hasta terminar lavando con un tampón similar al de desnaturalización pero sin urea y conteniendo glicerol y glucosa con el fin de evitar la precipitación de la proteína. Finalmente, la recuperación de la proteína se llevó a cabo mediante un gradiente creciente de imidazol hasta alcanzar 500mM, concentración a la que la proteína fue eluida de la columna. Una muestra de la proteína obtenida se separó mediante electroforesis en las condiciones descritas anteriormente (Figura 3, panel B, carriles 1-3), y su

30

concentración se determinó por regresión lineal conforme a un patrón de diferentes concentraciones de seroalbúmina bovina (BSA) en el mismo gel (Figura 3, panel B, carriles 5-7).

5 **Ejemplo 3: Empleo del gen NcSRS9 para la detección de ADN de *N. caninum* en tejidos animales infectados con *N. caninum* mediante PCR**

Se emplearon 2 muestras de tejido proveniente del sistema nervioso central de dos ratones experimentalmente infectados con 2×10^6 taquizoítos del aislado Nc-Liv de *Neospora caninum* y 2 muestras de tejido de sistema nervioso central de un ratón libre
10 de la infección por *N. caninum*. El ADN total de dichos tejidos se extrajo empleando un método comercial (DNeasy Blood & Tissue Kit de Qiagen). Para la reacción de amplificación de NcSRS9 se emplearon los oligonucleótidos NcSRS9F (SEQ ID NO: 9) y NcSRS9R2 (SEQ ID NO: 10), diseñados a partir de la ORF de NcSRS9 según se describe en el ejemplo 1. Como enzima se utilizó la DNA polimerasa Expand High
15 Fidelity de Roche Applied Science. Las condiciones de la reacción fueron 94° C durante 2 min, 30 ciclos a 94° C durante 15 s, 60° C durante 30 s y 72° C durante 1 min, y una fase de elongación final de 72° C durante 7 min. Los productos de la PCR fueron visualizados mediante electroforesis en gel de agarosa. En paralelo se llevó a cabo la amplificación del gen ITS-1 de *N. caninum* mediante PCR anidada (Buxton et al., 1998. J. Comp. Pathol. 118, 267-279) como control de la presencia del parásito en
20 las muestras.

Los productos de la PCR se purificaron empleando el “GENECLEAN Turbo nucleic acid purification kit” (Q-BIOgene) y se secuenciaron mediante ABI Prism 377 DNA
25 sequencer (Applied Biosystems) con el fin de comprobar la amplificación correcta de la ORF de NcSRS9 mediante alineamiento de secuencias empleando el software Bioedit v3.

Tras el análisis de las muestras se comprobó la amplificación de la ORF del gen
30 NcSRS9 en las muestras de tejido infectadas por *N. caninum* y positivas mediante PCR anidada del gen ITS-1, detectándose un 100% de identidad con respecto a la ORF de

NcSRS9 identificada a partir de taquizoítos obtenidos *in vitro* mediante paseo cromosómico.

**Ejemplo 4: producción de sueros policlonales frente a rNcSRS9 y su uso en la
5 detección directa de bradizoítos de *N. caninum*.**

Para la obtención de sueros policlonales se utilizaron conejos de la raza New Zealand hembras de 2,5 Kg de peso vivo. Los animales se mantuvieron con comida y agua *ad libitum* en jaulas individuales. La proteína rNcSRS9 purificada según se describe en el ejemplo 2 de esta memoria se emulsionó con el adyuvante Titermax (Sigma Aldrich,
10 USA) siguiendo la metodología recomendada por la casa comercial. Se realizaron 3 inmunizaciones por vía subcutánea con intervalos de 3 semanas, inoculando 100 µg en 200 µl repartidos en 2 puntos de inoculación (50 µg de proteína/ punto de inmunización) por conejo. El suero de los animales fue recogido a las 2 semanas de la última inmunización y fue comprobado mediante *western blot* frente a la proteína
15 recombinante rNcSRS9 detectándose el desarrollo de anticuerpos específicos frente a la misma. El suero policlonal se denominó anti-rNcSRS9.

Con el fin de valorar la expresión de NcSRS9 en el estadio de bradizoíto, se llevó a cabo una inmunofluorescencia (IF) doble con el suero policlonal de conejo anti-rNcSRS9, descrito previamente en este ejemplo, junto con el anticuerpo monoclonal
20 de ratón desarrollado frente al antígeno específico de taquizoíto NcSAG1 (Figura 4, Panel A). Para ello, se prepararon cultivos celulares infectados con taquizoítos en cristales de 12 mm de diámetro y se trataron con nitroprusiato sódico (SNP) a una concentración de 70 µM en el medio de cultivo durante 7 días tras la infección, siendo
25 reemplazado diariamente, de acuerdo a lo descrito por Risco-Castillo *et al.* (2004. J. Parasitol. 90, 466-70). Los cristales fijados fueron incubados con anti-NcSAG1 (1:1000) y anti-rNcSRS9 (1:500) y, a continuación, con los conjugados Alexa 594 y Alexa 488 (Molecular Probes), respectivamente. Los núcleos de la célula hospedadora y de los parásitos fueron marcados con 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). Los
30 resultados obtenidos demostraron que el anticuerpo anti-rNcSRS9 marca los bradizoítos obtenidos en el cultivo siguiendo un patrón predominantemente superficial, obteniendo hasta un 9,3% de vacuolas marcadas al día 7 postestrés.

Por otro lado, se determinó la reactividad del suero anti-rNcSRS9 utilizando
 bradizoítos maduros de *N. caninum* producidos *in vivo*. Para ello, se confirmó
 mediante inmunofluorescencia la seropositividad de un ternero infectado naturalmente
 5 con *N. caninum* y se examinaron secciones parafinadas de tejido cerebral con quistes
 tisulares de *N. caninum* mediante inmunohistoquímica (IHQ), incubando con el suero
 policlonal de conejo anti-rNcSRS9 (dilución 1:100) y siguiendo el método de
 estreptavidin-biotin-peroxidasa descrito por Pereira-Bueno et al. (2003. Vet. Parasitol.
 111, 143-152). Esta técnica demostró un reconocimiento del suero anti-rNcSRS9 por
 10 los bradizoítos contenidos en el quiste tisular, observándose dicho reconocimiento en
 la superficie de los parásitos, tal como se esperaba para un antígeno de superficie
 (Figura 4, Panel B).

Tal y como demuestran estos experimentos, el suero policlonal producido frente a la
 15 proteína recombinante rNcSRS9 es útil en el reconocimiento de la proteína nativa en
 bradizoítos y, por lo tanto, en la detección directa de *N. caninum*.

**Ejemplo 5: determinación de la capacidad de inducción de anticuerpos
 específicos de la proteína NcSRS9 en bovinos naturalmente infectados con *N.*
 20 *caninum***

Se determinó la inducción de anticuerpos específicos frente a NcSRS9, mediante
western blot basado en la proteína recombinante rNcSRS9, en 8 vacas reproductoras
 con infección crónica natural y 11 terneros precalostrales infectados congénitamente
 con *N. caninum*. Previamente, en estos animales, se había detectado anticuerpos
 25 específicos frente a extracto soluble de taquizoítos de *N. caninum* por las técnicas de
 ELISA y *western blot* (Álvarez-García et al., 2002. Vet. Parasitol. 107(1-2), 15-27;
 Álvarez-García et al., 2003. Vet. Res. 34(3), 341-352) y frente a la proteína rNcSAG4,
 específica de bradizoíto, de expresión temprana y marcador de infección crónica,
 mediante ELISA (Aguado-Martínez et al., 2008. Vet. Parasitol. 157(3-4), 182-195).
 30 En paralelo, se midió la presencia de anticuerpos frente a NcBSR4 y NcSRS9 en estos
 mismos sueros mediante *western blot* empleando las proteínas recombinantes
 rNcBSR4 y rNcSRS9, la primera de ellas proteína específica de bradizoíto de *N.*

caninum de expresión tardía (Risco-Castillo et al., 2007. Int. J. Parasitol. 37, 887-896). Para realizar el *western blot*, ambas proteínas recombinantes se utilizaron purificadas por IMAC a una concentración de 0,1 µg/µl 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 (Biorad), a 400 mA durante una hora sumergida en tampón de transferencia previamente enfriado (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 (Álvarez et al. 2002. Vet. Parasitol. 107, 17-27). Así, se bloquearon las membranas con leche desnatada al 5% en TBS con Tween-20 al 0,05% (TBS-T) durante toda la noche a 4°C. A continuación se incubaron las membranas con los sueros de origen bovino, a una dilución 1:20 en TBS-T con leche desnatada al 0,5%, 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 1:400 en TBS-T con leche desnatada al 0,5%, 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), a temperatura ambiente en oscuridad y en agitación.

De los 8 sueros de vacas con infección crónica seropositivos frente al extracto soluble de *N. caninum* y frente a la proteína rNcSAG4 (marcador de infección crónica) 4 presentaron anticuerpos específicos frente a rNcSRS9 y rNcBSR4. Respecto a los 11 sueros procedentes de terneros precalostrales con infección congénita seropositivos frente al extracto soluble de *N. caninum*, 2 sueros reconocieron rNcSRS9 y 1 reconoció rNcBSR4 (figura 4, panel C). Al mismo tiempo, el suero negativo utilizado como control no mostró reacción, como era de esperar.

30

Los resultados obtenidos por la técnica arriba descrita demuestran que la proteína NcSRS9 tiene carácter antigénico de tipo humoral tanto en vacas adultas como en terneros precalostrales infectados naturalmente con *N. caninum*.

5 **Ejemplo 6: Estudio de la respuesta inmune y de la protección frente a la neosporosis generada en ratones y su progenie por la proteína recombinante NcSRS9.**

La proteína recombinante rNcSRS9 fue producida y purificada según el ejemplo 2 de esta patente y se procedió a su encapsulación utilizando el método de doble emulsión
10 con el polímero Poly- épsilon- caprolactona (PCL). El método, en resumen, consistió en una primera fase acuosa, donde se encuentra rNcSRS9 disuelta en el tampón de purificación y mezclada con el detergente Pluoronic F68 al 6%. Ésta se añade a una fase orgánica con el polímero PCL al 5% disuelto en triclorometano, se emulsiona mediante sonicación y, posteriormente, se le añade una segunda fase acuosa con el
15 tensioactivo poly-vinilalcohol (PVA) al 0,5%, volviendo a sonicar para producir una segunda emulsión. La doble emulsión resultante se mantiene en agitación magnética hasta la evaporación completa del triclorometano utilizado en el proceso y formándose, así, las partículas con la proteína encapsulada en su interior (rNcSRS9-PCL).

20

Se determinó el tamaño y la polidispersión (pdl) de las nanopartículas con la proteína encapsulada mediante espectroscopia de correlación fotónica, dando un tamaño medio de 479,4 nm y una pdl de 0,604 nm. A continuación, se comprobó el éxito de la encapsulación cuantificando las partículas por SDS-PAGE y se confirmó la
25 antigenicidad de las mismas mediante *western blot* utilizando suero de vacas infectadas naturalmente (Fig. 5, panel A), con el fin de ser empleadas en un ensayo vacunal en un modelo murino.

Se estudió la capacidad de protección frente a la infección por *N. caninum* de esta
30 proteína recombinante en dos modelos murinos: gestante y no gestante. Para ello, se inmunizó un grupo de 29 ratones hembra de la estirpe BALB/c con 40 µg de rNcSRS9 encapsulada (G3), distribuida en 2 inmunizaciones con un intervalo de 21 días,

mientras los grupos control G1 y G2 (de 29 ratones hembra cada uno) fueron inoculados con el mismo volumen de PBS. A los 15 días, 24 ratones hembra de cada grupo fueron cubiertas con los machos tras la inducción del efecto Whitten. El desafío mediante la inoculación de 2×10^6 taquizoítos de un aislado virulento de *N. caninum* se llevó a cabo en todas las hembras cubiertas del G2 y G3 a los 21 días después de la última inmunización que, en el caso de las gestantes, coincidió con los días 7-10 de gestación. Las hembras no gestantes se mantuvieron hasta el día 30 p.i. fecha en la cual fueron sacrificadas. En el caso de las gestantes, las crías se mantuvieron con sus madres hasta el día 30 postparto cuando tanto madres como crías supervivientes fueron sacrificadas.

Cinco ratones de cada grupo fueron sacrificados cinco días después de la última inmunización para el estudio de la respuesta inmune humoral. Para ello se analizaron los sueros aplicándose las técnicas de ELISA y *western blot* (Fig. 5 panel B), confirmándose que en todos los ratones inmunizados se generaron anticuerpos específicos frente a la proteína recombinante rNcSRS9.

Además, se estudió la protección frente a la infección valorando morbilidad y mortalidad en las hembras no gestantes y en las madres y sus crías. Las hembras no gestantes no desarrollaron síntomas, mientras que en el grupo de hembras gestantes se observaron signos clínicos en todas las camadas de los grupos infectados tales como retraso en el crecimiento, parálisis, torneo e inactividad, apareciendo más tarde en el grupo inoculado con la proteína encapsulada. En cuanto a la mortalidad de las crías (Fig. 5, panel C), se observa un ligero retraso significativo durante los diez primeros días de vida de las crías vacunadas con rNcSRS9 encapsulada ($P < 0,05$) (G3) respecto al grupo testigo de la infección (G2).

TEXTO LIBRE DE LA LISTA DE SECUENCIAS

El texto libre utilizado en la lista de secuencias se corresponde en español a las siguientes características:

SEQ ID NO: 11

Cebador basado en SEQ ID NO: 14 de *Neospora caninum* desde el nucleótido 1976 al 1999.

Nucleótidos del 4 al 10: Sitio de reconocimiento para la enzima de restricción KpnI.

5

SEQ ID NO: 12

Cebador basado en la secuencia inversa de la hebra complementaria del fragmento 2979 al 3000 de SEQ ID NO: 14 de *Neospora caninum*.

Nucleótidos del 4 al 9: Sitio de reconocimiento para la enzima de restricción SacI.

10 Nucleótidos del 10 al 12: Codón de terminación insertado en el cebador para determinar la terminación de la traducción de la proteína recombinante.

SEQ ID NO: 14

Nucleótidos del 240 al 266: Sitio del cebador caracterizado por SEQ ID NO: 1.

15 Nucleótidos del 270 al 293: Sitio del cebador caracterizado por SEQ ID NO: 2.

Nucleótidos del 906 al 928: Sitio del cebador caracterizado por SEQ ID NO: 3.

Nucleótidos del 1551 al 1569: Sitio del cebador caracterizado por SEQ ID NO: 4.

Nucleótidos del 1843 al 1865: Sitio del cebador caracterizado por SEQ ID NO: 9.

Nucleótidos del 1976 al 1999: Sitio del cebador caracterizado por SEQ ID NO: 11.

20 Nucleótidos del 2186 al 2209: Sitio del cebador caracterizado por SEQ ID NO: 5.

Nucleótidos del 2248 al 2274: Sitio del cebador caracterizado por SEQ ID NO: 6.

Nucleótidos del 2839 al 2863: Sitio del cebador caracterizado por SEQ ID NO: 7.

Nucleótidos del 2877 al 2902: Sitio del cebador caracterizado por SEQ ID NO: 8.

25 Nucleótidos del 2979 al 3000: Secuencia inversa y en la hebra complementaria del sitio del cebador caracterizado por SEQ ID NO: 12.

Nucleótidos del 3071 al 3093: Secuencia inversa y en la hebra complementaria del sitio del cebador caracterizado por SEQ ID NO: 10.

SEQ ID NO: 16

30 Proteína recombinante basada en NcSRS9 de *Neospora caninum*.

Aminoácidos del 1 al 11: Bloque de aminoácidos provenientes del vector pET-45b(+) que incluye seis histidinas.

ES 2 388 416 B1

Aminoácidos del 12 al 347: Fragmento de la proteína NcSRS9 desde el aminoácido 40 al 375 de SEQ ID NO: 15.

REIVINDICACIONES

1. Molécula polinucleotídica caracterizada por SEQ ID NO: 13 que consiste en el gen NcSRS9 de *Neospora caninum* y codifica la proteína NcSRS9 de *Neospora caninum*
5 caracterizada por SEQ ID NO: 15.
2. Molécula polinucleotídica caracterizada por SEQ ID NO: 14 que comprende la secuencia polinucleotídica definida en la reivindicación 1.
- 10 3. Molécula polinucleotídica con al menos un 95% de identidad con las moléculas polinucleotídicas definidas en las reivindicaciones 1 ó 2.
4. Método para detectar *N. caninum* a partir de tejidos animales mediante PCR o RT-PCR o mediante sondas de ADN que incluye cualquiera de los oligonucleótidos
15 F3.2BSR4, F4.2BSR4, SECF1, SECF2, F5BSR4, F6BSR4, F7BSR4, F8BSR4, NcSRS9F, NcSRS9R2, FoSRS9KpnI y ReSRS9SacI, caracterizados por SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 y 12, como cebadores o como sondas.
5. Vector recombinante que comprende una secuencia nucleotídica definida en las
20 reivindicaciones 1, 2 ó 3.
6. Células eucariotas hospedadoras transfectadas con los vectores recombinantes de la reivindicación 5.
- 25 7. Células procariotas hospedadoras transformadas con los vectores recombinantes de la reivindicación 5.
8. Polipéptido sustancialmente purificado o aislado seleccionado de (a) la proteína antigénica NcSRS9 de *N. caninum*, caracterizada por SEQ ID NO:15; (b) polipéptidos
30 derivados o formas truncadas con al menos un 90% de identidad con la proteína NcSRS9 (SEQ ID NO: 15) y que conservan sus características antigénicas; o (c)

proteínas recombinantes que incluyen NcSRS9 (SEQ ID NO: 15) o incluyen polipéptidos derivados de NcSRS9 y que conservan sus características antigénicas.

5 9. Polipéptido según la reivindicación 8 que incluye desde el aminoácido 40 al aminoácido 375 de SEQ ID NO: 15.

10 10. Método para producir un polipéptido que comprende el cultivo de las células hospedadoras de las reivindicaciones 6 ó 7 en condiciones que permiten la expresión de un polipéptido definido en cualquiera de las reivindicaciones 8 ó 9.

11. Anticuerpos monoclonales o policlonales específicos frente a los polipéptidos definidos en las reivindicaciones 8 y 9.

15 12. Método para la detección de *N. caninum* a partir de tejidos animales mediante inmunohistoquímica o inmunofluorescencia o cualquier otra técnica basada en la detección directa del parásito mediante anticuerpos que incluye anticuerpos monoclonales o policlonales específicos definidos en la reivindicación 11.

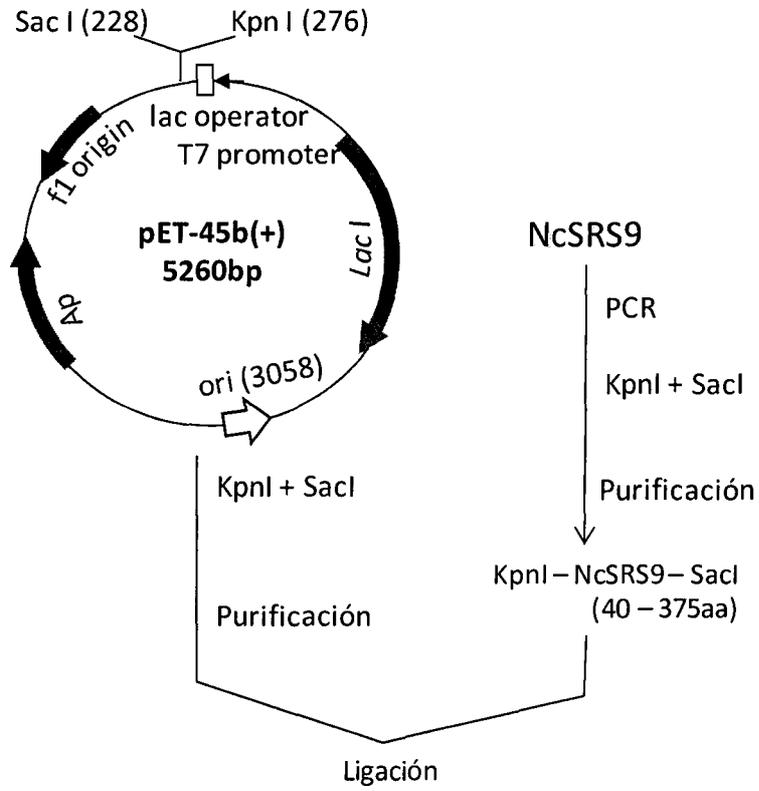
20 13. Composición inmunogénica o formulación vacunal que comprende: (a) un polipéptido definido en las reivindicaciones 8 y 9; (b) una molécula polinucleotídica según las reivindicaciones 1-3; (c) un vector recombinante como el definido en la reivindicación 5; (d) las células hospedadoras transfectadas según reivindicación 6; o (e) las células hospedadoras transformadas según reivindicación 7.

25 14. Composición inmunogénica o formulación vacunal según la reivindicación 13, que comprende un adyuvante, una o varias citoquinas o partículas no infecciosas similares a las cápsides víricas (VLP).

30 15. Kit de vacunación para mamíferos contra la neosporosis que comprende un contenedor que incluye una composición inmunogénica o formulación vacunal según cualquiera de las reivindicaciones 13 ó 14.

Figura 1.

A



B

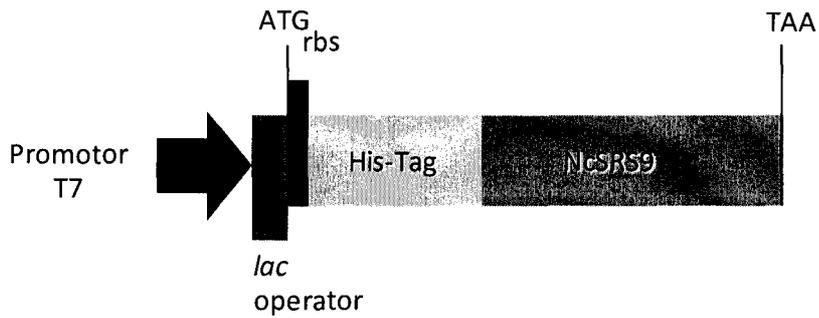


Figura 2.

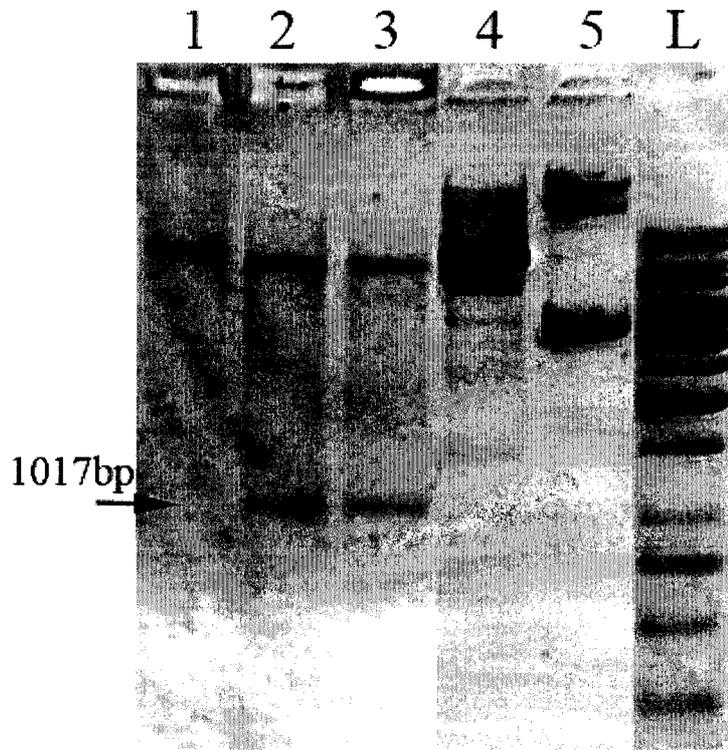


Figura 3.

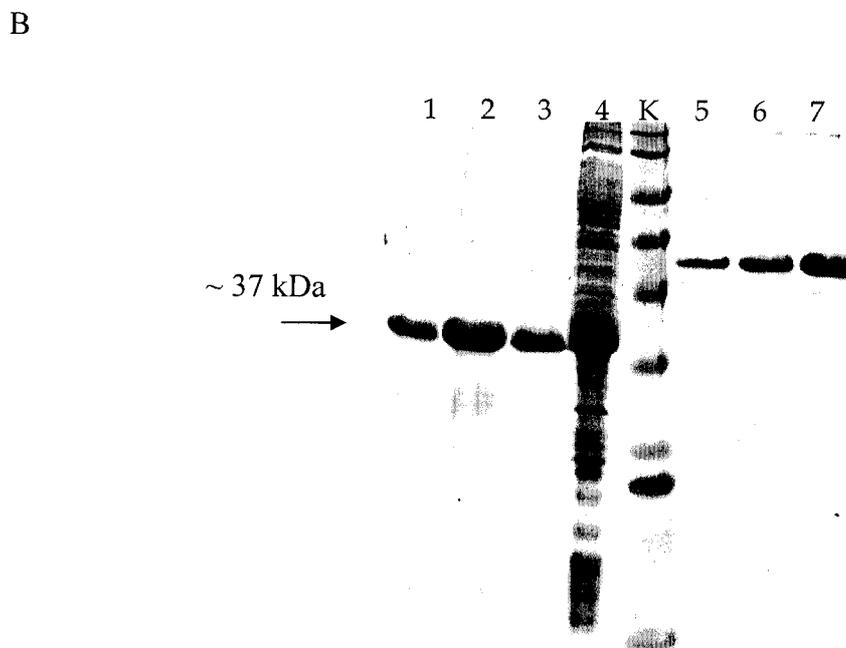
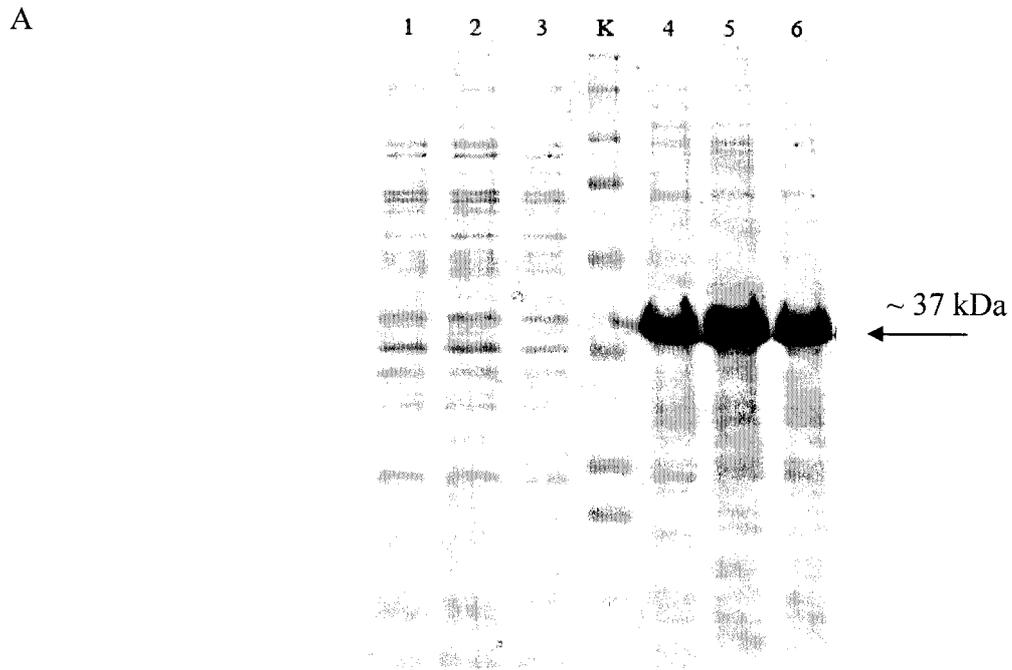
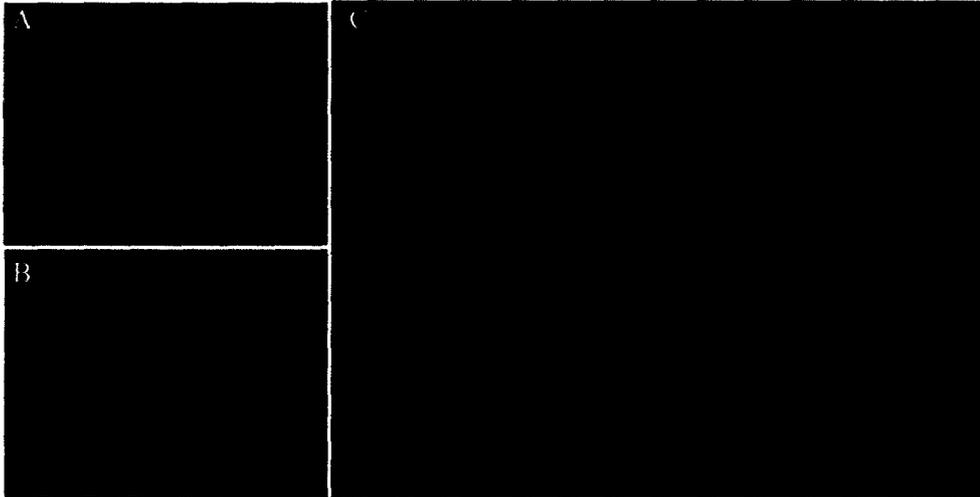
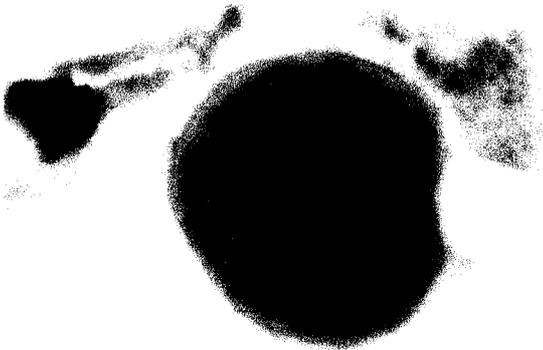


Figura 4.

A



B



C

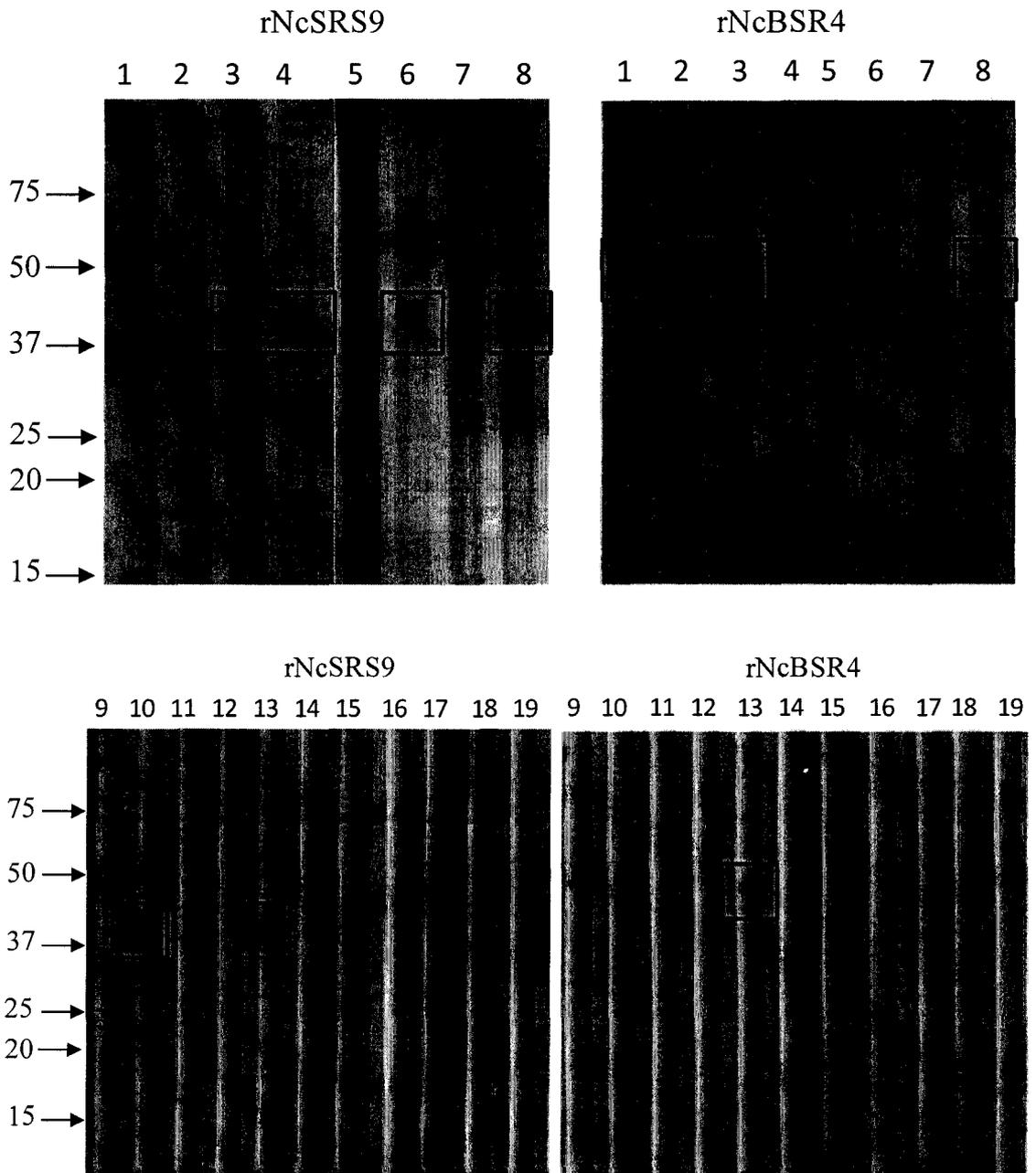
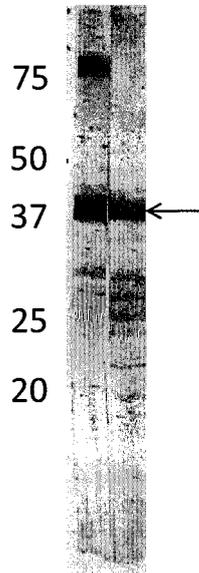
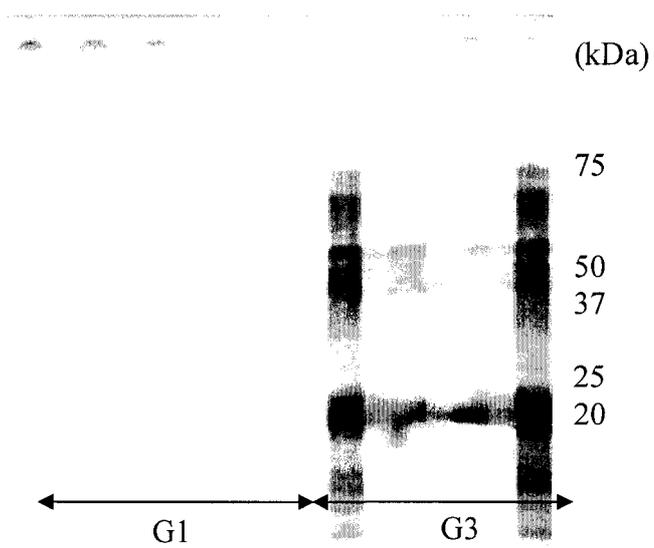


Figura 5

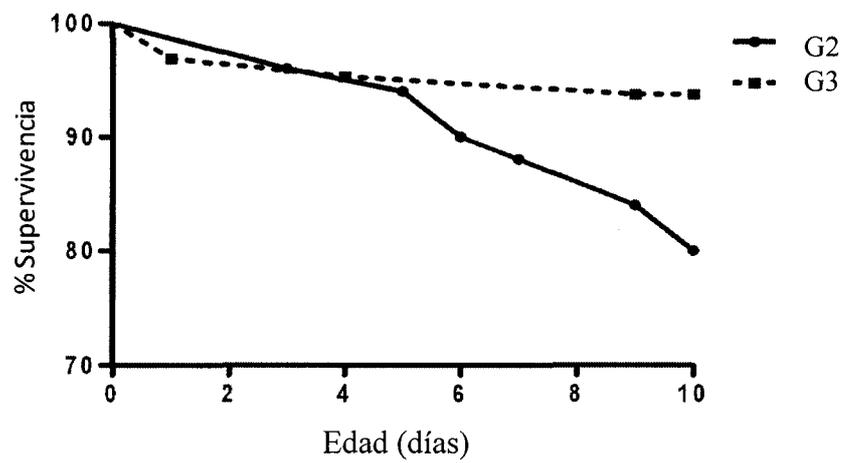
A



B



C



Lista de secuencias patente SRS9_def ST25
LISTA DE SECUENCIAS

<110> Universidad Complutense de Madrid

<120> USO DEL GEN NCSRS9 Y LA PROTEÍNA NCSRS9 PARA LA PREVENCIÓN Y EL DIAGNÓSTICO DE LA NEOSPOROSIS

<130> 2010.01

<160> 16

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1
<211> 27
<212> DNA
<213> Neospora caninum

<400> 1
cacgtcgacc acagcatcta tcttttt 27

<210> 2
<211> 24
<212> DNA
<213> Neospora caninum

<400> 2
ctttc gatgg aagcg ttttt gata 24

<210> 3
<211> 23
<212> DNA
<213> Neospora caninum

<400> 3
gctccaagac acatgccccat ctt 23

<210> 4
<211> 19
<212> DNA
<213> Neospora caninum

<400> 4
ccggcttgcc tgttcttat 19

<210> 5
<211> 24
<212> DNA
<213> Neospora caninum

<400> 5
acaatatcca cgataccccc gaat 24

<210> 6
<211> 27
<212> DNA
<213> Neospora caninum

<400> 6
agaaagtgc aagagctgca ggattga 27

<210> 7

ES 2 388 416 B1

Lista de secuencias patente SRS9_def ST25

<211> 25
 <212> DNA
 <213> Neospora caninum

 <400> 7
 acagtttcgt ttgagttgcg ttctc 25

<210> 8
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Neospora caninum

 <400> 8
 cgacaaacc agagagtga aaggtc 26

<210> 9
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Neospora caninum

 <400> 9
 taattcgttt tccagagtgt gca 23

<210> 10
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Neospora caninum

 <400> 10
 tggattccc acagaagtca agg 23

<210> 11
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Primer based on SEQ ID NO: 14 from Neospora caninum,
 nucleotide 1976 to 1999

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (4)..(10)
 <223> KpnI restriction enzyme recognition site

 <400> 11
 gctggtaccg aaaaactccg tgaa 24

<210> 12
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Primer based on the reverse sequence of the complementary strand
 from the SEQ ID NO: 14 2979 to 3000 fragment from
 Neospora caninum

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (4)..(9)
 <223> SacI restriction enzyme recognition site

ES 2 388 416 B1

Lista de secuencias patente SRS9_def ST25

```

<220>
<221> misc_feature
<222> (10)..(12)
<223> Stop codon inserted into the primer to determine the end of the
recombinant protein translation

<400> 12
ggcgagctct taaaacgaag caaaat                                     26

<210> 13
<211> 1191
<212> DNA
<213> Neospora caninum

<400> 13
atggcgagga gaggaagcat gcagcaccgt cgtggagggc tcaagtcgaa ggctggcaag      60
ctgatggtag tttgcatggg tggagttttg ttgattgcca gcggtcaggc tgggtgcagaa     120
aaactccgtg aaggacttca acatcggggg ttgcagcaac aagctagcac gactgttaca     180
ccaacaatca acgggtgcaac cgctacatgt actttcccaa cggcagtcgg acaacaaacc     240
gtcgcagcta gtagtggctt gaagctctca aaagaaagcc tgactgctgt tttgcagtgt     300
tctggtgaac aagggtccac aatatccacg atacccccga atctgggggc gaacgtgtgt     360
gtcaciaaact ataacggtaa gaaagtgaca agagctgcag gattgaaggc agcacagacg     420
gcgcagaaac cgcgctcaaa gaactcctgg ggacaacccg cgatatcacg gtggacgaaa     480
aaaactgtca acgagatctc aaaagcctcg accccacag attggagctt agaactactg     540
gattcagatc tgcctctatc cgagaaggcc ttcttcgctg gctgtcagca gactaccggg     600
actgacaaac gtgcacggca aacgaagtcg tgtactgtaa cagtaaactg cgacgcgaga     660
gattccgctg ttggggcgaa taacgtggta acctgcgcgt acggtaaaaa cagcaatcct     720
gagcccctga aggttgtgat gacaacagaa aagaacaccc tactcttca ctgtggttcc     780
gagggttctg tcaacccgc gtcatatgag actcagtttt gcgacacctca gggaaaagat     840
atgaaaaact gcgtacggaa gaattatggt gacattcttc cgacgtttct tacgagctgg     900
tggacaaagg agcatgaagg tagtacggtg aagctgacga tcccggaaac ggactttcct     960
gaatccgaac aacagtttcg tttgagttgc gttctcaaag atcgggatgc gacaaaccca    1020
gagagtgaaa aggtcaaaga agacagcgat ggtgcacagg ctgctgccac cgcgtcaaga    1080
tgcaatgtgg tggtcgtcgt caagtctgca aatthttgctt cgthttgcatc gcccgtgctg    1140
gaaattgcag ctgcagccgc tgtgacaggc ctcttcgcta gttcccttta a                1191

<210> 14
<211> 6411
<212> DNA
<213> Neospora caninum

<220>
<221> primer_bind
<222> (240)..(266)
<223> Site of the primer characterized by SEQ ID NO: 1

<220>

```

ES 2 388 416 B1

Lista de secuencias patente SRS9_def ST25

<221> primer_bind
 <222> (270)..(293)
 <223> Site of the primer characterized by SEQ ID NO: 2

<220>
 <221> primer_bind
 <222> (906)..(928)
 <223> Site of the primer characterized by SEQ ID NO: 3

<220>
 <221> primer_bind
 <222> (1551)..(1569)
 <223> Site of the primer characterized by SEQ ID NO: 4

<220>
 <221> primer_bind
 <222> (1843)..(1865)
 <223> Site of the primer characterized by SEQ ID NO: 9

<220>
 <221> CDS
 <222> (1868)..(3055)

<220>
 <221> primer_bind
 <222> (1976)..(1999)
 <223> Site of the primer characterized by SEQ ID NO: 11

<220>
 <221> primer_bind
 <222> (2186)..(2209)
 <223> Site of the primer characterized by SEQ ID NO: 5

<220>
 <221> primer_bind
 <222> (2248)..(2274)
 <223> Site of the primer characterized by SEQ ID NO: 6

<220>
 <221> primer_bind
 <222> (2839)..(2863)
 <223> Site of the primer characterized by SEQ ID NO: 7

<220>
 <221> primer_bind
 <222> (2877)..(2902)
 <223> Site of the primer characterized by SEQ ID NO: 8

<220>
 <221> primer_bind
 <222> (2979)..(3000)
 <223> Reverse sequence of the primer site characterized by
 SEQ ID NO: 12 in the complementary strand

<220>
 <221> primer_bind
 <222> (3071)..(3093)
 <223> Reverse sequence of the primer site characterized by
 SEQ ID NO: 10 in the complementary strand

<400> 14
 ggaggccggt gatcctgtgc ctaccccaaga gtccagtgtc tcagcgtgcc gccctagttt 60
 ccgccatttt gctgtttgtgg agaggctctc tttcccacca cattcagccc tcgcttcgag 120
 gtaggttttct tcggtattcg gagaccgcat ctcatcttgt ccaaagtata cgtagatgct 180
 tggaccgtgg catgctggaa ggttaagggc gttgtggat gtgcaccagg acaaatgtgc 240

ES 2 388 416 B1

Lista de secuencias patente SRS9_def ST25

acgtcgacca cagcatctat ctttttctgc tttcgatgga agcgttttttg atacgtgtgt	300
gataaatgca tataaagggga aggcacgcgt gcattagcga acccgccctg atgtgcttg	360
actggagaag acgttgatcat ggttcttcgc ggatataccc tcgatgtgag cgtgatgaaa	420
ggcgtgagct ccggtttcga aacacagatc aatgcgctgc tgtccatcaa tcgacaacag	480
caggcctgag tcttttgtac cttacgagcg ctcgcgtagc cggctaccgg ggattgaact	540
cattctcagt ggcttaacta atacatgtgt cgctcgcatt ggttgatgat tgtcttgttc	600
tcgcatcact ggtccacacg gtagtgacca cgacgaaaaa tcggtcccgc gccctcggcc	660
ctcccggctc aggtgggtcg ggtaagcagc ttgggggtgt gtttgtgctg gtgggtgacc	720
atgatgagtt agtggcccca tgtttttcca tattgcagat tagggaccgc tgctcgggaa	780
tatagcaact gccagacaaa ccgccaatt tccaccacct ttgaatgagg gcagcctcac	840
gagtgtagcg catgttcgat gacagtgggg tttgcaacat acacaacata tcaaacgtgg	900
ccagggctcc aagacacatg cccatcttgc tcttctctgc tgcggcgatc aatcgatgac	960
cacttgtcac gaccggggga acgactgatg gttgtgccat tcggatagcc aaaggcaggc	1020
ccagctacag ggtattgcag tccatatgaa atatcacgcc aacatggctt actgcacatc	1080
tcagatgtgg ctccggaatc agcttttttg tgtgcccctg cttgatatt ccaacttctt	1140
gccacagct cttcgcgtgt agtttcttcc ttgacgagga acacacgctc ccacataaat	1200
ggagcgtctc ttctgttcta actgttgggc tcctcattag cacacgtctc tctctatggg	1260
gcacacgttt cctcatgtgt gctcatgtgt aagaccctca aaccacgtgc gctgagcttc	1320
atgccatgtg gtatgtcacg tgcgcaatcc ctgtcgatgc ttctcgtttt ctttcacttc	1380
cttctactgg cacaccccc atccttcaat ttcgtctgcc tcgcacaaat ccgcaacact	1440
gtctacagcc tttctggtcg aaaattcctc agtaataagg gtgcaattcg catcgtctcc	1500
atthgacttc acgcacgatc aagaaaagca ctgatgaaaa ttcacatggc ccggcttgcc	1560
tgttcttatc agtccatcta tcttggcagc tagaaggaaa cccaatcctc tgtcaagtga	1620
tcgacctccc cgcgcacgcg agagatttgc tgcacccgac cgctctccgt cccgacgcc	1680
ccaaaacccc cttcttcaga tgtggcccaa ctgctgatcg caaagcccct cagccgagcc	1740
gtgtctgcct aactccgctc tttttgaagt gtagtcgtgc tttccgtatt aaaatttcac	1800
actctgaggt ttgttccttc ttgtgactct ttcacttttt ctttaattcgt tttccagagt	1860
gtgcata atg gcg agg aga gga agc atg cag cac cgt cgt gga ggg ctc	1909
Met Ala Arg Arg Gly Ser Met Gln His Arg Arg Gly Gly Leu	
1 5 10	
aag tcg aag gct ggc aag ctg atg gta gtt tgc atg ggt gga gtt ttg	1957
Lys Ser Lys Ala Gly Lys Leu Met Val Val Cys Met Gly Gly Val Leu	
15 20 25 30	
ttg att gcc agc ggt cag gct ggt gca gaa aaa ctc cgt gaa gga ctt	2005
Leu Ile Ala Ser Gly Gln Ala Gly Ala Glu Lys Leu Arg Glu Gly Leu	
35 40 45	
caa cat cgg ggt ttg cag caa caa gct agc acg act gtt aca cca aca	2053

ES 2 388 416 B1

Lista de secuencias patente SRS9_def ST25																
Gln	His	Arg	Gly	Leu	Gln	Gln	Gln	Ala	Ser	Thr	Thr	Val	Thr	Pro	Thr	
			50					55					60			
atc	aac	ggt	gca	acc	gct	aca	tgt	act	ttc	cca	acg	gca	gtc	gga	caa	2101
Ile	Asn	Gly	Ala	Thr	Ala	Thr	Cys	Thr	Phe	Pro	Thr	Ala	Val	Gly	Gln	
		65					70					75				
caa	acc	gtc	gca	gct	agt	agt	ggc	ttg	aag	ctc	tca	aaa	gaa	agc	ctg	2149
Gln	Thr	Val	Ala	Ala	Ser	Ser	Gly	Leu	Lys	Leu	Ser	Lys	Glu	Ser	Leu	
	80					85					90					
act	gct	ggt	ttg	cag	tgt	tct	ggg	gaa	caa	ggg	gcc	aca	ata	tcc	acg	2197
Thr	Ala	Val	Leu	Gln	Cys	Ser	Gly	Glu	Gln	Gly	Ala	Thr	Ile	Ser	Thr	
	95				100					105					110	
ata	ccc	ccg	aat	ctg	ggg	gcg	aac	gtg	tgt	gtc	aca	aac	tat	aac	ggg	2245
Ile	Pro	Pro	Asn	Leu	Gly	Ala	Asn	Val	Cys	Val	Thr	Asn	Tyr	Asn	Gly	
				115					120					125		
aaa	gaa	agt	gac	aag	agc	tgc	agg	att	gaa	ggc	agc	aca	gac	ggc	gca	2293
Lys	Glu	Ser	Asp	Lys	Ser	Cys	Arg	Ile	Glu	Gly	Ser	Thr	Asp	Gly	Ala	
			130					135					140			
gaa	acc	gcg	ctc	aaa	gaa	ctc	ctg	ggg	aca	acc	cgc	gat	atc	acg	tgg	2341
Glu	Thr	Ala	Leu	Lys	Glu	Leu	Leu	Gly	Thr	Thr	Arg	Asp	Ile	Thr	Trp	
		145					150					155				
acg	aaa	aaa	act	gtc	aac	gag	atc	tca	aaa	gcc	tcg	acc	ccc	aca	gat	2389
Thr	Lys	Lys	Thr	Val	Asn	Glu	Ile	Ser	Lys	Ala	Ser	Thr	Pro	Thr	Asp	
	160					165					170					
tgg	agc	tta	gaa	cta	ctg	gat	tca	gat	ctg	cct	cta	tcc	gag	aag	gcc	2437
Trp	Ser	Leu	Glu	Leu	Leu	Asp	Ser	Asp	Leu	Pro	Leu	Ser	Glu	Lys	Ala	
	175				180					185					190	
ttc	ttc	gtc	ggc	tgt	cag	cag	act	acc	ggg	act	gac	aaa	cg	gca	cg	2485
Phe	Phe	Val	Gly	Cys	Gln	Gln	Thr	Thr	Gly	Thr	Asp	Lys	Arg	Ala	Arg	
				195					200					205		
caa	acg	aag	tcg	tgt	act	gta	aca	gta	aac	gtc	gac	gcg	aga	gat	tcc	2533
Gln	Thr	Lys	Ser	Cys	Thr	Val	Thr	Val	Asn	Val	Asp	Ala	Arg	Asp	Ser	
			210					215					220			
gct	ggt	ggg	gcg	aat	aac	gtg	gta	acc	tgc	gcg	tac	ggg	aaa	aac	agc	2581
Ala	Val	Gly	Ala	Asn	Asn	Val	Val	Thr	Cys	Ala	Tyr	Gly	Lys	Asn	Ser	
		225					230					235				
aat	cct	gag	ccc	ctg	aag	ggt	gtg	atg	aca	aca	gaa	aag	aac	acc	ctc	2629
Asn	Pro	Glu	Pro	Leu	Lys	Val	Val	Met	Thr	Thr	Glu	Lys	Asn	Thr	Leu	
	240					245					250					
act	ctt	cac	tgt	ggg	tcc	gag	ggg	tct	gtc	aac	ccc	gcg	tca	tat	gag	2677
Thr	Leu	His	Cys	Gly	Ser	Glu	Gly	Ser	Val	Asn	Pro	Ala	Ser	Tyr	Glu	
	255				260					265					270	
act	cag	ttt	tgc	gat	cct	cag	gga	aaa	gat	atg	aaa	aac	tgc	gta	cgg	2725
Thr	Gln	Phe	Cys	Asp	Pro	Gln	Gly	Lys	Asp	Met	Lys	Asn	Cys	Val	Arg	
				275					280					285		
aag	aat	tat	ggt	gac	att	ctt	ccg	acg	ttt	ctt	acg	agc	tgg	tgg	aca	2773
Lys	Asn	Tyr	Val	Asp	Ile	Leu	Pro	Thr	Phe	Leu	Thr	Ser	Trp	Trp	Thr	
			290					295					300			
aag	gag	cat	gaa	ggg	agt	acg	gtg	aag	ctg	acg	atc	ccg	gaa	acg	gac	2821
Lys	Glu	His	Glu	Gly	Ser	Thr	Val	Lys	Leu	Thr	Ile	Pro	Glu	Thr	Asp	
		305					310					315				
ttt	cct	gaa	tcc	gaa	caa	cag	ttt	cg	ttg	agt	tgc	ggt	ctc	aaa	gat	2869

ES 2 388 416 B1

Lista de secuencias patente SRS9_def ST25																
Phe	Pro	Glu	Ser	Glu	Gln	Gln	Phe	Arg	Leu	Ser	Cys	Val	Leu	Lys	Asp	
	320					325					330					
cgg	gat	gcg	aca	aac	cca	gag	agt	gaa	aag	gtc	aaa	gaa	gac	agc	gat	2917
Arg	Asp	Ala	Thr	Asn	Pro	Glu	Ser	Glu	Lys	Val	Lys	Glu	Asp	Ser	Asp	
335					340					345					350	
ggt	gca	cag	gct	gct	gcc	acc	gcg	tca	aga	tgc	aat	gtg	gtg	gtc	gtc	2965
Gly	Ala	Gln	Ala	Ala	Ala	Thr	Ala	Ser	Arg	Cys	Asn	Val	Val	Val	Val	
				355					360					365		
gtc	aag	tct	gca	aat	ttt	gct	tcg	ttt	gca	tcg	ccc	gct	gcg	gaa	att	3013
Val	Lys	Ser	Ala	Asn	Phe	Ala	Ser	Phe	Ala	Ser	Pro	Ala	Ala	Glu	Ile	
			370					375					380			
gca	gct	gca	gcc	gct	gtg	aca	ggc	ctc	ttc	gct	agt	tcc	ctt			3055
Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Val	Thr	Gly	Leu	Phe	Ala	Ser	Ser	Leu			
		385					390					395				
taaggctagg	gggatccttg	acttctgtgg	gaataccaat	gtgtttccta	aaagattttt											3115
tcttttctgt	cgatagagat	aatactcttt	tgttgccgac	caaagaggta	cgtgggtgta											3175
caactatcga	cgaagcatct	cgatatatgg	cgccagggtc	tgctggccaa	acctgtagaa											3235
agggtgaaaca	ttgtgtttgc	tgttgctgct	acataggtgg	gatgtgagca	gagtgtagaa											3295
gaaacacatt	aatatattat	acttcgacgt	gccttagcc	cacgcccgac	atcggttaat											3355
cggtttgtgt	ccctaaaatt	gtgccgtgtc	ttcgaggata	gtttgagttt	gtggatggtc											3415
aacgtgtgag	cactgtgctc	gaaaacacag	atgagtgcat	ttgaatcaaa	atgaaatctc											3475
acaccaacat	gctcgctttt	gaaattaatc	acagcagcct	ctcaaagaaa	caactcagat											3535
ggtcacgcgc	agtctctctc	gctcgctacg	tccgtcaaag	tatttcgttt	tctttcactg											3595
cttcttcccg	gcaccctcat	taccctcga	tgtctctttc	tttcgaacca	acatacacca											3655
tgtggctgct	ggtgtcaaca	tgtcttcaac	cgccagcgac	gattgctact	tgaagtgtcg											3715
aactccctgg	taaccaaacg	cgggggatac	cttctgatgc	cttgtcactg	tggaaccca											3775
tgaagcactt	gctgcatcat	tccctcaagg	aagacaaata	gacggaaccg	ctcagtttgt											3835
cccttgctgc	atccacaacc	gttctgccct	ctcgttctgt	cttccgttga	actggacgat											3895
ggaggaagtc	acagaaacgc	cgaagaaatc	tggcgcgagt	cggtcgcaaa	tcaaaccgcc											3955
tcatgagttt	tccccatgc	gaccgttcac	tgcgcacacg	atacgaaaaa	actagcagca											4015
gaatgcgaat	caaaatgtaa	catgcttagc	tagtctccat	gtcttgtggg	cagtagagaa											4075
ggaagcctgg	attcatacga	ggaatgaaga	ctgaagtcgt	ccgagggatt	tccgtcgtcg											4135
ggccgcacgg	ctggccggat	ccatcaacc	gcccgcgcct	gagtcttgaa	aagcgtgccg											4195
aagctttcta	acattcatct	ccccgaatg	tgtttctggt	agaaatttag	cggttctctg											4255
gccattgaca	cttcacacct	ttgacctgt	ttggtccctt	gtttctcaa	tatttctca											4315
tttcgtttcc	agagtgtca	gcatgaggag	gacagaaagc	atgcagcacc	ggcgcggagg											4375
agtaaatttc	aaggcccaga	agttgatagc	agtttgtttg	aggactccac	ttctccatt											4435
agtcagcctc	tttgcggtt	tacttgtgag	aggcctccta	ccgcagcttc	gcagcctgcc											4495
gctaaatccg	tgccaccata	aaggggcgga	acgggtcaga	tggaactgcc	gtcaacgact											4555

ES 2 388 416 B1

Lista de secuencias patente SRS9_def ST25

cagagggaaa ctggtgcctt cgtcctccgc cgcttaccct accatcactt ccacaaacgt 4615
 ccagaaatga gaaaaacctg taaacgagac gcttggtaca accttccttt cttggtgtca 4675
 ttcaccgtcc atcggcgact agccgcaagc actgtgtagt cttgaggaac acacatttgt 4735
 ggcgggtcgc gcacagtaat tgtaccgcgc gcgggtcatc atcggcatcg tccccctggtg 4795
 cgatatggcg ccagcgaagg ctggtggggg ggagatggtg tgcacccgc tgtgggaggc 4855
 ggctggtgtg tttcgagagg tgggattata gtatgattgt cgattttgcg gatagaagaa 4915
 gcctctaata tgggtggaat tttaacgctc gtcattgttt catgaatatt ttcataatgg 4975
 cggggaggac ggcgagaatg cagcagcggc gtgccggggg tttgaggtcg aaggctcgca 5035
 agttggtcgc ggtgtgcatg ggtggagctt tgttgctttc tagcggtaaa gcagctgcaa 5095
 atcaaccgcg tgaaggtctt ctgcgtcggg gtttgtctag acaaatcagc aatgtagatc 5155
 catcgatcga taatgcagtc gccgcttgca gttttggcgc tgctgcagca gacagggcag 5215
 ctctgcctc tctgacgctg tcagaaacta gtctcaccgc taccttggtg tgtacaggaa 5275
 gcgaaatcac gatgataccc ggaaacctgg aaaaagtttg tgatccaaag caaaccaaag 5335
 aaggtaccga atgccagttc gacagtagcc agtccgacgg caaggcggtc aagctgaaag 5395
 acttgctcgg aacaagccgc gatgttcaat gggaacaggt acaacctgac gcaaaggacc 5455
 tcgccaagcc cgaaatacaa aaaacatgga tgctacagct agaggatgca ggcctacctt 5515
 tgtctgacaa gatcttccta gttggctgta aaaacccgat gaagaatcgg gtttccgggtg 5575
 atgccgaggt gtgcaaggtc acggtgaacg tagcagcaag aacttcttct gttggggaca 5635
 ggaatgtcgt caccgcgta cggcaaaaac agcaaccctg agcccctgaa ggttgagatg 5695
 acaacagaaa acaacaccct cactcttcag tgtggttccg agggatttct ccatccgact 5755
 acatacagaa ctcgctactg cgaccctgag gccccaaact ttcaggagtg caaccagaag 5815
 gattatacag gtattcttcc cggttttgtg gagagctggt gggcaaatgc ggacacggag 5875
 agttccgcta cgctgacaat cccagagact gagtttctct aatcaaacca gcaattccgt 5935
 ttgagttgtg ttccaacac ggcagattct tcgggatctg atgatacagc gaagactagc 5995
 aaggggtggg caaacgacgg ctcacagacg gttgaggcta cgtcgaactg caatgtgatt 6055
 gtgactgtca ggtcaggaag ctctgcatcg tcaactagtc agatggtagc tacagtctct 6115
 ggtgaggccg ctttgatcgg gctcctcgtg gcctcgttgt aatcattgcg atgatgtgcc 6175
 gtctggggcg ctgaatgttt cacagtgtg tctccatttc agcaactgcg cagtgttgta 6235
 gcgaccctgt agattgacaa tcctcaaaga aacttgatta acacgccaat tcagtttttc 6295
 tgccacaaat acttctgccc gtgtctgcca gttttcattt agagtccgaa ggcgacgctg 6355
 ctctgtttgg tggagagtgc gcacagaagg ccgtttttat cggctttttt gcgata 6411

<210> 15
 <211> 396
 <212> PRT
 <213> Neospora caninum

ES 2 388 416 B1

Lista de secuencias patente SRS9_def ST25

<400> 15

Met Ala Arg Arg Gly Ser Met Gln His Arg Arg Gly Gly Leu Lys Ser
 1 5 10 15

Lys Ala Gly Lys Leu Met Val Val Cys Met Gly Gly Val Leu Leu Ile
 20 25 30

Ala Ser Gly Gln Ala Gly Ala Glu Lys Leu Arg Glu Gly Leu Gln His
 35 40 45

Arg Gly Leu Gln Gln Gln Ala Ser Thr Thr Val Thr Pro Thr Ile Asn
 50 55 60

Gly Ala Thr Ala Thr Cys Thr Phe Pro Thr Ala Val Gly Gln Gln Thr
 65 70 75 80

Val Ala Ala Ser Ser Gly Leu Lys Leu Ser Lys Glu Ser Leu Thr Ala
 85 90 95

Val Leu Gln Cys Ser Gly Glu Gln Gly Ala Thr Ile Ser Thr Ile Pro
 100 105 110

Pro Asn Leu Gly Ala Asn Val Cys Val Thr Asn Tyr Asn Gly Lys Glu
 115 120 125

Ser Asp Lys Ser Cys Arg Ile Glu Gly Ser Thr Asp Gly Ala Glu Thr
 130 135 140

Ala Leu Lys Glu Leu Leu Gly Thr Thr Arg Asp Ile Thr Trp Thr Lys
 145 150 155 160

Lys Thr Val Asn Glu Ile Ser Lys Ala Ser Thr Pro Thr Asp Trp Ser
 165 170 175

Leu Glu Leu Leu Asp Ser Asp Leu Pro Leu Ser Glu Lys Ala Phe Phe
 180 185 190

Val Gly Cys Gln Gln Thr Thr Gly Thr Asp Lys Arg Ala Arg Gln Thr
 195 200 205

Lys Ser Cys Thr Val Thr Val Asn Val Asp Ala Arg Asp Ser Ala Val
 210 215 220

Gly Ala Asn Asn Val Val Thr Cys Ala Tyr Gly Lys Asn Ser Asn Pro
 225 230 235 240

Glu Pro Leu Lys Val Val Met Thr Thr Glu Lys Asn Thr Leu Thr Leu
 245 250 255

His Cys Gly Ser Glu Gly Ser Val Asn Pro Ala Ser Tyr Glu Thr Gln

ES 2 388 416 B1

Lista de secuencias patente SRS9_def ST25
 260 265 270

Phe Cys Asp Pro Gln Gly Lys Asp Met Lys Asn Cys Val Arg Lys Asn
 275 280 285

Tyr Val Asp Ile Leu Pro Thr Phe Leu Thr Ser Trp Trp Thr Lys Glu
 290 295 300

His Glu Gly Ser Thr Val Lys Leu Thr Ile Pro Glu Thr Asp Phe Pro
 305 310 315 320

Glu Ser Glu Gln Gln Phe Arg Leu Ser Cys Val Leu Lys Asp Arg Asp
 325 330 335

Ala Thr Asn Pro Glu Ser Glu Lys Val Lys Glu Asp Ser Asp Gly Ala
 340 345 350

Gln Ala Ala Ala Thr Ala Ser Arg Cys Asn Val Val Val Val Lys
 355 360 365

Ser Ala Asn Phe Ala Ser Phe Ala Ser Pro Ala Ala Glu Ile Ala Ala
 370 375 380

Ala Ala Ala Val Thr Gly Leu Phe Ala Ser Ser Leu
 385 390 395

<210> 16
 <211> 347
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Recombinant protein based on NCSRS9 from Neospora caninum

<220>
 <221> BINDING
 <222> (1)..(11)
 <223> Block of amino acids from pET-45b(+) vector including
 six histidines

<220>
 <221> CHAIN
 <222> (12)..(347)
 <223> Protein NCSRS9 fragment from amino acid 40 to 375
 from SEQ ID NO: 15

<400> 16

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

Gly Leu Gln His Arg Gly Leu Gln Gln Ala Ser Thr Thr Val Thr
 20 25 30

Pro Thr Ile Asn Gly Ala Thr Ala Thr Cys Thr Phe Pro Thr Ala Val
 35 40 45

ES 2 388 416 B1

Lista de secuencias patente SRS9_def ST25

Gly Gln Gln Thr Val Ala Ala Ser Ser Gly Leu Lys Leu Ser Lys Glu
50 55 60

Ser Leu Thr Ala Val Leu Gln Cys Ser Gly Glu Gln Gly Ala Thr Ile
65 70 75 80

Ser Thr Ile Pro Pro Asn Leu Gly Ala Asn Val Cys Val Thr Asn Tyr
85 90 95

Asn Gly Lys Lys Val Thr Arg Ala Ala Gly Leu Lys Ala Ala Gln Thr
100 105 110

Ala Gln Lys Pro Arg Ser Lys Asn Ser Trp Gly Gln Pro Ala Ile Ser
115 120 125

Arg Trp Thr Lys Lys Thr Val Asn Glu Ile Ser Lys Ala Ser Thr Pro
130 135 140

Thr Asp Trp Ser Leu Glu Leu Leu Asp Ser Asp Leu Pro Leu Ser Glu
145 150 155 160

Lys Ala Phe Phe Val Gly Cys Gln Gln Thr Thr Gly Thr Asp Lys Arg
165 170 175

Ala Arg Gln Thr Lys Ser Cys Thr Val Thr Val Asn Val Asp Ala Arg
180 185 190

Asp Ser Ala Val Gly Ala Asn Asn Val Val Thr Cys Ala Tyr Gly Lys
195 200 205

Asn Ser Asn Pro Glu Pro Leu Lys Val Val Met Thr Thr Glu Lys Asn
210 215 220

Thr Leu Thr Leu His Cys Gly Ser Glu Gly Ser Val Asn Pro Ala Ser
225 230 235 240

Tyr Glu Thr Gln Phe Cys Asp Pro Gln Gly Lys Asp Met Lys Asn Cys
245 250 255

Val Arg Lys Asn Tyr Val Asp Ile Leu Pro Thr Phe Leu Thr Ser Trp
260 265 270

Trp Thr Lys Glu His Glu Gly Ser Thr Val Lys Leu Thr Ile Pro Glu
275 280 285

Thr Asp Phe Pro Glu Ser Glu Gln Gln Phe Arg Leu Ser Cys Val Leu
290 295 300

Lys Asp Arg Asp Ala Thr Asn Pro Glu Ser Glu Lys Val Lys Glu Asp
305 310 315 320

ES 2 388 416 B1

Lista de secuencias patente SRS9_def ST25

Ser Asp Gly Ala Gln Ala Ala Ala Thr Ala Ser Arg Cys Asn Val Val
325 330 335

Val Val Val Lys Ser Ala Asn Phe Ala Ser Phe
340 345

10



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201001593

②② Fecha de presentación de la solicitud: 20.12.2010

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: **C12N15/30** (2006.01)
A61K39/002 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	Base de datos EMBL, Hinxton, UK; 30.08.2009; [en línea]; RISCO-CASTILLO V <i>et al.</i> "Organization of the SRS9 locus in <i>Neospora caninum</i> "; número de acceso EF440644. Ver todo el documento. y [Recuperado el 26.05.2011] Recuperado de internet: URL: <"http://www.ebi.ac.uk/ena/data/view/EF440644">. Ver todo el documento.	1-15
A	KIM SEON-KYEONG <i>et al.</i> Bradyzoite-specific surface antigen SRS9 plays a role in maintaining <i>Toxoplasma gondii</i> persistence in the brain and in host control of parasite replication in the intestine. <i>Infection and immunity</i> . Abril-2007. Vol. 75, No. 4, Páginas: 1626-1634. ISSN 0019-9567 (Impreso). Ver todo el documento, especialmente resumen y discusión.	1-15
A	WO 2009105355 A2 (US AGRICULTURE <i>et al.</i>) 27.08.2009, resumen; ejemplos; reivindicaciones.	1-15

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
27.09.2012

Examinador
B. Pérez Esteban

Página
1/4

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12N, A61K

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

EPODOC, WPI, MEDLINE, BIOSIS, NPL, EMBASE, XPESP, XPESP2, EBI (UniProt, Euro Patents, Japan Patents, Korea Patents, US Patents, EMBL All), GeneCards.

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 27.09.2012

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 4-7, 10-15	SI
	Reivindicaciones 1-3, 8 y 9	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones	SI
	Reivindicaciones 1-15	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	Base de datos EMBL, Hinxton, UK; 30.08.2009; [en línea]; RISCO-CASTILLO V <i>et al.</i> "; número de acceso EF440644. Y [Recuperado el 26.05.2011] Recuperado de internet: URL: <"http://www.ebi.ac.uk/ena/data/view/EF440644">.	30.08.2009
D02	KIM SEON-KYEONG <i>et al.</i> Infection and immunity. Abril-2007. Vol. 75, No. 4, Páginas: 1626-1634. ISSN 0019-9567 (Impreso).	Abril-2009
D03	WO 2009105355 A2 (US AGRICULTURE <i>et al.</i>)	27.08.2009

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La presente solicitud de patente describe y reivindica varias secuencias de nucleótidos y aminoácidos que corresponden al gen y la proteína SRS9 de *Neospora caninum*. Reivindica también un método para detectar este protozoo parásito mediante la amplificación de estas secuencias polinucleotídicas o la detección inmunológica de las secuencias peptídicas, los vectores y células que las contengan, los anticuerpos específicos frente a los polipéptidos, una composición vacunal que comprenda las secuencias, los vectores o las células, y el kit de vacunación correspondiente.

Se han encontrado en el estado de la técnica las secuencias nucleotídicas y peptídicas que se reivindican en la solicitud, por lo que las reivindicaciones 1 a 3, 8 y 9 no son nuevas según el artículo 6 de la Ley de Patentes. En el documento D01 se divulga una secuencia nucleotídica de *N. caninum* de 15183 pb, que comprende, entre otros, el gen SRS9; en ese mismo documento se especifica la secuencia peptídica de la proteína, que coincide exactamente con la SEQ ID NO 15. Además de afectar la novedad de las reivindicaciones 1 a 3, 8 y 9, el documento D01 anticipa las demás reivindicaciones de la solicitud, pues el método de detección, los vectores, células y anticuerpos, la vacuna y el kit resultan evidentes para el experto en la materia una vez conocida la secuencia del gen y/o de la proteína. Por tanto, las reivindicaciones 1 a 15 de la solicitud no cumplen el requisito de actividad inventiva según el artículo 8 de la Ley de Patentes.

A continuación se citan dos documentos del estado de la técnica que se consideran cercanos a la solicitud, pero que no afectan la novedad ni la actividad inventiva de la misma.

En el documento D02 se generan organismos de *Toxoplasma gondii* (un protozoo parásito cercano a *N. caninum*) con el gen SRS9 deletado, y se estudia el efecto de este gen en la capacidad infectiva del parásito en ratones, observándose que el gen SRS9 interviene en la persistencia del protozoo en cerebro y en la reactivación en intestino, y que juega un papel importante en la respuesta inmune, siendo, por tanto, un gen de elección para creación de vacunas.

En el documento D03 se divulga un método de inmunización frente a infecciones de *N. caninum* muy similar al de la invención, pero que emplea genes del protozoo diferentes a los de la solicitud. En este documento se establece que los genes NcCyP y NcSRS2 (sobre todo el primero de ellos) son buenos candidatos para la generación de vacunas frente a *N. caninum*.