



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 326 770**

② Número de solicitud: 200701978

⑤ Int. Cl.:

C12N 1/10 (2006.01)

A61K 39/002 (2006.01)

A61K 35/68 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

C12R 1/90 (2006.01)

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

⑫ Fecha de presentación: **13.07.2007**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **19.10.2009**

Fecha de la concesión: **13.07.2010**

⑮ Fecha de anuncio de la concesión: **26.07.2010**

⑯ Fecha de publicación del folleto de la patente:
26.07.2010

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

⑱ Inventor/es: **Ortega Mora, Luis Miguel;
Regidor Cerrillo, Javier;
Gómez Bautista, Mercedes;
Aguado Martínez, Adriana;
Collantes Fernández, Esther y
Arduriz, Gorka**

⑲ Agente: **No consta**

⑳ Título: **Uso de un nuevo aislado de *Neospora caninum* para el desarrollo de pruebas de diagnóstico y para la fabricación de productos para el tratamiento y prevención de la infección causada por *Neospora*.**

㉑ Resumen:

Uso de un nuevo aislado de *Neospora caninum* para el desarrollo de pruebas de diagnóstico y para la fabricación de productos para el tratamiento y prevención de la infección causada por *Neospora*.

El uso de un nuevo aislado de *Neospora caninum* (depositado en la Culture Collection of Algae and Protozoa, con número de acceso CCAP 2051/1), y de los extractos obtenidos a partir del mismo, en la elaboración de pruebas de diagnóstico y en la fabricación de productos para el tratamiento y la prevención de la infección causada por *Neospora* se basa en la facilidad con que el nuevo aislado se transforma del estadio de taquizoíto al de bradizoíto en condiciones *in-vitro*. Así mismo y con las mismas aplicaciones, se emplean los polipéptidos y polinucleótidos obtenidos a partir del: nuevo aislado y los anticuerpos inmunoreactivos desarrollados frente a antígenos del mismo.

ES 2 326 770 B1

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

DESCRIPCIÓN

Uso de un nuevo aislado de *Neospora caninum* para el desarrollo de pruebas de diagnóstico y para la fabricación de productos para el tratamiento y prevención de la infección causada por *Neospora*.

Campo de la técnica. Objeto de la invención

La presente invención se encuadra en el campo de la sanidad animal y se refiere, según se expresa en el enunciado de esta memoria descriptiva, al desarrollo de pruebas de diagnóstico para la detección de *Neospora caninum* en animales y a la fabricación de composiciones farmacéuticas para la prevención y el tratamiento de la neosporosis en los mismos.

De forma más concreta, la invención se refiere al uso del aislado Nc-Spain 7 de *N. caninum* que presenta como característica relevante la facilidad de conversión entre los estadios de taquizoíto y bradizoíto en condiciones *in vitro*, y por ello es un candidato apropiado para la fabricación de nuevos productos vacunales y terapéuticos frente a la neosporosis, y para el desarrollo de nuevos métodos de diagnóstico para detectar la infección causada por el parásito *Neospora caninum* en animales a partir de muestras biológicas.

Estado anterior de la técnica

Neospora caninum es un parásito perteneciente al phylum Apicomplexa dentro del cual se agrupan los géneros *Plasmodium*, *Babesia*, *Cryptosporidium*, *Eimeria* y *Toxoplasma*, que incluyen algunos de los organismos causantes de enfermedad más importantes conocidos por el hombre. *N. caninum* fue descrito por primera vez en 1984 como un protozoo capaz de producir encefalitis y miositis en perros y, poco después, fue reconocido como un agente productor de aborto y mortalidad neonatal en el ganado bovino. Durante los últimos años, también se han descrito infecciones producidas por el parásito en otros hospedadores que incluyen varios ungulados y cánidos, sin embargo destaca la importancia de la neosporosis en el ganado bovino y en el perro, que actúa como hospedador definitivo en el ciclo biológico, (Dubey *et al.*, 2006, J. Comp. Path. 134: 267-289).

Hasta la fecha se han descrito tres estadios en el ciclo biológico de *N. caninum*. Los esporozoítos, que se desarrollan en los oocistos eliminados en las heces del hospedador definitivo y son capaces de infectar al hospedador intermediario. Los taquizoítos, la forma de multiplicación rápida, responsables de la fase aguda de la infección y su propagación a otros tejidos. Y los bradizoítos, el estadio de multiplicación lenta del parásito dando lugar a quistes tisulares donde el parásito permanece acantonado durante la fase crónica de la infección hasta su reactivación.

La neosporosis bovina está considerada como una enfermedad parasitaria de distribución cosmopolita y una de las causas más frecuentes de fallo reproductivo en el ganado bovino en los diversos países productores donde se ha estudiado, incluida España (Pereira-Bueno *et al.*, 2003, Vet Parasitol 111: 143-152). La manifestación clínica más importante de la infección es el aborto que tiene lugar generalmente entre el quinto y séptimo mes de gestación. Además, pueden nacer terneros infectados vivos que pueden presentar problemas neuro-musculares hasta los dos meses post-parto. Sin embargo, lo más frecuente es el nacimiento de terneros clínicamente sanos, pero crónicamente infectados. En relación con la transmisión de la enfermedad, la vía fundamental es la infección transplacentaria endógena, aunque se ha demostrado la implicación de la transmisión horizontal (Trees & Willians, 2005, Trends Parasitol. 21(12): 558-561, Dubey *et al.*, 2006, J. Comp. Path. 134: 267-289).

Los métodos de diagnóstico utilizados para detectar la infección por *N. caninum*, generalmente en bovinos adultos, están constituidos principalmente por técnicas basadas en la detección de anticuerpos séricos específicos frente al parásito. Para ello, se han diseñado diferentes inmunoensayos que engloban la inmunofluorescencia indirecta (IFI), varios ensayos inmunoenzimáticos (ELISA) e inmunoblot (IB) (Ortega-Mora *et al.*, 2006, Acta Parasitologica 51: 1-14). Los antígenos utilizados en estas pruebas serológicas proceden de taquizoítos obtenidos en cultivos celulares de aislados bovinos y caninos de *N. caninum*. Taquizoítos enteros, extractos celulares obtenidos a partir de los mismos, proteínas antigénicas purificadas por afinidad a partir de estos extractos celulares o proteínas recombinantes, como se describe en la solicitud de patente WO97/39009, han sido utilizados como antígenos en el desarrollo de estas técnicas. Sin embargo, debemos puntualizar que, aunque un resultado serológico positivo ayuda a identificar un animal adulto infectado, un resultado negativo no descarta definitivamente la infección. Diferentes estudios han demostrado que los anticuerpos séricos frente a *N. caninum* pueden fluctuar en función de la edad y el estado de gestación, y seroconvertir a títulos que normalmente son considerados negativos (Pereira-Bueno *et al.*, 2000, in: Hemphill A & Gottstein B (Eds), Int J Parasitol 30: 906-909; Quintanilla-Gozalo *et al.*, 2000, in: Hemphill A, Gottstein B (Eds), Int J Parasitol 30: 900-906; Maley *et al.*, 2001, Vet Parasitol. 5; 96 (1): 1-9). Los niveles bajos de anticuerpos frente a *N. caninum* se han asociado principalmente a infecciones crónicas, donde existe un predominio del estadio de bradizoíto. Así, se ha sugerido que una prueba serológica utilizando antígenos derivados de bradizoítos podría ser más adecuada para la identificación de animales persistentemente infectados (Maley *et al.*, 2001, Vet Parasitol. 5; 96(1):1-9).

Por otra parte, los estudios llevados a cabo para el desarrollo de vacunas para la protección frente a la neosporosis han incluido la evaluación de vacunas inactivadas, vacunas atenuadas, vacunas desarrolladas a partir de proteínas antigénicas recombinantes y vacunas de ADN con resultados variables. Uno de los pocos estudios realizados con bovinos demostró que la vacuna desarrollada a partir de taquizoítos muertos emulsionados con el adyuvante POLYGEN™,

descrita en la solicitud de patente WO99/20303, era capaz de originar una ligera respuesta inmune celular (Andrianarivo *et al.*, 1999, Int. J. Parasitol. 29, 1613-1625), aunque en reproductoras gestantes fue incapaz de proteger frente a la infección fetal (Andrianarivo *et al.*, 2000, Int J Parasitol. 30(9): 985-90). Actualmente, es la única vacuna frente a *N. caninum* comercializada y registrada en los Estados Unidos denominada NeoGuard™ cuya eficacia ha sido recientemente evaluada en el campo (Romero *et al.*, 2004, Vet Parasitol. 123(3-4): 149-59).

Debemos destacar que todas las vacunas vivas atenuadas, como se describe en las patentes EP0841392 y WO2004/026903, e inactivadas, como las descritas en las patentes EP0898969 y WO99/20303, han sido elaboradas a partir de taquizoítos mantenidos en cultivo celular o a partir de proteínas antigénicas recombinantes que son expresadas en este estadio del ciclo biológico, como se recoge en la solicitud de patente EP0953641, y no a partir del estadio de bradizoíto, predominante en las infecciones crónicas.

Actualmente, en *N. caninum* no se conocen en detalle los procesos implicados en la conversión taquizoíto-bradizoíto. Durante los últimos años, en un único estudio se ha procedido a su obtención a partir de quistes tisulares purificados de animales infectados experimentalmente (McGuire *et al.*, 1997, J. Parasitol. 83: 647-651), aunque el elevado número de bradizoítos necesarios para los diferentes estudios ha planteado el desarrollo de nuevos métodos para su obtención *in vitro*. Estos métodos se han basado principalmente en la utilización de compuestos químicos como el nitroprusiato sódico como agente inductor de la transformación en diferentes líneas celulares (Vonlaufen *et al.*, 2002, Int. J. Parasitol. 32: 1253-1265; Risco-Castillo *et al.*, 2004, J. Parasitol. 90(3): 466-70). Y cabe resaltar que en los estudios realizados con diferentes aislados (Nc-Liverpool, Nc-1, Nc-2 y Nc-SweB1) también se observaron diferencias significativas en el porcentaje de transformación entre ambos estadios en función del aislado utilizado (Weiss *et al.*, 1999, Int. J. Parasitol. 29: 1713-1723; Vonlaufen, 2002, Int. J. Parasitol. 32: 1253-1265). Estas diferencias podrían ser atribuibles a la diversidad biológica que existe entre diferentes aislados de *N. caninum*.

Los estudios comparativos de las propiedades biológicas de distintos aislados de *N. caninum* han demostrado la existencia de variabilidad biológica, que incluye diferencias tanto en su patogenicidad como en sus perfiles genéticos (Atkinson *et al.*, 1999, Parasitology 118 (Pt 4): 363-370; Schock *et al.*, 2001, Parasitology 123(Pt 1): 13-23, Regidor-Cerrillo *et al.*, 2006, J. Parasitol. 92(3): 517-524). De hecho, en la solicitud de patente WO02/103430 se describen vacunas vivas obtenidas a partir de un aislado que presenta baja patogenicidad de forma natural en un modelo murino experimental.

Descripción detallada de la invención

Los inventores han obtenido y caracterizado un nuevo aislado de *Neospora caninum* con una alta capacidad de transformación *in vitro* entre los estadios de taquizoíto y bradizoíto de su ciclo biológico y con aplicabilidad en el desarrollo de pruebas de diagnóstico y productos para el tratamiento y prevención de la infección causada por este parásito.

El nuevo aislado se ha denominado Nc-Spain 7 cumpliendo la normativa internacional de nomenclatura de microorganismos, y se ha identificado y caracterizado mediante diferentes estudios *in vitro* e infecciones experimentales *in vivo* como un nuevo aislado de la especie *Neospora caninum*. Una muestra del cultivo de taquizoítos del aislado Nc-Spain 7 se ha depositado el día 20.09.2005, de acuerdo con las provisiones del Tratado de Budapest sobre reconocimiento internacional del depósito de microorganismos a fines del procedimiento en materia de patentes, en la Colección de Cultivos de Algas y Protozoos (Culture Collection of Algae and Protozoa, CCAP) situada en el Dunstaffnage Marine Laboratory, Dunbeg, OBAN, Argyll PA37 1 QA, Escocia, Gran Bretaña, que le ha otorgado el número de acceso CCAP 2051/1.

En esta descripción, cuando se habla del parásito aislado o simplemente aislado de la invención se refiere al nuevo aislado de *Neospora caninum*, Nc-Spain 7, obtenido en cualquier estadio de su ciclo biológico. Del mismo modo, cuando se habla de extractos, lisados celulares, polipéptidos y polinucleótidos obtenidos del aislado de la invención se refiere a extractos, lisados celulares, polipéptidos y polinucleótidos obtenidos del aislado de la invención en cualquier estadio de su ciclo biológico.

Dicho aislado fue obtenido a partir del tejido nervioso de un ternero congénitamente infectado de la especie *Bos taurus* de la raza Frisona-Holstein tal como se describe en el Ejemplo 1.

Para ello, antes de proceder al aislamiento, se confirmó la presencia del parásito en muestras de tejido nervioso procedentes del ternero infectado mediante una PCR anidada desarrollada para la detección específica del ADN del parásito en muestras clínicas. La amplificación específica de la región ITS-1 permitió detectar la presencia de ADN de este parásito en dichas muestras. Además, el análisis histológico e inmunohistoquímico del mismo tejido nervioso corroboró una vez más la presencia del parásito en este tejido, con la observación de lesiones compatibles con la infección por *N. caninum*, así como la detección de quistes mediante la utilización de un anticuerpo policlonal de conejo obtenido frente a taquizoítos de *N. caninum*. Inmediatamente después, se procedió a su aislamiento utilizando como primer paso ratones atímicos de la estirpe BALB/c sensibles a la infección que fueron inoculados con diferentes cantidades del tejido nervioso. La aparición de signos clínicos compatibles con la neosporosis permitió, en un segundo paso, su aislamiento *in vitro* en cultivos celulares de la línea celular MARC-145 (células de riñón de mono verde africano (*Ceropithecus aethiops*)).

ES 2 326 770 B1

Su caracterización genética se realizó mediante el estudio de secuencias microsátélites, que resulta ser una técnica adecuada para la identificación y discriminación de diferentes aislados de *N. caninum*, como se describe en el Ejemplo 2 de esta memoria. En cuanto a su caracterización patogénica se llevó a cabo en un modelo murino experimental, tal como se describe en el Ejemplo 3 de esta solicitud de patente. En dicho modelo algunos de los ratones inoculados con taquizoítos del aislado Nc-Spain7 desarrollaron signos clínicos compatibles con la infección por *N. caninum* y se detectó la presencia de ADN del parásito en sangre, pulmón y encéfalo mediante la PCR anidada de la región ITS-1 anteriormente mencionada. Por otro lado, en los ensayos de inmunogenicidad, descritos en el Ejemplo 4, mediante una técnica de ELISA para la detección de las inmunoglobulinas IgG2a e IgG1 específicas frente a *Neospora*, se comprobó la capacidad del aislado Nc-Spain 7 de inducir una respuesta inmune específica frente a *N. caninum* en los ratones infectados según el modelo murino experimental.

También se valoró la capacidad de transformación del aislado Nc-Spain7 entre los estadios de taquizoíto y bradizoíto *in vitro*, mediante un estudio en cultivos celulares de la línea MARC-145 y utilizando nitroprusiato sódico como agente estresante. La transformación entre ambos estadios se evaluó mediante la detección de vacuolas parasitóforas por la técnica de inmunofluorescencia indirecta con parásitos que expresan la proteína BAG1, expresada únicamente en el estadio de bradizoíto, frente a las vacuolas parasitóforas con parásitos que expresan la proteína NcSAG1, específica del estadio de taquizoíto tal y como se describe en el Ejemplo 5.

Los resultados obtenidos demostraron consecuentemente que el aislado Nc-Spain 7 pertenece a la especie *N. caninum* y posee una elevada capacidad de transformación del estadio de taquizoíto a bradizoíto *in vitro*, lo que lo hace de gran utilidad para el desarrollo de nuevas pruebas de diagnóstico, así como para el desarrollo de nuevas composiciones farmacéuticas para el tratamiento y prevención de la infección por *Neospora*, como se describe en los Ejemplos 7 y 8.

25 *Cultivos celulares*

Otro aspecto de la invención se refiere a cultivos celulares biológicamente puros infectados por el aislado Nc-Spain 7 de la invención que se mantiene *in vitro* mediante pases sucesivos en cultivos de diferentes líneas celulares. Mediante estos cultivos celulares se obtienen taquizoítos y bradizoítos del aislado de la invención que se emplean en la obtención de polipéptidos, antígenos, anticuerpos, ácidos nucleicos y otros compuestos de utilidad en la elaboración de productos para el diagnóstico, el tratamiento y la prevención de la neosporosis.

La expresión “cultivo celular biológicamente puro” del aislado de la invención se refiere a un cultivo del aislado Nc-Spain 7 mantenido de forma continua sustancialmente libre de otros organismos, salvo las células hospedadoras donde el parásito se multiplica. Se considera que un cultivo es sustancialmente libre de otros organismos si tras los procedimientos de recuperación normalizados del aislado dan como resultado una preparación con al menos el 95% y, preferiblemente, el 99% ó más del parásito.

El cultivo celular de preferencia es de células de riñón de mono verde entre las que se pueden mencionar las líneas MA-104, MARC-145, y las células Vero.

Anticuerpos

La invención también comprende los anticuerpos que reaccionan específicamente frente a los antígenos procedentes del aislado de la invención.

El termino “anticuerpo” se refiere a una molécula de inmunoglobulina producida por un organismo animal capaz de unirse a un epítipo específico de un antígeno. Los anticuerpos pueden estar constituidos por una mezcla policlonal o ser anticuerpos monoclonales. También pueden estar constituidos por inmunoglobulinas intactas de origen natural o de naturaleza recombinante o fragmentos de estos anticuerpos que retienen su capacidad de reconocimiento y unión del epítipo diana y que incluyen el fragmento Fc y los fragmentos de unión al antígeno, F(ab) y F(ab)₂, así como cadenas simples (cadena pesada (H) y ligera (L)) fusionadas o no a otras moléculas.

Preferiblemente el antígeno procedente del aislado Nc-Spain 7, frente al cual el anticuerpo reacciona específicamente, se selecciona entre el grupo formado por el propio aislado en cualquiera de sus estadios del ciclo biológico, extractos o lisados celulares, polipéptidos antigénicos, o sus mezclas.

Más preferiblemente el antígeno se selecciona entre el grupo formado por taquizoítos y/o bradizoítos, y polipéptidos antigénicos. Los polipéptidos antigénicos son los obtenidos a partir del propio aislado o bien mediante tecnología recombinante a partir de polinucleótidos del aislado de la invención.

Para la obtención de anticuerpos policlonales, distintas especies animales previamente seleccionadas (ratón, conejo, cabra o caballo, entre otros) son inmunizadas con un inmunógeno constituido por el propio aislado de la invención inactivado en cualquiera de los estadios de su ciclo biológico, o una o varias proteínas de origen natural y/o recombinante, purificadas o no, en formulación o no con un adyuvante. Posteriormente, se recoge el suero del animal inmunizado y existe la opción de tratarlo con el fin de producir un enriquecimiento de los anticuerpos inmunoreactivos de interés de acuerdo con diferentes procedimientos convencionales.

ES 2 326 770 B1

En cuanto a los anticuerpos monoclonales se definen como los anticuerpos producidos por una población clonal de células originada a partir de una única célula inmortalizada y, por tanto, son idénticos y capaces de reconocer específicamente un único epítipo.

5 Los anticuerpos monoclonales y policlonales desarrollados frente a determinados epítopos son particularmente útiles para el diagnóstico de la enfermedad, y aquellos que presentan una actividad neutralizante frente al parásito son de gran utilidad en inmunoterapias pasivas. Sus aplicaciones incluyen pruebas de diagnóstico mediante inmunoensayo como por ejemplo aglutinación o ELISA de competición, pruebas inmunohistoquímicas, y otras aplicaciones como evaluación *in vitro* de la capacidad de adhesión/invasión del parásito, la detección y selección previa de antígenos para
10 el desarrollo de nuevas vacunas, purificación de proteínas de interés, y el rastreo de genotecas genómicas y de ADN complementario para la identificación de genes de interés.

Los anticuerpos de la presente invención se unen específicamente al propio aislado de la invención en cualquiera de sus estadios del ciclo biológico, extractos y/o lisados celulares, polipéptidos antigénicos, o sus mezclas, y son
15 apropiados para detectar la presencia del parásito *N. caninum* o de la infección causada por el mismo en animales a partir de muestras biológicas.

Preferiblemente el anticuerpo de la invención es monoclonal.

20 *Polipéptidos*

También forman parte de la invención polipéptidos obtenidos a partir del parásito aislado. En esta descripción, el término “polipéptido” incluye los polipéptidos obtenidos a partir del aislado de la invención en cualquier estadio de su ciclo biológico, a partir de extractos y/o lisados celulares, o sus mezclas. Dentro de los mismos también se
25 incluyen los polipéptidos recombinantes producidos en sistemas de expresión heterólogos tras la transcripción y traducción de secuencias nucleotídicas obtenidas a partir del aislado de la invención en cualquier estadio de su ciclo biológico.

Las secuencias polipeptídicas de la invención incluyen no solamente las secuencias “idénticas”, sino también aquellas “sustancialmente idénticas” a las mismas. Los polipéptidos pueden variar mediante la realización de deleciones, inserciones y sustituciones en su secuencia aminoacídica, dando lugar a polipéptidos distintos pero sustancialmente idénticos. El término “idéntico o porcentaje de identidad” de secuencias para dos o más polinucleótidos y polipéptidos se refiere a dos o más secuencias que son la misma o presentan un porcentaje concreto de residuos nucleotídicos o aminoacídicos que son iguales, respectivamente, cuando estas son alineadas para la máxima correspondencia, comparadas y este porcentaje se calcula mediante el uso de algoritmos utilizados en su comparación o por inspección visual.
30 El término “sustancialmente idénticas” se refiere a secuencias polinucleotídicas o polipeptídicas que tienen al menos un 60%, preferiblemente un 80% y mucho más preferible un 90-95% de identidad en los residuos aminoacídicos o nucleotídicos, cuando son comparadas, alineadas para la máxima correspondencia y su porcentaje de identidad calculado por los métodos ya mencionados. El programa BLAST es un ejemplo de los programas utilizados para calcular el porcentaje de identidad y similitud entre secuencias (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>).
35

Los polipéptidos de la invención presentan interés diagnóstico o inmunogénico. En el primer caso, formando parte de pruebas de inmunoensayo como antígeno para la detección de anticuerpos específicos frente a *N. caninum*, y en el segundo caso, formando parte de composiciones farmacéuticas para la prevención y el tratamiento de las infecciones
40 causadas por *Neospora* y/o la obtención de anticuerpos.

Una opción para el aislamiento de polipéptidos antigénicos del nuevo aislado Nc-Spain 7 comprende la utilización de técnicas normalizadas de purificación de proteínas o polipéptidos.

50 Un procedimiento alternativo se basa en utilizar los polinucleótidos obtenidos del aislado de la invención para la expresión de proteínas recombinantes mediante la introducción de los polinucleótidos que codifican las proteínas de interés en sistemas heterólogos de expresión adecuados para su producción, procediendo posteriormente a un proceso de purificación. Estos sistemas incluyen células procariotas (por ejemplo *Escherichia coli*), levaduras (por ejemplo *Sacharomyces cerevisiae*, *Schizosacharomyces pombe*, *Pichia pastoris*), líneas celulares de mamíferos (por ejemplo CHO, HEK, COS) o de insecto (por ejemplo Sf9, Sf21).
55

Existe la opción de modificar las secuencias polinucleotídicas utilizadas en la expresión heteróloga de polipéptidos para dar lugar a polipéptidos modificados mediante deleciones, inserciones y/o sustituciones en su secuencia aminoacídica aunque siguen manteniendo su capacidad inmunogénica con el fin de obtener variaciones para facilitar su expresión y/o purificación, o para aumentar su semivida plasmática, aumentando su eficacia terapéutica, y disminuyendo el grado y/o la aparición de efectos colaterales, si su uso es terapéutico.
60

La introducción del material genético en la célula hospedadora o sistema de expresión del polipéptido se realiza, por ejemplo, por transfección con sales de calcio, esferoplastos, electroporación, liposomas o vectores virales. En cuanto al vector para la inclusión del material genético dentro de la célula, existe la posibilidad de utilizar cualquiera de los vectores de expresión convencionales desarrollados para la expresión de proteínas en células procariotas y eucariotas.
65

ES 2 326 770 B1

Los polipéptidos recombinantes obtenidos, una vez purificados, se emplean en la obtención de anticuerpos, para el desarrollo de pruebas de diagnóstico y para la elaboración de composiciones farmacéuticas inmunogénicas.

Polinucleótidos

5

En otro aspecto, la invención también comprende polinucleótidos obtenidos a partir del parásito aislado de la invención. En esta descripción el término “ácido nucleico o polinucleótido” hace referencia a moléculas de los ácidos nucleicos ADN o ARN obtenidas a partir del aislado de la invención en cualquier estadio de su ciclo biológico.

10

Igualmente, los polinucleótidos de la invención incluyen las secuencias “idénticas” y también las secuencias “sustancialmente idénticas” a las mismas. De hecho, un número variable de secuencias polinucleotídicas que son transcritas y traducidas pueden producir idénticos polipéptidos funcionales debido a la degeneración del código genético. Como hemos comentado en el apartado anterior, las secuencias polinucleotídicas son “sustancialmente idénticas” cuando tienen al menos un 60%, preferiblemente un 80% y mucho más preferible entre un 90-95% de identidad en los residuos nucleotídicos, cuando son comparadas, alineadas para la máxima correspondencia y su porcentaje de identidad calculado por los métodos ya mencionados. También dos secuencias polinucleotídicas son sustancialmente idénticas si dos moléculas hibridan la una con la otra en condiciones de alta especificidad. Estas condiciones dependen de la secuencia y serán diferentes en función de las condiciones ensayadas. Generalmente, las condiciones seleccionadas son la temperatura, que suele ser hasta 5°C más baja que la temperatura de disociación o T_m para una secuencia específica en una solución salina a un pH determinado. La T_m es la temperatura a la cual el 50% de la secuencia se deshibrida de la secuencia complementaria.

15

20

Una de las aplicaciones de estas moléculas polinucleotídicas comprende la expresión heteróloga de proteínas de *Neospora* de interés diagnóstico o inmunogénico, como se ha descrito anteriormente, para la elaboración de vacunas de ADN o como sondas en diferentes pruebas de diagnóstico de la infección en animales a partir de una muestra biológica.

25

Los polinucleótidos de interés en el desarrollo de pruebas de diagnóstico y para la expresión de proteínas recombinantes se obtienen mediante técnicas conocidas en la materia y, preferentemente, mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa o PCR a partir de ARN mensajero, ADN genómico o genotecas. Una opción para la identificación del polinucleótido requerido para la expresión heteróloga de una proteína en concreto se basa en la traducción inversa y en el diseño de oligonucleótidos degenerados a partir de la secuencia de la proteína de interés o de las regiones conservadas de proteínas homólogas de especies filogenéticamente relacionadas. Una vez identificado, a partir de su secuencia se procede al diseño de nuevos oligonucleótidos que se utilizarán para la amplificación y clonación del polinucleótido de interés para su posterior expresión heteróloga, el diagnóstico de la enfermedad mediante la amplificación de ADN específico de *Neospora* a partir del ADN obtenido de una muestra biológica, o para la obtención de sondas nucleotídicas que permiten detectar la presencia de ARN mensajero o ADN del parásito en muestras clínicas, o para cualquier otro método de detección basado en los ácidos nucleicos del parásito.

30

35

40

Uso del aislado de la invención en composiciones inmunogénicas

La invención también incluye el uso del nuevo aislado para preparar una vacuna para el tratamiento y/o prevención de la infección causada por *N. caninum* en animales.

45

Estas preparaciones se formulan a partir del aislado de la invención en cualquiera de los estadios de su ciclo biológico, preferiblemente a partir del parásito vivo atenuado, inactivado y/o fijado, o bien están constituidas por un extracto o lisado celular del mismo.

50

Como ya se ha descrito, otro aspecto de la invención se refiere a la utilización de proteínas antigénicas, recombinantes o no, parcial o totalmente purificadas, para la elaboración de productos vacunales. Entre las vacunas que incluye la invención también se encuentran las vacunas recombinantes como las de ADN mediante la clonación del gen codificante del inmunógeno en vectores plasmídicos que se transfectan a las células hospedadoras en los animales. Los virus, como por ejemplo el virus de la vacuna (*vaccinia*) o algunos adenovirus como vectores, son otras alternativas para la generación de vacunas recombinantes.

55

Las vacunas constituidas por los diferentes inmunógenos descritos se preparan preferentemente como inyectables en formulaciones líquidas, como soluciones, suspensiones o emulsiones donde el inmunógeno está o no encapsulado en liposomas o cualquier otro sistema apropiado, o en forma sólida para su posterior reconstitución previamente a su administración. Pero también pueden presentarse como formulaciones orales (por ejemplo cápsulas y comprimidos).

60

En su formulación el inmunógeno puede ir combinado con excipientes de uso farmacéutico, agentes humectantes o emulsionantes, reguladores del pH, conservantes y/o adyuvantes que aumentan la efectividad de la vacuna, además de citoquinas y/u otros inmunomoduladores.

65

Las vacunas de la presente invención pueden ser administradas de forma preventiva a animales sensibles a la infección con el fin de inducir una respuesta inmune eficaz frente al parásito. También se puede administrar la vacuna para el tratamiento de la enfermedad una vez han aparecido los primeros signos clínicos.

ES 2 326 770 B1

También forma parte de la presente invención el uso de anticuerpos que reaccionan específicamente contra un antígeno procedente del aislado de la invención, y en inmunoterapias pasivas preferiblemente aquellos que presentan una actividad neutralizante frente al parásito, para la preparación de un producto farmacéutico para el tratamiento de la infección y/o enfermedad causada por *N. caninum* en los animales.

5

Uso del aislado de la invención en técnicas de diagnóstico

En esta descripción el término “muestra biológica o muestra clínica” se refiere a cualquier muestra obtenida de organismos vivos o muertos. Ejemplos de muestras biológicas son los fluidos biológicos (sangre, suero, plasma, leche, orina, semen, líquido ascítico, líquido cerebrospinal y fluidos fetales), las muestras de tejidos (originarios de encéfalo, médula espinal, pulmón, corazón, hígado y placenta, entre otros) y los cultivos celulares.

Como objeto de la invención se incluye el uso de antígenos procedentes del aislado de la invención para detectar la infección por el parásito *N. caninum* en animales a partir de una muestra biológica.

Preferiblemente el antígeno estará constituido por el propio aislado en cualquiera de sus estadios del ciclo biológico, extractos o lisados celulares obtenidos a partir del mismo, polipéptidos antigénicos obtenidos a partir del aislado de la invención o producidos mediante técnicas de ADN recombinante a partir de polinucleótidos obtenidos del aislado de la invención, parcial o totalmente purificados, o sus mezclas.

Más preferiblemente el antígeno empleado estará constituido por taquizoítos y/o bradizoítos, y polipéptidos anti-génicos.

También forma parte de esta invención el uso de anticuerpos que reaccionan específicamente contra un antígeno procedente del aislado de la invención para detectar la infección por el parásito *N. caninum* en animales a partir de una muestra biológica. Si bien los anticuerpos pueden ser anticuerpos monoclonales o estar constituidos por una mezcla policlonal, una realización preferida de esta invención emplea anticuerpos monoclonales.

El diagnóstico de la infección por el parásito *Neospora* en animales a partir de una muestra biológica se puede llevar a cabo mediante diferentes técnicas de inmunoensayo que permiten la detección de anticuerpos específicos frente a *N. caninum* generados durante la respuesta inmune desarrollada en el animal infectado como son las técnicas inmunoenzimáticas (como la técnica ELISA), de inmunofluorescencia (como la técnica de IFI), de inmunoblot (IB) y de aglutinación (DAT) o cualquier otro método basado en la detección de los anticuerpos citados.

35

Con fines diagnósticos la detección del parásito en una muestra biológica también puede llevarse a cabo mediante técnicas inmunológicas utilizando anticuerpos específicos frente al parásito (como la técnica de inmunohistoquímica (IHQ)).

Esta invención también incluye la detección de los ácidos nucleicos del parásito con fines diagnósticos mediante el uso de diferentes técnicas de biología molecular, basadas en técnicas de hibridación específica, destacando la aplicación de la PCR, la hibridación *in situ* y la PCR *in situ*. En esta descripción la expresión “hibridación específica” se refiere a la hibridación específica entre la secuencia que actúa como sonda con la secuencia diana. Aunque la sonda podría unirse a otras secuencias no relacionadas, al menos el 90% y preferiblemente el 95% o más de los complejos de hibridación formados serán con la secuencia diana.

45

Además, a partir de una muestra biológica, es posible realizar el aislamiento del parásito en sistemas *in vivo* e *in vitro*, y su posterior identificación mediante cualquiera de las técnicas ya mencionadas.

50

Usos del aislado de la invención modificado genéticamente

La invención también incluye el uso del nuevo aislado modificado genéticamente y de los extractos obtenidos a partir del mismo para la elaboración de pruebas de diagnóstico y la fabricación de productos para el tratamiento y la prevención de la infección causada por *Neospora*. Así mismo y con los mismos usos se incluyen los polipéptidos y polinucleótidos obtenidos a partir del aislado modificado genéticamente y los anticuerpos inmunoreactivos desarrollados frente a antígenos del mismo.

55

El aislado de la invención puede ser manipulado genéticamente mediante la inserción y/o delección de secuencias polinucleotídicas homólogas o heterólogas en su genoma, o mediante mutagénesis dirigida por la sustitución de nucleótidos en la secuencia del genoma del mismo. Existe la opción de modificar las secuencias polinucleotídicas homólogas o heterólogas seleccionadas para su inserción en el genoma del aislado mediante delecciones, inserciones y/o sustituciones en su secuencia nucleotídica con la finalidad de lograr y facilitar su expresión en los diferentes estadios del ciclo biológico del parásito. La introducción del material genético se realiza mediante procedimientos bien conocidos en la materia como la electroporación o la transformación con sales de calcio. También el aislado puede ser modificado genéticamente por procedimientos alternativos que incluyen la mutagénesis al azar utilizando agentes químicos como el metil-sulfonato de etilo (EMS) o sulfonato de dietilo (DES) y agentes físicos como las radiaciones ionizantes y/o ultravioleta.

65

Los aislados de la invención modificados genéticamente presentan principalmente un interés diagnóstico e inmuno-profiláctico. En el primer caso, formando parte de pruebas de inmunoensayo incorporando la expresión de nuevas proteínas antigénicas que permitan aumentar la sensibilidad y especificidad del ensayo para la detección de anticuerpos específicos frente a *N. caninum* (por ejemplo, expresión de proteínas específicas de bradizoíto durante el estadio de taquizoíto usado como antígeno), y en el segundo caso, formando parte de vacunas para la prevención y el tratamiento de las infecciones causadas por *Neospora* mediante la generación de aislados que expresen nuevas proteínas antigénicas de interés inmuno-profiláctico (específicas de los estadios de bradizoíto y/o esporozoíto), mediante la generación de aislados atenuados por la modificación genética de genes implicados directamente en la virulencia de *Neospora* o la inserción de secuencias polinucleotídicas como “marcadores” si el aislado forma parte de una vacuna viva.

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 la presente memoria descriptiva, como parte integrante de la misma, de un juego de figuras en donde, con carácter ilustrativo y no limitativo, se ha representado lo siguiente:

Figura 1: Se muestra la carga parasitaria presente en el pulmón (panel A) y encéfalo (panel B) en el modelo de infección experimental murino desarrollado con el aislado Nc-Spain 7 en el ejemplo 3 de esta memoria.

Figura 2: Se presenta la valoración de la respuesta inmune humoral en el modelo de infección experimental murino desarrollado con el aislado Nc-Spain 7, según se explica en el ejemplo 4 de esta memoria.

Figura 3: Se muestra el porcentaje de transformación *in vitro* al estadio de bradizoíto a partir de taquizoítos del aislado Nc-Spain 7.

Figura 4: Se presenta la valoración de la respuesta inmune humoral desarrollada por los diferentes grupos de animales de la prueba vacunal desarrollada con el aislado Nc-Spain 7.

Figura 5: Se muestra el análisis por inmunoblot con el extracto proteico completo de los aislados de *N. caninum* Nc-Spain7 (Panel A) y Nc-1 (Panel B) en condiciones reductoras con una mezcla a partes iguales de los plasmas obtenidos a partir de ratones infectados experimentalmente.

Figura 6: Se muestra el análisis por inmunoblot con el extracto proteico completo de los aislados de *N. caninum* Nc-Spain7 (Panel A) y Nc-1 (Panel B) en condiciones reductoras con sueros obtenidos a partir de bovinos.

Modo de realización de la invención

Los ejemplos que siguen a continuación se exponen a efectos de proporcionar al experto en la materia una explicación suficientemente clara y completa de la presente invención, pero no deben ser considerados como limitaciones a los aspectos esenciales del objeto de la misma, tal y como han sido expuestos en los apartados anteriores de esta memoria.

Ejemplo 1

Obtención de un nuevo aislado de N. caninum a partir de un ternero congénitamente infectado

En este ejemplo se describe la obtención del aislado de *N. caninum* denominado Nc-Spain 7 a partir de un ternero congénitamente infectado de la raza Frisona-Holstein.

El ternero nació de una vaca con serología positiva en las pruebas de detección para anticuerpos específicos frente a *N. caninum* mantenida en una explotación de producción láctea localizada en la provincia de Navarra, España. El suero precalostrado del ternero fue analizado para la detección de anticuerpos específicos frente a *Neospora* por la técnica de IFI, dando como resultado un título de 1:800. Dos meses después de su nacimiento permanecía saludable y sin mostrar ningún signo clínico atribuible a la infección por *Neospora*. En esta fecha, fue sacrificado mediante una inyección de 30 ml de T-61 (Embutramida y Mebezonio yoduro, Intervet) por vía endovenosa e inmediatamente después, el encéfalo y la porción superior de la médula espinal fueron extraídos en condiciones asépticas y mantenidos a 4°C.

Tras la necropsia, diferentes porciones de 5 a 15 gramos de peso de ambos hemisferios y de la región anterior, media y posterior del cerebro, así como del cerebelo, tronco del encéfalo y la médula espinal, se retiraron en condiciones asépticas y se mantuvieron a 4°C en una solución de tampón PBS suplementada con una solución de antibióticos-antimicóticos (Penicilina G 200 UI/ml, Estreptomina 200 µg/ml y Anfotericina B 500 ng/ml) (Gibco, BRL, UK) hasta su posterior inoculación a ratones de la estirpe Balb/c *nu/nu* atímicos. Simultáneamente, diferentes porciones de encéfalo procedentes de las mismas localizaciones fueron fijadas en una solución de formolina tamponada al 10% para su posterior análisis histológico.

ES 2 326 770 B1

Antes de proceder al aislamiento del parásito, se analizaron las diferentes muestras de tejido nervioso mantenidas a 4°C con el fin de detectar la presencia del ADN de *N. caninum* mediante la utilización de la PCR anidada que amplifica la región ITS-1 del parásito (Buxton *et al.*, 1998, J. Comp Pathol. 118: 267-279). Para ello, diferentes porciones de unos 20 mg fueron retiradas de todas las secciones recogidas y procesadas para la extracción del ADN genómico con el kit comercial: “*Genomic-Prep cell and tissue ADN isolation kit*” (Amersham Biosciences) siguiendo las instrucciones del fabricante y, posteriormente, 5 µl de la solución del ADN resultante (100-200 ng) se utilizaron como molde en la PCR anidada de la región ITS-1 descrita a continuación.

La amplificación de la región ITS-1 del ADN ribosómico de *N. caninum* se llevó a cabo en una primera reacción de PCR utilizando los oligonucleótidos NN1 (SEQ ID NO: 13) y NN2 (SEQ ID NO: 14), y en una segunda reacción empleando los oligonucleótidos NP1 (SEQ ID NO: 15) y NP2 (SEQ ID NO: 16). La mezcla de PCR (25 µl) se componía de 0,15 µM de cada oligo (Sigma), 200 µM dNTPs (Sigma), 1x tampón (75 mM Tris pH 9, 20 mM (NH₄)₂SO₄, 50 mM KCl) (Biotools, España), 2 mM MgCl₂ (Biotools) y 0,625 unidades de ADN polimerasa (Biotools). En la primera reacción de amplificación se añadieron 5 µl de ADN y en la segunda 2 µl del producto de la primera. Ambas reacciones se realizaron en un termociclador según el siguiente programa: 94°C durante 5 min y 25 ciclos de 94°C/1 min, 48°C/1 min y 72°C/1,5 min y un último ciclo de 72°C durante 5 min. Los productos resultantes de la segunda amplificación, con un tamaño 213 pb, se visualizaron en un gel de agarosa al 1,6% en TBE 0,5 x (tampón Tris-borato-EDTA) teñido con bromuro de etidio.

Se detectó ADN del parásito en todas las secciones de encéfalo analizadas.

Además, las muestras mantenidas en la solución de formolina tamponada al 10% fueron deshidratadas, embebidas en parafina y se tiñeron con hematoxilina-eosina múltiples secciones de 3 a 6 µm de espesor siguiendo el método habitual. Para la detección de lesiones compatibles con la infección de *N. caninum* las muestras se examinaron microscópicamente como se describe en González *et al.*, 1999, Vet Rec 144: 145-150. Todas las muestras analizadas mostraron lesiones compatibles con la infección por este parásito caracterizadas por un cuadro de meningoencefalitis no supurativa, con múltiples nódulos gliales y manguitos perivascularares. Igualmente, secciones de varios de los bloques fueron desparafinados y examinados mediante la técnica inmunohistoquímica como se describe en Pereira-Bueno *et al.*, 2003, Vet Parasitol 111: 143-152, utilizando un suero policlonal de conejo desarrollado frente a taquizoítos de *N. caninum*, así como un suero policlonal de conejo frente a la proteína BAG1 como se describe en el Ejemplo 5 de la presente memoria. En la mayoría de las secciones analizadas se detectó la presencia de estructuras compatibles con quistes formados por este parásito.

Una vez confirmada la presencia del parásito, para el aislamiento se procesaron las muestras de encéfalo mantenidas a 4°C mediante su homogeneización con ciclos de 1 min de duración en un homogenizador de tejidos (Masticator IUL) hasta su perfecta disgregación. A continuación, se llevó a cabo la filtración de los macerados a través de una malla de 150 µm previamente esterilizada, y se centrifugó a 1350 x g durante 10 minutos. El sobrenadante fue descartado y el sedimento equivalente a unos 5 gramos de tejido de partida se inoculó intraperitonealmente con jeringa de insulina y aguja de diámetro 0,5x16 mm a ratones de la estirpe Balb/c *nu/nu* hembras con un peso aproximado de 20-25 gramos. Todo el proceso se realizó en condiciones asépticas.

Los ratones inoculados fueron examinados diariamente para detectar la aparición de signos clínicos atribuibles a neosporosis, entre los que se incluyen la pérdida de peso, parálisis de extremidades, ataxia, letargia, y otros signos neurológicos, tal como se describe en Yamane *et al.*, 1998, J. Vet. Diagn. Invest. 10: 364-368. Éstos fueron detectados en todos los ratones inoculados entre los 18-21 días postinoculación (PI) y, tras su aparición, los ratones fueron sacrificados en atmósfera de CO₂ y utilizados para el aislamiento del parásito en cultivo celular, mediante la inoculación del lavado peritoneal.

Además, con el fin de mantener el aislado *in vivo* en el modelo murino, el encéfalo de los ratones sacrificados fue retirado y homogeneizado en una solución de PBS suplementada con una solución de antibióticos-antimicóticos (100 UI/ml Penicilina G, 100 µg/ml Estreptomina y 250 ng/ml Anfotericina B) (Gibco, BRL, UK) mediante sucesivos pases de jeringa con agujas de 21 G y 25 G y, a continuación, el homogeneizado equivalente a la cuarta parte encéfalo, fue inoculado intraperitonealmente a un nuevo ratón de la estirpe Balb/c *nu/nu* atímico que igualmente se monitorizó hasta la aparición de los signos clínicos descritos anteriormente. El proceso se llevó a cabo hasta 6 pases consecutivos de ratón a ratón, observando la aparición de los signos clínicos ya descritos, en todos los ratones inoculados, entre los 6 y 15 días PI. Con el fin de confirmar que los signos clínicos observados eran consecuencia de la infección por *N. caninum*, se procedió a la extracción del ADN a partir de 20 mg de muestra del encéfalo de los ratones inoculados con el encéfalo del ternero, que fue sometido al análisis mediante la PCR anidada de la región ITS-1 descrita anteriormente, detectándose el producto de amplificación específico en todos los ratones analizados.

En cuanto al aislamiento en cultivo celular se llevó a cabo mediante la inoculación del lavado peritoneal de los ratones con signos clínicos previamente sacrificados, sobre un cultivo en monocapa de la línea celular MARC-145. Para ello, se llevó a cabo el lavado de la cavidad peritoneal con aproximadamente 8 ml de medio *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) suplementado con suero fetal bovino al 2% y una solución de antibióticos-antimicóticos al 2% (200 UI/ml Penicilina G, 200 µg/ml Estreptomina y 500 ng/ml Anfotericina B) (Gibco BRL, UK) que, inmediatamente después, fue añadido sobre una monocapa de aproximadamente 10⁶ células de la línea MARC-145 en un frasco de cultivo de 25 cm².

ES 2 326 770 B1

A las 24 horas, se retiró el medio y se sustituyó por DMEM suplementado con suero equino al 2% y la misma solución de antibióticos-antimicóticos al 1%. Cada 4 días el tapiz celular se levantó mecánicamente con el uso de un “raspador” celular, se pasó por jeringa y aguja de 25 G y se añadió sobre un nuevo cultivo de 5×10^5 células MARC-145. Nuevamente, a las 24 horas el medio se retiró y se sustituyó por DMEM suplementado con suero equino al 2%.

Los cultivos se mantuvieron en estufa húmeda a 37°C y atmósfera de CO₂ al 5% y se observaron diariamente en microscopio de contraste de fases para la visualización del parásito. A los 4 días PI se observaron algunas vacuolas y taquizoítos en el cultivo celular, que a continuación fue mantenido por pases sucesivos según el procedimiento descrito hasta obtener recuentos en cámara de Neubauer igual o superior a 10⁶ taquizoítos al tercer pase. A partir de este momento, el cultivo se mantuvo según describe Perez-Zaballos *et al.*, 2005, J. Parasitol., 91(3): 507-10.

Ejemplo 2

Caracterización genética del aislado Nc-Spain 7

En este ejemplo se describe la caracterización genética del aislado Nc-Spain 7 junto con otros aislados obtenidos a partir de diversos hospedadores y de diferente origen geográfico, permitiendo su identificación y discriminación del resto. Para ello, se amplificaron y secuenciaron 13 secuencias microsatélites, previamente identificadas en el genoma de *N. caninum*, a partir del aislado de la invención, tal y como se había realizado previamente con otros 9 aislados (Regidor-Cerrillo *et al.*, 2006, J. Parasitol., 92(3): 517-524).

Los microsatélites están constituidos por secuencias nucleotídicas sencillas de 2 a 5 nucleótidos que se repiten en tándem y que se caracterizan por un elevado polimorfismo, principalmente en función del número de repeticiones del motivo nucleotídico que presentan, constituyendo una herramienta adecuada para la identificación y discriminación de los diferentes aislados de *N. caninum*.

Para la identificación de secuencias microsatélites en el genoma de *N. caninum*, aproximadamente 25.330 ESTs (Expression Sequences Tags) depositadas en bancos de datos públicos derivadas de los aislados de *N. caninum* Nc-1 y Nc-Liv fueron analizadas con los programas informáticos *Tandem Repeat Occurrence Locator* (TROLL) (Castelo *et al.*, 2002, Bioinformatics. 18:634-636), *Tandem Repeats Finder* (TRF) (Benson 1999, Nucleic Acids Res. 27:573-580) y, por último, para evitar el análisis de secuencias redundantes, mediante el programa informático BLASTN.

De las 126 secuencias microsatélites detectadas, se seleccionaron 13 marcadores en función de varios criterios que incluían la posibilidad de diseño de cebadores para su posterior amplificación por PCR y secuenciación, el número de repeticiones en tándem que presentaban, seleccionando los de mayor número, y su localización fuera de regiones codificantes del genoma, con la finalidad de seleccionar los más polimórficos. En la Tabla I se describen los 13 microsatélites utilizados en este estudio como marcadores moleculares. Para cada microsatélite seleccionado, que se denominaron como se especifica en la Tabla I, se diseñaron cebadores específicos (de SEQ ID NO: 17 a SEQ ID NO: 42) que fueron utilizados para la amplificación de productos de PCR de aproximadamente 300 pb, que incluían el motivo de repetición y parte de las secuencias que lo flanquean, a partir del ADN genómico de diez aislados de *N. caninum* de diferentes hospedadores y origen geográfico, incluido el aislado objeto de la invención, tal como se muestra en la Tabla II.

El ADN genómico del aislado Nc-Spain7 fue obtenido a partir de 10⁸ taquizoítos mediante la utilización del sistema comercial *Genomic Prep Cells and Tissue DNA Isolation Kit* (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden). Para ello, los taquizoítos mantenidos en monocapa de la línea celular MARC-145, según se describe en el Ejemplo 1, fueron recogidos del cultivo cuando el 70-80% de las vacuolas parasitóforas se habían roto, y purificados de los restos celulares mediante varios pases por aguja de 25 G y la utilización de las columnas de cromatografía PD10 (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden). Tras su extracción, la concentración del ADN genómico fue determinada mediante espectrofotometría a 260/280 nm y almacenadas a -20°C.

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en volúmenes de 50 μ l compuestos de 0,2 μ M de cada oligonucleótido, 200 μ M dNTPs (Sigma), 1x tampón de reacción (75 mM Tris pH 9, 20 mM (NH₄)₂SO₄, 50 mM KCl), (Biotools, España), 2 mM MgCl₂ (Biotools), 2 unidades de ADN polimerasa (Biotools) y 50 ng de ADN molde. Las condiciones de reacción fueron las siguientes: 1 ciclo a 94°C durante 5 min, 35 ciclos de 94°C/1 min, 60°C/1 min, y 72°C/1 min, con un ciclo final de 72°C durante 10 min. En cada serie de amplificaciones, como control negativo, se incluyeron ADN obtenido a partir de las células donde el parásito era habitualmente mantenido y H₂O. Los productos de PCR obtenidos se separaron por electroforesis en geles de agarosa con bromuro de etidio (NuSieve 3:1, Cambrex Bioscience, USA) al 2,5% y se visualizaron bajo luz UV. Posteriormente, los productos fueron purificados con el ExoSAP IT kit (USB, USA), de acuerdo con las instrucciones del fabricante, y directamente secuenciados en ambas direcciones. Las secuencias se analizaron usando el programa informático BioEdit Sequence Alignment Editor v.7.0.1 (Copyright© 1997-2004 Tom Hall, Ibis Therapeutics, Carlsbad CA 92008, USA) y se depositaron en el banco de datos GenBank database bajo los números de acceso AY935165-AY935200 y AY937107-AY937178, excepto para el aislado Nc-Spain 7.

ES 2 326 770 B1

La presencia de polimorfismo para los 13 microsatélites seleccionados variaba desde un bajo polimorfismo con 2 ó 3 alelos para cada microsatélite (MS1A, MS1B, MS12 y MS21) hasta 4 a 9 alelos para el resto de microsatélites en los 10 aislados analizados. Además, el MS7 mostró un alelo que portaba un SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) dentro del microsatélite. Las secuencias obtenidas para el aislado objeto de la invención se describen en SEQ ID NO: 1 (microsatélite MS1A), SEQ ID NO: 2 (microsatélite MS1B), SEQ ID NO: 3 (microsatélite MS2), SEQ ID NO: 4 (microsatélite MS3), SEQ ID NO: 5 (microsatélite MS4), SEQ ID NO: 6 (microsatélite MS5), SEQ ID NO: 7 (microsatélite MS6A y MS6B), SEQ ID NO: 8 (microsatélite MS7), SEQ ID NO: 9 (microsatélite MS8), SEQ ID NO: 10 (microsatélite MS10), SEQ ID NO: 11 (microsatélite MS12), SEQ ID NO: 12 (microsatélite MS21).

Para el análisis de los genotipos de cada aislado en “multilocus”, cada alelo fue designado con un número de acuerdo con la longitud del motivo repetitivo y las diferencias encontradas en su secuencia. El análisis en “multilocus” aumentó considerablemente el poder discriminatorio de las secuencias microsatélites y así, se obtuvieron perfiles genéticos únicos para cada aislado, indicando que todos los aislados diferían significativamente entre ellos, como se puede observar en la Tabla II.

(Tabla pasa a página siguiente)

TABLA I: Descripción de los microsatélites utilizados como marcadores.

Marcador	N° Acceso	Fuente ^a	Motivo de repetición ^b	Cebadores PCR (5'-3')		N° de Alelos
				Directo	Inverso	
MS1A	CF260074	Nc-Liv	(TA) ₆₀	ACGACGCCITTTCAACIGIC (SEQ ID NO: 17)	CGTCCGTTCTCCTCTCTCAG (SEQ ID NO: 18)	3
	CF941843	Nc-1				
MS1B	CF260074	Nc-Liv	(AT) ₁₂	GGAGAACGGACGCGTTAAG (SEQ ID NO: 19)	CCCACAAACTCCCTTTCCTC (SEQ ID NO: 20)	3
	CF941871	Nc-1				
MS2	CF261297	Nc-Liv	(AT) ₂₃	CTCTTCTCACCAGCCCAGTIC (SEQ ID NO: 21)	GCTGTTACAAACCCACGGAAC (SEQ ID NO: 22)	4
	CD667923	Nc-1				
MS3	CF423151	Nc-Liv	(AT) ₁₄	GACTTTGGTTTGCCACTGTCC (SEQ ID NO: 23)	TCCGACATCTACGGACATCG (SEQ ID NO: 24)	4
	CF967777	Nc-1				
MS4	CF937799	Nc-Liv	(AT) ₁₈	AGAAGAAGAAACCGGGAATG (SEQ ID NO: 25)	TCTGAAACGAAATCCCITGG (SEQ ID NO: 26)	6
	CF942627	Nc-1				
MS5	CF598243	Nc-Liv	(TA) ₁₁	AATCAGGACTCCGTACACACC (SEQ ID NO: 27)	CCAGAGAGTCCCACATCTC (SEQ ID NO: 28)	7
	CD667615	Nc-1				

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

MS6A	CF942647	Nc-1	(TA) ₁₂	TCCGGGTGTGGTTTATCT (SEQ ID NO: 29)	TGCGCATGCACGAATAATAG (SEQ ID NO: 30)	5
MS6B	CF261131	Nc-Liv	(AT) ₁₂	GCACTCATGGGATTTTGTAGG (SEQ ID NO: 31)	AAAAATCAATGCACCTGATCG (SEQ ID NO: 32)	4
	CF942647	Nc-1				
MS7	CF371133	Nc-Liv	(TA) ₁₅	GATCCAACTCGGGGAGATAC (SEQ ID NO: 33)	CGTTCCCTTCCCAAATCTTC (SEQ ID NO: 34)	5
	CD680118	Nc-1				
MS8	CF938766	Nc-Liv	(AT) ₁₇	ACACTCGCCTTCCCTTGTG (SEQ ID NO: 35)	CACACAGGCCAGTTGAAAAG (SEQ ID NO: 36)	6
	CF421954	Nc-1				
MS10	CF659321	Nc-1	(ACT) ₇ -(AGA) ₁₂ ^a	CTATCACAGCCGTGAGTGTG (SEQ ID NO: 37)	CGCGCTATCCTTTAATCT (SEQ ID NO: 38)	9
			(TGA) ₉			
MS12	CF937360	Nc-Liv	(GT) ₁₆	CCAGCAATTCCTCCCTT (SEQ ID NO: 39)	CAAAAACGCCACTTCTTTCG (SEQ ID NO: 40)	3
MS21	BF824453	Nc-1	(TACA) ₁₀	TGTGAGCATAACGGTGGTTC (SEQ ID NO: 41)	TTTCTACCCCTCCCTTCACC (SEQ ID NO: 42)	2

^a ESTs de genotecas de ADN complementario de taquizoitos.

^b Motivo de repetición identificado en las ESTs del aislado Nc-Liv y, excepcionalmente del aislado Nc-1 cuando únicamente esta estaba disponible.

TABLA II: Aislados de *N. caninum* utilizados y alelos obtenidos para los distintos microsatélites analizados.

Aislado	Hospedador	Origen Geográfico	Referencia	Alelos y análisis en multilocus de los microsatélites estudiados												
				MS1A	MS1B	MS2	MS3	MS4	MS5	MS6A	MS6B	MS7	MS8	MS10	MS12	MS21
Nc-Liv	Canino	UK	Barber <i>et al.</i> , 1995, Parasitol. 111 (Pt 5): 563-568.	1	1	3	4	6	1	4	2	4	5	9	2	1
Nc-SweBI	Bovino	Suecia	Stenlund <i>et al.</i> , 1997, Parasitol. Res. 83:214-219	1	1	4	1	4	5	1	4	3	2	2	2	1
Nc-Bahia	Canino	Brasil	Gondim <i>et al.</i> , 2001, Vet. Parasitol. 101:1-7	1	2	2	3	4	5	4	2	1	2	1	2	1
Nc-PV1	Bovino	Italia	Magnino <i>et al.</i> , 1999, Vet. Rec. 144:456	1	1	3	2	5	3	5	2	4	4	4	2	1
<i>Hammondia heydorni</i> -Berlin-1996	Canino	Alemania	Müller <i>et al.</i> , 2001, Parasitol. Res. 87:883-885	2	1	2	2	2	2	2	1	1	6	3	3	1
Nc-GFERI	Canino	Alemania	Peters <i>et al.</i> , 2000, Parasitol. Res. 86:1-7	1	3	3	2	3	4	3	2	3	2	8	3	1
KBA1	Bovino	Corea	Kim <i>et al.</i> , 2000, Vet. Parasitol. 90:147-154	1	1	2	1	6	6	3	2	2	3	5	2	1

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

KBA2	Bovino	Corea	Kim <i>et al.</i> , 2000, Vet.Parasitol. 90:147- 154	3	1	2	1	6	7	3	2	2	3	6	2	1
Nc-SHEEP	Ovino	Japón	Koyama <i>et al.</i> , 2001, J.Parasitol. 87:1486- 1488	1	1	1	2	1	1	4	3	2	1	7	1	1
Nc-Spain 7	Bovino	España		1	1	2	4	4	2	2	1	5	4	6	2	2

Ejemplo 3

Caracterización patogénica del aislado Nc-Spain 7 en un modelo murino

5 En este apartado se describen los experimentos llevados a cabo para determinar la patogenicidad del aislado objeto de la invención Nc-Spain 7 en un modelo murino experimental.

10 Se inocularon ratones hembras de la estirpe BALB/c de 6 semanas de edad por vía intraperitoneal con 10^6 (grupo A) y 10^7 (grupo B) taquizoítos del aislado Nc-Spain 7 mantenidos en cultivo celular como se describe en el Ejemplo 1. El grupo testigo (grupo C) consistió en ratones BALB/c de las mismas características inoculados con 200 μ l de PBS por vía intraperitoneal. En el curso del experimento se sacrificaron aleatoriamente en los días 1, 2, 4, 8, 16, 32 y 64 cinco animales de cada grupo, excepto para el grupo testigo que se sacrificaron tres ratones por día.

15 Todos los ratones fueron examinados diariamente para observar signos clínicos compatibles con la infección por *N. caninum*.

20 El sacrificio de los ratones se realizó en atmósfera de CO₂. Inmediatamente después del sacrificio se obtuvo sangre mediante punción intracardíaca con jeringa de insulina y aguja de 0,5x16 mm. Los ratones se pesaron en el momento del sacrificio con el fin de detectar disminuciones del peso con respecto al grupo testigo. Las muestras de sangre (200-500 μ l) se depositaron en tubos de 1,5 ml con EDTA para al estudio de la parasitemia. Posteriormente, se realizó la necropsia de cada individuo procediendo a la apertura de las cavidades abdominal y torácica, valorando la presencia de lesiones macroscópicas y extrayendo el pulmón y el encéfalo, los cuales se congelaron a -80°C en tubos de 1,5 ml estériles hasta la extracción del ADN, con el objetivo de detectar la presencia del parásito por PCR.

25 Las muestras de sangre se centrifugaron a 2000 x g durante 10 min. El sedimento formado por las células sanguíneas se destinó a la extracción del ADN utilizando el sistema comercial “*Genomic-Prep cell and blood DNA isolation kit*” (Amershan Biosciences) y el plasma obtenido fue mantenido a -80°C. El ADN de pulmón y encéfalo se extrajo a partir de 10-20 mg de tejido congelado con el sistema comercial “*Genomic-Prep cell and tissue DNA isolation kit*” (Amershan Biosciences).

30 Para la detección del parásito en las muestras de sangre, pulmón y encéfalo recogidas de los animales sacrificados se utilizó la técnica de PCR anidada de la región ITS-1, siguiendo el procedimiento descrito en el Ejemplo 1. En todas las reacciones se utilizaron como testigo positivo el ADN obtenido de taquizoítos de *N. caninum* y como negativo agua ultrapura estéril.

35 Todos los ratones del grupo testigo (grupo C) sobrevivieron hasta el final del experimento clínicamente saludables. Por el contrario, uno de los ratones del grupo A desarrolló signos clínicos claramente compatibles con la neosporosis (hemiparesia y ataxia) a partir del día 31 y sobrevivió hasta el día 38 postinoculación (PI) cuando, por la gravedad de los síntomas, fue sacrificado. En el grupo B un total de 11 ratones presentaron signos clínicos compatibles con la neosporosis en mayor o menor grado a lo largo del experimento. A partir del día 14 PI, estos presentaron erizamiento del pelo, fuerte anorexia, letargia, hemiparesia y algunos de ellos torneo. Tres de los ratones fueron sacrificados los días 24 y 58 PI debido a la gravedad de los síntomas.

45 Durante la necropsia se observó esplenomegalia en la mayoría de los ratones sacrificados de los grupos A y B desde el día 2 al día 16 PI, y linfadenopatía en ganglios mesentéricos e iliacos desde el día 2 hasta el día 32, en el grupo A, y desde el día 1 hasta el final del experimento en el grupo B.

50 El ADN de *N. caninum* se detectó en sangre desde el día 1 al 8 PI, y en pulmón y encéfalo desde el día 2 al 64 PI. En lo que se refiere a la frecuencia de detección de *N. caninum* se observó una mayor detectabilidad del parásito al aumentar la dosis del inóculo. En el grupo C (grupo testigo) todas las muestras analizadas fueron negativas, según lo esperado. Los resultados obtenidos para la distribución del parásito en los grupos A y B se muestran en la Tabla III.

55 En dicha tabla se puede observar que a partir de los 16 días PI el parásito desaparece de la sangre y de los pulmones de los ratones, incluso de aquellos que fueron inoculados con la dosis más alta. En cuanto a la presencia del parásito en encéfalo el ADN fue detectado a partir del día 16 PI en el grupo A y a partir del día 4 PI en el grupo B hasta el día 64 PI, demostrando la capacidad de acantonamiento del aislado de la infección en este órgano.

60

65

ES 2 326 770 B1

TABLA III

Detección del ADN del aislado NcSpain7 en sangre, pulmón y cerebro de ratón a lo largo del experimento del Ejemplo 3 en los grupos A y B

5

Días PI	Sangre		Pulmón		Encéfalo	
	Grupo A	Grupo B	Grupo A	Grupo B	Grupo A	Grupo B
1	0/5 ^a (0%) ^b	3/5 (60%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)
2	1/5 (20%)	3/5 (60%)	0/5 (0%)	2/5 (40%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)
4	1/5 (20%)	1/5 (20%)	2/5 (40%)	5/5 (100%)	0/5 (0%)	1/5 (20%)
8	0/5 (0%)	2/5 (40%)	4/5 (80%)	5/5 (100%)	0/5 (0%)	4/5 (80%)
16	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	3/5 (60%)	2/5 (40%)	5/5 (100%)
24 ^c	-	0/2 ^c	-	0/2 ^c	-	2/2 ^c
32	0/5 (0%)	0/4 (0%)	0/5 (0%)	0/4 (0%)	2/5 (40%)	4/4 (100%)
38 ^c	0/1 ^c	-	0/1 ^c	-	1/1 ^c	-
58 ^c	-	0/1 ^c	-	0/1 ^c	-	1/1 ^c
64	0/5 (0%)	0/4 (0%)	0/5 (0%)	0/4 (0%)	4/5 (80%)	4/4 (100%)

10

15

20

25

^aLas fracciones representan el n° de ratones positivos frente al n° total de ratones.

30

^bPorcentaje de detección.

35

^cAnimales sacrificados por la gravedad de sus síntomas.

40

A continuación se procedió a determinar la carga parasitaria de las muestras de encéfalo y pulmón positivas mediante la técnica de PCR cuantitativa en tiempo real según consta en la patente EP1655378.

45

Las cargas parasitarias obtenidas para el grupo A en el pulmón fueron bajas en el día 4 PI, incrementándose ligeramente el día 8 PI. En el caso del grupo B, la carga detectada se incrementó significativamente en el día 4 PI, alcanzando el máximo el día 8 PI (Figura 1, panel A). Cuando se estudiaron las cargas parasitarias en el encéfalo de los ratones del grupo A, el número de parásitos encontrados los días 16 y 32 PI fue similar y se incrementó ligeramente en el día 64 PI. En el grupo B la carga parasitaria fue máxima en el día 16 PI, y en los días 32 y 64 disminuyó, aunque se mantuvo en niveles elevados. El análisis estadístico comparativo de ambos grupos mediante el programa informático Statistica (version 5.0, copyright Statsoft. Inc.) demostró que durante los días 16 y 32 PI, el grupo B presentó una mayor carga parasitaria ($P < 0,05$ U de Mann-Whitney), sin embargo en el día 64 PI, las cargas detectadas en ambos grupos fueron similares ($P > 0,05$ U de Mann-Whitney) (Figura 1, panel B).

50

55

En la figura 1, en ordenadas se representa el número de taquizoítos detectados por microgramo de ADN genómico del hospedador, cuantificados por la técnica de la PCR en tiempo real en pulmón (Panel A) y encéfalo (Panel B) de los ratones de los grupos A (barras de puntos), inoculados con 10^6 taquizoítos del aislado Nc-Spain 7, y B (barras listadas), inoculados con 10^7 taquizoítos, a lo largo de la infección experimental. En abscisas se indica el día postinoculación. Las barras están representadas con su mediana, y los cuartiles 25% y 75%.

Ejemplo 4

60

Immunogenicidad del aislado Nc-Spain 7 en un modelo murino

La detección de las inmunoglobulinas de los isotipos IgG1 e IgG2a específicas para *N. caninum* en el plasma de los ratones infectados del Ejemplo 3 se llevó a cabo mediante un ensayo inmunoenzimático (ELISA) indirecto.

65

Para ello, cada placa de 96 pocillos (Maxisorp de Nunc) fue antigenada con $0,5 \mu\text{g}$ de proteína del extracto soluble de taquizoítos del aislado Nc-1 de *N. caninum* obtenido por sonicación y fijada con solución de formolina tamporada al 10%. Tras bloquear con tampón PBS-Tween-20 al 0,05% y seroalbumina bovina al 1%, e incubar con los

ES 2 326 770 B1

sueros problema a una dilución 1/100, se emplearon como anticuerpos secundarios anti-IgG1 y anti-IgG2a de ratón conjugados con peroxidasa (Southern Biotechnology) a una dilución 1/5000. Finalmente, la reacción colorimétrica se desarrolló mediante la adición del sustrato *o*-dihidrocloruro-diamino-fenileno (0,6 mg/ml; Sigma) en tampón citrato 0,05 M suplementado con el 0,045% de H₂O₂. Tras parar la reacción colorimétrica con una solución de H₂SO₄ 2M, la absorbancia se midió en un lector de ELISA a una longitud de onda de 450 nm. Los resultados se expresaron como densidad óptica. Como testigos de la prueba se incluyeron en cada placa una muestra de suero de ratón negativa (densidad óptica menor de 0,1) así como un suero de ratón infectado experimentalmente con una densidad óptica mayor de 2,0.

La producción de las inmunoglobulinas IgG1 e IgG2a no fue detectada hasta el día 8 PI para ambos grupos A y B. En el grupo A, a partir del día 16 PI se produjo un fuerte incremento de los niveles detectados para ambos isotipos que se mantuvieron hasta el día 64 PI. A lo largo del experimento, los ratones inoculados con 10⁶ taquizoítos tuvieron una concentración de IgG2a ligeramente superior a IgG1 durante los días 8, 16 y 32 PI, aunque el día 64 PI la concentración de IgG1 superó ligeramente a la de IgG2a (Figura 2, panel A). En cuanto al grupo B, se produjo un incremento de los niveles de ambas inmunoglobulinas a partir del día 8 PI que se mantuvo hasta el día 64 PI, donde se obtuvieron los máximos valores. En este caso la producción de la IgG2a el día 8 PI fue considerablemente superior a la de IgG1, mientras que en los días 16, 32 y 64 PI los niveles de IgG1 predominaron frente a los de IgG2a (Figura 2, panel B).

En la figura 2, en ordenadas se representa la densidad óptica (D.O.), determinada a 450 nm utilizando la técnica de ELISA, como la medida de los anticuerpos IgG1 (barras en negro) e IgG2a (barra en gris) específicos frente a *N. caninum* producidos por los ratones de los grupos A, (Panel A) y B (Panel B), que fueron inoculados con 10⁶ y 10⁷ taquizoítos del aislado Nc-Spain 7 respectivamente, frente al grupo testigo (IgG1, representados por barras con líneas oblicuas e IgG2a representados por barras en blanco) a lo largo de la infección experimental. En abscisas se muestran los días postinfección (PI).

Ejemplo 5

Determinación de la capacidad de transformación entre el estadio de taquizoíto y bradizoíto del aislado Nc-Spain7 en estudios in vitro

En este apartado se describe la valoración de la capacidad de transformación al estadio de bradizoíto de taquizoítos del aislado Nc-Spain 7 *in vitro* siguiendo el procedimiento descrito por Risco-Castillo *et al.*, 2004, J Parasitol. 90 (3):466-70.

Se cultivaron monocapas de la línea celular MARC-145 sobre cubreobjetos circulares de 10 mm de diámetro, dentro de placas de 24 pocillos utilizando como medio de cultivo medio DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino, HEPES 15 mM (pH 7,2), glutamina 2 mM, penicilina 100 U/ml, estreptomycin 100 µg/ml y anfotericina B 250 ng/ml. Las monocapas celulares fueron infectadas a las 24 horas con taquizoítos del aislado Nc-Spain 7 a una dosis de infección hospedador:parásito de 2:1. Veinticuatro horas después de la infección, el medio se reemplazó con medio fresco conteniendo 2% de suero fetal bovino y nitroprusiato sódico 70 µM (Sigma) como agente estresante inductor de la transformación al estadio de bradizoíto. Este medio se renovó diariamente durante 7 días y los cultivos se mantuvieron a 37°C y 5% CO₂.

A lo largo del experimento se fijaron las monocapas celulares infectadas diariamente hasta el día 3 y los días 5 y 7 postestrés para la realización de un ensayo de inmunofluorescencia indirecta de doble marcaje, utilizando un suero policlonal de conejo producido frente a la proteína TgBAG1 recombinante (αBAG1; dilución 1:100), que reacciona frente el antígeno intracitoplasmático específico de bradizoíto denominado NcBAG1, y un anticuerpo monoclonal desarrollado en ratón frente a la proteína superficial específica de taquizoíto llamada SAG1 (αSAG1, dilución 1:150). Como anticuerpos secundarios, se usaron anti-IgG de conejo conjugada con isotiocianato de fluoresceína (FICT) y anti-IgG de ratón conjugado con tetrametil rodamina (TRIC) (Sigma), respectivamente. Los núcleos de las células hospedadoras y del parásito fueron marcados con DAPI.

Los cristales fueron observados en un microscopio invertido de fluorescencia (Nikon Eclipse TE200) usando un objetivo de inmersión 100X. La transformación se evaluó por duplicado para cada día estudiado, contando 10 campos al azar en cada cristal, para determinar la expresión de cada proteína específica. La expresión de BAG1 se detectó desde el segundo día post-estrés y aumentó progresivamente hasta observar un 32% de vacuolas parasitóforas BAG1 positivas el día 7 post-estrés (Figura 3).

El grado de conversión entre estadios se estableció como el porcentaje relativo del número de vacuolas parasitóforas que expresaron BAG1 *versus* el total de vacuolas parasitóforas contadas.

En la figura 3, en el eje de las ordenadas se representa la media del porcentaje de vacuolas BAG1 positivas (barras en negro) y SAG1 (barras en blanco). En el eje de las abscisas se muestran los días de tratamiento con 70 µM de nitroprusiato sódico (SNP).

ES 2 326 770 B1

Ejemplo 6

Análisis inmunohistoquímico de la capacidad de transformación taquizoíta-bradizoíta del aislado Nc-Spain7 in vivo

5 En este ejemplo se describen los análisis inmunohistoquímicos llevados a cabo en las muestras del encéfalo del ternero congénitamente infectado a partir del cual se obtuvo el aislado de la invención con lo que se confirma la capacidad de transformación entre los estadios de taquizoíta-bradizoíta del aislado Nc-Spain 7 *in vivo*.

10 Para ello, las diferentes muestras de tejido nervioso mantenidas en solución de formolina al 10% fueron deshidratadas y embebidas en parafina siguiendo el método habitual. A continuación, múltiples secciones consecutivas de 3 a 6 μm de espesor de las muestras parafinadas fueron desparafinadas con xileno, rehidratadas y sometidas al tratamiento en H_2O_2 al 0,3% en metanol durante 30 minutos, con el fin de inhibir la actividad peroxidasa endógena. Posteriormente, fueron tratadas con solución de cloruro cálcico-tripsina (pH 7,8) durante 40 minutos a 37°C y bloqueadas con suero de cabra durante 30 minutos. Las diferentes secciones fueron incubadas con suero policlonal de conejo desarrollado frente al antígeno BAG1, expresado en el estadio de bradizoíta (αBAG1) a una dilución 1:200 durante 12-18 horas a temperatura ambiente, o un suero policlonal de conejo anti-taquizoítas de *N. caninum* (ataquizoíta) a una dilución 1:3000. Inmediatamente después, las muestras fueron incubadas con el anticuerpo anti-inmunoglobulina IgG de conejo biotinilado durante 30 minutos y, seguidamente, con la solución ABC-P durante 40 minutos. El revelado se realizó mediante la utilización de diaminobenzidina como sustrato de acuerdo con las instrucciones del fabricante especificadas en el kit ABC (Vectastain ABC kit, Vector Lab.). Por último, las diferentes secciones fueron teñidas con hematoxilina, deshidratadas y montadas para su observación microscópica.

25 En la mayoría de las secciones analizadas se detectó la presencia de bradizoítas localizados en quistes. Estos bradizoítas fueron específicamente reconocidos por el anticuerpo αBAG1 .

Ejemplo 7

Evaluación de la capacidad protectora de una vacuna inactivada elaborada con el aislado Nc-Spain7

30 En este ejemplo se describe el desarrollo de una vacuna inactivada elaborada con el aislado de la invención Nc-Spain7 y se evalúa su seguridad y eficacia utilizando un modelo murino experimental.

35 El antígeno para las inmunizaciones se preparó a partir de taquizoítas obtenidos, recogidos y purificados como se describe en el Ejemplo 2, que fueron inactivados mediante su tratamiento con el agente etilimina binaria (BE!) a una concentración 0,01 M en agua destilada durante un período de 96 horas a 4°C y, posteriormente, se neutralizó con una solución de tiosulfato sódico. A continuación, el producto vacunal fue formulado mediante su adyuvantado con el adyuvante A (Laboratorios Hipra S.A., Girona, España) a una concentración de antígeno equivalente a 5×10^5 taquizoítas inactivados por dosis de inoculación en los laboratorios Hipra S.A. (Gerona, España). Para la prueba de vacunación se emplearon ratones hembras de la estirpe BALB/c de 8 semanas de edad (Harlan Ibérica, Barcelona).

45 En la Tabla IV se recogen los diferentes grupos incluidos en la prueba vacunal que incluyen un grupo vacunado con el antígeno adyuvantado (G1) o con el adyuvante sin antígeno (G2) que fueron desafiados con una dosis de infección experimental de 2×10^6 taquizoítas del aislado Nc-1, y dos grupos de ratones testigo, uno no vacunado y desafiado (G3) y otro no vacunado no desafiado (G4), que constituyeron el grupo "no vacunado" durante el período inductor. En cuanto a la pauta de vacunación consistió en dos dosis vacunales con 21 días de intervalo considerando la primera inoculación como día 0 del experimento, y a los 53 días postinoculación se realizó el desafío con 2×10^6 taquizoítas del aislado Nc-1, por vía subcutánea.

50 La seguridad del producto vacunal se evaluó observando diariamente a los animales, comprobando si se producían reacciones locales en la zona de inoculación o bien reacciones sistémicas debidas a la vacunación.

55 La eficacia de la vacuna se valoró mediante la evaluación de la respuesta inmune humoral inducida en los animales vacunados, morbilidad y mortalidad, así como la presencia del parásito en el sistema nervioso central por la técnica de PCR.

60

65

TABLA IV

Distribución de los grupos de la prueba vacunal

GRUPO	Número de animales	Adyuvante	Dosis antígeno ($\mu\text{g}/\text{ratón}$) (Nc-Spain7)	Vacunación y revacunación	Infección experimental (Nc-1)
G1	16	A	5×10^5 taquizoítos inactivados	+	2×10^6
G2	13	A	0	+	2×10^6
G3	5	-	0	-	2×10^6
G4	14	-	0	-	-

Para evaluar la respuesta inmune humoral (IgG1 e IgG2a) desarrollada en los diferentes grupos ensayados se utilizó un ELISA indirecto con proteínas solubles de *N. caninum* como antígeno según se describe en el Ejemplo 4. La respuesta inmune se estudió durante la fase inductora (proceso de vacunación), sacrificando un número de 5 animales del grupo G1, G2 y “no vacunado” en el día 23 postinoculación. El día 30 postdesafío (día 83 postinoculación) los ratones de los diferentes grupos fueron sacrificados. Se recogió una muestra de sangre para la evaluación de la respuesta inmune humoral desarrollada durante la fase efectora (fase de desafío o infección con el parásito).

La presencia del parásito en el encéfalo de los animales sacrificados el día 30 postdesafío se determinó mediante la técnica de PCR. Para ello, se realizó la extracción del ADN genómico a partir de 10-20 mg de tejido nervioso de los diferentes encéfalos mediante la prueba comercial “Realpure Extracción DNA Genómico” (Realpure, Durviz), siguiendo las instrucciones del fabricante, y a continuación, se procedió a la detección del parásito mediante la técnica de PCR anidada de la región ITS-1 siguiendo el procedimiento descrito en el Ejemplo 1.

En cuanto al análisis estadístico de los datos obtenidos, la valoración de las diferencias entre porcentajes se realizó aplicando la prueba estadística Chi cuadrado o *F* de Fisher mediante tablas de contingencia 2x2. En el caso de los valores de densidad óptica para IgG1 e IgG2a, las diferencias entre los grupos fueron analizadas por la prueba paramétrica Anova unifactorial. Cuando se observaron diferencias estadísticamente significativas, los grupos se compararon dos a dos mediante la prueba paramétrica de Duncan. Asimismo y empleando el test paramétrico de Dunnett, todos los grupos se compararon con el grupo G3 (no vacunado e infectado).

En cuanto a la seguridad, únicamente se observó en aquellos grupos inoculados con el adyuvante A una reacción local debida a la vacunación. Sin embargo, en ninguno de los grupos se observaron reacciones sistémicas adversas como consecuencia de la misma.

En cuanto a la eficacia, después del desafío, se observaron signos clínicos compatibles con la infección por *N. caninum* (inactividad, erizamiento, encorvamiento, debilidad y sintomatología nerviosa) en algunos animales (un ratón del grupo G1 y otro del grupo G3). No se observaron diferencias significativas en ninguno de los grupos analizados.

En la fase inductora se detectaron los niveles más altos de los isotipos IgG1 e IgG2a en el grupo vacunado (G1). Con respecto a IgG1 se observaron diferencias significativas al comparar el grupo G1 versus G2 (Anova unifactorial) y el grupo “no vacunado” (G4) (Prueba de Dunnett). En el caso del isotipo IgG2a no se observaron diferencias estadísticamente significativas (Figura 4, Panel A). Durante la fase efectora se detectaron niveles elevados para ambos isotipos IgG2a e IgG1 en todos los grupos desafiados (G1, G2 y G3). Con respecto a IgG1 no se observaron diferencias estadísticamente significativas al comparar los grupos desafiados, aunque con respecto al isotipo IgG2a los niveles detectados en el grupo G2 fueron significativamente superiores frente al grupo G1 (Anova unifactorial) (Figura 4, Panel B).

En la figura 4, en ordenadas se representa la densidad óptica (D.O.), determinada a 450 nm utilizando la técnica de ELISA, como la medida de los anticuerpos IgG1 (barras en gris) e IgG2a (barras en negro) específicos frente a *N. caninum* producidos por los ratones de los diferentes grupos de la prueba vacunal durante la fase inductora el día 23 postinoculación (Panel A) y efectora el día 30 tras el desafío (Panel B). En abscisas se muestran los diferentes grupos incluidos en la prueba vacunal.

Los resultados obtenidos durante el período inductor demostraron la capacidad del preparado vacunal de inducir una respuesta inmunológica, al menos de tipo humoral, específica frente a *N. caninum*.

La presencia de ADN de *N. caninum* se detectó en un número variable de animales en función del grupo analizado (Tabla V). No se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas cuando se compararon los grupos G1 versus G2 o G2 versus G3 ($P > 0,05$, *F* de Fisher), aunque el resultado fue estadísticamente significativo cuando se efectuó

ES 2 326 770 B1

la comparación del grupo G1 (vacunado y desafiado) frente al grupo G3 (no vacunado y desafiado) ($P < 0,05$, F de Fisher). Por tanto, en los animales vacunados con el aislado Nc-Spain 7 se observó una disminución significativa de la detectabilidad del parásito en el SNC respecto al grupo testigo no vacunado y desafiado, lo cual implica que la respuesta inmune desarrollada por el preparado vacunal es capaz de limitar la multiplicación del parásito en este órgano diana.

TABLA V

Resultados de PCR anidada en encéfalo

GRUPO	G1	G2	G3	G4
ANIMALES POSITIVOS/TOTAL	4/11	6/8	5/5	0/9
PORCENTAJE	36,6 %	75 %	100 %	0 %

Ejemplo 8

Aplicación del aislado Nc-Spain7 en pruebas serológicas de diagnóstico

Se describe la utilización del aislado de la invención Nc-Spain7 en técnicas de diagnóstico basadas en la detección de anticuerpos serológicos específicos frente a *N. caninum*, y en este ejemplo concreto, mediante su empleo en la técnica de inmunoblot.

Diferentes muestras de 10^8 taquizoítos de los aislados Nc-Spain7 y Nc-1, utilizado en este estudio como aislado de referencia, mantenidos a -80°C , obtenidos, recogidos y purificados como se describe en el Ejemplo 2, fueron resuspendidos en tampón de Tisis de proteínas (2% de sodio dodecil sulfato (SDS), 10% de glicerol, 60 mM de Tris-HCl (pH 6.8), 100 mM de ditioneitol (DTT) y 0,048% de azul de bromofenol), hervidos durante 10 minutos y sometidos a electroforesis en geles de acrilamida. De este modo, el antígeno equivalente a 2×10^7 taquizoítos por gel fue resuelto a través de un gel empaquetador de bis/acrilamida al 4% (pH 6,8) seguido a continuación por un gel separador de acrilamida-DATD al 12,5%, utilizando el sistema Mini-PROTEAN II System (Bio-Rad, California, USA). Con el fin de estimar el patrón de migración de los diferentes antígenos posteriormente detectados, se incluyó también el marcador Precision Plus Protein Standards Kaleidoscope (Bio-Rad). A continuación, las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa de $0,22 \mu\text{m}$ utilizando el sistema Mini Trans-Blot Cell (Bio-Rad).

Tras el tratamiento de las membranas en solución bloqueante TBS (BSA 3% en TBS- Tween 0,05%), fueron incubadas con los plasmas obtenidos a partir de ratones infectados experimentalmente y los sueros de bovinos infectados natural o experimentalmente, a una dilución 1:50 y 1:20, respectivamente. Como segundo anticuerpo se utilizó un anticuerpo policlonal desarrollado en conejo frente a la molécula completa de la IgG de ratón a una dilución 1:500 (Sigma) y un anticuerpo monoclonal frente a la IgG1 e IgG2 de bovino a una dilución 1:400 (Hipra S.A., Gerona, Spain), ambos conjugados con peroxidasa. Tras la incubación con este segundo anticuerpo, los complejos antígeno-anticuerpo formados fueron detectados utilizando el compuesto cromogénico 4-cloro- 1 naphthol (Bio-Rad) como sustrato.

Las muestras de plasma de ratón utilizadas se obtuvieron mediante la mezcla a partes iguales de los plasmas recogidos a partir del día 32 postinfección de ratones infectados experimentalmente con 10^6 taquizoítos de los aislados Nc-1, Nc-Liverpool y Nc-Spain7 y 10^7 taquizoítos de Nc-Spain7, según se describe en el Ejemplo 3. Igualmente, se incluyó como control la mezcla de los plasmas de los ratones testigo inoculados con PBS el día 32 postinfección.

En cuanto a las muestras de bovino estudiadas se incluyeron sueros de animales naturalmente infectados, tanto sueros pre-calostrales obtenidos a partir de terneros infectados congénitamente, incluyendo el suero del ternero a partir del cual se obtuvo el aislado Nc-Spain7, como sueros obtenidos a partir de vacas naturalmente infectadas. Además, se probaron sueros obtenidos mediante la mezcla a partes iguales de los sueros recogidos a partir de novillas experimentalmente infectadas en el día 70 de gestación con 10^8 taquizoítos del aislado Nc-1. Los respectivos sueros testigos negativos también fueron incluidos.

Los perfiles antigénicos detectados al usar el plasma de los ratones analizados fueron idénticos en los extractos de ambos aislados, Nc-Spain 7 y Nc-1 (Figura 5). Las principales proteínas antigénicas detectadas en ambos aislados fueron de 17, 24, 30, 34-35, 37, 39, 72-74 kDa, y algunas con elevado peso molecular (> 80 kDa). Aunque la reacción fue más intensa y se observó un mayor número de bandas con el plasma de los ratones infectados con 10^7 taquizoítos del aislado Nc-Spain7 frente al plasma de los infectados con 10^6 , la mayoría de los antígenos inmunodominantes de 30, 34-35 y 37 kDa descritos en estudios previos (Atkinson *et al.*, 1999, Parasitology 118 (Pt 4):363-370) se detectaron claramente.

En la Figura 5 se muestra el análisis por inmunoblot con el extracto proteico completo de los aislados de *N. caninum* Nc-Spain7 (Panel A) y Nc-1 (Panel B) en condiciones reductoras con una mezcla a partes iguales de los plasmas obtenidos a partir de ratones infectados experimentalmente como se describe a continuación: Ratones Balb/c infectados con 10^6 taquizoítos de Nc-1 (línea 1), ratones Balb/c infectados con 10^6 taquizoítos de Nc-Liverpool (línea 2),

ES 2 326 770 B1

5 ratones Balb/c infectados con 10^7 taquizoítos de Nc-Spain7 (línea 3), ratones Balb/c infectados con 10^6 taquizoítos de Nc-Spain7 (línea 4) y ratones Balb/c inoculados con PBS (línea 5). El perfil de migración de las proteínas correspondientes al marcador Precision Plus Protein Standards Kaleidoscope (Bio-Rad) está indicado mediante líneas con su masa molecular correspondiente en kDa. Los principales antígenos inmunodominantes detectados están señalados mediante puntas de flecha, indicando la masa molecular aparente en kDa.

10 También en el análisis realizado con los sueros bovinos se reconocieron perfiles antigénicos similares para ambos aislados. Los antígenos inmunodominantes de 17, 28, 30, 34-35 y 37 kDa, identificados en estudios previos (Alvarez-García *et al.*, 2002, Vet Parasitol. 107(1-2):15-27) fueron detectados con los sueros bovinos de infección natural. Los perfiles antigénicos desarrollados con los sueros obtenidos a partir de las novillas infectadas experimentalmente, en cambio, mostraron un perfil distinto donde destacó la reacción generada por una proteína de 39 kDa, pero fueron idénticos para ambos aislados.

15 En la Figura 6 se muestra el análisis por inmunoblot con el extracto proteico completo de los aislados de *N. caninum* Nc-Spain7 (Panel A) y Nc-1 (Panel B) en condiciones reductoras de los sueros obtenidos a partir de bovinos, como se describe a continuación: suero precalostral de ternero (título IFI 1:1600) (línea 1), suero precalostral de ternero (título IFI 1:800) (ternero de origen para el aislamiento de Nc-Spain7) (línea 2), suero precalostral de ternero testigo negativo (línea 3), mezcla a partes iguales de los sueros de novillas experimentalmente infectadas con 10^8 taquizoítos de Nc-1 (línea 4 y 5), mezcla a partes iguales de los sueros de novillas inoculadas con PBS (línea 6) y suero de vacas naturalmente infectadas (línea 7 y 8). El perfil de migración de las proteínas correspondientes al marcador Precision Plus Protein Standards Kaleidoscope (Bio-Rad) está indicado mediante líneas con su masa molecular correspondiente en kDa. Los principales antígenos inmunodominantes detectados están señalados mediante puntas de flecha, indicando la masa molecular aparente en kDa.

25 Los resultados mostrados en esta prueba confirman la utilidad del aislado Nc-Spain7 como antígeno en pruebas de inmunoensayo para la detección de anticuerpos específicos frente a *Neospora* en una muestra biológica. La batería de sueros utilizada en la prueba de inmunoblot desarrollada en el presente ejemplo, formada por sueros procedentes de animales infectados natural y experimentalmente con el parásito *N. caninum*, mostraron idéntico patrón antigénico de detección en los extractos celulares obtenidos del aislado de referencia, Nc-1, y de Nc-Spain7, incluyendo la detección del conjunto de proteínas antigénicamente predominantes o antígenos inmunodominantes descritos en estudios previos por otros autores, lo cual corrobora su utilidad diagnóstica.

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 326 770 B1

REIVINDICACIONES

- 5 1. Parásito aislado a partir de tejido nervioso bovino, de la especie *Neospora caninum* y denominado Nc-Spain7, depositado en la Colección de Cultivos de Algas y Protozoos con número de acceso CCAP 2051/1.
2. Cultivo celular biológicamente puro infectado por el aislado Nc-Spain7.
- 10 3. Cultivo celular biológicamente puro infectado por el aislado Nc-Spain7, según la reivindicación 2, **caracterizado** porque es un cultivo de células de riñón de mono verde.
4. Uso de los cultivos celulares de las reivindicaciones 2 y 3 para la obtención de taquizoítos de Nc-Spain7.
5. Uso de los cultivos celulares de las reivindicaciones 2 y 3 para la obtención de bradizoítos de Nc-Spain7.
- 15 6. Uso de los cultivos celulares de las reivindicaciones 2 y 3 para la obtención de ADN genómico de taquizoítos de Nc-Spain7.
7. Uso de taquizoítos de Nc-Spain7 para producir anticuerpos frente a *Neospora caninum*.
- 20 8. Uso del aislado Nc-Spain7 de la reivindicación 1 en la elaboración de una vacuna para el tratamiento y/o prevención de la infección causada por *Neospora* en animales.
9. Uso del aislado Nc-Spain7, según la reivindicación 8, **caracterizado** porque la elaboración de la vacuna se realiza a partir del aislado Nc-Spain7 vivo atenuado, inactivado y/o fijado en cualquiera de los estadios del ciclo biológico.
- 25 10. Uso del aislado Nc-Spain7, según la reivindicación 8, **caracterizado** porque la elaboración de la vacuna se realiza a partir de un extracto y/o lisado celular del aislado Nc-Spain7 en cualquiera de los estadios del ciclo biológico.
- 30 11. Uso del aislado Nc-Spain7, según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, **caracterizado** porque la vacuna se prepara como inyectable en formulaciones líquidas o en forma sólida para su posterior reconstitución.
- 35 12. Uso del aislado Nc-Spain7, según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, **caracterizado** porque la vacuna se prepara como formulación oral.
13. Uso del aislado Nc-Spain7, según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 12, que comprende un adyuvante y/o una o varias citoquinas y/o inmunoestimuladores.
- 40 14. Composición vacunal que comprende taquizoítos purificados de Nc-Spain7 y un excipiente farmacéuticamente aceptable.
15. Composición vacunal, según la reivindicación 14, en la que los taquizoítos están inactivados.
- 45 16. Composición vacunal, según cualquiera de las reivindicaciones 14 y 15, en la que se incluye un adyuvante.
17. Uso del aislado de *Neospora caninum* de la reivindicación 1 en el diagnóstico de la infección causada por *Neospora*.
- 50 18. Uso según la reivindicación 17 en el que el diagnóstico se realiza mediante técnicas inmunológicas.
19. Uso según la reivindicación 18 en el que las técnicas inmunológicas se basan en el empleo de proteínas antigénicas de Nc-Spain7.
- 55 20. Uso según la reivindicación 19 en el que las proteínas antigénicas se **caracterizan** por tener una masa molecular aparente de 17, 24, 28, 30, 34-35, 37, 39 ó 72-74 kDa.
21. Uso según la reivindicación 17 en el que las técnicas inmunológicas se basan en el empleo de los extractos completos del aislado Nc-Spain7.
- 60 22. Uso según la reivindicación 17 en el que las técnicas inmunológicas se basan en el empleo de anticuerpos frente al aislado Nc-Spain7.
23. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 19-22 en el que la técnica inmunológica empleada es el inmunoblot.
- 65 24. Uso de las secuencias SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 y/o 12 del aislado de la reivindicación 1 en el diagnóstico de la neosporosis mediante técnicas de detección de ácidos nucleicos.

ES 2 326 770 B1

25. Uso según la reivindicación 24 en el que la técnica de detección de ácidos nucleicos utilizada es la PCR.

26. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 24 y 25 en el que la técnica de detección de ácidos nucleicos se aplica al DNA del parásito extraído a partir de una muestra biológica.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

FIG. 1

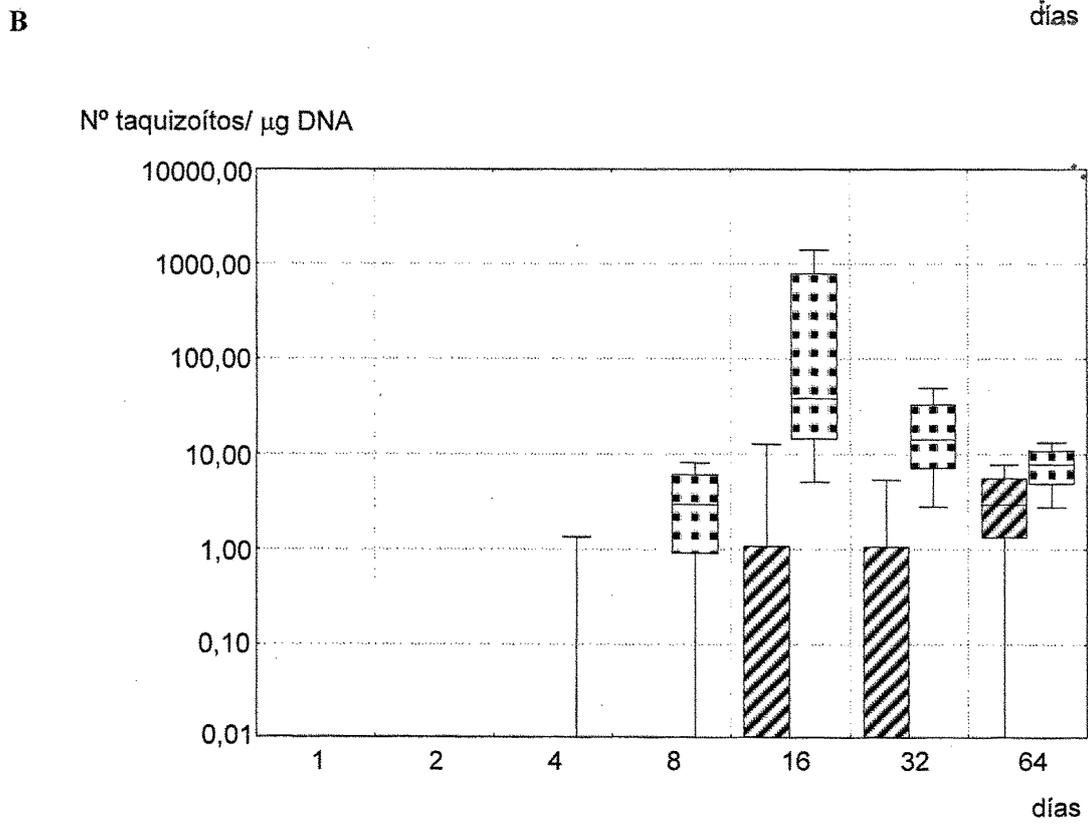
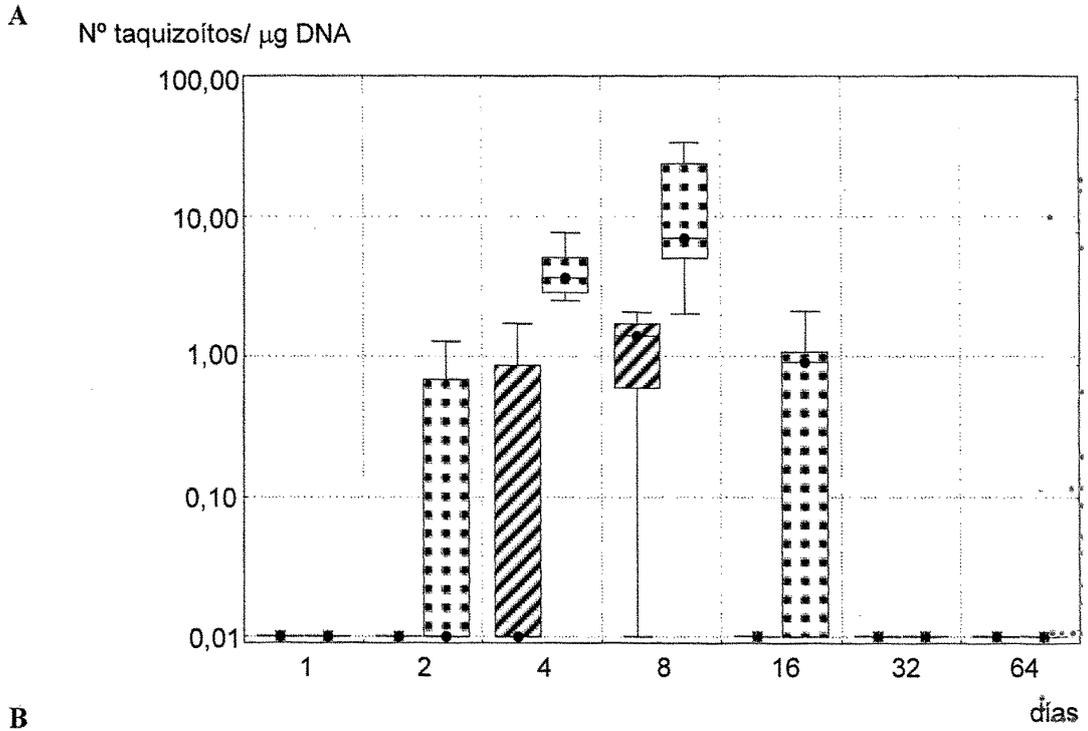
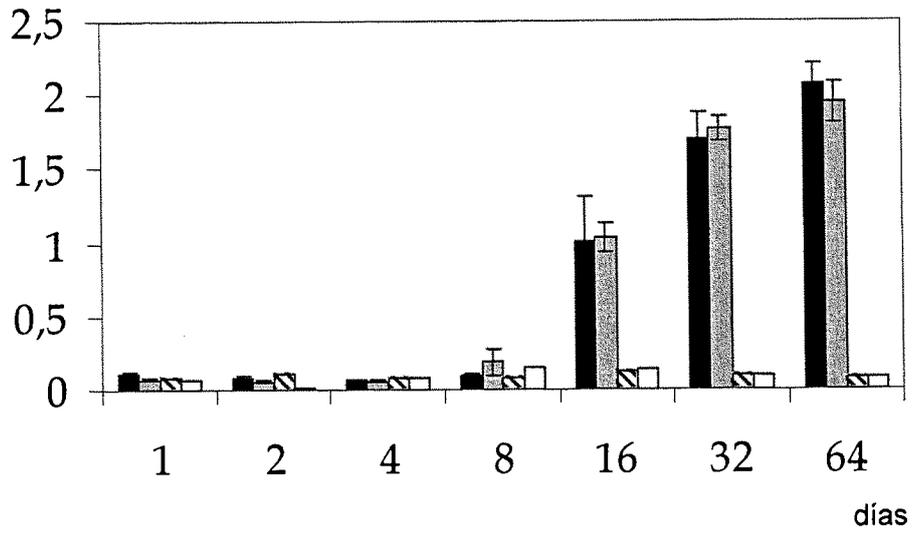


FIG. 2

A

D.O. (450nm)



B

D.O. (450nm)

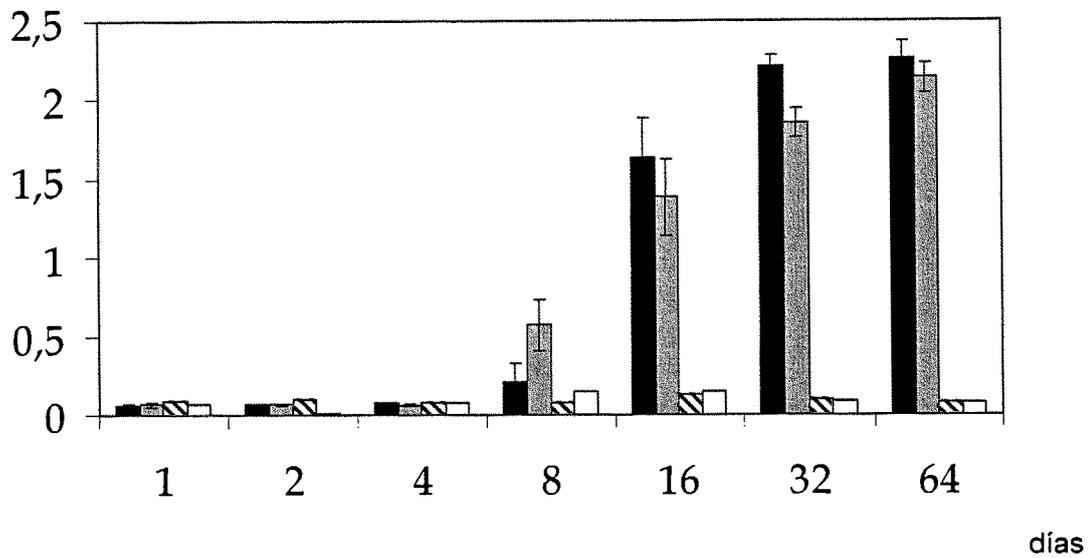


FIG. 3

% BAG1 •
% SAG1 ○

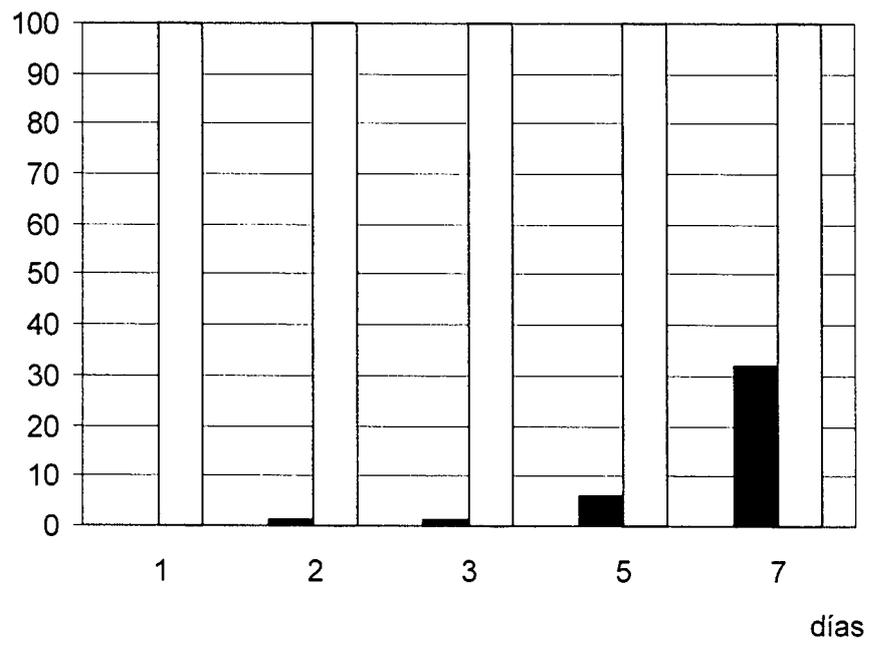
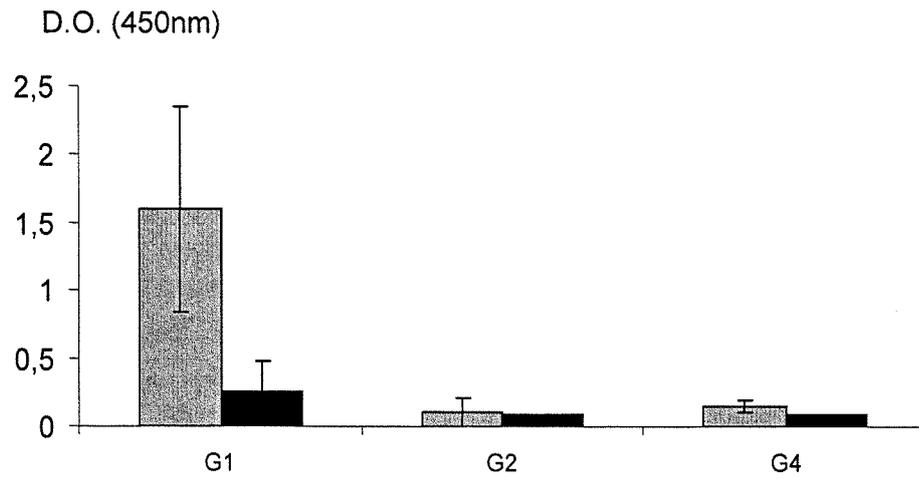


FIG. 4

A



B

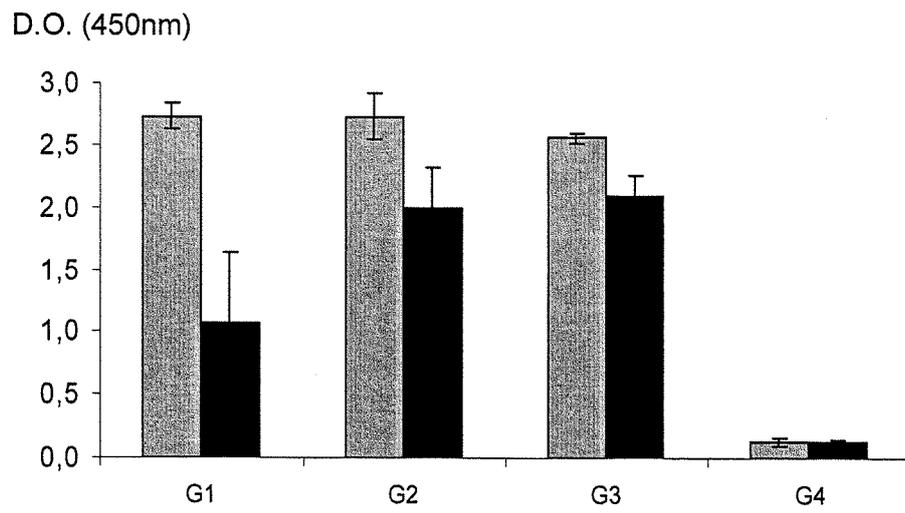


FIG. 5

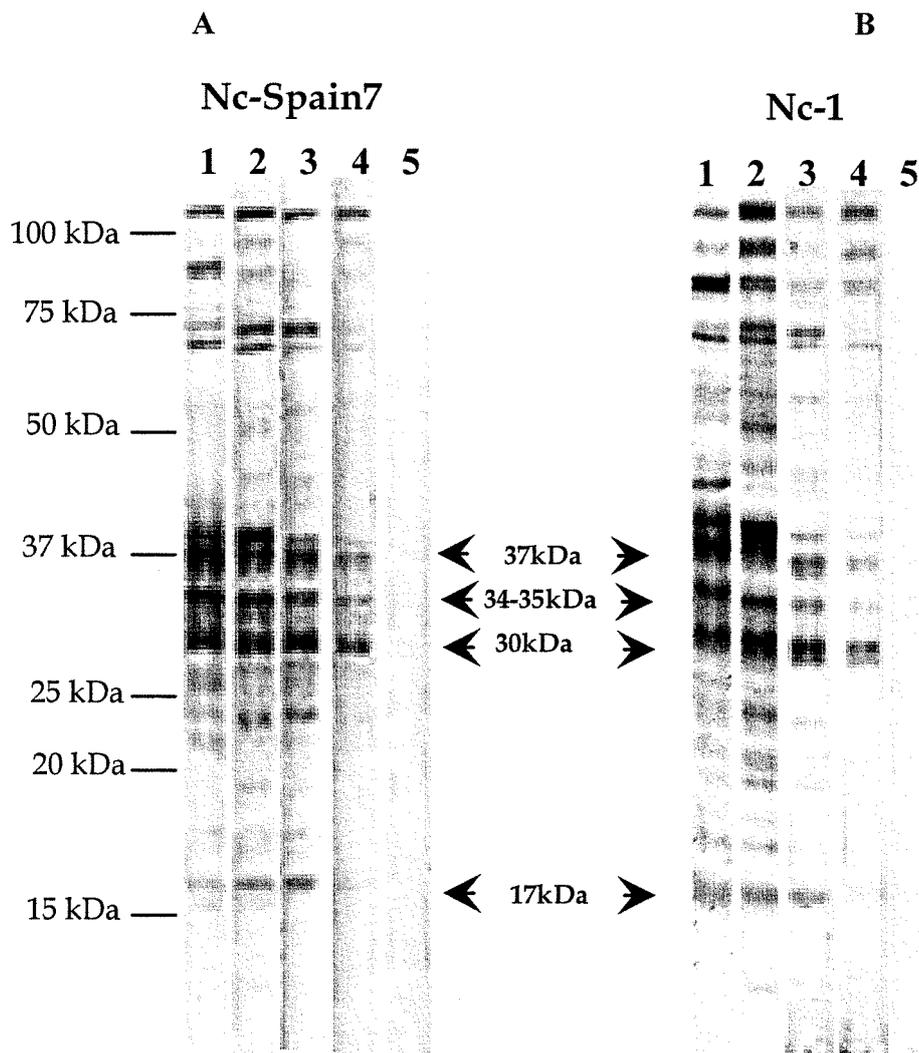
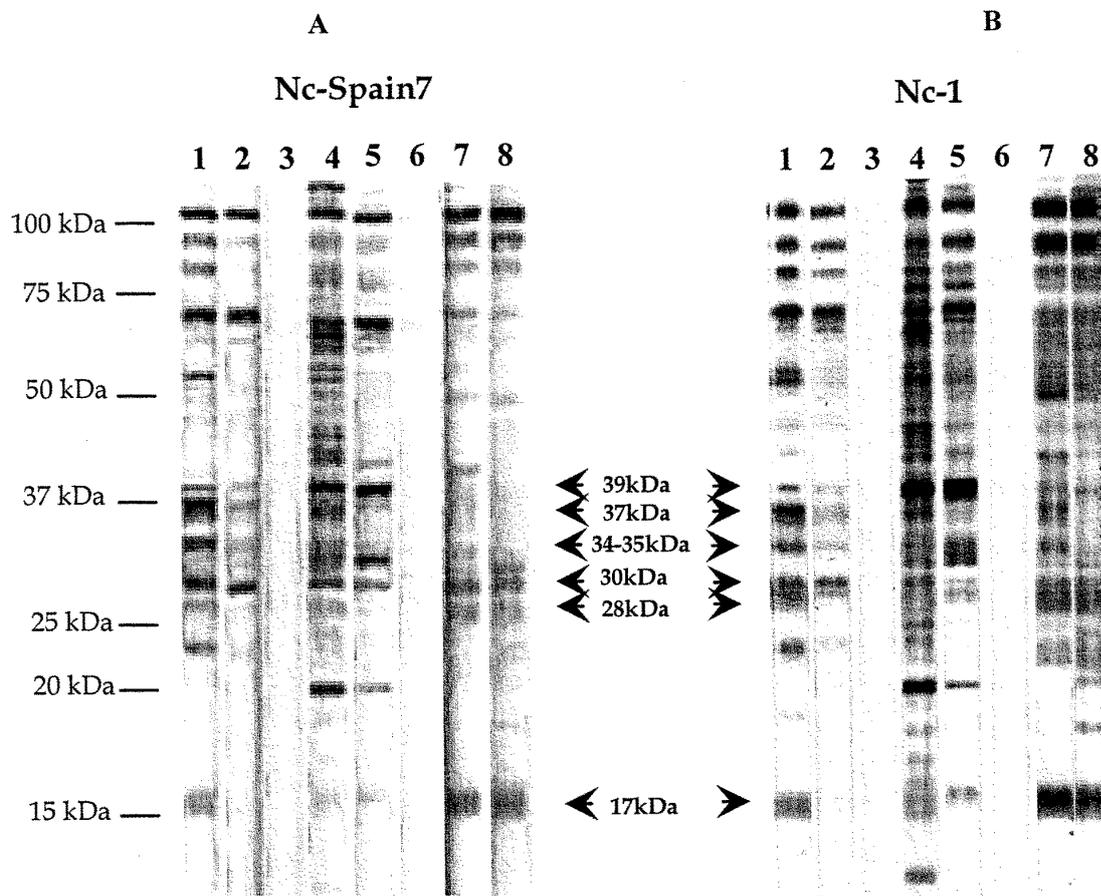


FIG. 6



ES 2 326 770 B1

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Universidad Complutense de Madrid

5 <120> Uso de un nuevo aislado de *Neospora caninum* para el desarrollo de pruebas de diagnóstico y para la fabricación de productos para el tratamiento y prevención de la infección causada por *Neospora*.

<160> 42

10

<210> 1

<211> 313

<212> DNA

15

<213> *Neospora caninum*

<400> 1

20

gacgcctttt caactgtcaa cagatacttt tttctagttc gactcaccgc aacacatgcc 60

cacagcgaca gatacgcgcc atatgcaggc gcgggcaggt gcatgcacgc ttgcgacaag 120

25

tatatatata aatatatata tgtatatatg tataaatata tatatatgta tatatgtata 180

aatatatata tatatatgta tatatgtata aatatatata tatatgtata tgtatatata 240

tgcaaggccg gtgtgtggac cttcggctga agctgaggag ttcgtcgagg tgtatggcga 300

30

gtgattggaa gtt 313

<210> 2

<211> 253

35

<212> DNA

<213> *Neospora caninum*

<400> 2

40

gaaagacgat tccccatttc aaactgcaaa cgtctcagca aatacaagtg acctcttgcg 60

cccggagttc ttcgtatgca cacacatcta catatatata tatatataca tatatgcatt 120

45

tccatagga tttacatgtg tagaaaatat agatgtgtat gtttgatttt gtgactctcg 180

atgcatctgc ctgcacgcgc atgtggaggt tttcttgtga atgcagcagg cgagaggaaa 240

50

gggagtttgt ggg 253

<210> 3

<211> 139

55

<212> DNA

<213> *Neospora caninum*

<400> 3

60

gaagtcgaac tcctctgctg ttttattgga cgcgagggtc tcaccgaaaa gctgcatata 60

tatatatttg tatcatatat atatatatat atatgtatat cccaagtaac cgcggcatgt 120

65

gtggactcca cacctagtc 139

<210> 4

<211> 198

ES 2 326 770 B1

<212> DNA

<213> *Neospora caninum*

5 <400> 4

ctgtcgtatg aatgcatata tatatatata tatatatata tataattatg tagatgtacc 60

tgtatctata catatgtaog tgtgccttga ttgctgcacc atgccgtttt gtggcctggt 120

10 ttacgaagga gaagggattc ccttttcatt tcatttgcag aaaattgaca agagctgcag 180

cctcaccatg ccatgtgg 198

15 <210> 5

<211> 250

<212> DNA

<213> *Neospora caninum*

20

<400> 5

cggcgtagtg catcttctgt ttttatctgt cgaaagacgc ttggcgtcac cacacttttt 60

25 cctttgcata ttggcacact tgtacgcgca tactgttcgc acatctacac ctctgcatat 120

atatatatat atatatatat atacatztat atacgtgggc gtataagcgt gggcgtgttt 180

30 gggcagtgcg cgcggtgtac gtgggaggag aggggcgggt ttcgcgacgc ttgacggtgc 240

caaggaatt 250

<210> 6

35 <211> 269

<212> DNA

<213> *Neospora caninum*

40

<400> 6

tcaggactcc gtcacaccgg tgaaggcagt ctcgtctgat atggcgcaca catgacagct 60

45 ttaacacgtg cgtatgtaaa taggcatgcg agagaataacc ccggtttacg tggacagacc 120

tgacgggctg aaagtccag acggtcgaog gtgacataag gcggatacgc gcagagatgt 180

50 gcgtatatat atatatatat atatgtaggc ctttcgcctg ggcgctgccca cgttgacacg 240

ctagtacttt gtctcggggc gaggaggcg 269

<210> 7

55 <211> 403

<212> DNA

<213> *Neospora caninum*

60 <400> 7

cagagctcgc caatagatct gaggaacct caaagtgcaa agtgcattgt tgtatccctt 60

gaagctatat atatatatat atatatatat aacttcatat gcatatgaat gtctgggtctc 120

65 gcactcatgg gattttgtag gccgatgcgt gcttaccat cgaccctct gcatagctgt 180

ES 2 326 770 B1

ccatctgtgt gtctgcataa tatgcacaca tgcactaaa gctgcgtgca tgtaactatt 240
attcgtgcat gcgcaaaata ctgacatcca tatatatata tatatatata tgtacatgca 300
5 taccacgtgt gtacgattac gttagcagag gcggccgatt gcgcgaccac gacagagggg 360
ttggaccgtg gtcactctttg ttactagcga tcaggtgcat tga 403

10 <210> 8
<211> 254
<212> DNA
<213> *Neospora caninum*

15 <400> 8
tccaactcgg cgagatacgc agagagggct gttcctggca acacgacagt gactctccat 60
20 acatcccgcg ctgctcccgt cgctgcacac ttgcatgcac ctatacgtct tcagaccata 120
atatatatat atatatatat aggggatagg cgacgacggc gagtgttgcg tgtgtgcggt 180
25 ccctgcggag agagcgctag ggagtcgatt gacaggggct gtgggggcct gcttacggga 240
gaggagggac tgaa 254

30 <210> 9
<211> 193
<212> DNA
<213> *Neospora caninum*

35 <400> 9
agcgcgaaac tcttgccaac agattttccac gtgtctcttc cgtgtacggc tattgcaagg 60
40 cacaaaggtc cccgaaaaat ttcattgctga catatatata tatatatata tatatatata 120
tatggatacg cttctttcaa agttggcagt tttgactgaa gcttttttcg aatgcggaat 180
45 cccgtctttc cgc 193

<210> 10
<211> 292
<212> DNA
50 <213> *Neospora caninum*

<400> 10
55 tcttctcttc tctccgcttt ctccaaattt aaaaggcctt tcggaagtct cccgagctgt 60
gacctccctc gtgtcgtact cgtagtagta gtactactac tactactact agaagaagaa 120
gaagaagaag aagaagaaga agaagaagaa gaagaagaag aagaagaaga agaagaagat 180
60 gatgatgatg atgatgatga tgatgatgac aatctacgtc aatctacgtc aacagggat 240
gtgcaagtac ctgcaaggaa gagctatagg aagagagaaa ggagaataaa gg 292

65 <210> 11
<211> 242

ES 2 326 770 B1

<212> DNA

<213> *Neospora caninum*

5 <400> 11

tgtttttttg agttccttgc aaaactcggg agaaattcgg gacccaaggg gaagtggaca 60

ctcgggggggc tgagggcaac cgtctcgttt ctggccagga gcaaaagcta ctcaagagac 120

10 agcaagatcg gcgcatttcc gctccgatgc tctgcgtgtg tgtgtgtgtg tgtgtgtgtg 180

tgtgtgtgcg cccgagtctc gtttgttatt aattgccgtc gtctgcgtgt tcggagtctc 240

15 tt 242

<210> 12

<211> 289

20 <212> DNA

<213> *Neospora caninum*

<400> 12

25 cgggtggttct tcagcagcgt tccaaaaaga accagtgaat aggtcggagc ccggtactcc 60

tggatggtga gacggttgaa tcgggctggt ccctaatacgt ttaccacgag ttccctccaa 120

30 catgcatata tacatgtaca tacatacata cctacatata tacatacata catttcccc 180

cgctctttct caaacgtttc ctttggccga gcttgacat atacaaagta taacatccag 240

35 gcggcgatgg aatcagcatg ttcacttttg gtgaagggga gggtagaaa 289

<210> 13

<211> 18

<212> DNA

40 <213> *Neospora caninum*

<400> 13

45 tcaacctttg aatcccaa 18

<210> 14

<211> 18

<212> DNA

50 <213> *Neospora caninum*

<400> 14

55 cgagccaaga catccatt 18

<210> 15

<211> 19

<212> DNA

60 <213> *Neospora caninum*

<400> 15

65 tactactccc tgtgagttg 19

<210> 16

<211> 18

ES 2 326 770 B1

	<212> DNA	
	<213> <i>Neospora caninum</i>	
5	<400> 16 tctcttcctt caaacgct	18
	<210> 17	
10	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> <i>Neospora caninum</i>	
15	<400> 17 acgacgcctt ttcaactgtc	20
	<210> 18	
20	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> <i>Neospora caninum</i>	
25	<400> 18 cgtccgttct cctctctcag	20
	<210> 19	
30	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> <i>Neospora caninum</i>	
35	<400> 19 ggagaacgga cgacgttaag	20
	<210> 20	
40	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> <i>Neospora caninum</i>	
45	<400> 20 cccacaaaact ccctttctctc	20
	<210> 21	
50	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> <i>Neospora caninum</i>	
55	<400> 21 ctcttctcac cagcccagtc	20
	<210> 22	
60	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> <i>Neospora caninum</i>	
65	<400> 22 gctggttaciaa cccacggaac	20

ES 2 326 770 B1

	<210> 23	
	<211> 21	
	<212> DNA	
5	<213> <i>Neospora caninum</i>	
	<400> 23	
	gacttttggtt tgccactgtc g	21
10	<210> 24	
	<211> 20	
	<212> DNA	
15	<213> <i>Neospora caninum</i>	
	<400> 24	
	tccgacatct acggacatcg	20
20	<210> 25	
	<211> 20	
	<212> DNA	
25	<213> <i>Neospora caninum</i>	
	<400> 25	
	agaagaagaa acgcggaatg	20
30	<210> 26	
	<211> 20	
	<212> DNA	
35	<213> <i>Neospora caninum</i>	
	<400> 26	
	tctgaaacga attcccttgg	20
40	<210> 27	
	<211> 20	
	<212> DNA	
45	<213> <i>Neospora caninum</i>	
	<400> 27	
	aatcaggact ccgtcacacc	20
50	<210> 28	
	<211> 19	
	<212> DNA	
55	<213> <i>Neospora caninum</i>	
	<400> 28	
	ccagagagtc ccacatctc	19
60	<210> 29	
	<211> 18	
	<212> DNA	
65	<213> <i>Neospora caninum</i>	

ES 2 326 770 B1

<400> 29	tccgcgtgtg gtttatct	18
5 <210> 30		
<211> 20		
<212> DNA		
<213> <i>Neospora caninum</i>		
10 <400> 30	tgcgcatgca cgaataatag	20
15 <210> 31		
<211> 21		
<212> DNA		
<213> <i>Neospora caninum</i>		
20 <400> 31	gcactcatgg gattttgtag g	21
25 <210> 32		
<211> 21		
<212> DNA		
<213> <i>Neospora caninum</i>		
30 <400> 32	aaaaatcaat gcacctgac g	21
35 <210> 33		
<211> 20		
<212> DNA		
<213> <i>Neospora caninum</i>		
40 <400> 33	gatccaactc ggcgagatac	20
45 <210> 34		
<211> 20		
<212> DNA		
<213> <i>Neospora caninum</i>		
50 <400> 34	cgttcccttc ccaaattctc	20
55 <210> 35		
<211> 20		
<212> DNA		
<213> <i>Neospora caninum</i>		
60 <400> 35	aactcgcct ttcctttgtg	20
65 <210> 36		
<211> 20		
<212> DNA		

ES 2 326 770 B1

	<213> <i>Neospora caninum</i>	
	<400> 36	
5	cacacaggcc agttgaaaag	20
	<210> 37	
	<211> 21	
10	<212> DNA	
	<213> <i>Neospora caninum</i>	
	<400> 37	
15	ctatcacagc cgtgagtgtt g	21
	<210> 38	
	<211> 18	
20	<212> DNA	
	<213> <i>Neospora caninum</i>	
	<400> 38	
25	cgcgctatcc tttattct	18
	<210> 39	
	<211> 18	
30	<212> DNA	
	<213> <i>Neospora caninum</i>	
	<400> 39	
35	ccagcatttc ttctcctt	18
	<210> 40	
	<211> 20	
40	<212> DNA	
	<213> <i>Neospora caninum</i>	
	<400> 40	
45	caaaaacgca ctttctttcg	20
	<210> 41	
	<211> 20	
50	<212> DNA	
	<213> <i>Neospora caninum</i>	
	<400> 41	
55	tgtgagcata acggtggttc	20
	<210> 42	
	<211> 20	
60	<212> DNA	
	<213> <i>Neospora caninum</i>	
	<400> 42	
65	tttctaccct ccccttcacc	20



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 326 770

② Nº de solicitud: 200701978

③ Fecha de presentación de la solicitud: 13.07.2007

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: Ver hoja adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	WO 2007073914 A1 (ORTEGA MORA, L.M., et al.) 05.07.2007, todo el documento.	2-18,21-26
Y		19-20
Y	ÁLVAREZ-GARCÍA, G., et al. Pattern of recognition of Neospora caninum tachyzoite antigens by naturally infected pregnant cattle and aborted fetuses. Veterinary parasitology. 29.07.2002. Vol. 107, nº 1-2, páginas 15-27. Ver resumen, figuras 1-3 y páginas 19, 25 y 26.	19-20
A		8-18,21-26
X	WO 0210340 A1 (ELLIS, J.T., et al.) 07.02.2002, todo el documento.	2-18,21-26
X	WO 9525541 A1 (CONRAD, P.A., et al.) 28.09.1995, todo el documento.	2-18,21-26
X	WO 9920303 A1 (CHOROMANSKI, L. & BROWN, K.) 29.04.1999, todo el documento.	2-18,21-26

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

30.09.2009

Examinador

B. Pérez Esteban

Página

1/5

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

C12N 1/10 (2006.01)

A61K 39/002 (2006.01)

A61K 35/68 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

C12R 1/90 (2006.01)

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

C12N, A61K, G01N , C12R

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

INVENES, EPODOC, WPI, MEDLINE, BIOSIS, NPL, EMBASE, XPESP.

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 30.09.2009

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	1	SÍ
	Reivindicaciones	2-26	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	1	SÍ
	Reivindicaciones	2-26	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 ha sido publicada.

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	WO 2007/073914 A1	05.07.2007
D02	ÁLVAREZ-GARCÍA, G., et al.	29.07.2002
D03	WO 02/10340 A1	07.02.2002
D04	WO 95/25541 A1	28.09.1995
D05	WO 99/20303 A1	29.04.1999

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 un aislado del parásito *Neospora caninum*, denominado Nc-Spain7, con número de depósito en la Colección de Cultivos de Algas y Protozoos CCAP 2051/1, y un cultivo celular biológicamente puro de células de riñón de mono verde infectadas por el aislado. Reivindica también los usos de NC-Spain7 en sus distintas formas biológicas para diagnóstico, tratamiento y prevención de la neosporosis mediante técnicas inmunológicas. Asimismo, se divulgan las vacunas preparadas a partir del aislado, proteínas antigénicas y extractos del mismo. Por último, la solicitud incluye el uso de secuencias nucleotídicas de microsatélites del aislado de *Neospora* para el diagnóstico de la neosporosis mediante técnicas de PCR..

No se ha encontrado ningún documento en el estado de la técnica donde aparezca el aislado de *Neospora caninum* con el mismo número de acceso que el reivindicado en la presente solicitud, por lo que ésta se considera nueva según el artículo 6 de la Ley de Patentes.

Sin embargo, se han encontrado numerosos documentos que divulgan otros aislados de *Neospora caninum*, y en los que los usos de éstos son los mismo que los de la solicitud, por lo que, aunque la reivindicación 1 se considera inventiva según el artículo 8 de la Ley de Patentes, las demás reivindicaciones, referidas a los distintos usos del aislado, no se consideran con actividad inventiva.

El documento D01 se considera el más cercano del estado de la técnica. En él se divulga un aislado de *Neospora caninum*, obtenido, como el de la solicitud, de tejido nervioso de ganado bovino. El empleo del aislado en este documento es igual que el que se da al aislado de la solicitud, y el contenido de las reivindicaciones es muy similar en los dos casos. Así, además del propio organismo con su número de acceso, se describen en D01 cultivos biológicamente puros de líneas celulares de riñón de mono verde infectados con el aislado, y su uso para obtener productos que sirvan para la fabricación de vacunas, y para desarrollar métodos de diagnóstico, tratamiento y prevención de neosporosis; del mismo modo que en la solicitud de patente, se trata de métodos inmunológicos y de hibridación de ácidos nucleicos, y los productos incluyen el propio aislado en todos sus estadios de desarrollo, extractos del mismo, lisados celulares, antígenos, anticuerpos, polipéptidos y polinucleótidos. Además, tanto los métodos empleados en el documento D01 como las moléculas utilizadas en su desarrollo coinciden con los reivindicados en la solicitud; incluso coinciden las secuencias de los oligonucleótidos empleados en la detección e identificación del parásito en muestras biológicas, los antígenos y anticuerpos utilizados en las técnicas inmunológicas y el inóculo empleado para los protocolos de vacunación; asimismo, son semejantes los protocolos de inmunización y toma de muestras, y los resultados finales obtenidos son muy parecidos.

Por todo ello se considera que el documento D01 anticipa la actividad inventiva de las reivindicaciones 2 a 18 y 21 a 26 de la solicitud, y que, por lo tanto, estas reivindicaciones no cumplen el requisito de actividad inventiva del artículo 8 de la Ley de Patentes.

En el documento D02 los autores realizan un análisis de las proteínas antigénicas en ganado infectado con taquizoítos del aislado Nc-1 de *Neospora caninum*, y destacan el importante papel de las proteínas detectadas en el diagnóstico de la neosporosis. Como se puede observar en las figuras 1 a 3, las proteínas encontradas en los geles coinciden con las de la reivindicación 19 de la solicitud.

Se estima que la combinación de los documentos D01 y D02 es evidente para el experto en la materia, por lo que las reivindicaciones 19 y 20 de la solicitud no cumplen el requisito de actividad inventiva.

Hoja adicional

Los documentos D02 a D04 divulgan nuevos aislados de Neospora obtenidos de distintas muestras y, como en el caso de la solicitud, se emplean para la fabricación de nuevas vacunas y composiciones farmacéuticas, y para el desarrollo de métodos de diagnóstico, tratamiento y prevención de neosporosis de una forma muy similar a la reivindicada en la solicitud. Por tanto, se considera que cada un de estos documentos afecta la actividad inventiva de las reivindicaciones 2 a 18 y 21 a 26 de la presente solicitud.