

CAVELIER**ABOGADOS**

WEB SITE www.cavelier.com
 E MAIL cavelier@cavelier.com

EDIFICIO SISKI
 CARRERA 4 No 72 35
 BOGOTÁ 8 COLOMBIA

TELEFONO (57) (1) 347 3611
 TELEFAX (57) (1) 217-9211 (57) (1) 310-4995

Señora Jefe de la
 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES
 SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
 E S

Radicacion 02112910 00000001
 Fecha (AÑO) 2002-12-17 17:00 35
 Folios: 143
 Trámite , 011 PCT-PATENT 379 FASE NDCI 329 COMPLETEN
 Dependencia: 2002 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

Trámite 002
 Evento 001
 Actuación 329

Referencia Expediente N 02 112 910
 Solicitante UNIVERSITY OF SASKATCHEWAN
 Asunto Solicitud de patente para "INMUNIZACIÓN DE GANADO LECHERO CON PROTEINA GapC CONTRA LA INFECCIÓN DEL ESTREPTOCOS"
 Fecha de solicitud 12 de diciembre de 2002

Yo, Emilio FERRERO, obrando como apoderado de la solicitante en el asunto antes identificado, atentamente presento la traducción al español de la solicitud de patente en referencia

Atentamente solicito que se continúe con su tramitación

Bogotá, 17 DIC 2002
 Señora Jefe,


 EMILIO FERRERO
 T P.A No 31 929

0002 Colo 13578 841 003 7
 JBP/MRM Id 6

IMUNIZACION DE GANADO LECHERO CON PROTEINA GapC CONTRA
INFECCION DE ESTREPTOCOCO

El campo técnico de la presente invención se relaciona de manera general con antígenos de bacteria y genes que codifican el mismo. Mas particularmente, la presente invención pertenece o corresponde a la clonación, expresión caracterización de las proteínas de unión plasmin [GAPC] de streptococcus reptococus disgalactiae. El streptococcus reptococus agalactiae, streptococcus reptococus uberis, y [STREPTOCOCCUS PARAUBERIS,] y streptococcus reptococus [INIAE,] y el uso del mismo en composiciones de vacuna.

ANTECEDENTES La mastitis es una infección de la glándula mamaria usualmente causada por bacterias u hongos.

La respuesta inflamatoria que sigue a la infección da como resultado una disminución en la producción de leche así como también en la calidad, y origina pérdidas económicas anuales importantes a la industria lechera.

Entre las especies bacterianas mas comúnmente asociadas con Mastitis están las especies del genero streptococcus reptococo, que incluyen streptococcus reptococos aureus, streptococcus reptococos uberis (no digitable), streptococcus reptococos agalactiae (Lancefield grupo B), streptococcus reptococos disgalactiae (Lancefield grupo C, streptococcus reptococos [ZOOEPIDEMICUS], y los streptococcus reptococos zooepidemicus, y los streptococcus reptococos de los grupos D, G , L y N Algunas de aquellas especies son contagiosas (por ejemplo S agalactiae), mientras que otras son consideradas ambientalmente patógenas (por ejemplo S dysgalactiae y S uberis)

Los patógenos ambiental S [UBERIS] son responsables de cerca del 20% de todos los casos clínicos de Mastitis (Bramley, A J y Dodd, F H (1984) [J DAIRIES] 51 481-512, Bramley, A J (1987) Animal Health Nutrition 42 12-16, Watts, J L (1988) J Dairy Sci 71 1616-1624), es el organismo predominantemente aislado de las glándulas mamarias durante el periodo de no lactancia

(Bramley, A J (1984) Br VET J 140 328-335, Bramley and Dodd (1984) J

Dairy Res 51 481-512, Oliver, S P (1988) Am J Vet Res] 49 1789-1793)

La Mastitis que resulta de la infección con *S. uberis* es comúnmente [SUBCLINICAL,] caracterizada aparentemente por leche normal con un incremento en el conteo de células somáticas debido a la influencia de de leucocitos. La composición química de la leche se cambia debido a la supresión de la secreción con la transferencia de cloruro de sodio y bicarbonato proveniente de la sangre a la leche originando un cambio en el pH a un nivel más alcalino. La Mastitis del *S. uberis* también puede tomar la forma de una condición clínica aguda, con los signos obvios de enfermedad tales como coágulos o decoloración de la leche e hinchamiento o dureza de la glándula mamaria. Algunos casos de la enfermedad clínica pueden ser severos y se puede presentar pirexia. Para una revisión de las

manifestaciones clínicas de la mastitis de *S. uberis*,
ver, Bramley (1991) Mastitis physiology or pathology p
G3-9 En C Burvenich, G

Vandeputte-van Messom, y A W Hill (ed), New
insights into the pathogenesis of [MASTITIS
RIJKSUNIVERSITEIT] Gent, Belgium, y Schalm et al (1971)
la mastitis complejo-A breve resumen p 1-3 En Mastitis
de Bovino Lea & Febiger, los métodos de control
antibacteriano de la Convención de Filadelfia tal como
inmersión de teta y terapia antibiótica son efectivos en
el control de muchos tipos de mastitis contagiosa, pero
los organismos ambientales típicamente encontrados en
todas los estables lecheros son a menudo resistentes a
tales medidas La vacunación es por lo tanto una
estrategia atractiva para evitar las infecciones de las
glándulas mamarias, y se han encontrado benéficas en el
caso de algunos mastitis contagiosa por patógenos

La literatura se limita con relación a los estudios
de vacunación a [*S.*] dysgalactiae y [*S. uberis*] y se han
obtenido resultados variables observado, en algunos
casos, la inmunización ha dado como resultado una

sensibilidad creciente al organismo específico y en otros casos de protección específica de cepa se han obtenido

Por ejemplo, estudios previos han mostrado que la infección primaria con *S. uberis* puede reducir considerablemente la proporción de la infección luego de una segunda exigencia con la misma cepa (Hill, A W (1988) Res Vet Sci 44 386-387) La vacunación local con *S. [UBERIS]* muerto protege la glándula mamaria bovina contra desafíos inflamatorios con la cepa homóloga (Finch et al (1994) Infect Immun 62 3599-3603), similarmente, la vacunación subcutánea con *S. [UBERIS]* vivo ha mostrado originar una modificación dramática de la patogénesis de la mastitis con la misma cepa (Hill et al (1994) [FEMS IMMUNOL MED]

Microbiol 8 109-118) Los animales vacunados de esta manera esparcen mas pocas bacterias en su leche y muchos cuartos permanecen libres de infección

No obstante, la vacunación con bacterias vivas o atenuadas puede poseer riesgo para el receptor. Además, es claro que las vacunas convencionales muertas son en general grandemente inefectivas contra *S. [UBERIS]* y *S. agalactiae*, debido a la falta de antígenos de protección sobre las células de crecimiento in vitro o enmascarar estos antígenos mediante mimetismo molecular.

La falta habitual de existencia de vacunas para la mastitis contra *[S.] agalactiae* o las cepas contagiosas de *Streptococcus* se deben al menos en parte a una falta de conocimiento con relación a los determinantes de virulencia y los antígenos de protección producidos por aquellos organismos que están involucrados en la invasión y protección de la glándula mamaria (Collins et al (1988) [J] Dairy Res] 55 25-32, Leigh et al (1990) [RES VET SCI] 49 [85-87] , Marshall et al (1986) J Dairy Res 53 507-514)

El *S. dysgalactiae* es conocido por unir varias proteínas extracelulares y derivadas de plasma tales como

fibronectina, fibrinogeno, colágeno, alfa-II-macroglobulina, IgG, albumina y otros compuestos

El organismo también produce hialuronidasa y fibrinolisisina y es capaz de adherirse a unas células epiteliales mamarias de bovino invadidas Sin embargo, los papeles exactos de los componentes bacteriales responsables por estos fenotipos en la patogénesis no es conocido

Similarmente, la patogénesis de la infección S [UBERIS] esta pobremente entendida Adicionalmente, la influencia de los factores de virulencia der S [UBERIS] sobre los mecanismos de defensa del hospedero y la fisiología de la glándula mamaria no esta bien definida Los factores de virulencia conocidos asociados con S [UBERIS] incluyen una cápsula de ácido hialurónico (Hill, A W (1988) Res Vet Sci 45 400-404), hialuronidasa [(SCHAUFUSS] et al (1989) [ZENTRALBL] Bakteriologie Ser [A] 271 46-53), [R-LIKE] protein (Groschup, M H and Timoney, J F (1993) Res Vet Sci 54 124-126), y una

cohemolisina, el factor CAMP, también conocido como factor UBERIS (Skalka, B y Smola, J

[(1981) ZENTRALBL BAKTERIOL SER A] 249 190- 194), proteína similar a R, activador de plasminogeno y factor CAMP Sin embargo, se conoce muy poco de sus papeles en la patogenicidad

El uso de determinantes de virulencia provenientes de streptococcus reptococos como agentes inmunogenicos se ha propuesto Por ejemplo, el factor CAMP de [S UBERIS] se ha mostrado como protector de sujetos vertebrados de infección para aquel organismo (Jiang, Patente estadounidense No 5,863,543)

El antígeno [Y] de la cepa Estreptococo grupo B A909 (ATCC No 27591) es un componente del complejo marcador de proteína c, que adicionalmente comprende y (3 subunidades (Boyle, Patent U S No 5,721,339) Los subconjuntos [DEL SEROTIPO IA, II,] y virtualmente todas las células del serotipo 1b de los streptococcus del B, se han reportado por expresar componentes de la proteína

c Se ha propuesto el uso de estas unidades como un agente inmunogénico contra infecciones por infección de estreptococo Lancefield Grupo B Sin embargo, no ha sido estudiado su uso para evitar o tratar las infecciones bacterianas en animales, que incluyen mastitis en ganado

La proteína M de streptococco del grupo A se considera por ser uno de los factores de mayor virulencia de este organismo en virtud de su capacidad para impedir el ataque de fagocitos humanos (Lancefield, R C (1962) J Immunol 89 307-313) La bacteria persiste en el tejido infectado hasta que se producen anticuerpos contra la molécula M Los anticuerpos de tipo específico a la proteína M son capaces de reversar el efecto antifagocítico de la molécula y permitir la liberación del organismo invasor

Las proteínas M son unos de los factores claves de virulencia de los [ESTREPTOCOCCUS PYOGENES,] debido a su involucramiento en la resistencia mediada a fagocitos (Kehoe, M A [(1991) Vacuna] 9 797-806) y su capacidad

de inducir respuestas inmunes a hospederos potencialmente dañosos por vía de su superantigenicidad y su capacidad para inducir respuestas anticorporales reactivas cruzadas del hospedero (Bisno, A L [(1991) [NEW ENGL J MED] 325 783-793, Froude et al (1989) [CUREZ] Top

[MICROBIOL INMUNOL] 145 5-26, Stollerman, G H (1991) Clin INMUNOL INMUNOPATOL] 61 131-142)

Sin embargo, existen obstáculos para utilizar las proteínas M intactas como vacunas. Los epitopos opsonicos de proteínas son extremadamente de tipo específico, dando como resultado una protección estrecha de tipo específico. Además, algunas proteínas M parecen contener epitopos que reaccionan en forma cruzada con tejidos del sujeto inmunizado, originando una respuesta auto inmune dañina (Ver por ejemplo, Dale, J L y Beached, G H (1982) J Exp Med 156 1165-1176, Dale, J L y Beached, G H (1985) [J]

[EXP] Med 161 113-122 , Baird, R W , Bronze, M S ,
 Drabs, W , Hill, H R , Veasey, L G y Dale, J L
 (1991) [J, IMMUN]146 3132-3137, Bronze, M S y Dale,
 J L (1993) J Immun 151 2820-2828, Cunningham, M W y
 Russell, S M (1983) Infect

42 531-538)

Las proteínas quiméricas que contienen tres dominios de unión de fibronectinas diferentes (FNDBS) derivadas de proteína de unión de fibronectina de *S DYS GALACTIAE* Y *stafilococcus aureus* se han expresado sobre la superficie de las células del [STAPH CARNOSUS] En el caso de una de estas proteínas, la inmunización intranasal con células de [STAPH][CARNOSUS] recombinantes vivas que expresan la proteína quimérica sobre su superficie da como resultado una respuesta anticorporal y mejorada al modelo inmunogeno presente dentro de la proteína de superficie quimérica

Una proteína de unión de plasmin GapC de una cepa del *streptococcus* grupo A se ha identificado previamente y

caracterizado, y se ha descrito su uso en terapias trombolíticas (Boyle, et al, patente U S No 5,237,050, Boyle, et al, patente U S No 5,328,996)

Sin embargo, hasta ahora, la capacidad protectora del GapC no se ha estudiado, ni tiene proteínas de GapC del STREPTOCOCCUS DYSGALACTIAE, STREPTOCOCCUS AGALACTIAE, streptococcus UBERIS streptococcus parauberis streptococcus INIAE se han aislado o caracterizado

RESUMEN DE LA INVENCION

De acuerdo con esto, la presente invención proporciona proteínas GapC novedosas de streptococcus y composiciones de vacunas que comprenden el mismo En una modalidad, la invención esta dirigida a un proteína GapC aislada seleccionada del grupo que consiste de (a) una proteína GapC de streptococcus dysgalactiae aislada que comprende la secuencia de aminoácido mostrada en las posiciones de aminoácido 1 a 336, inclusive, de las figuras [-1A-1B] (SEQ ID NO 4), (b) una proteína GapC de streptococcus sobre la agalactiae aislada que comprende

la secuencia de aminoácidos mostrada en las posiciones de aminoácido 1 a 336, inclusive, de las figuras 2A-2B (SEQ ID NO 6), (c) una proteína GapC de streptococcus uberis aislada que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en las posiciones de aminoácido 1 a 336, inclusive, de las figuras 3A-3B (SEQ ID NO 8, (d) una proteína GapC de streptococcus parauberis aislada que comprende la secuencia de aminoácido mostradas en las posiciones de aminoácidos 1 a 336, inclusive, de las figuras 4A-4B (SEQ ID NO 10), (e) una proteína GapC de streptococcus iniae aislada que comprende la frecuencia la secuencia de aminoácidos mostrada en las posiciones de aminoácido 1 a 336, inclusive, de las figuras 5A-5B (SEQ ID NO 12), Y (f) fragmentos inmunogenicos de de (a), (b), (c), (d), y (e) que comprenden al menos 5 amino ácidos

En otra modalidad la invención esta dirigida a polinucleótidos aislados que comprenden secuencias de codificación para las proteínas GapC descritas anteriormente, o complementos de esta, vectores recombinantes que comprenden los oplinucleótidos, células hospederas que comprenden los vectores recombinantes, y métodos de producción recombinante de proteína GapC

Aun en otra modalidad, la invención objeto se dirige a composiciones de vacuna que comprenden un vehículo farmacéuticamente aceptable y una proteína GapC como se describió anteriormente, los métodos de producción de las composiciones de vacuna, así como también los métodos de tratar o evitar infecciones de bacteria en sujetos vertebrados que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de la composición de vacuna La infección bacterial es, por ejemplo, una infección de streptococcus y puede causar mastitis Las composiciones de vacuna pueden comprimir adicionalmente un adyuvante

En otras modalidades, la invención esta dirigida a anticuerpos dirigidos contra las proteínas GapC aisladas Los anticuerpos pueden ser policlonales o monoclonales

Aún en otras modalidades adicionales la invención esta dirigida a métodos para detectar anticuerpos de streptococcus en muestras biológicas, que comprende (a)

hacer reaccionar la muestra biológica con una proteína GapC aislada bajo condiciones que permitan que dichos anticuerpos de streptococcus, cuando están presentes en la muestra biológica, se unan a una proteína GapC para formar un complejo anticuerpo/antígeno, (b) decretar la presencia o ausencia del complejo, detectando de esta manera la presencia o ausencia de los anticuerpos de streptococcus en dicha muestra

En otra modalidad, la invención esta dirigida a un método para detectar una proteína GapC en una muestra biológica, que comprende (a) hacer reaccionar la muestra con anticuerpos dirigidos contra la proteína GapC bajo condiciones las cuales le permitan los anticuerpos unirse a la proteína GapC, cuando está presente en la muestra, para formar complejos anticuerpo/antígeno, y (b) detectar la presencia o ausencia de los complejos, detectando de esta manera la presencia o ausencia de la proteína GapC en la muestra

En otra modalidad, la invención se dirige a un kit de ensayo de INMUNODIAGNOSTICO para detectar infecciones de streptococcus, el kit de ensayo comprende una proteína GapC, o anticuerpos dirigidos contra la proteína GapC e instrucciones para conducir el ensayo de inmunodiagnostico

Esta y otras modalidades de la invención objeto serán evidentes fácilmente para aquellos expertos en la técnica de la descripción que aparece aquí

BREVE DESCRIPCION DE LAS FIGURAS

Las figuras 1A-1B describen la secuencia de nucleótidos aislada y la secuencia de amino ácidos deducida del gen gapC para *S. dysgalactiae* (SEQ ID NO 3 y SEQ ID NO 4)

Las Figuras 2A-2B describen las secuencias de nucleótidos aisladas y las secuencias de amino ácidos

deducidas del gen gapC para *S. agalactiae* (SEQ ID NO 5 y SEQ ID NO 6)

Las Figuras 3A-3B describen la secuencia de nucleótidos aisladas y las secuencias de amino ácido deducidas del gen gapC para *S. uberis* (SEQ ID NO 7 y SEQ ID NO 8)

Las Figuras 4A-4B describen las secuencias de nucleótidos aisladas y las secuencias de amino ácidos deducida del gen [GAPC] para *S. parauberis* (SEQ ID NO 9 y SEQ ID NO 10)

Las Figuras 5A-5B describen la secuencia de nucleótidos aisladas y la secuencias de amino ácidos deducidas del gen [GAPC] para *S. [INIAE]* (SEQ ID NO 11 y SEQ ID NO 12)

Las Figuras 6A-6E no están un alinamiento de ADN cread mediante PileUp y mostrado por un software Pretty (un componente de paquete GCG Wisconsin, versión 10, suministrado por SeqWep sequence analysis package versión 1 1, de Canadian BIOINFORMATICS Resoure)

Las figuras describen las secuencias de nucleótidos aisladas de los genes GAPC del *S. dysgalactiae* ((DysGapC, Check 9344) *S. agalactiae* (AgalGapC Check 2895), *S. UBERIS* (UberGapC, Check 5966) *S. parauberis* (PuberGapC, Check 9672), y *S. [INIAE]* IniaeGapC, Check 990) Las secuencias previamente conocidas de *S. equisimilis* (SeqGapC, Check 5841), *S. pyogenes* (SpyGapC, Check 4037), y la proteína GAPDH de bovino [(BOVGAPC,) check 5059) también están incluidas La longitud y peso de los parámetros fueron iguales para todas las secuencias (1018 y 1 00, respectivamente) Los parámetros utilizados en la comparación de la secuencias de ADN fueron como sigue Pluralidad--2 00, Umbral-1, peso promedio-1 00, [AVEMATCH--1] 00, AvMisMatch-0,00, comparación de Símbolo tabla--pileupdna cmp, [COMPCHECLC--6876] , [GAPWEIGHT--5] , [GAPLENGTHWEIGHT--L] , PileUp MSF--1018

, TypO--N, [CHECLC--3804] En la figura, los guiones representan nucleótidos idénticos, los puntos representan vacíos introducidos por el soporte lógico utilizado para generar la grafica de alineamiento, y las tildes representan regiones no incluidas en el alineamiento total debido a diferencias en la longitud de las secuencias de genes

Las Figuras 7A-7B muestran una alineamiento de secuencia amino ácido creada por PileUp y mostrada por Pretty (como anteriormente) que describe las secuencias de amino ácido deducidas de las proteínas GapC del *S dysgalactiae* (DysGapC, Check 6731), *S AGALACTIAE* (AgalGapC Check 1229) *S uberis* (UberGapC, Check 8229), *S parauberis* [(PUBERGAPC,] Check 8889) y *S INIAE* (iniaegapc, Check 8785) Las secuencias previamente conocidas de *S equisimilis* (SeqGapC, Check 8252), *S PYOGENES* (SpyGapC, Check 6626), y proteína GAPDH de bovino [BOVGAPC,] check 8479) también están incluidas En las figuras, los guiones representan residuos de amino ácidos idénticos, los puntos representan vacíos introducidos mediante el soporte lógico PileUp y las

tildes representan regiones no incluidas en el alinamiento total debido a diferencias en la longitud de las secuencias de genes

La figura 8 muestra graficas de hidropatita Quite-Doolittle (promediadas sobre una ventana de 7), graficas de probabilidad superficie Emini, gráficas de flexibilidad de cadena [KARPLUS-SCHULZ] graficas de indice antigénico [JAMESON-WOLF] y gráficas de estructura secundaria tanto Chou-Fasman como Garnier-Osguthorpe-Robson para la proteína GapC aislada de *S. dysgalactiae*

La figura 9 muestra graficas de hidropatia Quite-Doolittle, (promediada sobre una ventana de 7), graficas de probabilidad de superficie Emini, graficas de flexibilidad de cadena [KARPLUS-SCHULZ] graficas de indice antihigiénico jameson-wolf, y graficas de estructuras secundaria tanto Chou-Fasman como Garnier-Osguthorpe-Robson para la proteína GapC aislada de *S. agalactiae*

La figura 10 muestra las graficas de hidropatia Quite-Doolittle, (promediada sobre una ventana de 7), las graficas de probabilidad de superficie Emini, las graficas de flexibilidad de cadena KARPLUS-SCHULZ], las grafica de indice antihigiénico Jameson-Wolf, y Las graficas de estructuras secundaria tanto de Chou-Fasman como de Garnier-Osguthorpe-Robson para proteína GapC aislada proveniente de S [UBERIS]

La figura 11 muestra una grafica de hidropatia Quite-Doolittle, (promediada sobre una ventana de 7, graficas de probabilidad de superficie Emini, grafica de flexibilidad de cadena [KARPLUS-SCHULZ], graficas de indice antihigiénico Jameson-Wolf, y unas graficas de estructuras secundaria Chou-Fasman y [GARNIER-OSGUTHORPE-ROBSON] para la proteína GapC aislada de S [PARAUBERIS]

La figura 12 muestra graficas de hidropatia kyte-doolittle, (promediada sobre una ventana de 7), graficas de probabilidad de superficie Emini, graficas de flexibilidad de cadena [KARPLUS-SCHULZ], graficas de

índice antihigiénico Jameson-Wolf, y unas graficas de estructuras secundaria Chou-Fasman y Garnier-Osguthorpe-Robson para la proteína GapC aislada de *S. infantiae*

La figura 13 es una representación diagramática de las gráficas de la estructura secundaria Chou-Fasman para la proteína GapC aislada proveniente de *S. dysgal*

La figura 14 es una representación diagramático de las graficas de estructura secundaria Chou-Fasman para la proteína GapC aislada de *S. agalactiae*

La figura 15 es una representación diagramatica de la grafica de estructura secundaria [CHOU-FASMAN] para la proteína GapC aislada de *S. [UBERIS]*

La figura 16 es una representación diagramática de la grafica de estructura secundaria Chou-Fasman para la proteína GapC aislada de *S. [PARAUBERIS]*

La figura 17 es una representación diagramática de la grafica de estructura secundaria chou-fasman para la proteína GapC aislada de *S. iniae*

La figura 18 muestra los resultados de de electroforesis de gel de SDS-poliacrilamida de *S. dysgalactiae* recombinante GapC producido en [E. COLI DE3] carril 1 marcadores de peso moleculares (20, 5-103 kDa, BioRad, Emeryville, CA), carril 2, *S. GapC* de *S. dysgalactiae* recombinante soluble purificado por [NI-NTA] cromatografía de de afinidad Los números sobre la izquierda de la figura indican las posiciones de los marcadores de peso molecular (en kDa)

La figura 19 es Una histografía que compara la actividad enzimática del plasmin bovino unido a células de *S. dysgalactiae* intactas, plasmino bovino unidas a proteína GapC de *S. dysgalactiae* recombinantes de afinidad purificada, células de *S. dysgalactiae* intactas, proteína GapC *S. dysgalactiae* recombinante de afinidad

purificada sola, y plasmin de bovino solo La actividad se determinó mediante un incremento en la absorbancia a [405 NM] seguido de la liberación de paranitroanilida proveniente de sustrato sintético [CROMOSINA-PL] (Roche Diagnostics, Laval, Québec, Canada

Los datos representan el significado de tres ensayos individuales

La figura 20 compara el cambio en porcentaje de los cuartos de las ubres infectadas con *S dysgalactiae* durante un periodo de siete días entre tres grupos experimentales (1) animales de control no vacunados, (2) animales vacunados con la proteína de unión Mig Fc, y (3) animales vacunados con GapC La infección se definió como recuperación [de > 500 CFU DEL *S DISGALACTIAE*] POR ML SECRESIONES DE LECHE

La figura 21 grafica el número máximo de *S dysgalactiae* en cualquier cuarto de ubre contra título de

anticuerpo anti-GapC de suero (expresado como el recíproco de la dilución que muestra actividad por enzima de los niveles de antecedentes) Los títulos anti-GapC de suero se mostraron por correlacionarse con el número máximo de [CFU/ML] recuperado de glándulas mamarias (D)= 0,74, según se determinó utilizando soporte lógico GraphPad Prism, v 2 01, de GraphPad Software, Inc, San Diego, CA)

La figura 22 grafica el numero acumulado de cuartos mamarios infectados contra titulo de anticuerpo de suero (de nuevo expresado como el recíproco de la dilución que muestra actividad por enzima de los niveles de antecedentes) Una fuerte correlación entre el nivel de anticuerpos del suero de anticuerpo anti-GapC y el numero total de cuartos infectados se observó

La figura 23 ilustra la recuperación de bacterias provenientes de animales inmunizados con GapC, los puntos de los datos son graficados como medio de recuperaciones bacteriales/leche ml vs tiempo (en días de post-

demanda) En la figura, los diamantes (- + -) representan animales no vacunados, los cuadros (- -) representan animales con título bajo (es decir animales que exhiben la respuesta más pobre contra GapC en términos de título de anticuerpo), y los triángulos representan animales con alto título (es decir) los animales restantes)

La figura 24 muestra la recuperación de *S dysgalactiae* de animales inmunizados co GapC, traficados como el porcentaje de cuartos mamarios infectados contra tiempo en días de post demanda En la figura, las barras punteadas representan animales no vacunados, las barras sombreadas cruzadas representan animales con bajo título (es decir animales que exhiben la respuesta más pobre contra GapC en términos de título de anticuerpo) y las barras sombreadas representan animales de alto título (es decir los animales restantes)

La figura 25 describe la respuesta inflamatoria observada a la infección con *S dysgalactiae* graficada como conteo de células somática media (SCC) para cada

grupo experimental contra el tiempo en días de post desafío En la figura, los diamantes (- + -) representan cuartos no demandados, sin vacunar los cuadrados (-N-) representan animales demandados, sin vacunar, los triángulos (A-) representan animales demandados vacunados con Mig, y las x s representan animales demandados vacunados con gAPc

La figura 26 ilustra conteo de células somáticas por cuarto mamario un día uno post demanda En la figura, la bar representa el medio para cada grupo Los cuadrados (- «-) representan animales no vacunados, los triángulos (- ^-) representan animales vacunados con GapC y los triángulos invertidos (-S-) representan animales vacunados con Mig

La figura 27 describe los conteos de células somáticas de animales de alto título inmunizados con GapC no demandados (es decir los cuatro animales que exhiben los títulos de anticuerpos mayores de los ocho animales en el grupo particular) durante siete días post demanda,

traficados como el LOG, del conteo de células somática medio/leche ml contra el tiempo en días post demanda

Los diamantes (- + -) representan animales no demandados, no vacunados, los cuadrados (--) representan animales demandados no vacunados, los triángulos (-A-) representan animales demandados vacunados con GapC

DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

La practica de la presente invención empleara, a menos que se indique otra cosa, técnicas convencionales de biología molecular, microbiología, tecnología de AND recombinante, e inmunológica, las cuales están dentro del experto de la técnica

Tales técnicas son explicadas completamente en la literatura Ver, por ejemplo, Sambrook, Fritsch & Maniatis, Molecular Cloning A Laboratory Manual, Vols

I, II and III, Second Edition (1989) , Perbal, B , A Practical Guide to Molecular Cloning (1984), the series, Methods In Enzymology(S Colowick and N Kaplan eds , Academic Press, Inc), [and Handbook of Experimental Immunology, Vols I-IV (D M Weir and C C blackwell eds , 1986, Blackwell Scientific Publications)

Las siguientes abreviaturas de amino ácidos se utilizan a lo largo del texto Alanina Ala (A) Arginina Arg (R) Asparagina Asn (N) ácido Aspartico Asp (D) Cisteina Cys (C) Glutamina Gln (Q) ácido Glutámico Glu (E) Glicina Gly (G) Histidina His (H) Isoleucina Ile (I) Leucina Leu (L) Lisina Lys (K) Metionina Met (M) Fenilalanina Phe (F) Prolina Pro (P) Serina Ser (S) Treonina Thr (T) Triptofano Trp (W) Tirosina Tyr (Y) Valina Val (V) A

1 Definiciones para describir la presente invención, los siguientes terminos se emplearan y pretenden estar definidos como se ha indicado adelante

Se debe notar que, como se utiliza en la especificación y en las reivindicaciones finales, las formas singulares "un" y "el" incluyen referentes plurales a menos que el contenido claramente dictamine otra cosa

Así, por ejemplo, la referencia a "proteína GapC de estreptococo" incluye una mezcla de dos o mas proteínas, y similares

Los terminos "PROTEINA] [GAPC"] [Y "PROTEINA DE UNION PLASMIN GAPC"] (utilizadas hache de manera intercambiable) o una secuencia de nucleótidos que codifica el mismo, esta destinada a una proteína o a una secuencia de nucleótidos, respectivamente, la cual se deriva del gen GapC encontrado en una variedad de especies de Estreptococo, incluyendo, sin limitación ciertas cepas de un estreptococo del grupo A (Lottenbery, R , et al , (1987) Infect Immun 55 1914-1918) La secuencia de nucleótidos de los genes de estreptococo [GAPC] representativos, y la secuencia de amino ácidos

correspondiente de las proteínas GapC codificadas mediante estos genes, se describen en las figuras. En particular, las figuras 1 hasta 5 describen las secuencias de nucleótidos aislados y las secuencias de amino ácidos aisladas de *S. dysgalactiae* (SEQ ID NO 3 y SEQ ID NO 4, respectivamente), *S. agalactiae* (SEQ ID NO 5 y SEQ ID NO 6, respectivamente), *[S.] uberis* (SEQ ID NO 7 y SEQ ID NO 8, respectivamente), *[S.] parauberis* (SEQ ID NO 9 y SEQ ID NO 10, respectivamente), y *[S.] INIAE* (SEQ ID NO 11 y SEQ ID NO 12, respectivamente). Sin embargo, una proteína GapC como se definió hace no está limitada a las secuencias descritas como subtipos de cada una de estas especies de *Streptococcus* que son conocidas y las variaciones de las proteínas GapC se presentarán entre ellas.

Los genes representativos de *S. dysgalactiae*, *S. agalactiae*, *S. uberis*, y *S. parauberis*, se encuentran en plásmidos pET15bgapC (ATCC No), pMF521c, (ATCC NO), pMF521A, (ATCC NO), pMF521d, (ATCC NO), y [PMF521E, (ATCC NO), respectivamente.

Adicionalmente, la proteína derivada o secuencias de nucleótidos no necesitan ser físicamente derivadas del gen descrito anteriormente, pero se pueden generar de cualquier manera, incluyendo por ejemplo, síntesis química, aislamiento (por ejemplo, de *S. dysgalactiae*) o mediante producción recombinante, basados en la información suministrada. Adicionalmente, el término está destinado a proteínas que tienen secuencias de amino ácidos sustancialmente homologas (como se definió adelante) con secuencias de amino ácidos contagiosos codificadas por los genes, que muestran actividad inmunológica y/o de unión de plasmin.

Así, los términos destinados a secuencias de longitud completa, así como también inmunogénicas, como truncadas y parciales, y análogos activos y formas precursoras de las proteínas también se incluyen en el término. Fragmentos de nucleótidos del gen que incluyen al menos aproximadamente 8 pares de bases contiguas, mas preferiblemente al menos aproximadamente 10 -20 pares de base contiguos, y mas preferiblemente al menos aproximadamente 25 a 50, o mas, pares de bases contiguos.

del gen, o cualquier entero entre estos valores. Tales fragmentos son útiles como sondas y en métodos de diagnóstico, discutidos más completamente adelante.

Los términos también incluyen aquellas formas que poseen, así como también le faltan, una secuencia de señal, si tal esta presente, así como también secuencias de ácido nucleico que codifican para estas. Adicionalmente, el término pretende formas de proteínas GapC a las cuales les falta la región y anclaje de membrana, y proteínas que codifican secuencias de ácido nucleico con tales supresiones. Tales supresiones pueden ser deseables en sistemas que no suministran la secreción de la proteína. Adicionalmente, los dominios de unión de plasmin de las proteínas, pueden estar o no presentes. Así, por ejemplo, si la proteína de unión de plasmin GapC se utilizara para purificar plasmin, el dominio de unión de plasmin será generalmente retenido. Si la proteína se utiliza en composiciones de vacuna, estarán presentes los epitopos inmunogénicos que pueden o no incluir el dominio de unión de plasmin.

Los términos también incluyen proteínas en la forma neutra o en la forma de sales de adición básica o ácida dependiendo del modo de preparación. Tales sales de adición ácida pueden involucrar grupos aminos libres y las sales básicas pueden estar formadas con carboxilos libres. Las sales de adición básica y ácida farmacéuticamente aceptables se discuten adicionalmente adelante. Además, las proteínas se pueden modificar mediante combinación con otros materiales biológicos tales como lípidos (ambos de ocurrencia natural con la molécula u otros lípidos que no destruyen la actividad inmunológica) y los sacáridos, o mediante modificación de cadena lateral, tales como hace ilación de grupos amino, fosforilación de cadenas laterales hidroxilo, oxidación de grupos sulfidrilo, glicosilación de residuos de amino ácido, así como también otras modificaciones de secuencias primarias codificadas.

El término por lo tanto pretende las supresiones, adiciones y sustituciones a la secuencia, en tanto las funciones de polipeptido producen una respuesta inmunológica como se definió hace. A este respecto, las

sustituciones particularmente preferidas serán de manera general de naturaleza conservadora, es decir aquellas sustituciones que tienen lugar dentro de una familia de amino ácidos. Por ejemplo, los amino ácidos se dividen generalmente en cuatro familias (1) aspartato y glutamato ácido, (2) lisina, arginina, histidina básicas, (3) alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptofano-no polares, y (4) glicina, asparagina, glutamina, cistina, serina, treonina, tirosina, sin carga polar. Fenilalanina, triptofano, y tirosina son algunas veces clasificadas como amino ácidos aromáticos. Por ejemplo, es razonablemente predecible que un reemplazo aislado de leucina con isoleucina o valina, o vice versa, un aspartato con glutamato o vice versa, una treonina con serina o vice versa, o un reemplazo conservador similar de un amino ácido con un amino ácido estructuralmente relacionado, no tendrá un mayor efecto sobre la actividad biológica.

Las proteínas que tienen sustancialmente la misma secuencia de amino ácido como la molécula de referencia,

pero poseen menos sustituciones de amino ácido que no afecta sustancialmente la inmunogenicidad y/o la afinidad de unión de plasmin de la proteína están por lo tanto dentro de la definición del polipéptido de referencia

Por ejemplo, el polipeptido de interés puede incluir hasta aproximadamente 5-10 sustituciones de amino ácido conservador o no conservador, y aun hasta aproximadamente 15-25 o 20-50 sustituciones de amino ácido conservador o no conservador, o cualquier entero dentro de estos valores, en tanto que la función deseada de la molécula permanece intacta

A este respecto, las proteínas GapC aisladas provenientes de estreptococo exhiben varias regiones variables en sus secuencias de amino ácido, localizadas en posiciones de 62 a 81, 102 a 112, 165 a 172, 248 a 271, y 286 a 305. Estas regiones, las cuales en *S dysgalactiae*, *S AGALACTIAE*, *S UBERIS*, *S [PARAUBERIS AND S INIAE]* exhiben de 1 a 9 sustituciones de amino ácido, y son probablemente las responsables de

variaciones sin afectar de manera sustancial la función inmunogenica o enzimatica

Similarmente, las sustituciones que ocurren en el dominio de unión de la transmembrana, si están presentes, y la secuencia de señal, si están presentes, normalmente no afecta la inmunogenicidad. Uno de los expertos en la técnica podía fácilmente determinar otras regiones de moléculas de interés que pueden tolerar cambio mediante referencia a las graficas de estructura de proteína mostradas en las Figuras 8-17.

El termino "proteína GapC de estreptococo" pretende una proteína de unión de plasmin GapC, como se definió anteriormente, derivada de especies de streptococcus que producen los mismos, incluyendo, pero no limitados a [S] dysgalactiae, S [AGALACTIAE, S UBERIS, S PARAUBERIS, Y S INIAE] Por ejemplo, una "proteína de S dysgalactiae GapC" es una proteína de unión de plasmin GapC como se definió anteriormente, derivada de S dysgalactiae. Similarmente, una "proteína de S agalactiae GapC" esta

destinada a una proteína de unión [GAPC] derivada de [S]
agalactiae

Las proteínas tipo "Silvestre" o "nativas" o los polipéptidos que se refieren a proteínas o polipéptidos aislados de la fuente en la cual la proteína ocurre naturalmente. Los polipéptidos "Recombinantes" se refieren a polipéptidos producidos mediante técnicas de ADN recombinantes, es decir, producidos de células transformadas mediante una construcción de ADN exógeno que codifica el polipéptido deseado. Los polipeptidos "Sintéticos" son aquellos preparados mediante síntesis química.

Una proteína "aislada" o un polipeptido es una proteína o una molécula de polipéptido separada y discreta del organismo total con el cual la molécula se encuentra en la naturaleza, o una proteína o polipeptido desprovisto, en todo o en parte, de secuencias normalmente asociadas con esta en naturaleza, o una secuencia, como existe en la naturaleza, pero que tiene

secuencias heterologas (como se define adelante) en asocio con estas

El termino ["FUNCIONALMENTE EQUIVALENTE"] esta destinado a la secuencia de amino ácidos de la proteína de unión plasmin GAPC que es una que elicitará una respuesta inmunológica sustancialmente equivalente o mejorada, como se definió anteriormente, comparada con la respuesta elicitada por la proteína de unión plasmin GapC que tiene identidad con la proteína de unión de plasmin GapC de referencia, o una porción inmunogenica de esta

El termino "epitopo" se refiere al sitio sobre un antígeno o haptén al cual responden células B y/o células T específicas El termino también se utiliza intercambiabilmente con "determinante ANTIGENICO" o "sitio determinante antihigiénico" Los anticuerpos que reconocen el mismo epitopo se pueden identificar en un inmunoensayo simple que muestra la capacidad de un anticuerpo para bloquear la unión de otro anticuerpo a un antígeno objetivo

Los terminos proteina o polipeptido "inmunogenico" se refieren a una secuencia de amino acido que elicit una respuesta inmunologica como se describio hace. Una proteina "inmunogenica" o polipeptido, como se utilizo hace, incluye la secuencia de longitud completa de la proteina de union de plasmin GapC en cuestion, con o sin la senal de secuencia, dominio de anclaje de membrana y/o dominio de union de plasmin, análogos de este, o fragmentos inmunogenicos de este. Por "fragmento inmunogenico" se quiere significar un fragmento de proteina de union de plasmin GapC que incluye uno o mas epitopos y así elicit la respuesta inmunologica descrita anteriormente.

Tales fragmentos se pueden identificar utilizando cualquier numero de técnicas de mapeo de epitopo, bien conocidas en el arte. Ver, por ejemplo, epitopo en Methods in Molecular Biology, Vol 66 (Glenn E Morris, Ed, 1996) Humana Press, Totowa, New Jersey. Por ejemplo, los epitopos lineales se pueden determinar mediante por ejemplo, numeros grandes concurrentemente sintetizados de

peptidos sobre soportes sólidos, los peptidos corresponden a porciones de la molécula de proteína y hacen reaccionar los peptidos con anticuerpos mientras que los peptidos están aun unidos a los soportes. Tales técnicas son conocidas en el arte y se describen en, por ejemplo, la Patente U S No 4,708,871, Geysen et al (1984) Proc Natl Acad Sci USA 81 3998-4002, Geysen et al (1986) [MOLEC] Immunol 23 709-715. Similarmente, los epitopos [CONFORMACIONALES] son rapidamente identificados al determinar la conformacion espacial de los amino ácidos tales como, por ejemplo, cristalografia de rayos X y resonancia magnética nuclear bi-dimensional.

Ver, por ejemplo, Protocolos de Mapeo de Epitopo, supra. Las regiones antigénicas de las proteínas también se pueden identificar utilizando antigenicidad estándar y graficas de hidropatia, tales como aquellas calculadas utilizando, por ejemplo, el programa de soporte lógico versión Omega 1.0 disponible de Oxford Molecular Group. Este programa de computador emplea el metodo Hopp/Woods, Hopp et al, Proc [NATL] Acad Sci USA (1981) 78 3824-3828 para determinar perfiles de antigenicidad, y las técnicas Quate-Doolittle, Quate et al, [J MOL BIOL] (1982) 157 105-132 para graficas de hidropatia. Las

figuras 8 a 12 describen hache los perfiles [KYTE-DOOLITTLE] para proteínas representativas comprendida por la invención

Los fragmentos inmunogenicos, para los propósitos de la presente invención, usualmente incluirán al menos 3 amino ácidos, preferiblemente al menos 5 amino ácidos, mas preferiblemente al menos cerca de 10-15 amino ácidos, y mas preferiblemente 25 a mas amino ácidos, de la molécula de proteína de unión plasmin GapC Padre No existe un limite critico superior a la longitud del fragmento, que pueda comprender cercanamente la longitud completa de la secuencia de la proteína, o aun una proteína de fusión que comprenda dos o mas epitopos de GapC

UNA "COMPOSICION INMUNOGENICA" Es una composición que comprende una molécula antihigiénica donde el administrador de la composición es un sujeto que resulta del desarrollo en el sujeto de una respuesta inmune humoral y/o celular a la molécula de anfigeno de interés

Por "composición de subunidad de vacunas" se significa una composición que contiene al menos un polipeptido inmunogenico, pero no todos los antígenos, derivados u homologos a un antígeno de un patógeno de interés. Tal composición es sustancialmente libre de células intactas de patógeno o partículas, o el lisado de tales células o partículas. Así, una "composición de subunidad de vacunas" se prepara de, al menos, parcialmente, polipeptidos inmunogenicos purificados (preferiblemente sustancialmente purificados) del patógeno, o analogo recombinantes de este. Una composición de subunidad de vacuna puede comprender el antígeno o antígenos subunitarios de interés sustancialmente libres de otros antígenos o polipeptidos del patógeno.

Por "FARMACEUTICAMENTE ACEPTABLE" o "farmacológicamente aceptable" se significa un material que no es biológicamente o de ninguna otra forma indeseable, es decir, el material se puede administrar a un individuo en una formulación o composición sin originarle efectos biológicos indeseables o interactuar

de una manera deleterea con ninguno de los componentes de la composición en la cual esta contenida

Una "respuesta inmunologica" a una composición o vacuna es el desarrollo en el huesped de una respuesta immune mediada por células y/o anticuerpos a la composición o vacuna de interés Usualmente, una "RESPUESTA INMUNOLOGICA" incluye pero no esta limitada a uno o mas de los siguientes efectos la produccion de anticuerpos, células B, células ayudantes T, células supresoras T, [Y/O] células T citotoxicas y/o células T Y5, dirigidas especificamente a un anfitrión o antígenos incluidos en la composición o vacuna de interés Preferiblemente, el huésped mostrara una respuesta inmunologica terapéutica o protectora tal que la resistencia de la glándula mamaria a la nueva infección se mejorara [Y/O] la severidad clínica de la enfermedad se reducirá Tal protección se demostrara bien sea mediante la reduccion o la falta de síntomas normalmente mostrados por un huésped infectado [Y/O] un tiempo de recuperación mas rápido

Por "inmunización de ácido nucleico" se significa la introducción de una molécula de ácido nucleico que codifica uno o mas antígenos seleccionados en una célula huésped, para expresión en vivo de un antígeno, antígenos, un epítipo, o epítopos. La molécula de ácido nucleico se puede introducir directamente a un sujeto receptor, tal como mediante inyección, inhalación, administración oral, intranasal o por mucosa, o similar, o se puede introducir ex vivo, dentro de células que se han removido del huésped. En el caso final, las células transformadas son reintroducidas en el sujeto donde se puede montar una respuesta inmune contra el antígeno codificado por la molécula de ácido nucleico.

El término "TRATAMIENTO" como se utiliza aquí se refiere a (1) la prevención de la infección o reinfección (profilaxis), o (2) la reducción o eliminación de los síntomas de la enfermedad de interés (terapia).

Por "mastitis" se significa una inflamación de la glándula mamaria en mamíferos, que incluídas en vacas,

corderos, cabras, cochinillas, yeguas, y similares, causadas por la presencia de [S] uberis La infección se manifiesta a si misma mediante la infiltración de células fagocíticas en la glándula Generalmente, se reconocen 4 tipos clínicos de mastitis (1) peraguda, asociada con hinchamiento, calor, dolor, y secreción anormal en la glándula y acompañada por fiebre y otros signos de disturbio sistémico, tales como depresión marcada, pulso rápido debil, ojos hundidos, debilidad y anorexia completa, (2) aguda, con cambios en glandulas similares a aquellos anteriores pero donde la fiebre, anorexia y depresión son ligeros a moderados, (3) subaguda, donde no existen cambios sistemicos mostrados y los cambios en la glándula y su secreción son menos marcados y (4) [SUBCLINICA,] donde la reaccion inflamatoria es detectable solo mediante ensayos estandar para mastitis

Los ensayos estandar para la deteccion de mastitis incluyen pero no están limitados a, el Ensayo de Mastitis de California, el Ensayo de Mastitis de Wisconsin, el Ensayo de Nagasa, conteo electrónico de células y conteo de células somáticas para detectar un contenido

persistentemente alto de células sanguíneas blancas en la leche. En general, un conteo de células somáticas de aproximadamente 300,000 a aproximadamente 500,000 células por ml o mayor, en la leche indica la presencia de la infección. Así, una vacuna se considera efectiva en el tratamiento y/o prevención de mastitis cuando, por ejemplo, el conteo de células somáticas en la leche se retiene por debajo de aproximadamente 500,000 células por ml. Para una discusión de mastitis y diagnóstico de esta, ver por ejemplo, el manual veterinario Merck A HANDBOOK OF DIAGNOSIS, THERAPY, AND DISEASE PREVENTION AND CONTROL] for the [VETERINARIAN, MERCK] y Co, Rahway, New Jersey, 1991.

Por los términos de "sujeto", "vertebrado", y "sujeto vertebrado" se significa cualquier miembro del subfilum cordata, que incluye, sin limitación, mamíferos tales como rebaños de vacas, ovejas, cerdos, cabras, caballos y humanos, animales domésticos tales como perros y gatos, y pájaros, incluyendo pájaros domésticos, silvestres y de juego tales como pollos y gallinas incluyendo gallinas, pavos y otros pájaros gallináceos, y

peces El término no denota una edad particular Así, tanto animales adultos como recién nacidos, así como fetos, pretenden estar cubiertos

Una molécula de "ácido nucleico" puede incluir, pero no está limitado a, secuencias procarióticas, [MRNA] eucarióticas, cADN de [MRNA] eucariótico, secuencias genómicas de ADN provenientes de ADN eucariótico (por ejemplo mamíferos), y secuencias de ADN aun sintéticas El término también captura secuencias que incluyen cualquiera de los análogos de base de ADN y ARN

Una molécula de ácido nucleico "AISLADA" es una molécula de ácido nucleico separada y discreta del organismo completo con el cual la molécula se encuentra en la naturaleza, o una molécula de ácido nucleico desprovista, en todo o en parte, de secuencias normalmente asociadas con esta en la naturaleza, o una secuencia, como esta existe en la naturaleza, pero que tiene secuencias heterólogas (como se define adelante) en asociación con esta El término "aislado" en el contexto de

un poli nucleótido pretende que el poli nucleótido se aislé del cromosoma con el cual esta normalmente asociado, y se aísla de la secuencia genómica completa en la cual esta ocurre normalmente

"poli nucleótido purificado" se refiere a un poli nucleótido de interés o fragmento de este que es esencialmente libre, por ejemplo, contiene menos de aproximadamente 50%, preferiblemente menos de aproximadamente 70%, y mas preferiblemente menos de aproximadamente 90%, de la proteína con la cual el poli nucleótido esta naturalmente asociado Las técnicas para purificar nucleótidos de interés son bien conocidos en el arte e incluyen, por ejemplo, la disrupcion de las células que contienen el poli nucleótido con un agente [CAOTROPIC] y la separación de el o los poli nucleótidos y las proteínas mediante cromatografía de intercambio de iones, cromatografía de afinidad y sedimentación de acuerdo con la densidad

Una "secuencia de codificación" o una "codificación de secuencia de nucleótidos" de una proteína particular, es una secuencia de nucleótidos que se transcribe y se traduce en un polipéptido in vitro o in vivo cuando se ubica bajo el control de los elementos regulatorios apropiados. Los límites de la secuencia de codificación se determinan mediante un codón de inicio en el terminal 5' (amino) y un codón de parada de traducción en el terminal 3' (carboxi). Una secuencia de codificación puede incluir, pero no está limitada a, secuencias procarióticas, cADN de eucarióticas [MRNA], secuencias de ADN genómico provenientes de ADN eucariótico (por ejemplo, mamíferos), y aun secuencias de ADN sintético. Una secuencia de terminación de transcripción se localizará usualmente aguas arriba a la secuencia de codificación. Una secuencia "complementaria" es una en la cual la base nitrogenada en una posición de nucleótido dada es el complemento de la base nitrogenada que aparece en la misma posición en la secuencia de referencia. Para ilustrar, el complemento de adenosina es tirosina, y vice versa, similarmente, la citosina es complementaria a la guanina, y vice versa, de esta manera, el complemento de la secuencia de referencia 5'-ATGCTGA-3' sería 5'-TACGACT-3'.

Una secuencia "tipo silvestre" o "nativa", como se utiliza aquí, se refiere a secuencias que codifican polipeptidos que son esencialmente como se encuentran en la naturaleza, por ejemplo, las secuencias que codifican la proteína de GapC de *S. dysgalactiae* descritas en las figuras [IA-IB] (SEQ ID NO 4)

"Recombinante" como se utiliza aquí describe una molécula de ácido nucleico que significa un poli nucleótido de [CDNA] genómico, semisintético, o de origen sintético el cual, por virtud de su origen o manipulación (1) no está asociado con todo o una porción del poli nucleótido con la cual este se asocia en la naturaleza, y/o (2) está ligado a un poli nucleótido diferente de aquel al que está ligado en la naturaleza. El término "recombinante" como se utiliza con respecto a una proteína o polipeptido significa un polipeptido producido por la expresión de un poli nucleótido recombinante.

"células hospederas recombinantes", "células hospederas", "células", "líneas celulares", "cultivos de células", y otros de tales terminos denotan microorganismos procarioticos o líneas de células eucarioticas cultivadas como entidades unicelulares, son utilizadas intercambiabilmente, y se refieren a células que pueden ser, o han sido utilizadas como receptores para vectores recombinantes u otros ADN de transferencia, e incluyen la progenie de la célula original la cual ha sido [TRANSFECTADA] Se entiende que la progenie de una célula parental simple puede no necesariamente ser completamente identica en morfologia o en genómica o complemento de AND total al padre original, debido a mutación accidental o deliberada

La progénie de la célula parental que es suficientemente similar al padre a ser caracterizado por la propiedad relevante, tal como la presencia de una secuencia de nucleótidos que codifica un péptido deseado, se incluyen en la progénie pretendida mediante esta definición y son cubiertas por los terminos anteriores

La "homologa" se refiere al porcentaje de identidad entre dos poli nucleótidos o dos porciones de polipéptido. Los dos ADN, o dos secuencias de polipeptido son "substancialmente homologas" una a la otra cuando las secuencias exhiben al menos aproximadamente 80%-85%, preferiblemente al menos 90%, y mas preferiblemente al menos aproximadamente 95%-98% de la identidad de secuencia sobre una longitud definida de las moléculas. Como se utiliza aquí, sustancialmente homologos también se refiere a secuencias que muestran identidad completa al ADN especificado o a la secuencia de polipeptido.

En general, "la identidad" se refiere a un nucleótido-a-nucleótido exacto o a una correspondencia de amino ácido-a-amino ácido de dos secuencias de poli nucleótidos o polipeptidos, respectivamente. La identidad porcentual se puede determinar mediante una comparación directa de la información de secuencia entre dos moléculas al alinear las secuencias, contar el numero exacto de parejas entre las dos secuencias alineadas, dividir por longitud la secuencia mas corta, y multiplicar el resultado por 100. Programas de computador

fácilmente disponibles se pueden utilizar para ayudar en el análisis, tal como ALIGN, Dallo, M O en Atlas of Protein Sequence and Structure M O [DAYHOFF ED ,] 5 Suppl 3 [353-] 358, National biomedical Research Foundation, Washington, DC, que adapta el algoritmo de homologa local de Smith and Waterman [(1981) AVANCES EN APPL MATH] 2 482-489 para analysis de péptidos Programas para determinar la identidad de secuencias de nucleótidos están disponibles en la Wisconsin Sequence Analysis Package, Versión 8 (disponible de Genetics Computer Group, Madison, WI) por ejemplo, los programas BESTFIT, FASTA y GAP, que también confían en el algoritmo Smith y Waterman Estos programas son fácilmente utilizados con parámetros por defecto recomendados por el fabricante y descritos en el Wisconsin Sequence Analysis Package referido anteriormente Por ejemplo, el porcentaje de identidad de una secuencia de nucleótido particular a una secuencia de referencia se puede determinar utilizando el algoritmo de homologa de Smith and Waterman con una mesa de marcador por defecto y una pena de vacío de seis posiciones de nucleótido

Otro metodo de establecer identidad porcentual en el contexto de la presente invención es utilizar el paquete MPSRCH de programas con derecho de autor de la Universidad de Edinburgo, desarrollado por John F Collins y Shane S [STURROK,] y distribuido por IntelliGenetics, Inc (Mountain View, CA) De este conjunto de paquetes el algoritmo Smith-Waterman se puede emplear donde se utilizan parametros por defecto para la mesa de conteo (por ejemplo, pena abierta de espacio de 12, pena de extencion de espacio de uno, y un espacio de seis) De los datos generados el valor "coincidente" refleja "identidad de secuencia" Otros programas adecuados para calcular la identidad porcentual o similaridad entre secuencias son generalmente conocidos en la técnica, por ejemplo, otro programa de alineamiento es BLAST, utilizado con parámetros por defecto Por ejemplo, BLASTN y BLASTP que se pueden utilizar usando los siguientes parametros por defecto código genetico = estandar, filtro = ninguno, hebra = ambas, corte = 60, esperado = 10, Matriz = [BLOSUM62], Descripciones = 50 secuencias, tipo por = ALTO MARCADOR, Bases de datos = no redundantes, GenBank + EMBL + DDBJ + PDB + GenBank CDS translaciones + proteina Suiza + Spupdate + PIR Detalles de estos programas se pueden encontrar en la siguiente

direccion de internet [http //www \[NCBI \] nhn \[GOV/CGI-BIN/BLAST \]](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/CGI-BIN/BLAST)

Alternativamente, la homologia se puede determinar mediante la hibridizacion de poli nucleótidos bajo condiciones que forman duplex estables entre regiones homologas, seguida por la digestion con nucleasa o nucleasas especificas de hebra simple, y la determinación del tamaño de los fragmentos digeridos. Las secuencias de ADN que son sustancialmente homologas se pueden identificar en un experimento de hibridizacion Southern bajo, por ejemplo, condiciones severas como se definio para el sistema en particular. Definir las condiciones de hibridizacion apropiadas esta dentro del experto en la técnica. Ver, por ejemplo, Sambrook et al , supra, clonación de ADN, supra, hibridizacion de ácido nucleico, supra.

Por el termino "VARIANTE DEGENERADA" se destina a un poli nucleótido que contiene cambios en la secuencia de ácido nucleico de este, que codifica un polipeptido que

tiene la misma secuencia de amino ácidos que el polipeptido codificado por el poli nucleótido del cual se deriva la variante degenerada

Las técnicas para determinar la "similaridad" de la secuencia de amino ácidos son bien conocidas en la técnica

En general, "similaridad" significa la comparación exacta de amino ácido a amino ácido de dos o mas polipeptidos en el sitio apropiado, donde los amino ácidos son identicos o poseen propiedades químicas y/o físicas similares tales como carga o hidrofobicidad La así llamada "SIMILARIDAD PORCENTUAL" & APOS, entonces se puede determinar entre las secuencias de polipeptido comparadas

Las técnicas para determinar la identidad de secuencia de ácido nucleico y amino ácido que también son conocidas en el arte e incluyen determinar la secuencia

de nucleótidos del [MRNA] para aquel gen (usualmente por vía de un intermedio de cADN) y determinar la secuencia de amino ácido codificada por medio de este, y comparar esto con una segunda secuencia de amino ácido. En general, la "identidad" se refiere a una correspondencia exacta nucleótido a nucleótido o amino ácido a amino ácido de dos polinucleótidos o secuencias de polipéptido, respectivamente.

Una región "heterologa" de una construcción de ADN es un segmento identificable de ADN dentro o unido a otra molécula de ADN que no se encuentra en asociación con la otra molécula en la naturaleza. De esta forma, cuando la región heterologa que codifica un gen de bacteria, el gen usualmente será flanqueado por un ADN que no flanquea el gen de bacteria en el genoma de la fuente de bacteria.

Otro ejemplo de la secuencia codificadora heterologa es una construcción donde la secuencia de codificación misma no se encuentra en la naturaleza (por ejemplo, secuencias sintéticas que tienen codones diferentes del

gen nativo) Los eventos rotacionales de ocurrencia por variación alelica o naturales no generan una región heterologa de ADN, como se utiliza aquí

Un "vector" es un replicon, tal como un plasmido, fago, o cosmido, al cual otro segmento de ADN se puede unir con el fin de traer la replicación del segmento unido. Un vector es capaz de transferir secuencias de genes a células objetivo (por ejemplo, vectores de plasmido bacteriano, vectores virales, vectores no virales, portadores particulados, y liposomas)

Tipicamente, el término "construcción de vector", "vector de expresión", "vector de expresión de gen", "vector de suministro de gen", "vector de transferencia de gen", y "cartucho de expresión" se refieren todos a un montaje que es capaz de dirigir la expresión de la secuencia o gen de interés

Así, los terminos incluyen vehículos de clonación y expresión, así como también vectores virales

Estos montajes incluyen un promotor que esta operablemente ligado a las secuencias o genes de interés. Otros elementos de control pueden estar presentes también. Los cartuchos de expresión descritos aquí pueden estar contenidos dentro de la construcción del plasmido. Adicionalmente a los componentes del cartucho de expresión, la construcción del plasmido también puede incluir un origen bacterial de replicación, uno o mas marcadores seleccionables, una señal que le permite a la construcción del plasmido existir como un ADN de hebra simple (por ejemplo, un origen [M13] de replicacion), un sitio de clonación multiple, y un origen "mamifero" de replicacion (por ejemplo, un origen SV40 o adenovirus de replicacion).

Los "ELEMENTOS DE CONTROL" del ADN se refieren colectivamente a los promotores de transcripción, elementos mejoradores de transcripción, secuencias de

terminacion de transcripción, secuencias de poliadenilacion (localizadas en 3' hasta el codon de parada de traduccion), secuencias para optimizacion de la iniciación de la traducción (localizadas en 5' hasta la secuencia de codificacion), secuencias de terminacion de traduccion, dominios regulatorios corriente arriba, sitios de unión de ribosomas y similares, que colectivamente suministran la transcripción y traducción de una secuencia codificante en una célula hospedera Ver por ejemplo McCaughan et al

(1995) PNAS USA 92 5431-5435, [KOCHETOV] et al
(1998) FEBS Letts 440 351-355 No todas las secuencias de control necesitan siempre estar presentes en un vector recombinante hasta tanto el gen deseado sea capaz de ser transcrito y traducido

"Operablemente ligado" se refiere a una disposición de elementos en donde los componentes así descritos se configuran con el fin de desarrollar su función usual De esta manera, los elementos de control operablemente

ligados a una secuencia de codificación son capaces de efectuar la expresión de la secuencia de codificación. Los elementos de control no necesitan ser contiguos con la secuencia de codificación, en tanto ellos funcionen para dirigir la expresión de este. De esta manera, por ejemplo, interviniendo secuencias transcritas todavía sin traducir se pueden presentar entre un promotor y la secuencia de codificación y el promotor puede aun ser considerado "operablemente ligado" a la secuencia de codificación.

Similarmente, "ELEMENTOS DE CONTROL COMPATIBLES CON LA EXPRESION EN UN SUJETO" son aquellos que son capaces de efectuar la expresión de la secuencia de codificación en ese sujeto.

Un elemento de control, tal como un promotor, "dirige la transcripción" de una secuencia de codificación en una célula cuando la polimerasa de ARN se ligara al promotor y se transcribiera a la secuencia de codificación.

en el [MARN], la cual es entonces traducida en el polipeptido codificado por la secuencia de codificación

Una "célula hospedera" es una célula que se ha transformado o es capaz de transformación, mediante una molécula de ácido nucleico exógeno

Una célula ha sido "TRANSFORMADA" por ADN exógeno cuando tal ADN exógeno se ha introducido dentro de la membrana celular. El ADN exógeno puede estar o no integrado (covalentemente ligado) dentro del ADN cromosómico confeccionando el genoma de la célula. En procariotes y levaduras, por ejemplo, el ADN exógeno se puede mantener en un elemento episomal, tal como un plasmido. Con respecto a las células eucarióticas, una célula establemente transformada es aquella en la cual el ADN exógeno se ha integrado en el cromosoma de tal forma que este se hereda por las células hijas a través de la replicación del cromosoma. Esta estabilidad se demuestra por la capacidad de la célula eucariótica de establecer

líneas o clones celulares comprendidos de una población de células hijas que contienen el ADN exógeno

Como se utiliza aquí, una "muestra biológica" se refiere a una muestra de tejido o fluido aislado proveniente de un sujeto, que incluye pero no está limitado a, por ejemplo, sangre, plasma, suero, materia fecal, orina, medula espinal, bilis, fluido espinal, fluido linfático, muestras de piel, secreciones externas de la piel, tractos respiratorio, intestinal, y genitourinario, lágrimas, saliva, leche, células de sangre, órganos, biopsias y también muestras de constituyentes de cultivos de células [IN VITRO] que incluyen pero no están limitados a medios acondicionados que resultan del crecimiento de células y tejidos en medios de cultivo, por ejemplo, células recombinantes, y componentes de células

Como se utiliza aquí, el término "etiqueta" y "etiqueta detectable" se refiere a una molécula capaz de detección, que incluye, pero no está limitado a, isótopos

radioactivos, elementos fluorescentes, quimo luminiscentes, enzimas, substratos de enzimas, cofactores de enzima, inhibidores de enzima, cromoforos, tintes, iones metálicos, soles metálicos, ligandos (por ejemplo, biotina o haptens) y similares El termino "ELEMENTO FLUORESCENTE" se refiere a una sustancia o a una porción de esta que es capaz de exhibir fluorescencia en el rango detectable Ejemplos particulares de etiquetas que se pueden utilizar bajo la invención incluyen fluorescina, rodamina, [DANSILIL], umbeliferona, rojo Texas, luminol, NADPH y [A- β -GALACTOSIDASE]

2 MODOS DE LLEVAR A CABO LA INVENCION

Antes de describir la presente invención en detalle, se debe entender que la invención no esta limitada a unas formulaciones particulares o parametros de proceso como tales podrian, por supuesto, variar También se debe entender que la terminología utilizada aquí es para el propósito de describir modalidades particulares de la invención solamente, y no están destinadas a limitarla

Aunque un número de métodos y materiales similares o equivalentes a aquellos descritos aquí se pueden utilizar en la práctica de la presente invención, los materiales los materiales y los métodos preferidos se describen aquí

Parte central de la presente invención es el descubrimiento de que la proteína GapC es capaz de elicitar una respuesta inmune en un sujeto vertebrado. En particular, los genes para la proteína GapC en *S. dysgalactiae*, *S. agalactiae* [S] *uberis*, [S] *parauberis*, y *S. iniae* se han aislado, secuenciado y caracterizado, y las secuencias de proteínas para aquellos genes se han deducido de esta. Las secuencias de ADN completas para aquellos genes y las correspondientes secuencias de aminoácidos se muestran en las figuras 1 hasta 5.

Como se describió en los ejemplos, el gen GapC de longitud completa de *S. dysgalactiae*, descrito en las posiciones de nucleótidos 1-1011, inclusive, de las figuras 1A-1B, codifican la proteína GapC de longitud completa del *S. dysgalactiae* de 336 aminoácidos, mostrados como aminoácidos 1-336, inclusive, de la misma

figura El GapC del *S. dysgalactiae* tiene un peso molecular predicho de aproximadamente 36 kDa

(Calculado utilizando el programa Peptide Sort de el GCG Winsconsin Package, versión, suministrado por SeqWeb sequence analysis package, versión 1.1 de Canadian Bioinformatics Resource) Similarmente, los genes GapC aislados de *S. agalactiae*, *S. uberis*, *S. parauberis* y *S. iniae* se describen en las figuras 2 hasta 5, cada uno codifica una proteína GapC de longitud completa de 336 aminoácidos, también cada uno tiene un peso molecular predicho de aproximadamente 36 kDa Ninguna de las secuencias de longitud completa parecen influir un péptido de señal o una región de anclaje de membrana

Las figuras 6 y 7 muestran un alineamiento de ADN y de secuencias de aminoácido, respectivamente, que muestran regiones de homología y variabilidad que existen entre proteínas GapC de varias cepas de *Streptococcus*. En particular, varias regiones variables se localizan en posiciones de aminoácido 62 a 81, 102 a 112, 165 a 172, 248 a 271, y 286 a 305. Tales regiones variables son típicamente más susceptibles a cambiar. De esta manera, los cambios de aminoácido en estas regiones, tales como

sustituciones, adiciones, y supresiones, son probablemente toleradas

Las figuras 8 a 12 muestran graficas de lo siguiente para cada una de las proteínas GapC de la presente invención hidropatia Kyte-Doolittle, promediadas sobre una ventana de 7, probabilidad de superficie de acuerdo con Emini, flexibilidad de cadena de acuerdo con Karplus-Schulz, índice de antigenicidad de acuerdo con Jameson-Wolf, estructura secundaria de acuerdo con Garnier-Osguthorpe-Robson, estructura secundaria de acuerdo con Chou-Fasman, y sitios de glicolización predichos

Las figuras 13 hasta 17 muestran graficas de estructura secundarias de acuerdo con Chou-Fasman para cada una de las proteínas GapC de la presente invención. Un experto en la técnica puede fácilmente utilizar la información presentada en las figuras 8 a 17 para determinar regiones inmunogenicas en la proteína para uso en composiciones de vacuna

La proteína de unión de plasmin GapC de *S. dysgalactiae*, los fragmentos inmunogenicos de esta o las proteínas quiméricas que incluyen lo mismo, se pueden

suministrar en composiciones de subunidad de vacuna. Adicionalmente al uso en composiciones de vacuna, las proteínas y los anticuerpos de este se pueden utilizar como reactivos de diagnóstico para detectar la presencia de infección en un sujeto vertebrado. Similarmente, los genes que codifican las proteínas se pueden clonar y utilizar para designar sondas para detectar genes homólogos aislados en otras cepas bacteriales. Por ejemplo, los fragmentos que comprenden al menos 15-20 nucleótidos, más preferiblemente al menos aproximadamente 20-50, y más preferiblemente aproximadamente 60-100 nucleótidos, o cualquier entero entre estos valores, encontrarán uso en estas modalidades.

Las composiciones de vacuna de la presente invención se pueden utilizar para tratar o evitar una amplia variedad de infecciones bacteriales en sujetos vertebrados. Por ejemplo, composiciones revacuna que incluyen proteína de unión de plasmina GapC de *S. dysgalactiae*, *S. uberis*, *S. parauberis*, *S. iniae* y/o *Streptococcus* del grupo B (GBS) tales como *S. agalactiae*, también se pueden utilizar para tratar infecciones de *Streptococcus* en sujetos vertebrados que se originan por estos u otras especies. En particular, *S. uberis* y

S agalactiae son patógenos bacteriales comunes asociados con mastitis en bovinos, equinos, ovinos, y especies de cabras. Adicionalmente, los *Streptococcus* de grupo B, tales como *S agalactiae*, son conocidos por originar numerosas otras infecciones en vertebrados, que incluyen septicemia, meningitis, bacteremia, impetigo, artritis, infecciones del tracto urinario, abscesos, abortos espontáneos etc. De esta manera, las composiciones de vacuna que contienen *Streptococcus* de proteínas de unión a plasmina GapC encontraran uso en el tratamiento y/o prevención de una amplia variedad de infecciones de *Streptococcus*.

Similarmente, las proteínas unidas a plasmina GapC derivadas de otros géneros de bacterias tales como *Estafilococos*, *Micobacterias*, *Escherichia*, *Seudomonas*, *Nocardia*, *Pasteurella*, *Clostridium* y *Mycoplasma* encontraran uso para tratar infecciones bacteriales causadas por especies que pertenecen a estos géneros. Así, será fácilmente evidente que las proteínas de unión a plasmina GapC se pueden utilizar para tratar o evitar una amplia variedad de infecciones bacteriales en numerosas especies.

Las proteínas de unión a plasmin GapC de streptococcus de la presente invención se pueden utilizar en composiciones de vacuna bien sean solas o en combinación con otros antígenos bacteriales, fungos, virales o protozoarios. Estos antígenos se pueden suministrar separadamente o aun como proteínas de fusión que comprenden uno o mas epítopos de una proteína de unión de plasmin GapC fusionada a uno o mas de estos antígenos. Por ejemplo, otras proteínas inmunogénicas de *S. uberis* tales como el factor CAMP, cápsula de ácido hialurónico, y hialuronidasa, proteína similar a R y activador plasminogénico, se puede administrar con la proteína GapC. Adicionalmente, las proteínas inmunogénicas de otros organismos involucrados en mastitis, tales como las del género *Estafilococos*, *Corinabacterium*, *Seudomonas*, *Nocardia*, *Clostridium*, *Micobacterium*, *Mycoplasma*, *Pasteurella*, *Prototeca*, otros *Streptococcus*, Bacterias Coliformes, así como también Levaduras, se pueden administrar junto con las proteínas de unión de plasmin GapC descritas aquí para proporcionar un amplio espectro de protección. Así, por ejemplo, las proteínas inmunogénicas de *Estafilococos Aureus*, *Str Agalactiae*, *Str Dysgalactiae*, *Str Zooepidemicus*, *Corinebacterium Piogenes*, *Seudomonas Aeruginosa*, *Nocardia*

Asteroides, Clostridium Peifringens, Esqueriquia Coli, Eiterobacter Aerogenes, y Clebsiela Spp se pueden suministrar con las proteínas de unión de plasmin GapC de la presente invención

Adicionalmente, las proteínas GapC de diferentes especies de streptococcus se pueden utilizar juntas en las composiciones de vacunas de la presente invención En esta modalidad, las proteínas GapC múltiples se pueden suministrar como proteínas de fusión o como antígenos discretos en las mismas o diferentes composiciones de vacuna

La producción de proteína de unión de plasmin GapC La s proteínas de unión de plasmin descritas anteriormente y los fragmentos activos, análogos y proteínas quiméricas derivadas de las mismas, se pueden producir mediante una variedad de métodos

Específicamente, las proteínas de unión de plasmin GapC se pueden aislar directamente de bacterias que expresan las mismas Esto generalmente se cumple al preparar primero un extracto crudo con componentes celulares faltantes y varias proteínas extrañas Las

proteínas deseadas pueden ser adicionalmente purificadas de la fracción de lisado de célula por, por ejemplo, cromatografía de columna, HPCL, técnicas inmunoabsorventes u otros medios convencionales bien conocidos en el arte

Más particularmente, las técnicas para aislar las proteínas de unión de plasmin GapC se han descrito. Por ejemplo, la proteína GapC del S. Piogenes se purificó de un extracto de célula mediante precipitación con sulfato de amonio, seguido por dos ciclos de cromatografía a través de columna Mono FPLC, y ciclos simples a través de superosa 12 FPLC, y columnas HPLC TSK-fenol (Pancholi, V y Fischetti, VA (1992) JExptl Med 76 415-426). Otras técnicas involucran el uso de una columna de afinidad NAD + -Agarosa para purificar GapC proveniente de protoplastos lisados de la cepa de S. Piogenes 64/14 (WINRAM, SB y Lottenber, R (1996) Microbiol 142 2311-2320).

Alternativamente, las proteínas se pueden producir recombinantemente como se describen aquí. Como se explicó anteriormente, estos productos recombinantes pueden tomar la forma de secuencias de proteína parciales, secuencias

de longitud completa, formas precursoras que incluyen secuencias de señal, formas maduras sin señales, o aun proteínas de fusión (por ejemplo, con un líder apropiado para el huésped recombinante, o con otra secuencia de antigena subunitaria para streptococcus u otro patógeno)

En una modalidad de la presente invención las proteínas GapC se fusionan a una etiqueta de Histidina, producida mediante medios de recombinación, y son entonces purificadas de una fracción de lisado de célula que utilizan cromatografía de afinidad Ver por ejemplo 1A-E infra

Las proteínas de unión de plasmin GapC de la presente invención se pueden aislar con base en la habilidad de los productos de proteína a unir plasmin, utilizar ensayos de unión de plasmin como se describe adelante Ver, por ejemplo, el método descrito en la sección F 3 del ejemplo 1, infra Así, las librerías de genes se pueden construir y los clones resultantes utilizados para transformar una célula de huésped apropiada Las colonias se pueden unir y tamizar para clones que tienen actividad de unión a plasmin

Las colonias también se pueden tamizar utilizando suero Policlonal o anticuerpos monoclonales a la proteína de unión de plasmin

Alternativamente, una vez se determina las secuencias de aminoácidos, las sondas de oligonucleotidos que contienen los codotes para una porción de las secuencias de aminoácidos determinadas se pueden preparar y utilizar para tamizar a librerías genómicas o de cADN para genes que codifican las proteínas sujeto Las estrategias básicas para preparar son las de oligonucleotidos librerías de ADN, así como también su tamizado mediante hibridización de ácido nucleico, son bien conocidas por aquellos expertos en la técnica, ver por ejemplo, clonación de ADN Vol 11, supra, Hibridización de ácido nucleico, supra, síntesis de oligonucleotidos, supra, Sambrook et al, supra Una vez se ha identificado la biblioteca tamizada mediante hibridación positiva, se puede confirmar mediante análisis de enzima de restricción y secuenciación de ADN que el inserto de la biblioteca particular contiene genes u homólogos de proteínas de unión de plasmin GapC de estos Los genes pueden ser adicionalmente aislados utilizando técnicas estándar y, si se desea,

aproximaciones PCR o enzimas de restricción empleadas para suprimir porción de la secuencia de longitud completa

Similarmente, los genes se pueden aislar directamente de las bacterias utilizando técnicas conocidas, tales como extracción de fenol y secuencias adicionalmente manipuladas para producir cualquier alteración deseada Ver, por ejemplo, Sambrook et al , supra para una descripción de técnicas utilizadas para obtener un ADN aislado

Alternativamente, las secuencias de ADN que codifican las proteínas de interés se pueden preparar sintéticamente en lugar de ser clonadas Las secuencias de ADN se pueden diseñar con los codotes apropiados para la secuencia de aminoácido particular En general, uno seleccionara los colores preferidos para el huésped pretendido si la secuencia se utilizara para expresión La secuencia completa se ensambla de oligonucleotidos traslapantes preparados mediante métodos estándar y ensamblados en una secuencia de codificación completa Ver, por ejemplo, Edge (1981) Nature 292 756, Nambair Et

al (1984) Science 223 1299, Jay et al (1984) J Biol Chem 259 6311

Una vez las secuencias de codificación para las proteínas deseadas se han preparado o aislado, ellas se pueden clonar en cualquier vector o replicon adecuado. Numerosos vectores de clonación son conocidos por aquellos expertos en la técnica, y la selección de los vectores de clonación apropiados es una materia de escogencia. Ejemplos de vectores de ADN recombinantes para la clonación de células huésped que ellos pueden transformar incluyen el Bacteriófago K E coli, pBR322 (E coli), pACYC177 (E coli), PKT230 (bacteria gram ion negativa), PGV1106 (bacteria gram ion negativa), PLAFRL (bacteria gram ion negativa), pME290 (bacterias gram negativas diferentes de E coli), pHV14 (E coli y bacilos subtilis), pBD9 (bacilos), pIJ61 (Esteptomices), pUC6 (estreptomices), YIp5 (sacaromices), YCPL9 (sacaromices) y virus de papiloma bovino (células de mamíferos).

Ver, Sambrook et al, supra, clonación de ADN, supra, B perbal, supra

El gen se puede ubicar bajo control de un promotor, sitio de unión de ribosoma (para expresión bacteriana), y, opcionalmente, un operador (colectivamente dominado aquí como elementos de "control"), de tal forma que la secuencia de ADN que codifica la proteína deseada se transcribe en un ARN en la célula huésped transformada mediante un vector que contiene esta construcción de expresión. La secuencia de expresión puede o no puede contener un péptido de señal a una secuencia líder. Si se incluye una secuencia de señal, esta puede ser nativa, secuencia homologa, o secuencia heterologa.

Por ejemplo, la secuencia de señal para la proteína de unión de plasmina GapC de *S. dysgalactiae* puede ser utilizada para secreción de esta, como pueden ser un número de secuencias de señal bien conocidas en el arte.

Las secuencias líderes se pueden remover mediante huéspedes en procesos post-transduccionales. Ver, por ejemplo, la Patente U S Nos 4, 431,739, 4, 425,437, 4, 338,397.

Otras secuencias regulatorias también pueden ser deseables las cuales permiten la regulación de la

expresión de las secuencias de proteína con relación al crecimiento de las células huésped. Las secuencias regulatorias son conocidas por aquellos expertos en la técnica, y los ejemplos incluyen aquellos que originan la expresión de un gen a ser prendido o pagado en respuesta a un estímulo químico o físico, que incluye la presencia de un compuesto regulatorio. Otros tipos de elementos regulatorios también pueden estar presentes en el vector, por ejemplo, secuencias mejoradoras.

Las secuencias de control y otras secuencias reguladoras pueden estar ligadas a las secuencias codificantes antes de la inserción en un vector, tal como los vectores de clonación descritos anteriormente.

Alternativamente, la secuencia de codificación se puede clonar directamente en un vector de expresión que ya contiene unas secuencias de control y un sitio de restricción apropiado.

En algunos casos puede ser necesario modificar la secuencia de codificación de tal forma que esta se pueda unir a las secuencias de control con la orientación apropiada, es decir mantener una estructura de lectura

adecuada También puede ser deseable producir mutantes o análogos de la proteína de unión de plasmin GapC Los mutantes o los análogos se pueden preparar mediante la supresión de una porción de la secuencia que codifica la proteína, mediante la inserción de una secuencia y/o una sustitución de uno o más nucleótidos dentro de la secuencia Las técnicas para modificar las secuencias de nucleótidos, tales como la mutagenesis de sitio dirigido, se describen en, por ejemplo, Sambrook et al , supra, DNA cloning, supra, Nucleic acid hybriditation, supra

El vector de expresión es entonces utilizado para transformar una célula huésped apropiada Un numero de líneas de células de mamíferos son conocidas en la técnica e incluye líneas de células inmortalizadas disponibles de la Colección de Cultivos Tipo Americano (ATTC), tales como pero no limitados a, células de ovario de hámster Chino (CHO), células Hela, células de riñón de hámster nene, (BHK), células de riñón de mono (COS), células de carcinoma epato celular humano (por ejemplo, Hep G2), células de riñón bovino Madin-Darby "MDBK", así como también otras Similarmente, los huéspedes bacteriales tales como E coli, bacillus subtilis, y streptococcus SPP, encontraran uso con las presentes

construcciones de expresión Los huéspedes de levaduras útiles en la presente invención incluyen Inter Alia, *saccharomyces cerevisiae*, *Candida Albicans*, *Candida Maltosa*, *Hansenula polimorfa*, *Kluiveromises BR BR fragilis*, *Kluiveromises lactis*, *pichia guillerimondi*, *pichia pastoris*, *esquizosaccharomises pompe* y *yarrowia lipolitica* Las células de insectos para uso con vectores de expresión de baculovirus incluyen, *interalia*, *aedes aegypti*, *autographa californica*, *bombix mori*, *drosophila melanogaster*, *esplotoptera frugiperda*, y *tricoplusia ni*

Dependiendo del sistema de expresión y el huésped seleccionado, las proteínas de la presente invención se producen mediante células huésped transformadas con un vector de expresión descrito anteriormente bajo condiciones por medio de las cuales la proteína de interés se expresa La proteína se aísla entonces de las células huésped y se purifican Si el sistema de expresión secreta la proteína en un medio de crecimiento, la proteína se puede purificar directamente del medio Si la proteína no se secreta, esta se aísla de los lisados de célula La selección de las condiciones de crecimiento apropiadas y los métodos de recuperación están dentro del experto de la técnica

Las proteínas de la presente invención también se pueden producir por síntesis química tal como síntesis de péptido de fase sólida, utilizando secuencias de aminoácido conocidas o secuencias de aminoácido derivadas de las secuencias de ADN de los genes de interés. Tales métodos son conocidos por aquellos expertos en la técnica. Ver, por ejemplo, J. M. Stewart y J. D. Young, síntesis de péptido de fase sólida, segunda Ed., Pierce Chemical Co., Rockford, IL (1984) y G. Barany y R.

B. Merrifield, (SHE) peptides analysis, synthesis, biology, editors E. Gross and J. Meienhofer, Vol. 2, Academic Press, New York, (1980), pp. 3-254, for solid phase peptide synthesis techniques, and M. Bodansky, Principles of peptides synthesis, Springer, Berlin (1984) and Gross and J. Meienhofer, Eds., The Peptides Analysis Synthesis, Biology, supra, Vol. 1, for classical solution Synthesis. La síntesis química de péptidos puede ser preferiblemente de un fragmento pequeño del antígeno en cuestión es capaz de elevar la respuesta inmunológica en el sujeto de interés.

Las proteínas de unión de plasmin GapC de la presente invención o sus fragmentos, se pueden utilizar para producir anticuerpos tanto policlonales como monoclonales. Si los anticuerpos policlonales son deseados, un mamífero seleccionado, (por ejemplo ratón, conejo, cabra, caballo, etc) se inmuniza con un antígeno de la presente invención, o su fragmento, o un antígeno mutado. El suero del animal inmunizado se recolecta y se trata de acuerdo con procedimientos conocidos. Ver, por ejemplo, Jurgens et al (1985) J Chrom 348 363-370. Si el suero que contiene anticuerpos policlonales se utiliza, los anticuerpos policlonales se pueden purificar mediante cromatografía de inmuno afinidad, utilizando procedimientos conocidos.

Los anticuerpos monoclonales para las proteínas de unión plasmin GapC y a los fragmentos de esta, pueden ser fácilmente producidos por un experto en la técnica. La metodología general para la elaboración de anticuerpos monoclonales al utilizar tecnología de hibridoma es bien conocida. Las líneas celulares de producción de anticuerpos inmortales se pueden crear mediante fusión de células, y también por otras técnicas tales como la transformación directa de linfocitos B con ADN.

oncogénico, o la transformación con virus de Epstein-Barr Ver, por ejemplo, M Schreier et al , Hybridoma Techniques (1980), Hammmering et al , Monoclonal Antibodies And T cells Hybridomas (1981), Kennett et al , Monoclonal antibodies (1980), see also U S Patent Nos 4, 341, 761, 4, 399, 121, 4, 427, 783, 4, 444, 887, 4, 452, 570, 4, 466, 917, 4, 472, 500, 4, 491, 632, and 4, 493, 890 Los paneles de los anticuerpos monoclonales producidos contra las proteínas de unión de plasmin GapC, o los fragmentos de estos, se pueden tamizar para varias propiedades, es decir para isótopo, epítopo, afinidad, etc

Los anticuerpos monoclonales son útiles en la purificación, utilizando técnicas de inmuno afinidad, de los antígenos individuales contra los que ellos están dirigidos Ambos anticuerpos policlonales y monoclonales también se pueden utilizar para inmunización pasiva o se pueden combinar con preparaciones de vacuna subunitaria para mejorar la respuesta inmune Los anticuerpos policlonales y monoclonales también son útiles para propósitos de diagnóstico

Las formulaciones de vacuna y la administración Las proteínas de unión de plasmin GapC de la presente invención se pueden formular en composiciones de vacuna, bien sean solas o en combinación con otros antígenos, para uso en inmunización de sujetos como se describe adelante Los métodos de preparación de tales formulaciones se describen en, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania, 18 edición, 1990 Típicamente, las vacunas de la presente invención se preparan como inyectables, bien sea como soluciones líquidas o suspensiones Las formas sólidas adecuadas para la solución o suspensión en vehículos líquidos antes de la inyección también se pueden preparar La preparación también se puede emulsificar o encapsular el ingrediente activo en vehículos de liposoma El ingrediente activo inmunogénico se mezcla generalmente con un vehículo compatible farmacéutico, tal como, por ejemplo, agua, solución salina, dextrosa, glicerol, etanol, o similar, y combinaciones de estos Además, si se desea, el vehículo puede contener cantidades menores de sustancias auxiliares tales como agentes de humectación y emulsificación y agentes de amortiguamiento de pH

Los adyuvantes que mejoran la efectividad de la vacuna también se pueden agregar a la formulación. Los adyuvantes pueden incluir por ejemplo, dipéptido Muramilo, avridina, hidróxido de aluminio, bromuro de dimetildioctadecil amonio (DDA), aceites, emulsiones de aceite en agua, Saponinas, Citocinas, y otras sustancias conocidas en el arte.

La proteína de unión de plasmin GapC se puede ligar a un portador con el fin de incrementar la inmunogenicidad de este. Los portadores adecuados incluyen macromoléculas grandes, lentamente metabolizadas tales como proteínas, que incluyen Sero albúminas, Hemocianina de linfa hueco de llave, moléculas de inmuno globulina, tiroglobulina, ovalmumina, y otras proteínas bien conocidas por aquellos expertos en la técnica, polisacáridos tales como sefariosa, azarosa, celulosa, glóbulos de celulosa y similares, aminoácidos poliméricos tales como ácido poli glutámico, polilisina, y similares, copolímeros de aminoácido, y partículas de virus inactivas.

Las proteínas de unión de plasmin GapC se pueden utilizar en su forma nativa o en su contenido de grupo

funcional pueden ser modificadas por, por ejemplo, succinilación de residuos de lisina o reacción con Cistiolactona. Un grupo de sulfridilo también se puede incorporar en el portado (o anfígeno) por, por ejemplo, reacción de funciones amino con 2-iminotiolano o el ester de N-hidroxisuccinimida de 3-(4-ditiopropil propionato). Los portadores adecuados también se pueden modificar para incorporar brazos espaciadores (tales como hexametileno diamina u otras moléculas bifuncionales de similar tamaño) para unión a los pépticos.

Otros portadores adecuados para las proteínas de unión de plasmin GapC de la presente invención incluyen polipéptidos VP6 de rotavirus, o fragmentos funcionales de este, como se describe en la Patente U S No 5, 071, 651. También son útiles un producto de fusión de una proteína viral y los inmunogenos sujetos hechos por métodos descritos en la Patente U S No 4, 722, 840. Aun otros portadores adecuados incluyen células, tales como, linfocitos, en razón a que la presentación en esta forma remeda el modo natural de presentación en el sujeto, el cual da origen al estado inmunizado. Alternativamente, las proteínas de la presente invención se pueden acoplar a eritrocitos, preferiblemente

eritrocitos del propio sujeto Los métodos de acoplar pépticos a proteínas o células son conocidos por aquellos expertos en la técnica

Adicionalmente, las proteínas de unión de plasmin GapC (o complejos de estas) se pueden formular en composiciones de vacuna bien sea en forma neutra o de sal Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las sales de adición ácida (formadas con los grupos libres amino de los polipéptidos activos) y que se forman con ácidos inorgánicos tales como, por ejemplo, ácido clorhídrico o fosfórico, o ácidos orgánicos tales como ácido acético, axalico, tartarico, mandelico, y similares Las sales formadas de grupos carboxilos libres también se pueden derivar de bases inorgánicas tales como, por ejemplo, sodio, potasio, amonio, calcio o hidróxidos férricos, o base orgánicas tales como isopropilamina, trimetilamina, 2-etilamino etanol, histidina, procaína, y similares

Las formulaciones de vacuna contendrán una "cantidad terapéuticamente efectiva" del ingrediente activo, que es, una cantidad capaz de elicitar una respuesta inmune en un sujeto al cual la composición se administra En el

tratamiento o prevención de la mastitis, por ejemplo, una "cantidad terapéuticamente efectiva" sería preferiblemente una cantidad que mejora la resistencia de la glándula mamaria a la nueva infección y/o produce la severidad clínica d la enfermedad

Tal protección se demostrara bien sea mediante la reducción o falta de síntomas normalmente mostrados por un huésped infectado, una rápida recuperación en el tiempo y/o conteo de células somáticas disminuido en la leche proveniente del cuarto infectado Por ejemplo, la capacidad de la composición de retener o traer el conteo de células somáticas (SCC) en la leche por debajo de aproximadamente 500 000 células por ml, el valor del umbral establecido por la Federación Lechera Internacional, por encima de la cual, los animales son considerados por que tienen mastitis clínica, será indicativo de los efectos terapéuticos

La cantidad exacta se determina fácilmente por un experto en la técnica utilizando ensayos estándar

La concentración de proteína de unión de plasmin GapC típicamente variara desde aproximadamente 1% a

aproximadamente 95% (w/w) de la composición, o a un mayor o menor si es apropiado. Con las presentes formulaciones de vacuna, de 5 a 500 ug de ingrediente activo por ml de solución inyectada deberá ser adecuado para elevar una respuesta inmunológica cuando se administra una dosis de 1 a 3 ml por animal.

Para inmunizar un sujeto, la vacuna es generalmente administrada parenteralmente, usualmente por inyección intra muscular. Otros modos de administración, sin embargo, tal como inyección subcutánea, intra peritoneal, e intra venosa también son aceptables. La cantidad a ser administrada depende del animal a ser tratado, la capacidad del sistema inmune del animal a sintetizar anticuerpos, y el grado de protección deseado. Las dosis efectivas pueden ser fácilmente establecidas por un conocedor medio de la técnica a través de ensayos de rutina que establecen las curvas de respuesta de dosis. El sujeto se inmuniza mediante la administración de la vacuna en al menos una dosis, y preferiblemente dos dosis. Más aun, el animal puede ser administrado con tantas dosis como se requiera para mantener un estado de inmunidad a la infección.

Las formulaciones adicionales de vacuna que son adecuadas para otros modelos de administración incluyen supositorios y, en algunos casos formulaciones de aerosol, intranasales u orales, y formulaciones de liberación sostenida. Para los supositorios, la composición del vehículo incluirá ligadores tradicionales y portadores, tales como, polialcalino glicoles, o triglicéridos. Tales supositorios se pueden formar de mezclas que contiene el ingrediente activo en el rango de aproximadamente 0.5% a aproximadamente 10% (w/w), preferiblemente aproximadamente 1% a aproximadamente 2%. Vehículos orales incluyen tales excipientes normalmente empleados como, por ejemplo, grados farmacéuticos de manitol, lactosa, almidón, magnesio, estearato, celulosa de sacarina de sodio, carbonato de magnesio, y similares. Estas composiciones de vacuna oral se pueden tomar en la forma de soluciones, suspensiones, tabletas, píldoras, cápsulas, formulaciones de liberación sostenida, o polvos, y contienen desde aproximadamente 10% a aproximadamente 95% del ingrediente activo, preferiblemente aproximadamente 25% a aproximadamente 70%.

Las formulaciones intranasales incluirán usualmente vehículos que no causan irritación a la mucosa nasal ni perturban significativamente la función ciliar. Los diluyentes tales como el agua, la solución salina acuosa u otras sustancias conocidas se pueden emplear en la invención objeto. Las formulaciones nasales también pueden contener preservativos tales como, pero no limitados a, clorobutanol y cloruro de benzalconio. Un tenso activo puede estar presente para mejorar la absorción de las proteínas del sujeto por medio de la mucosa nasal.

Las formulaciones de liberación controlada o sostenida son hechas al incorporar la proteína dentro de portadores o vehículos tales como liposomas, polímeros impermeables no reabsorvibles tales como copolímeros de etileno-vinil acetato, copolímeros de hitrel (G), copolímeros hinchables tales como hidrogeles, o copolímeros reabsorvibles tales como colágeno y ciertos poliácidos o poliésteres tales como aquellos utilizados para hacer suturas reabsorvibles. Las proteínas de unión de plasmin GapC se pueden suministrar utilizando mini bombas implantadas, bien conocidas en el arte.

Las proteínas de unión de plasmin GapC de la invención presente se pueden administrar por vía de un virus portador que expresa el mismo. Los virus portadores que encontraran uso con la invención presente incluyen pero no están limitados a la vaccinia y otros pox virus, adenovirus y virus herpes. Por vía de ejemplo, los virus vaccinia recombinantes que expresan las proteínas novedosas se pueden construir como sigue. El ADN que codifica a una proteína particular se inserta primero en el vector apropiado de tal forma que este es adyacente al promotor de vaccinia y flanquea las secuencias de ADN de la vaccinia, tal como la secuencia que codifica la timidita quinaza (TK). El vector se utiliza entonces para transfectar células que son simultáneamente infectadas con vaccinia. La recombinación homologa sirve para insertar el promotor de vaccinia mas el gen que codifica la proteína presente en el genoma viral. El TIC resultante recombinante se puede seleccionar al cultivar las células en la presencia de 5-bromodeoxiuridina y recoger las placas virales resistentes a esta.

Una ruta alternativa de administración involucra la terapia de gen o la inmunización de ácido nucleico. Así, las secuencias de nucleótido (y los elementos

regulatorios que lo acompañan) que codifican las proteínas de unión de plasmin GapC sujeto se pueden administrar directamente al sujeto para traducción in vivo de esta Alternativamente, la transferencia de genes se puede lograr al transfectar las células o los tejidos del sujeto ex vivo y reintroducir el material transformado dentro del huésped El ADN se puede introducir directamente en el organismo huésped, es decir mediante inyección (ver Publicación Internacional No WO/90/1192, y WOLF et al (1990) Science 247 1465-1468) La transferencia del gen mediado por liposoma también se puede lograr utilizando métodos conocidos

Ver, por ejemplo, Hazinslci et al (1991) Am J respir Cell mol Boil 4 206-209, Brigham et al (1989) Am J Med SCI 298 278-281, Canonico et al (1991) Clin Res 39 219A, and Nabel et al (1990) Science 249 1285-1288 los agentes objetivo, tales como anticuerpos dirigidos contra la superficie de los antígenos expresados sobre los tipos de células específicos, pueden ser covalentemente conjugados a la superficie liposomal de tal forma que el ácido nucleico se puede suministrar a tejidos específicos y a células susceptibles de infección

Los ensayos de diagnósticos como se explico anteriormente, Las proteínas de unión de plasmin GapC de la presente invención se pueden utilizar como diagnósticos para detectar la presencia de anticuerpos reactivos del estreptococo por ejemplo, S dysgalactiae, en una muestra biológica con el fin de determinar la presencia de infección de estreptococo Por ejemplo, la presencia de anticuerpos reactiva con proteína de unión de plasmin GapC se puede detectar utilizando electroforesis estándar y técnicas de inmunodiagnostico, que incluyen inmuno ensayos tales como competición, reacción directa, o ensayos tipo sándwich

Tales ensayos incluyen, pero no están limitados a, Western blots, ensayos de aglutinación, enzima-etiquetada e inmuno ensayos mediados, tales como ELISAS, ensayos tipo biotina/avidita, radioinmuno ensayos, inmuno electroforesis, inmuno precipitación, etc Las reacciones incluyen generalmente etiquetas reveladoras tales como moléculas fluorescentes, quimo luminiscente, radioactivo, etiquetas enzimáticas o moléculas de tintes, u otros métodos para detectar la formación de complejos entre el

anfígeno y el anticuerpo o anticuerpos que reaccionan con este

Los ensayos anteriormente mencionados generalmente involucran la separación del anticuerpo no unido a una fase líquida proveniente de un soporte de fase sólida al cual los complejos de anfígeno-anticuerpo están unidos

Los soportes sólidos que se pueden practicar en la práctica de la invención incluyen sustratos tales como nitrocelulosa (por ejemplo, en membrana o forma de pozo microtitulador), polivinilcloruro (por ejemplo, láminas o pozos microtituladores), látex de poliestireno (por ejemplo, glóbulos o platos microtituladores), fluoruro de polivinilideno, papel diazotizado, membranas de nylon, glóbulos activados, glóbulos de respuesta magnética, y similares

Típicamente, un soporte sólido reacciona primero con un componente de fase sólida (por ejemplo, una o más proteínas de unión plasmin GapC) bajo condiciones de unión adecuadas tales que el componente sea suficientemente inmovilizado al soporte. Algunas veces, la inmovilización del antígeno al soporte se puede

mejorar al acoplar primero el antígeno a la proteína con mejores propiedades de unión. Los agentes de acoplamiento adecuados incluyen, pero no están limitados a, macromoléculas tales como soro albúminas que incluyen soro albúmina de bovino (BSA), emocionina de linfa hueco de llave, moléculas de inmuno globulina, tiroglobulina, ovalbumina, y otras proteínas bien conocidas por aquellos expertos en la técnica. Otras moléculas que se pueden utilizar para unir los antígenos al soporte incluyen polisacáridos, ácidos polilácticos, ácidos poliglicólicos, aminoácidos poliméricos, o copolímeros de aminoácido y similares. Tales moléculas y métodos de acoplar estas moléculas a los antígenos, son bien conocidas por aquellos expertos en la técnica. Ver, por ejemplo, Brinkley, M. A. Bioconjugate Chem (1992) 3: 2-13, Hashida et al., J. Appl. Biochem (1984) 6: 56-63, y Anjaneyulu and Staros, International J. of peptide and protein Res (1987) 30: 117-124.

Después de hacer reaccionar el soporte sólido con el componente de fase sólida, cualquier tipo de componentes no inmovilizados de fase sólida se remueven del soporte al lavarlos, y el componente unido al soporte es puesto en contacto con la muestra biológica que se sospecha que

contenga las porciones de ligando (por ejemplo, anticuerpos hacia los antígenos inmovilizados) bajo condiciones de unión adecuadas. Después de lavar para remover cualquier ligando no unido, una porción secundaria de unión se agrega bajo condiciones de unión adecuadas, en donde el ligador secundario es capaz de asociar selectivamente con el ligando de unión. La presencia del ligador secundario puede entonces ser detectado utilizando técnicas bien conocidas en el arte.

Más particularmente, un método ELISA se puede utilizar, en donde los pozos de un plato microtitulador son recubiertos con una proteína de unión de plasmin GapC. Una muestra biológica que contiene o se sospecha que contiene moléculas de inmuno globulina de proteína de unión de plasmin anti-GapC se agrega entonces a los pozos recubiertos. Después de un periodo de incubación suficiente para permitirle al anticuerpo unirse al antígeno inmovilizado, el o los platos se pueden lavar para remover las porciones no unidas y una molécula de unión secundaria detectablemente etiquetada agregada. Una molécula de unión secundaria se le permite reaccionar con cualquiera de los anticuerpos de muestra capturados, el plato lavado y la presencia de la molécula de unión

secundaria detectada utilizando métodos bien conocidos en el arte

Así, en una modalidad particular, la presencia de ligandos de antígeno de unión plasmin anti-GapC de unión provenientes de una muestra biológica se pueden detectar fácilmente utilizando un ligador secundario que comprende un anticuerpo dirigido contra los ligandos del anticuerpo. Un número de moléculas (Ig) de inmunoglobulina de anti-bovina son conocidos en la técnica pueden ser fácilmente conjugados a etiquetas de enzima detectables, tales como peroxidasa de rábano, fosfatasa o ureasa alcalina, utilizando métodos conocidos por aquellos expertos en la técnica. Un sustrato de enzima apropiado se utiliza entonces para generar una señal detectable. En otras modalidades relacionadas, las técnicas de ELISA tipo competitivo se pueden practicar utilizando métodos conocidos por aquellos expertos en el arte.

También los ensayos se pueden conducir en solución, tales como proteínas de unión de plasmin GapC y anticuerpos específicos para aquellas formas de proteínas complejas bajo condiciones de precipitación. En una

modalidad particular, las proteínas de unión de plasmin GapC se pueden unir a una partícula de fase sólida (por ejemplo, un glóbulo de azarosa o similar) utilizando técnicas de acoplamiento conocidas en el arte, tales como química directa o acoplamiento indirecto. La partícula recubierta de antígeno es entonces puesta en contacto bajo condiciones de unión adecuadas con una muestra biológica que se sospecha que contiene anticuerpos de las proteínas de unión de plasmin GapC. La reticulación entre anticuerpos de unión origina la formación de agregados de complejo partículas-antígeno-anticuerpo que se pueden precipitar y separar de la muestra utilizando lavado y/o centrifugación. La mezcla de reacción se puede analizar para determinar la presencia o ausencia de complejos de anticuerpo-antígeno utilizando cualquier número de métodos estándar, tales como aquellos métodos de inmuno diagnóstico descritos anteriormente.

Aun en otra modalidad, una matriz inmuno afinidad se puede suministrar, en donde una población policlonal de anticuerpos de una muestra biológica que se sospecha que contiene moléculas de unión de plasmin anti-GapC se inmovilizan en un sustrato. A este respecto, una purificación de afinidad inicial de la muestra se puede

llevar a cabo utilizando antígenos inmovilizados. La preparación de la muestra resultante solo contendrá así porciones de anti-estreptococo, evitando las propiedades de unión no específicas potenciales en el soporte de afinidad. Un número de métodos de inmovilización de inmuno globulinas (íntactas o en fragmentos específicos) a alta producción y buena retención de actividad de unión de antígeno son conocidas en el arte. No estando limitadas por ningún método particular, la proteína A inmovilizada o la proteína G se pueden utilizar para inmunizar inmuno globulinas.

De acuerdo con esto, una vez que las moléculas de inmuno globulina se han inmovilizado para proporcionar una matriz de inmunogenidad, las proteínas de unión de plasmin GapC etiquetadas son puestas en contacto con los anticuerpos de unión bajo condiciones de unión adecuadas. Después de que cualquier antígeno de unión no específica se ha lavado del soporte de inmuno afinidad, la presencia del antígeno de unión se puede determinar al ensayar para etiqueta utilizando métodos conocidos en el arte.

Adicionalmente, los anticuerpos levantados a las proteínas de unión de plasmin GapC, en lugar de las

proteínas de unión de plasmin GapC mismas se pueden utilizar en los ensayos anteriormente descritos con el fin de detectar la presencia de anticuerpos a las proteínas en una muestra dada. Estos ensayos se desarrollan esencialmente como se describió anteriormente y son bien conocidos por aquellos expertos en la técnica.

Los reactivos de ensayo anteriormente descritos, incluyen las proteínas de unión de plasmin GapC, o anticuerpos a este, que se pueden suministrar en kits, con instrucciones adecuadas u otros reactivos necesarios con el fin de conducir inmuno ensayos como se describió anteriormente. El kit también puede contener dependiendo del inmuno ensayo particular utilizado, etiquetas adecuadas y otros reactivos empaquetados y materiales (es decir amortiguadores de lavado y similares). Los inmuno ensayos estándar, tales como aquellos descritos anteriormente, se pueden conducir utilizando estos kits.

Los depósitos de cepas útiles en la práctica de la invención. Un depósito de cultivos biológicamente puros de las siguientes cepas se hicieron con la colección cultivos tipo Americano, 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia, bajo las provisiones del tratado de

Budapest El número de acceso indicado se asigno después de un ensayo de viabilidad exitoso, y el requisito de taza se pago Los depósitos designados se mantuvieron durante un periodo de treinta (30) años desde la fecha del depósito, o de cinco (5) años después de la solicitud del depósito, el que sea mas largo Si un cultivo se hace no viable o se destruye inadvertidamente, o, en el caso de cepas que contienen plasmidos, pierden su plasmido, este será reemplazado con cultivo o cultivos viables de la misma descripción taxonómica

Si existe una discrepancia entre la secuencia presentada en la presente solicitud y la secuencia del gen de interés en el plasmido depositado debido a los errores de secuenciación de rutina, la secuencia en el plasmido depositado los controla

Fecha de depósito de gen del plasmido bacterial ATCC
 No Cepa E coli Pet15bgapc GapC mayo 31, 2000 PTA-1976
 BL21 DE3 (S dysgalactiae), E coli pmf521c GapC mayo 31,
 2000 PTA -1975 BL DE3 (S agalactiae) E coli pmf521a GapC
 mayo 31, 2000 PTA-1973 BL21 DE3 (S uberis) E coli
 pmf521e GapC mayo 31, 2000 Pta-1972 BL21 DE3 (S iniae)
 3 EXPERIMENTAL

Adelante existen ejemplos de modalidades específicas para llevar a cabo la presente invención

Los ejemplos se ofrecen solo con propositos de ilustración, y no pretenden limitar el alcance de la presente invención de ninguna manera

Se han hecho esfuerzos para asegurar la presición con respecto a los números utilizados (por ejemplo, cantidades, temperaturas, etc), pero algunos errores experimentales y desviaciones deben, or supuesto ser permitidos

Los enzimas de materiales y métodos se compraron de fuentes comerciales y se utilizaron de acuerdo con las directrices de los fabricantes

En el aislamiento de los fragmentos de ADN, exceptuando donde se anota, todas las manipulaciones del ADN fueron hechas de acuerdo a los procedimientos estandar Ver, Sambrook et al , supra enzimas de restricción, ligaza ADN T4, E Coli, polimeraza ADN II, fragmento Klenow, y otros reactivos biológicos se pueden comprar de suministradores comerciales y ser utilizados de acuerdo con las directrices del fabricante Los fragmentos de ADN de doble hebra se separaron sobre geles de agarosa

Las fuentes para reactivos químicos generalmente incluyen Sigma Chemical Company, St

Louis MO, Alrich, Milwaukee, WI, Roche MolecularBiochemicals, Indianápolis, IN

EJEMPLO 1 Preparación, amplificación, secuenciación, expresión, purificación y caracterización de la proteína de unión de plasmin del GAPc del *S. dysgalactiae* ADN CROMOSOMAL *S. dysgalactiae* un aislado clinico *S. dysgalactiae* proveniente de un caso de mastitis bovina número de acces

mezcla se incubo a [50° C] durante 30 minutos El ADN cromosomal se purificó entonces utilizando un Qiagen [GENOMIC-TIP] 100g (Qiagen, Santa Clarita, CA) y se precipitó utilizando 0.7 volúmenes de isopropanol El glóbulo resultante se lavó en etanol al [70%] y se re suspendió en 0.5 ml 10 mM [TRIS-HCl,] pH 8.8

b Amplificación y clonación del gen GapC *S. dysgalactiae* El gen GapC se amplificó mediante PCR (ver Mullis et al , patente estadounidense No 4,683,195, Mullis, U S patente No 4,683,202,) El iniciador delantero, GapC, contenía una restricción NdeI (SEQ ID NO 1 mostrado en la tabla 1) y el iniciador inverso, GapC_{lr} contenido en el sitio [BAMHI] (SEQ ID NO 2, mostrado en la tabla 1) En las secuencias de iniciadoras precedentes, se describieron en la tabla 1, el subrayado denota nucleótidos agregados a la secuencia original, y el resaltado indica la localización de sitios de reconocimiento de endonucleasa de restricción

El PCR fue llevado a cabo utilizando una polimerasa de ADN vent (New England Biolabs, Mississauga, ON, Canada) 0,7 jug de ADN cromosomal de *S dygalactiae* se incubó en una mezcla de reacción que contienen (L) LM de cada uno de los iniciadores precedentes, 200 UM cada uno de los [DATP, DTTP, DCTP] y [DGTP,] 3 MM de MGSO4, LX concentración de amortiguador termopol (New Englans Biolabs, Mississagua, ON, Canada) y dos unidades de polimeraza ADN La mezcla se incubó para tres ciclos de amplificación de un minuto 94°C, 3 minutos a 50°C, y 1 minuto, 10 segundos a 72°C, y luego durante 27 ciclos de amplificación a 15 segundos a 95°C, 30 segundos a 55°C, y un minuto a 72°C, y finalmente un ciclo de 5 minutos a 72°C

Tabla 1 Números de identificación de Secuencia y nucleótidos correspondientes y secuencias de Amino ácido

SEQ	ID	Nombre de Secuencia	liniciador	gapCl	GG	CGG	CGG
GTA	AAA	GTT	GGT	ATT	AAC	GG-3	2 iniciador gapCLr
TCC	TTA	TTT	AGC	GAT	TTT	TGC	AAA GTA CTC-3 -3
streptococcus dysgalactiae (ver figura 1)							
Gap-1	AAA	AAA	GGA	TCC	GGT	ATG	GTA GTT AAA GTT GG
Gap-2	AAA	AAA	CCA	TGG	TTA	CTC	GAG TGC TTC CAG AAC
Gap-3	AAA	AAA	CTC	GAG	GGT	ACT	GTA GAA GTT AAA G
Gap-4	AAA	AAA	CCA	TGG	TTA	ATC	

GAT TTC AAG AAC GAT TTC AAC ACC GTC Gap-5 AAA AAA ATC GAT
 GGT ACT GTT GAA GTT AAA GAA G Gap-6 (ver Figura 1) 4
 proteína gapC de *Streptococcus dysgalactiae* 5 gen GapC
Streptococcus agalactiae (ver figura 2) 6 proteína GapC
Streptococcus agalactiae 7 gen GapC de *Streptococcus*
uberis (ver Figura 3), proteína GapC (ver figura 3) de
Streptococcus uberis 9 gen GapC de *Streptococcus parauberis*
 (ver Figura 4), 10 proteína GapC de *Streptococcus*
parauberis, 11 gen GapC de *Streptococcus iniae* (ver Figura
 5), 12 proteína GapC *Streptococcus iniae* El producto PCR
 de GAPC se clonó en el vector de expresión PET15B
 (Novagen, Madison, WI) que se había dirigido con BAMHI y
 NDEI La clonación del producto PCR dentro de este sitio
 dio como resultado la adición de una secuencia de
 codificación en estructura para una etiqueta hexahistidil
 a la secuencia de codificación GapC La subsecuente
 expresión produjo una proteína de longitud completa con
 una etiqueta de histidina unida, que permitió la
 purificación de la proteína bajo condiciones no
 desnaturalizantes utilizando cromatografía de quillato
 metálico

Esta construcción se utilizó para transformar *E. coli* BL21 DE3 (Life Technologies, Gaithersburg, MD). Las cepas transformadas se designaron BL21 DE3 (PET15BGAPC) (ATCC No.)

C Aislamiento de ADN cromosomal y amplificación y clonación del gen del ZAPC proveniente de *S. agalactiae*, *S. uberis*, *S. Paraberis* y *S. iniae* del gen GapC. Se prepararon de otros aislados esencialmente como se describió anteriormente.

El ADN cromosomal de *S. AGALACTIAE*, *S. UBERIS*, y *S. PARAUBERIS* se aisló de cepas obtenidas de la colección de cultivos tipo americano (10801) University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209, las cepas se asignaron ATCC 27541, 9927, y 13386, respectivamente. El ADN cromosómico de *S. iniae* se aisló de una cepa aislada 9117 obtenida de del Hospital de Monte Sinai, Universidad de Toronto.

Los iniciadores utilizados para amplificar los genes GapC provenientes de las cepas de *Streptococcus* listados atrás fueron los mismos que aquellos utilizados en el

caso de *S. dysgalactiae* es decir el iniciador GAPCL 7SEQ ID NO 1) Y EL INICIADOR GAPCIR (SEQ ID 2)

Después de la amplificación, el producto PCR en cada caso se clonó en un p pcr-Script, utilizando el protocolo de clonación descrito en el PCR-Script Amp Cloning Kit (Stratagene, la Jolla, CA) El inserto del producto PCR fue entonces dividido utilizando NDI y (BA7NHI) y reclonado en estos sitios en PE15B utilizando protocolos de clonación convencionales (ver, por ejemplo, Sambrook et al , SUPRA) Los plasmidos que contenían el *S. agalactiae*, *S. uberis* y *S. parauberis* y *S. iniae* fueron designados PMF521c (ATCCNO), PMF521A (ATCCNO), PMF521d (ATCCNO), PMF5212 (ATCCNO), respectivamente

D La secuencia de nucleótidos del gen GA, 2C y reducida de secuencias de amino ácido secuencias homologas alGAPC de *S. equisimilis* homologo (Gase, et al , (1996) European J biochem 239 42-51) fueron identificadas originalmente mientras se secuenciaba una ligazón pero el gen no relacionado de *S. dysgalactiae* Para obtener la

secuencia completa del gen gapC de *S. dysgalactiae* se empleó PCR utilizando los iniciadores descritos anteriormente, es decir el iniciador gapCL (ANI iniciador GAPCLR

Las secuencia se determinó utilizando terminadores de etiqueta fluorocente sobre una ABI 373 ADN automatic sequencer (Applied Biosystems, Emeryville, CA) en el instituto de Biotecnología Vegetal (pbi) Saskatoon, Canadá) Damos 1 describe la secuencia de codificación del gen GAPC del *S. dysgalactiae* (DysGapC) (SEQ ID 3) y la secuencia de amino ácido deducida ((SEQ ID 4)

Las secuencias de las proteínas GapC aisladas de *S. agalctiae*, *S. uberis*, *S. parauberis* y *S. iniae* se determinaron mediante el mism método

Las figuras 2 hasta 5 describen ambas las secuencias de nucleótido y la secuencia de amino ácidos predichas para el S de la proteina GapC de *S. dysgalactiae*

(DysgalGapC) ((SEQ ID 3) y (SEQ ID 4), así como también para las proteínas GapC de *S. agalactiae* (Agal GapC) (SEQ ID 5 y (SEQ ID 6), *S. uberis*, (UberGapC) (SEQ ID 7) y (SEQ ID 8), *S. PARAUBERIS* (PUBERGAPC) (SEQ ID 9) Y (SEQ ID 10), Y *S. iniae* (IniaeGapC) (SEQ ID 11) Y (SEQ ID 12), respectivamente

El gen de la proteína GapC *S. dysgalactiae* descrito en las figuras IA-LB codifica para una proteína de 336 aminoácidos que no parece contener una secuencia de señal o un dominio de anclaje de membrana. Una búsqueda de la base de datos de Gen Bank utilizando el programa BLASTX reveló que la estructura de lectura abierta será de 95,5% homologa al GapC de *E. coli* (Gen Bank Accession No X97788) Y 99,4% homologa al GapC de *S. PYOGENES* (genbank) No De acceso M95569). La secuencia de aminoácido predicha de la proteína GapC también exhibió 43% de identidad de amino ácido a la deshidrogenasa gliceraldehído-3-fosfat bovina (Gen Bank No De acceso (U85042)

Similarmente, para las secuencias de proteína GapC de *S. agalctiae*, *S. Uberis*, *S. parauberis* y *S. iniae*, ni secuencias de señales ni dominios de anclaje de membrana parecen estar presentes

Las homologías de secuencias se tabulan en la tabla 2

Tabla 2 Homologías de secuencia entre varias secuencias de proteína GapC *S. equisimiles*, *S. pyogenes* GAPDH bovino *S. dysgalacteae* 95,5% 94,4% 43% *S. agalactiae* 87,2% 91,07% *S. parauberis* 86,31% 90,77% (no determinado) *S. uberis* 88,39% 92,26% *S. iniae* 86,31% 89,88% E Expresión y purificación de recombinante *S.* de proteína de unión la proteína GapC etiquetada Hexahistidilo se expreso y se purificó bajo condiciones desnaturalizantes utilizando cromatografía de afinidad (Ni-NTA) de quillato de metal

El *E. coli* BL 31 DE3 que contenía el plasmido recombinante creció en Luria Broth, que contenía, 100, UG/ML de ampicilina una a 600 de aproximadamente 0,5 de expresión de la proteína GapC que fue entonces

introducida mediante la adición de 1 mM isopropilo-0, D-tiocalaptosida (IPTG) (sigma, st, Louis, MO) Luego de 3 horas de incubación a 37°C, las células se cosecharon, se lavaron en amortiguador de columna (50 mM de amortiguador de fosfato de sodio, Ph 8,0, 0,3 M (NACL), 10 mM de imidazol) lisada por sonicación

Aproximadamente el 40% de la proteína recombinante estaba la fracción soluble de las células sonicada con un rendimiento de aproximadamente 50 mg de la proteína rcombinante por litro de volumen de cultivo, determinada con un kit de ensayo de proteína DC (Bio-Rad Laboratorios, Mississagua, ON, Canada Utilizando albúmina de suero bovina (Pierce, Rockford, IL) como un estándar

El lisado se aclaró mediante centrifugación y la fracción soluble se purificó a una columna de de NI-NTA) (Qiagen), que fue subsecuentemente lavada con 10 volúmenes de columna de un amortiguados de columna (como anteriormente, excepto que contenía 20 mM de imidazol)

El GapC etiquetado Hexahistidyl se eluo utilizando una motoguardia con una (como anteriormente, exceptuando que contenia 250 mM de imidazol), produciendo una fracción de proteína homogénea que tenía una concentración de GapC de 10-15 mg/ml Esa fracción se dializo contra 2000 volúmenes de PBSA (136 mM de cloruro de sodio, 2,6 mM de cloruro de potasio, 8 (1 mM) de fosfato de sodio dibasico, 1,46 mM de fosfato de potasio monobasico

f Expresión y purificación de la proteína GapC recombinante de *S. agalactiae*, *S. uberis*, *S. parauberis* y *S. iniae* La expresión y purificación de las proteínas recombinantes de estas especies de streptococcus se cumplen mediante los mismos métodos descritos en el ejemplo 1E, anterior Las cepas bacteriales transformadas utilizadas para expresar proteínas recombinantes de *S. agalactiae*, *S. uberis*, *S. parauberis* y *S. iniae* Se designaron BL21 DE3 (PMF521D) (ATCC No), bl21 de3 (PMF521A) (ATCC No) BL21 DE3 (PMF521D) (ATCC No) BL21 DE3 (PMF521D) (ATCC No), respectivamente

G Caracterización de la proteína GUC recombinante de
S DLS ALACTIAE La proteína 1 la electroforesis de gel
de SDS-poliacilamida con análisis SDS-pagina se
desarrollo sobre la muestra de la proteína eluada
utilizando el método descrito por Laemli (Laemli, U K
(1970) Nature 227 680-685)

Los resultados se presentan denla figura 18 La
figura el carril 1, marcadores de peso molecular (20,5 a
103 kDA de rango, BioRad Laboratories, Emerville, CA)
carril 2, proteína GapC soluble recombinante de S
dysgalactiae mediante cromatografía de afinidad en NI-
NTA

Estos resultados demuestran que la purificación
mediante cromatografía de afinidad sobre una columna de
NI-NTA produjo una fracción de proteína homogénea

2 (Actividad de GAPDH gliceraldehído-3-fosfato
deshidrogenasa de GapC recombinante y células completas

de *S. dysgalactiae*) el GAPDH cataliza la fosforilación oxidativa de D-glyseraldehído-3-fosfato a 1,3-difosfoglicerato en la presencia de NDA y fosfato inorgánico. El alto grado de homología de GapC a gliceraldehído-fosfato deshidrogenasa de *Streptococcus* sugirió que el GapC puede exhibir esta actividad de enzima.

La actividad de GAPDH de las células compuestas de *S. dysgalactiae* (101°) (CFIJ) y la proteína GapC recombinante se determinó al medir la reducción de NAD a NADH. El amortiguador de ensayo se compuso de 40 mM de trietanolamina, 50 mM Na₂ (HPO₄ AN), 5 mM EDTA, pH 6,8 de células *S. dysgalactiae* o 0,5 mg de proteína recombinante purificada se incubaron en un amortiguador de ensayo que contenía 7 ml de gliceraldehído-3-fosfato (49 mg/ml, Sigma Chemical Company), 75 microlitos (NAD⁺) (15 mM, Sigma Chemical Company) en un volumen final de 1 ml.

Los controles negativos consistieron de muestras que no contenían gliceraldehído -3-fosfato o la molécula GapC.

recombinante/células de *S. dysgalactiae* La reducción de NAD⁺ A NADH se monitoreo espectrofotometricamente a una absorbancia de 340 nanometros

Los resultados indicaron que tanto la proteína recombinante así como también las células de *S. dysgalactiae* tipo silvestre tenían actividad enzimática (no mostrada) Adicionalmente, cuando las células de *S. dysgalactiae* se trataron con tripsina para digerir las proteínas de superficie, la actividad de GAPDH desapareció

Así, la actividad enzimática observada para las células tipo silvestre intactas no se debió al GAPDH intracelular

Los datos sugieren que la proteína GapC esta localizada sobre la superficie celular a pesar de la aparente falta de una secuencia de señal o una región de anclaje de membrana en cualquiera de los nucleotidos amino ácidos

3 Actividad de unión de plasmin de proteína de unión de plasmin GapC de *S. dysgalactiae* y células completas de *S. dysgalactiae*

Un ensayo del microplato se utilizó para determinar si la proteína GapC recombinante era capaz de unir plasmin bovino, y si así era si el plasmin de unión era una forma activa enzimáticamente

Platos microtrituradores de 96 posos se recubrieron con 5 mg de proteína GapC recombinante purificada, lavada 3 veces con 0,1% de gelatina-PBSA con 0,05% de Tween -20 (PBSGT)

Los posos se bloquearon durante 1 hora a 37°C en el mismo amortiguador, se lavaron, se incubaron, con 200 µl de plasmin bovino (0,25 mg/ml, Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN) durante 1 hora a 37°C. Los pozos se lavaron 8 veces con PBSGT. 200 µl de sustrato sintético de cromación -PL (Tos-Gly-Pro-Lys-4-NA, 0,3 mg/ml) se agregaron a los pozos y se incubaron a 37°C durante 1 hora. La presencia de actividad de plasmin asociado se determinó al medir el nivel de 4-nitroanilina liberada en el suero nadante y detectada con base en una observancia de 405 nanómetros. Un

procedimiento similar se utilizó para medir la actividad de -de plasmin de células completas de *S. dysgalactiae* con la excepción de que células 101° se lavaron con PBSGT y se resuspendieron en 400 UL de cromatina-PL (0,3 mg/ml) en incubada durante 1 hora a 37°C

Los resultados, mostrados en la figura 19 demuestran que la proteína recombinante purificada era capaz de unirse a plasmin bovino enzimáticamente activo. De manera similar, cuando las células completas de *S. dysgalactiae* se utilizaron, se tuvieron resultados similares. En la figura, los datos representan la media de tres ensayos individuales.

Así, el receptor de plasmin se localiza sobre la superficie de *S. dysgalactiae* y la proteína purificada retiene la actividad biológica.

EJEMPLO 2 Inmunización con GAPC de *S. dysgalactiae* y la infección experimental de vacunas para ganado formuladas de tal forma que ellas contienen 50 mg/ml de GapC recombinante purificado de afinidad en un adyuvante basado en aceite VSA3 (VIDO, Saskatoon, Saskatchewan,

Canada) El VSA3 es una combinación de emulsigen plus (MVP Laboratories, Ralston, Nebraska) y de dimetildioctadecil amonio bromuro (KODAK, Rochester, New York) La proteína GapC recombinante purificada y afinidad utilizada para preparación de la vacuna se muestra en la figura 18

Veinticuatro Holstein no lactantes sin historia de infección con *S. dysgalactiae* se obtuvieron de varias fincas en Saskatchewan, Canada Una semana antes de la vacunación todos los animales se trataron con (CEPHA-DRY) (Ayers Laboratories, Montreal, Canada) (300 mg por cuarto), con el fin de limpiar cualquier infección de las ubres antes de la etapa de vacunación

Grupos de 8 animales se inmunizaron subcutáneamente con dos dosis de vacunas que contenían GapC *S. dysgalactiae* Mig (una proteína receptora Fc aislada de ese punto *dysgalactiae* la cual se evaluó simultáneamente), o un placebo con un intervalo de tres semanas entre inmunizaciones Dos semanas luego de la segunda inmunización, los animales se expusieron a 650

unidades formadoras de colonia de *S. dysgalactiae* suministradas en tres cuartos con una cánula de infusión de ubre. El cuarto sobre cada animal sirvió como un control no infectivo.

Todos los animales se examinaron diariamente para signos clínicos de enfermedad y muestras de todas las cuartos de ubre se recolectaron cada día. Las muestras se observaron para consistencia de conteo de células somáticas así como también se determinaron los números bacteriales.

EJEMPLO 3 determinación de anticuerpos específicos GapC. Los anticuerpos específicos GapC en el suero bovino se midieron utilizando un ensayo inmunsorbente ligado enzima (ELISA). Brevemente los platos microtituladores

(NUNC, Naperville, Illinois) se recubrieron al agregar un microgramo por pozo de antígeno recombinante purificado 50 mM de amortiguador de carbonato de sodio, pH 9,6 incubado durante toda la noche a 4°C. El líquido se removió y las células se bloquearon con caso albúmina

bovina al 3% durante un lu a 37°C Las dilusiones seriales del suero de bovino (de 1 en 4 a 1 en 6400) fueron entonces agregadas a los pozos encubadas durante 2 horas a temperatura ambiente Los pozos se aspiraro se lavaron y se incubaron con 100 ml de IgG anti-bovino de cabra fosfatasa-conjugada (Kirkgaar & Perry Laboratories Inc , Gaithersburg, MD) durante 1 hr temperatura ambiente Los pozos se lavaron de nuevo, y 100 U L de fosfato de nitrofcenol (SIGMA, St, Louis, MO) se agregaron a un sustrato para detectar la actividad de fosfatasa alcalina La absorbancia a 405 nanometros se registró siguiendo 1 hora de incubación conel sustrato a temperatura ambiente

A donde se refieren las figuras, el titulador del anticuerpo específico se expresa como recíproco de la actividad que muestra dilusión por encima de los niveles de antecedente

EJEMPLO 4 Colonización de bacterias Las bacterias se esmeraron mediante un regado de dilusiones seriales 10° a

10-3 directamente sobre platos de agar consagre de oveja TSA seguida durante incubación durante toda la noche a 37°C, 5% CO2

La colonización se definió como > 500 CFU/ML de un organismo provocado recuperado

Para confirmar que las bacterias recuperadas de secreciones de la leche eran *S. dysgalactiae*, se seleccionaron colonias recuperadas de cada animal que fueron ensayadas durante un ensayo de API strep-20 (BIOMERIEUX) Ssa, Hazelwood, Missouri) de acuerdo con las instrucciones del fabricante Este ensayo es un método estándar que combina 20 ensayos bioquímicos para la determinación de actividad enzimática para fermentación de azúcares Las reacciones se leyeron de acuerdo con la tabla de lecturas y se obtuvo identificación bien sea al referirse al índice de perfil analítico o utilizando un soporte lógico de identificación

Luego de la provocación, los animales de todos los grupos se mostraron por estar colonizados con *S*

dysgalactiae (figura 20) Solo las vacas inmunizadas con GapC tenían una reducción estadísticamente significativa en el número de cuartos infectados y el número total de bacterias aisladas por cuarto. Por lo tanto, la inmunización con GapC reducida la colonización bacteriana luego de la provocación con *S. dysgalactiae*.

La relación entre el titulador anti-GapC y la colonización bacteriana se muestra en las figuras 21 y 22. Existía una fuerte correlación entre el nivel de anticuerpos de suero anti-GapC y el número máximo de bacterias (expresadas en CFU) ($\text{LOG}_{10}/\text{ML}$ leche) encontrada en cualquier cuarto ($r = 0,74$) (figura 21) así como también el número total de cuartos infectados ($r = 0,74$) (figura 22). La correlación se calculó utilizando un soporte lógico de GraphPad Prism, versión 2.01 (GraphPad Software Inc., San Diego, California).

Esta correlación también se ilustra en la figura 23 y en la figura 24 en donde el grupo inmunizado con GapC se subdivide en respondedores de titulador alto y de

titulador bajo En estas figuras "respondedores de titulador bajo" se refieren a 4 animales con la respuesta más pobre contra GapC mientras "respondedores de titulador alto" se refieren al resto del grupo donde no ocurrió colonización en el grupo de alta titulación, mientras que aún en el grupo de baja titulación mostró número reducido de bacterias recuperadas después del día 3

EJEMPLO 5 Determinación de la respuesta inflamatoria La respuesta inflamatoria se midió como una función del conteo de células somáticas (es decir linfocitos, neutrofilos y monocitos) El conteo de células somáticas se midió en un contador Coulter utilizando técnicas estándar, como se recomendó en el plegable del Agriculture and Agri-Food Canada IDF50B (1985) (MILK AND MILK PRODUCTS—METHODS OF SAMPLES Las muestras fueron siempre leídas entre 48 horas a 48 horas de la recolección y fijación, 1 hasta 7 días post provocación

Los números de células somáticas presentes en la glándula se determinaron en cada día post provocación. Los números de los cuartos no provocados permanecieron constantes a través del ensayo mientras en el día 1, el grupo GapC era más bajo que el grupo inmunizado con placebo (figura 25).

La diferencia entre los grupos de GapC y placebo era estadísticamente significativa. Los datos individuales del día 1 se muestran en la figura 26, los datos de los animales tratados con GapC en el periodo del día 7 post retos se muestran en la figura 27. Las muestras de los cuartos de animales inmunizados con GapC son indistinguibles de los cuartos no provocados.

Por lo tanto la inmunización con GapC redujo la respuesta inflamatoria luego de la provocación con *S. dysgalatiae*.

EJEMPLO 6 Protección cruzada contra *S. Uberis* La infección durante los últimos tres días del ensayo de vacuna, una población mezclada de bacterias se recuperó de las secreciones de la glándula mamaria análisis adicional con un ensayo API 20 Strep confirmó la identidad de una de las cepas presentes en la mezcla como *S. dysgalactiae* y *S. uberis*, la última representando una infección natural la cual ocurrió durante el ensayo El grupo que se inmunizó con GapC pareció ser significativamente protegido cruzado contra colonización de *S. uberis* (ver figura 20), que indicaba que el GapC podría ser un antígeno con protección cruzada amplia capaz de proteger contra infección por especies múltiples de streptococcus

Así como la vacunación con GapC *S. dysgalactiae* es capaz por o tanto de suministrar protección cruzada contra la infección de *S. uberis*

Así, la clonación, expresión y caracterización de varias proteínas de unión de plasmin GapC se describen, como son los métodos de uso de las mismas Aunque las modalidades preferidas de la invención objeto se ha

descrito en algún detalle, se debe entender que se pueden hacer variaciones obvias sin apartarse del espíritu y alcance de la invención como se define en las reivindicaciones finales

REIVINDICACIONES

1 Una proteína GapC aislada seleccionada del grupo que consiste de (a) una proteína GapC de estreptococcus dysgalactiae aislada que comprende la secuencia de amino ácidos mostrada en las posiciones de amino ácido 1 a 336, inclusive, de la figura (IA-IB) (SEQ ID NO 4), (b) una proteína GapC de estreptococcus agalctiae aislada que comprende la secuencia de amino ácidos mostrada en las posiciones de amino ácido 1 a 336, inclusive, de las figuras 2A-2B (SEQ ID NO 6), (c) una proteína GapC de estreptococcus uberis aislada que comprende la secuencia de amino ácidos mostrada en las posiciones de amino ácido 1 a 336, inclusive, de las figuras 3A-3B ((SEQ ID NO 8), (d) una proteína GapC de estrptococus parauberis aislada que comprende la secuencia del amino ácido mostrada en las posiciones de amino ácido 1 a 336, inclusive, de las figuras 4A-4B (SEQ ID NO 10), (e) una proteína GapC de estrptococus iniae aislada que comprende la secuencia del amino ácido mostrada en las posiciones de amino ácido 1 a 336, inclusive, de las figuras 5A-5B (SEQ ID NO 12, Y (f) fragmentos inmunogénicos de (a), (b), (c), (d) y (e) que comprenden al menos 5 amino ácidos

VI

Jo

2 La proteína GapC aislada de la reivindicación 1 en donde la proteína es una proteína GapC de *Streptococcus dysgalactiae* que comprende la secuencia de amino ácido mostrada en la posición de aminoácido 1 a 336 inclusive de las figuras 1A-1B SEQ ID NO 4)

3 La proteína GapC aislada de la reivindicación 1, en donde la proteína es una proteína GapC de *Streptococcus agalactiae* que comprende la secuencia de amino ácido mostrada en las posiciones de amino ácido 1 a 336, inclusive de las figuras 2A-2B (SEQ ID NO 6)

4 La proteína GapC aislada de la reivindicación 1, en donde la proteína es una proteína GapC de *Streptococcus uberis* que comprende la secuencia de amino ácido mostrada en las posiciones de amino ácido 1 a 336, inclusive de las figuras 3A-3B (SEQ ID NO 8)

5 La proteína GapC aislada de la reivindicación 1, en donde la proteína es una proteína GapC de *Streptococcus parauberis* que comprende la secuencia de amino ácido mostrada en las posiciones de amino ácido 1 a 336, inclusive de las figuras 4A-4B (SEQ ID NO 10)

6 La proteína GapC aislada de la reivindicación 1, en donde la proteína es una proteína GapC de *Streptococcus* *iniae* que comprende la secuencia de amino ácido mostrada en las posiciones de amino ácido 1 a 336, inclusive de las figuras 5A-5B (SEQ ID NO 12)

7 Un polinucleótido aislado que comprende una secuencia de codificación para una proteína GapC aislada de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-6, o complementos de esta

8 Un vector recombinante que comprende (a) un polinucleótido aislado de la reivindicación 7 y (b) al menos un elemento de control heterólogo operablemente ligado a dicho polinucleótido aislado, por medio del cual dicha secuencia de codificación se puede transcribir y traducir en una célula huésped y al menos uno de estos elementos de control es heterólogo a dicha secuencia de codificación

9 Una célula huésped que comprende un vector recombinante de la reivindicación 8

10 Un método para producir una proteína GapC, dicho método comprende cultivar las células de la

reivindicación 9 bajo condiciones para producir dicha proteína

11 Una composición de vacuna que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable y una proteína GapC, en donde dicha proteína GapC se selecciona del grupo que consiste de (a) una proteína GapC *Streptococcus dysgalactiae* que comprende la secuencia de amino ácido mostrada en las posiciones de amino ácido 1 a 336, inclusive, de las figuras 1A-1B (SEQ ID NO 4), (b) una proteína GapC de *Streptococcus agalactiae* que comprende la secuencia de amino ácido mostrada en las posiciones de amino ácido 1 a 336, inclusive, de las figuras 2A-2B (SEQ ID NO 6), (c) una proteína GapC de *Streptococcus uberis* que comprende la secuencia de amino ácido mostrada en las posiciones de amino ácido 1 a 336, inclusive, de las figuras 3A-3B (SEQ ID NO 8), (d) una proteína de *Streptococcus parauberis* GapC que comprende la secuencia de amino ácido mostrada en las posiciones de amino ácido 1 a 336, inclusive, de las figuras 4A-4B (SEQ ID NO 10), (e) una proteína de *Streptococcus iniae* GapC que comprende la secuencia de amino ácido mostrada en las posiciones de amino ácido 1 a 336, inclusive, de las figuras 5A-5B (SEQ ID NO 12), (f) una proteína GapC de *Streptococcus* que

tiene al menos aproximadamente 70% de identidad de secuencia con (a), (b), (c), (d), y (e), (g) fragmentos inmunogénicos de (a), (b), (c), (d), (e), y (f), dichos fragmentos comprenden al menos 5 amino ácidos

12 La composición de vacuna de la reivindicación 11, en donde dicha proteína GapC comprende la secuencia de amino ácidos de la proteína GapC de estreptococcus disgalactiae descrita en las posiciones de amino ácido 1 a 336, inclusive de las figuras 1A-1B (SEQ ID NO 4) o un fragmento inmunogénico de esta, dicho fragmento comprende al menos aproximadamente 5 amino ácidos /

13 La composición de vacunas de la reivindicación 12, en donde dicha proteína GapC comprende la secuencia de amino ácidos descrita en la posición de amino ácido 1 a 336, inclusive, de las figuras 1A-1B (SEQ ID NO 4)

14 La composición de vacuna de la reivindicación 11, en donde dicha proteína GapC comprende la secuencia de amino ácidos de la proteína GapC de estreptococcus agalactiae descrita en las posiciones de amino ácido 1 a 336 inclusive, de las figuras 2A-2B (SEQ ID NO 6) o un fragmento inmunogénico de este, dicho fragmento comprende al menos aproximadamente 5 amino ácidos

15 La composición de vacuna de reivindicación 14, en donde dicha proteína GapC comprende la secuencia de amino ácido descrita en las posiciones de amino ácido 1 a 336, inclusive en las figuras 2A-2B (SEQ ID NO 6)

16 La composición de vacuna de reivindicación 11, en donde dicha proteína GapC comprende la secuencia de amino ácidos de la proteína GapC de estreptococcus uberis descrita en las posiciones de amino ácido 1 a 336, inclusive en las figuras 2A-2B (SEQ ID NO 8) o un fragmento inmunogenico de esta, dicho (fragmento) comprende al menos aproximadamente 5 amino ácidos *ola*

17 La composición de vacuna de la reivindicación 16, en donde dicha proteína GapC comprende la secuencia de amino ácido descrita en las posiciones de amino ácido 1 a 336, inclusive en las figuras 3A-3B (SEQ ID NO 8),

18 La composición de vacuna de la reivindicación 11, en donde dicha proteína GapC comprende la secuencia de amino ácidos de la proteína GapC de estreptococcus parauberis descrita en las posiciones de amino ácido 1 a 336, inclusive en las figuras 2A-2B (SEQ ID NO 10) o un fragmento inmunogénico de esta, dicho fragmento comprende al menos 5 amino ácidos

19 La composición de vacuna de la reivindicación 18, en donde dicha proteína GapC comprende la secuencia de amino ácido descrita en las posiciones de amino ácido 1 a 336, inclusive en las figuras 4A-4B (SEQ ID NO 10)

20 La composición de vacuna de la reivindicación 11, en donde dicha proteína GapC comprende la secuencia de amino ácidos de la proteína GapC del estreptococcus iniae descrita en las posiciones de amino ácido 1 a 336, inclusive en las figuras 5A-5B (SEQ ID NO 12) o un fragmento inmunogénico de esta, dicho fragmento comprende al menos aproximadamente 5 amino ácidos

21 La composición de vacuna de la reivindicación 20, en donde dicha proteína GapC comprende la secuencia de amino ácido descrita en las posiciones de amino ácido 1 a 336, inclusive en las figuras 5A-5B (SEQ ID NO 12)

22 La composición de vacuna de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 11-21, que comprende adicionalmente un adyuvante

/23 Un método de producción de una composición de vacuna que comprende las etapas de (1) suministrar una proteína GapC o un fragmento inmunogénico de esta, dicho fragmento comprende al menos aproximadamente 5 amino ácidos, y (2)

11-21

VI

NI

combinar dicha proteína con un vehículo farmacéuticamente aceptable

24 El método de la reivindicación 23, en donde la proteína GapC es la proteína de cualquiera de las reivindicaciones 1-6

NI
uso

25 Anticuerpos dirigidos contra la proteína GapC aislada de cualquiera de las reivindicaciones 1-6

} clausula
no def

26 los anticuerpos de la reivindicación 25 en donde dichos anticuerpos son policlonales

27 Los anticuerpos de la reivindicación 25 en donde dichos anticuerpos son monoclonales

28 El uso de la proteína GapC de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en la elaboración de una composición de vacuna útil para el tratamiento o prevención de infección con bacterias en un sujeto vertebrado

29 El uso de la reivindicación 28, en donde dicha infección bacteriana es una infección de estreptococcus

30 El uso de la reivindicación 29, en donde dicha infección bacteriana causa mastitis

31 El uso de un polinucleótido de acuerdo a la reivindicación 7 en la elaboración de una composición de vacuna para el tratamiento o prevención de infección bacteriana en un sujeto vertebrado

32 El uso de la reivindicación 31, en donde dicha infección bacteriana es una infección de estreptococo

33 El uso de la reivindicación 32, en donde dicha infección bacteriana causa mastitis

34 El uso de una proteína GapC en la elaboración de un reactivo de diagnóstico para detectar anticuerpos de estreptococcus en una muestra biológica

35 El uso de una proteína GapC de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 1-6 en la elaboración de un reactivo de diagnóstico para detectar anticuerpos de estreptococcus en una muestra biológica

36 El uso de anticuerpos de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 25-27 en la elaboración de un reactivo de diagnóstico para detectar una proteína GapC en una muestra biológica

37 Un kit de ensayo de inmunodiagnóstico para detectar infección de estreptococcus, dicho kit de ensayo comprende una proteína GapC e instrucciones para conducir el ensayo de inmunodiagnóstico

38 Un kit de ensayo de inmunodiagnóstico para detectar infección de estreptococcus, dicho kit de ensayo comprende anticuerpos dirigidos contra la proteína GapC e instrucciones para conducir el ensayo de inmunodiagnóstico

no definidos

39 Un método para tratar o evitar una infección bacterial en un sujeto vertebrado que comprende administrar a dicho sujeto una cantidad terapéutica efectiva de una composición de vacuna de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 11-22

40 El método de la reivindicación 39, en donde dicha infección bacterial es una infección por estreptococcus

41 El método de la reivindicación 40 en donde dicha infección bacterial causa mastitis

42 Un método de tratamiento o prevención de una infección bacterial en un sujeto vertebrado que comprende administrar a dichos sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de un polinucleotido de acuerdo a la reivindicación 7

43 El método de la reivindicación 42, en donde dicha infección bacterial es una infección por estreptococo

44 El método de la reivindicación 43 en donde dicha infección bacterial causa mastitis

Fig 45 Un método para detectar anticuerpos de estreptococcus en una muestra biológica que comprende (a) hacer reaccionar dicha muestra biológica con una proteína GapC aislada bajo condiciones las cuales le permitan a dichos anticuerpos de estreptococo, cuando están presentes en la muestra biológica, unirse a dicha proteína GapC para formar un anticuerpo/complejo antígeno, (B) detectar la presencia ausencia de dicho

complejo, detectando de esta forma la presencia o ausencia de anticuerpos de estreptococcus en dicha muestra

46 Un método para detectar anticuerpos de estreptococcus en una muestra biológica, que comprende (a) hacer reaccionar dicha muestra biológica con una proteína GapC aislada de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 1-6, bajo condiciones las cuales le permiten a dichos anticuerpos de estreptococo, cuando están presentes en la muestra biológica, unirse a dicha proteína GapC para formar un anticuerpo/complejo antígeno, (b) detectar la presencia ausencia de dicho complejo, detectando de esta forma la presencia o ausencia de anticuerpos de estreptococcus en dicha muestra

47 Un método para detectar una proteína GapC en una muestra biológica, que comprende (a) hacer reaccionar dicha muestra con anticuerpos dirigidos contra la proteína GapC bajo condiciones que le permitan a dichos anticuerpos unirse a dicha proteína GapC cuando están presentes en la muestra, para formar un anticuerpo/complejo de antígeno, y (b) detectar la

presencia o ausencia de dicho complejo, detectando de esta forma la presencia o ausencia, de la proteína GapC en dicha muestra