

CAVELIER

ABOGADOS

WEB SITE www.caveller.com
E-MAIL caveller@caveller.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 COM
E S

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO

Radicacion : 02112912 00000001

Folios: 135

Fecha (ADM): 2002-12-17 17:01:04

Trámite : 011 PCT-PATENT 379 FASE INCI 329 COMPLEMEN
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

Trámite	002
Evento	001
Actuación	329

Referencia

Expediente N 02 112 912

Solicitante

UNIVERSITY OF SASKATCHEWAN

Asunto

Solicitud de patente para "INMUNIZACIÓN DE
GANADO LECHERO CON PROTEINA GapC
QUIMERICA CONTRA INFECCIÓN DE
ESTREPTOCOCOS"

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

Colo 13578-841-002-9
JBP/MRM-Id-5

INMUNIZACION DE GANADO LECHERO CON PROTEINA GapC

QUIMERICA CONTRA INFECCION DE ESTREPTOCOCO

El campo técnico de la presente invención se relaciona de manera general con antígenos bacterianos y genes que codifican el mismo. Más particularmente, la presente invención pertenece a la construcción de un gen de proteína que se une a un plásmido quimérico que comprende la secuencia completa de codificación del *S. dysgalactiae* [GAPC] así como también las secuencias de codificación para las regiones únicas provenientes de varias especies de bacterias estreptococos, y el uso de la misma en composiciones de vacuna.

Los antecedentes de la Mastitis, una infección de la glándula mamaria usualmente causada por bacteria u hongo, da como resultado pérdidas económicas mayores a la industria lechera anualmente. Entre las especies bacterianas mas comúnmente con la Mastitis se encuentran varias especies del genero estreptococo, que incluyen *S. [AUREUS, S. UBERIS, (NO ESCRIBIBLE), S. AGALACTIAE (LANCEFIELD] grupo B)*, *S. dysgalactiae* (Lancefield group

C), *S. zooepidemicus*, y los grupos Lancefield D, G., L y N estreptococci. Algunas de aquellas especies son contagiosas (por ejemplo *S. agalactiae*), mientras que otras son consideradas ambientalmente patógenos (por ejemplo *S. dysgalactiae* y *S. uberis*). El patógeno ambiental *S. uberis* es responsable de cerca del 20% de todos los casos clínicos de Mastitis (Bramley, A. J. y Dodd, F. H. (1984) [J. DAIRY RES.] 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 proveniente de 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 al influjo 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 tale como coágulos o decoloración de la leche e hinchamiento o endurecimiento de la glándula mamaria. Algunos casos de 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. 3-9. 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) The mastitis complex-A brief summary. p. 1-3. En Mastitis de Bovino. Lea & Febiger, los métodos de control antibacteriales Convencionales Filadelfia tales como inmersión de la teta y terapia antibiótica son efectivas en el control de muchos tipos de mastitis contagiosa, pero los organismos ambientales típicamente encontrados en todas las granjas lecheras 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 mostrado benéficas en el caso de algunos patógenos contagiosos de mastitis.

La literatura se limita con relación a los estudios de vacunación a [*S.*] *dysgalactiae* y *S.* [*UBERIS*,] y se han observado resultados variables. En algunos casos, la inmunización ha dado como resultado una sensibilidad creciente al organismo específico y en otros casos se ha obtenido una protección específica a la cepa.

Por ejemplo, estudios previos han mostrado que la infección primaria con *S. uberis* puede reducir considerablemente la proporción de la infección que sigue un segundo reto con la misma cepa (Hill, A. W. (1988) *Res. Vet. Sci.* 44: 386-387). La vacunación local con *S.* [*UBERIS*] muerta protege la glándula mamaria bovina contra el reto [*INTRAMAMMARY*] con la cepa homóloga (Finch et al. (1994) *Infect. Immun.* 62: 3599-3603). Similarmente, la vacunación subcutánea con *S.* [*UBERIS*] viva 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 mimica molecular.

La falta habitual de existencia de vacunas para la mastitis contra [*S.*] *agalactiae* o las cepas de estreptococos contagiosas 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-macro globulina, IgG, albúmina y otros compuestos.

El organismo también produce hialuronidasa y fibrinolisisina y es capaz de adherirse e invadir células epiteliales mamarias bovinas. Sin embargo, los papeles exactos de los componentes bacteriales responsables de estos fenotipos en la patogénesis no es conocido.

Similarmente, la patogénesis de la infección [DE *S. UBERIS*] esta pobremente entendida. Adicionalmente, la influencia de factores de virulencia [DE *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.] [BAKTERIOL.] Ser. [A] 271. 46-53), proteína similar a R (Groschup, M. H. y 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.] Bakterirol. [SER. A] 249: 190- 194), proteína similar a R, activador plasminogeno y factor CAMP. Sin embargo, se conoce muy poco de sus papeles en la patogenicidad.

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

El antígeno [Y] del grupo de cepa B *Streptococci* A909 (ATCC No. 27591) es un componente del complejo

marcador de proteína c, que adicionalmente comprende una subunidad a y [B] (Boyle, Patente U. S. No. [5,] 721,339). Los subconjuntos [DEL SEROTIPO IA, II,] y virtualmente todas las células del serotipo [IB] del grupo estreptococi B, se han reportado por expresar componentes de la proteína c. Se ha propuesto el uso de la subunidad [Y] como un agente inmunogenico 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 de unión plasmina GapC de una cepa del estreptococo Grupo A se ha identificado previamente y caracterizado, y su uso en terapias trombo liticas se ha descrito (Boyle, et al., Patente U. S. No. 5,237,050; Boyle, et al., [U.] Patente S. No. 5,328,996). Sin embargo, el uso del GapC como un agente inmunogenico para tratar o evitar la mastitis no se ha descrito ni sugerido.

La proteína M de estreptococo 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 [ANTIFAGOCITICO] de la molécula y permitir la liberación eficiente del organismo invasor.

Las proteínas M son unos de los factores claves de virulencia de los piógenos de estreptococo, debido a su involucramiento en la resistencia mediada para fagocitos (Kehoe, M. A. (1991) Vacuna 9: 797-806) y su capacidad de inducir respuestas inmunes potencialmente dañinas por vía de su superantigenicidad y su capacidad para inducir respuestas de anticuerpos reactivos cruzados de huésped (Bisno, A. L. [(1991). NEW] Engl. J. Med. 325: 783-793, Froude et al. (1989) Curr. Top. [MICROBIOL.] Immunol. 145: 5-26 ; Stollerman, G. H. (1991) Clin. Immunol. Immunopatol 61: 131-142).

Sin embargo, existen obstáculos para utilizar proteínas M como vacunas. Los epitopos opsonicos de proteínas son extremadamente de tipo específico, dando como resultado una protección estrecha de tipo específico. Adicionalmente, 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. Immun. 42: 531-538).

Una vacuna de proteína M octava lente se ha desarrollado y se ensayo para inmunogenicidad protectora contra múltiples serotipos de la infección de estreptococo del grupo A en conejos.

Sin embargo, la respuesta inmune obtenida fue específica de serotipo, confiriendo solo protección contra aquellas cepas bacterianas que exhiben epitopos proteína M presentes en la proteína quimérica (Dale, J. B., Simmons, M., Chiang, E. C., y Chiang, E. Y. (1996) Vacuna 14: [944-948].)

Las proteínas quiméricas que contienen tres diferentes dominios de unión de fibronectina [(FNBDs)] derivadas de unión de fibronectina de *S. [DUSGIZACTIAE]* y *Estafilococo. aureus* se han expresado sobre la superficie de células [DE STAPH. CARINOSUS]. En el caso de una de estas proteínas, las inmunizaciones intranasales con células recombinantes vivas [STAPH.] [CARINOSUS] que expresan la proteína quimérica sobre su superficie dieron como resultado una respuesta anticorporal mejorada a un modelo inmunogénico presente dentro de la proteína superficial quimérica.

Una molécula de proteína G quimérica (un tipo específico de proteína ligante tipo III Fc para la región

Fc de todas las subclases de las moléculas anticuerpo IgG) es conocida, pero su uso como un agente inmunogenico no se ha descrito o sugerido [(BJORCK,] et al. (1992) Patente U. S. No. 5,108,894).

Hasta ahora, la capacidad protectora de las proteínas de fusión del epítopo múltiple GapC no se ha estudiado.

El resumen de la invención.

De acuerdo con esto la presente invención suministra proteínas de fusión de epítopo múltiple GapC y polinucleótidos que codifican el mismo. En la modalidad, la invención esta dirigida a un polipéptido de fusión de epítopo múltiple que comprende la formula de estructura general [(I)] · [(A) X--(B) Y--(C) Z (I)] donde (I) es una secuencia de aminoácido lineal; B comprende una secuencia de aminoácido que contiene al menos cinco aminoácidos cuyos aminoácidos corresponden a un determinante antigénico de una proteína GapC; A y C

comprenden cada uno una secuencia de amino ácido que es (i) diferente de B, (ii) diferente del otro, y (iii) una secuencia de amino ácido que contiene al menos cinco amino ácidos, cuya secuencia de amino ácido corresponde a un determinante antigénico de una proteína GapC dicho determinante antigénico no es adyacente a B en naturaleza; Y es un entero de 1 o mas; y X y Z cada uno independientemente enteros donde $x + z$ es 1 o mas.

En ciertas modalidades, el polipéptido de fusión de epítopo múltiple comprende además una secuencia de señal y/o una secuencia de transmembrana. Además, A, B, y/o C del polipéptido de fusión de epítopo múltiple se pueden mediante uno o mas secuencias espaciadoras, en donde los espaciadores (i) son secuencias de amino ácido que van de 1 a 1,000 amino ácidos, inclusive; (ii) pueden ser iguales o diferentes que A, B, o C; y (iii) pueden ser iguales o diferentes uno del otro.

En ciertas modalidades, A, B, y C comprenden cada una epítopos provenientes de una o mas especies de bacteria, tales como de una o mas especies de bacterias

del genero *Streptococcus*, que incluyen pero no están limitadas a una o mas especies bacterianas seleccionados del grupo que consiste de *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus parauberis*, y *Streptococcus* [INIAE.]

Aun en otra modalidad, A, B, y C comprenden cada una secuencias de amino ácidos seleccionadas del grupo que consiste de (a) la secuencia de amino ácido mostrada en la posición del amino ácido 61 a 81, inclusive, de las Figuras 1 hasta 5, o cualquier secuencia de aminoácido que tenga al menos 80% de identidad con este; (b) las secuencias de amino ácido mostradas en las posiciones de amino ácido 102 a 112, inclusive, de las Figuras 1 hasta 5, o cualquier secuencia de aminoácido que tenga al menos [80%] de identidad con este; (c) las secuencias de aminoácido mostradas en las posiciones de aminoácido 165 a 172, inclusive, de las Figuras 1 hasta 5, o cualquier secuencia de amino ácido que tenga al menos aproximadamente [80%] de identidad con este; (d) las secuencias de amino ácido mostradas en las posiciones de amino ácido [248] a 271, inclusive, de las Figuras hasta 5, o cualquier secuencia de aminoácido que tenga al menos

80% de identidad con este, y (e) las secuencias de amino ácido mostradas en las posiciones de amino ácido 286 a 305, inclusive, de las Figuras 1 hasta 5, o cualquier secuencia de amino ácido que tenga al menos aproximadamente 80% de identidad con este.

En otra modalidad, el polipéptido de fusión de epítipo múltiple que comprende la secuencia de amino ácido descrita en la Figura 6 (SEQ ID NO: 22). ?

En aun otras modalidades, la invención esta dirigida a secuencias de poli nucleótidos que codifican la secuencia de polipéptido de fusión de epítipo múltiple descritas anteriormente o cumplimientos de esta, así como también vectores recombinantes que comprenden el poli nucleótido, células hospederas que comprenden los vectores recombinantes y métodos de producción recombinante de polipéptidos. En otra modalidad, la invención esta dirigida a una composición de vacuna que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable y un polipéptido de fusión de epítipo múltiple como de

describió anteriormente. En ciertas modalidades, las composiciones de vacuna comprenden un adyuvante.

En aun una modalidad adicional, la invención esta dirigida a un método de producción de una composición de vacuna que comprende las etapas de [(1)] que suministra el polipéptido de fusión de epitopo múltiple; y (2) combinar el polipéptido con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En otra modalidad, la invención esta dirigida a un método de tratamiento o para evitar una infección bacteriana en un sujeto vertebrado que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de una composición de vacuna como se describe anteriormente.

En ciertas modalidades, la infección bacteriana es una infección de estreptococo. Adicionalmente, la infección bacteriana puede causar mastitis.

Aun en otra modalidad, la invención esta dirigida a un método para tratar o evitar una infección bacteriana en un sujeto vertebrado que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de un polinucleótido como se describió aquí.

En ciertas modalidades, la infección bacteriana es una infección de estreptococo. Adicionalmente, la infección bacteriana puede causar mastitis.

En modalidades adicionales, la invención esta dirigida a anticuerpos dirigidos contra los polipéptidos de fusión de epitopo múltiples. Los anticuerpos pueden ser policlonal o monoclonales.

En otra modalidad, la invención esta dirigida a un método para detectar anticuerpos de Estreptococo en una muestra biológica, que comprende: (a) hacer reaccionar dicha muestra biológica con un polipéptido de fusión de epitopo múltiple bajo condiciones que permitan a dichos anticuerpos de Estreptococo, cuando están presentes en la

muestra biológica ligarsen a dicha secuencia para formar un complejo anticuerpo/antígeno; y (b) detectar la presencia o ausencia de dicho complejo y detectar de esta manera la presencia o ausencia de anticuerpos de *Estreptococo* en dicha muestra.

En aun una modalidad adicional, la invención esta dirigida a un kit de ensayo de inmunodiagnostico para detectar infección de *Estreptococos*. El kit comprende un polipéptido de fusión de epitopo múltiple como se describió aquí en instrucciones para llevar a cabo el ensayo de inmunodiagnostico.

Estas y otras modalidades de la invención objeto ocurrirán fácilmente para aquellos expertos en la técnica en vista de la presente descripción.

Breve descripción de las figuras [LA-LB] describen la secuencia de nucleótidos aislada y la secuencia de amino ácidos deducida del gen gapC *S. dysgalactiae* (SEQ ID NO. 11 y SEQ ID NO : 12). En la figura, el asterisco

representa un codon de parada, y las regiones subrayadas representan secuencias de nucleótidos complementarias a las primeras utilizadas para aislar los genes provenientes de cromosomas bacteriales.

Las Figuras [2A-2B] describen la secuencia de nucleótidos aislada y la secuencia de amino ácidos deducida del gen gapC para *S. agalactiae* (SEQ ID NO. 13 y SEQ ID NO: 14). En la figura, el asterisco representa un codon de parada, y las regiones subrayadas representan secuencias de nucleótidos complementarias a las primeras utilizadas para aislar los genes provenientes de cromosomas bacteriales.

Las Figuras 3A-3B describen la secuencia de nucleótidos aislada y la secuencia de amino ácido deducida del gen gapC para [S.] [UBERIS] [(SEQ ID] NO. 15) y SEQ [ID] NO: 16). En la figura, el asterisco representa un codon de parada, y las regiones subrayadas representan secuencias de nucleótidos complementarias a los iniciadores utilizados para aislar los genes provenientes de cromosomas bacteriales.

Las Figuras 4A-4B describen la secuencia de nucleótidos aislada y la secuencia de amino ácidos deducida del gen [GAPC] para S. [PARAUBERIS] (SEQ ID NO: 17 y SEQ ID NO: 18). En la figura, el asterisco representa un codon de parada, y las regiones subrayadas representan secuencias de nucleótidos complementarias a los iniciadores utilizados para aislar los genes provenientes de cromosomas bacteriales.

Las Figuras [5A-5B] describen la secuencia de nucleótidos aislada y la secuencia de amino ácidos deducida del gen [GAPC] para S. [INIAE] (SEQ ID NO: 19 y SEQ ID NO: 20). En la figura, el asterisco representa un codon de parada, y las regiones subrayadas representan secuencias de nucleótidos complementarias a los iniciadores utilizados para aislar los genes provenientes de cromosomas bacteriales.

La Figura 6 describe la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO. 21) y la secuencia de amino ácidos deducida

(SEQ ID NO: 22) de la proteína de fusión de epitopo múltiple GapC de la presente invención.

Las Figuras 7A-7E muestran una gráfica de alineamiento de ADN creada mediante PileUp y mostrada mediante un software Pretty (un componente del paquete Wisconsin GCG0, versión 10, suministrada por el paquete de análisis de secuencia SeqWeb, versión 1.1, de the Canadian Bioinformatics Resource). La figura describe las secuencias de nucleótidos aislada de los genes gapC provenientes de *S. dysgalactiae* (DysGapC, Check 9344) (SEQ ID NO: 11), [*S.*] [*AGALACTIAE*] (AgalGapC, Check 2895) (SEQ ID NO. 13); *S.* [*UBERIS*] (UberGapC, Check [5966]) (SEQ ID NO: 15); [*S.*] parauberis [(PUBERGAPC,) Check 9672) (SEQ ID NO: 17); y *S. iniae* [(INIAEGAPC,) Check 990) (SEQ ID NO: 19). 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 secuencias de ADN fueron como sigue: Pluralidad--2. 00; Umbral-- [1 ; AVEWEIGHT--

1.] 00; [AVEMATCH--1.] 00; AvMisMatch-0.00; tabla de comparación de Símbolo-- pileupdna. cmp; [COMPCHECK-6876] ; [GAPWEIGHT--5] , [GAPLENGTHWEIGHT-1] ; PileUp MSF--1018 ; Type-N; [CHECLC-3804.] En la figura, los guiones representan nucleótidos idénticos; los puntos representan espacios 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 [8A-8C] muestran una grafica de alineamiento de secuencias de amino ácidos creadas mediante PileUp y mostradas mediante Pretty (como anteriormente) que describen el alineamiento de Polygap4 (SEQ ID NO: 22), el polipéptido de fusión de epítopo múltiple de la presente invención, con secuencias de amino ácido deducidas de las proteínas GapC nativas aisladas de ese punto *S. dysgalactiae* (DysGapC, Check [6731]) (SEQ ID NO: 12), *S. agalactiae* (AgalGapC, Check 1229) (SEQ ID NO: 14), [*S.*] *uberis* (UberGapC, Check 8229) (SEQ ID NO: 16), [*S.*] [PARAUBERIS] (PUberGapC, Check 8889) (SEQ ID NO: 18), y *S. iniae* (IniaeGapC, check

8785) (SEQ ID NO: 20). Las secuencias previamente conocidas [DE S. EQUISIMILIS] (SeqGapC, Check 8252), S. pyogenes (SpyGapC, Check 6626) y la proteína GAPDH de bovino (BovGapC, Check [8479]) también están incluidas. En la figura, los guiones representan residuos de amino ácidos idénticos; los puntos representan vacíos introducidos por el soporte lógico PileUp, y las tildes representan regiones no incluidas en el alineamiento total debido a diferencias en la longitud de las secuencias de genes.

La figura 9 muestra una grafica de hidropatia Kyte-Doolittle, promediada sobre una ventana de 7, una grafica de probabilidad de superficie Emini, una grafica de flexibilidad de cadena Karplus-Schulz, una grafica de índice antigénico [JAMESON-WOLF], y unas graficas de estructuras secundaria Chou-Fasman y [GARNIER-OSGUTHORPE-ROBSON] para la proteína GapC aislada de S. dysgal.

La figura 10 muestra una grafica de hidropatia Kyte-Doolittle, promediada sobre una ventana de 7, una grafica de probabilidad de superficie Emini, una grafica de

flexibilidad de cadena Karplus-Schulz, una grafica de índice antigénico [JAMESON-WOLF], y unas graficas de estructuras secundaria Chou-Fasman y Garnier-Osguthorpe-Robson para la proteína GapC aislada de S. agal.

La figura 11 muestra una grafica de hidropatia Kyte-Doolittle, promediada sobre una ventana de 7, una grafica de probabilidad de superficie Emini, una grafica de flexibilidad de cadena Karplus-Schulz, una grafica de índice antigénico Jameson-Wolf, y unas graficas de estructuras secundaria [CHOU-FASMAN] y [GAMIER-OSGUTHORPE-ROBSON] para la proteína GapC aislada de S. uberis.

La figura 12 muestra una grafica de hidropatia [KYTE-DOOLITTLE], promediada sobre una ventana de 7, una grafica de probabilidad de superficie Emini, una grafica de flexibilidad de cadena Karplus-Schulz, una grafica de índice antigénico Jameson-Wolf, y unas graficas de estructuras secundaria Chou-Fasman y Garnier-Osguthorpe-Robson para la proteína GapC aislada de S. [PARAUBERIS.]

La figura 13 muestra una grafica de hidropatia Kyte-Doolittle, promediada sobre una ventana de 7, una grafica de probabilidad de superficie Emini, una grafica de flexibilidad de cadena Karplus-Schulz, una grafica de índice antigénico Jameson-Wolf, y unas graficas de estructuras secundaria Chou-Fasman y [GARNIER-OSGUTHORPE-ROBSON] para la proteína GapC aislada de *S. iniae*.

La figura 14 muestra una grafica de hidropatia Kyte-Doolittle, promediada sobre una ventana de 7, una grafica de probabilidad de superficie Emini, una grafica de flexibilidad de cadena Karplus-Schulz, una grafica de índice antigénico [JAMESON-WOLF], y unas graficas de estructuras secundaria Chou-Fasman y Garnier-Osguthorpe-Robson para Lipofgap4 (SEQ ID NO: 22), la proteína quimérica GapC.

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

La figura 16 es una representación diagramática de la gráfica de estructura secundaria Chou-Fasman para la proteína GapC aislada de *S. agal*.

La figura 17 es una representación diagramática de la gráfica de estructura secundaria [CHOU-FASMAN] para la proteína GapC aislada de *S. uberis*.

La figura 18 es una representación diagramática de la gráfica de estructura secundaria Chou-Fasman para la proteína GapC aislada de *S. [PARAUBERIS.]*

La figura 19 es una representación diagramática de la gráfica de estructura secundaria Chou-Fasman para la proteína GapC aislada de *S. [WHILE.]*

La figura [20] es una representación diagramática de la gráfica de estructura secundaria Chou-Fasman para Lipofgap4 (SEQ ID NO: 22), la proteína quimérica GapC.

La figura 21 es un diagrama de un plasmido pPolyGap. [1.]

La figura 22 es un diagrama de un plasmido pPolyGap. 2.

La figura 23 es un diagrama de un plasmido pPolyGap. 3.

La figura 24 es un diagrama de un plasmido pPolyGap. 4

La figura 25 es un diagrama de un plasmido polygap4.

descripción detallada.

La práctica de la presente invención empleara, a menos que se indique otra cosa, técnicas convencionales de biología molecular, microbiología, tecnología de AND recombinante, e inmunología, 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) Tiroxina: Tyr (Y) Valina: Val (V) A. Definiciones para describir la presente invención, los siguientes términos 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 aquí 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. 11 y SEQ ID NO. 12, respectivamente), *S. agalactiae* (SEQ ID NO. 13 y SEQ ID NO. 14, respectivamente), [*S.*] *uberis* (SEQ ID NO. 15 y SEQ ID NO. 16, respectivamente), [*S.*] *parauberis* (SEQ ID NO. 17 y SEQ ID NO. 18, respectivamente), y [*S.*] [*INIAE*] (SEQ ID NO. 19 y SEQ ID NO. 20, respectivamente).

Sin embargo, una proteína GapC como se definió aquí no esta limitada a las secuencias descritas como subtipos de cada una de estas especies de *Streptococos* son conocidas y variaciones de las proteínas GapC se presentaran entre ellas.

Los genes representativos [*GAPC*], derivados de [*S.*] *dysgalactiae*, *S. agalactiae*, *S. uberis*, y *S. parauberis*, se encuentran en plasmidos [*PET15BGAPC*,] *pmf521c*, *pmf521a*, *pmf521d*, y [*PMF521E*, 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 aquí. Adicionalmente, el termino esta destinado a proteínas que tienen secuencias de amino ácidos sustancialmente homologas (como se definió adelante) con secuencias de amino ácidos contiguas codificadas por los genes, que muestran actividad inmunológica [Y/O] de unión de plasmin.

así, los términos destinados a longitud completa, así como también inmunogenica, secuencias truncadas y parciales, y análogos activos y formas precursoras de las proteínas. también se incluyen en el termino fragmentos de nucleótidos del gen que incluyen al menos aproximadamente 8 pares de base contiguas, mas preferiblemente al menos 10 - 20 pares de base contiguas, y mas preferiblemente al menos aproximadamente 25 a 50, o mas, pares de bases contiguas del gen, o cualquier entero entre estos valores. Tales fragmentos son útiles como

169 :

sondas y en métodos de diagnóstico, discutidos mas 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 termino pretende formas de proteínas GapC a las cuales les falta la región y anclaje de membrana, y secuencias de ácido nucleico que codifican proteínas 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. De esta manera, 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 inmunogenicos 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 de amino ácidos y sales básicas pueden estar formadas con carboxilos libres. Sales de adición farmacéutica mente aceptables básicas y ácidas se discuten adicionalmente adelante. Además, las proteínas se pueden modificar mediante combinación con otros materiales biológicos tales como lípidos (tanto aquellos de ocurrencia natural como las moléculas u otros lípidos que no destruyen la actividad inmunológica) y sacáridos, o mediante modificación de cadena lateral, tal como acetilacion de grupos amino, fosforilación de cadenas laterales hidroxilo, oxidación de grupos [SULFIDRILO], glicosilacion 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 polipéptido producen una respuesta inmunológica como se defino aquí. 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 aminoácidos. Por ejemplo, los amino ácidos se dividen generalmente en cuatro familias: (1) ácido-aspartato y glutamato; (2) básico--lisina, arginina, histidina; (3) no polar--alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptofano; y (4) polar no cargada--glicina, asparagina, glutamina, cistina, serina [TREONINA,] tiroxina. Fenilalanina, triptofano, tiroxina son algunas veces clasificadas como amino ácidos aromáticos. Por ejemplo, es razonablemente predecible que un reemplazo aislado de leucina con isoleucina o valina, o viceversa; un aspartato con glutamato o viceversa; una treonina con serina o viceversa; 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 polipéptido 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, son probablemente las responsables de la variación sin afectar sustancialmente la función inmunogenica o enzimática.

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 9 a 20 aquí.

El termino "proteína GapC de estreptococo" pretende una proteína de unión de plasmin GapC, como se definió anteriormente, derivada de especies de estreptococos 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" pretende 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 provenientes 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, provenientes 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 polipéptido es una molécula de proteína o polipéptido separada y discreta del organismo total con el cual la molécula se encuentra en la naturaleza; o una proteína o polipéptido 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"] pretende que la secuencia de amino ácidos de la proteína de unión plasmin GAPC es la que elicitara 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 o a 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 antigénico". 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 epitopos pueden incluir 3 a 5 aminoácidos, más preferiblemente 5 a 10 amino ácidos, hasta la longitud completa de la molécula de referencia.

El termino proteína "epitopo múltiple" o polipéptido específica una secuencia de amino ácidos que comprenden un epitopo como se definió aquí, que contiene al menos un epitopo repetido dos o tres veces dentro de una molécula lineal. Las secuencias repetidas no necesitan estar directamente conectadas a si mismas, no sen repetidas en naturaleza de la misma manera y, adicionalmente, pueden estar presentes dentro de una secuencia mas larga que incluye otros amino ácidos que no están repetidos. Para los propósitos de esta invención, la secuencia del epitopo puede ser una copia exacta de una secuencia del epitopo tipo Silvestre, o una secuencia que es "funcionalmente equivalente" a como se definió aquí. Se refiere a una proteína de epitopo múltiple o polipéptido como se definió aquí que se produce mediante métodos recombinantes o sintéticos.

Una proteína o polipéptido de "fusión" o "quimérica" es aquella en la cual la secuencia de amino ácido de mas de una fuente se unen. Tale moléculas se pueden producir sintéticamente o recombinantemente, como se describe además aquí (ver la sección titulada "Production of GapC Plasmin-Binding [PROTEINS"INFRA)."). De esta forma, el

termino "proteína o polipéptido de fusión de epitopo múltiple" se refiere a una proteína o polipéptido de epitopo multiple como se definió aquí el cual es hecho por medios sintéticos o recombinantes.

A este respecto, una proteína de fusión de epitopo múltiple que comprende las regiones variables en las secuencias de amino ácidos de las proteínas GapC referidas anteriormente se pueden producir. La secuencia de aminoácidos para la proteína de fusión de epitopo múltiple GapC, y la secuencia de codificación de poli nucleótidos correspondientes, se describe en las figuras 6A-6C aquí. Los métodos para producir recombinantemente la proteína, incluyen un método para construir un plasmido polygap4 que contiene la secuencia codificadora quimérica (diagrama en la figura 25) y un método para expresar la proteína del plasmido polygap4 se describen en los ejemplos 4 y 5 infra.

Los términos proteína o polipéptido "inmunogenico" se refieren a una secuencia de amino ácido que elicitaba una respuesta inmunológica como se describió aquí. Una

proteína "inmunogenica" o polipéptido, como se utilizo aquí, incluye la secuencia de longitud completa de la proteína de unión de plasmin GapC en cuestión, con o sin la señal de secuencia, dominio de anclaje de membrana y/o dominio de unión de plasmin, análogos de este, o fragmentos inmunogenicos de este. Por "fragmento inmunogenico" se quiere significar un fragmento de proteína de unión de plasmin GapC que incluye uno o mas epitopos y así elicitla la respuesta inmunológica descrita anteriormente.

Tales fragmentos se pueden identificar utilizando cualquier número de técnicas de mapeo de epitopo, bien conocidas en el arte. Ver, por ejemplo, protocolo de mapeo de 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 números largos concurrentemente sintetizantes de péptidos sobre soportes sólidos, los péptidos corresponden a porciones de la molécula de proteína y hacen reaccionar los péptidos con anticuerpos mientras que los péptidos están aun unidos a los soportes. Tales técnicas son conocidas en el arte y se

179

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 rápidamente identificados al determinar la conformación espacial de los aminoácidos tales como, por ejemplo, cristalografía de rayos X y resonancia magnética nuclear bi-dimensional.

Ver, por ejemplo, Protocolos de Mapeo de Epitopo, supra. Las regiones antigénicas de las proteína 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 método Hopp/Woods, Hopp et al., Proc. [NATL.] Acad. Sci USA (1981) 78: 3824-3828 para determinar perfiles de antigenicidad, y las técnicas Kyte-Doolittle, Kyte et al., [J: MOL. BIOL.] (1982) 157: 105-132 para graficas de hidropatia. Las figuras 9 a 20 describen aquí los perfiles [KYTE-

DOOLITTLE] para proteínas representativas comprendidas 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. 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 antigénica 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 antígeno de interés.

Por "composición de subunidad de vacunas" se significa una composición que contiene al menos un polipéptido inmunogenico, pero no todos los antígenos, derivados de u homólogos a un antígeno de un a 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, polipéptidos inmunogenicos purificados (preferiblemente sustancialmente purificados) del patógeno, o análogo recombinantes de este. Una composición de subunidad de vacuna puede comprender el antígeno o antígenos subunitarios de interés sustancialmente libres de otros antígenos o polipéptidos del patógeno.

Por "FARMACEUTICAMENTE ACCEPTABLE" o "FARMACOLOGICAMENTE ACCEPTABLE" 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 delectrea con cualquiera de los componentes de la composición en la cual esta contenida.

Una "respuesta inmunológica" a una composición o vacuna es el desarrollo en el huésped de una respuesta inmune 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 producción de anticuerpos, células B, células ayudantes T, células supresoras T, [Y/O] células T citotóxicas y/o células T, dirigidas específicamente a un antígeno o antígenos incluidos en la composición o vacuna de interés. Preferiblemente, el huésped mostrara una respuesta inmunológica 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 reducción 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 in vivo de un antígeno, antígenos, un epitopo, o epitopos. 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 termino "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 incluidas en vacas, ovejas, cabras, cochinillas, yeguas, y similares,

causadas por la presencia de microorganismos patógenos, tales como [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 débil, ojos hundidos, debilidad y anorexia completa; (2) aguda, con cambios en glándulas similares a aquellos anteriores pero donde la fiebre, anorexia y depresión son ligeros a moderados; (3) subaguda, donde no existen cambios sistémicos mostrados y los cambios en la glándula y su secreción son menos marcados: y (4) [SUBCLINICA,] donde la reacción inflamatoria es detectable solo mediante ensayos estándar para mastitis.

Los ensayos estándar para la detección 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 diagnostico de esta, ver por ejemplo, The Merck [VETERINAR » O MANUAL : 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 [CHORDATA,] 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 heterologas (como se define adelante) en asociación con esta.

El termino "aislado" en el contexto de un poli nucleótido pretende que el poli nucleótido se aísle del cromosoma con el cual esta normalmente asociado, y se aísla de la secuencia genomica 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 poli nucleótidos de interés son bien conocidos en el arte e incluyen, por ejemplo, la disrupción 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 codon de inicio en el terminal 5' (amino) y un codon de parada de traducción en el terminal 3' (carboxy). Una secuencia de codificación puede incluir, pero no esta limitada a, secuencias procarióticas, cADN de eucarióticas [MRNA], secuencias de ADN genómico provenientes de ADN eucariótico (por ejemplo, mamíferos), t aun secuencias de ADN sintético. Una secuencia de terminación de de transcripción usualmente estará localizada en el 3' de 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 tiroxina, y viceversa; similarmente, la citosina es complementaria a la guanina, y viceversa; de esta manera, el complemento de la secuencia de referencia 5'-ATGCTGA-3' seria 5'-TACGACT-3'.

Una secuencia "tipo silvestre" o "nativa", como se utiliza aquí, se refiere a secuencias que codifican polipéptidos 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: 12).

"Recombinante" como se utiliza aquí describe una molécula de ácido nucleico que significa un polinucleótido 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 polinucleótido con la cual este se asocia en la naturaleza; y/o (2) está ligado a un polinucleótido diferente de aquel al que está ligado en la naturaleza. El término "recombinante" como se utiliza con respecto a una proteína o polipéptido significa un polipéptido producido por la expresión de un polinucleótido recombinante. "células hospederas recombinantes", "células hospederas", "células", "líneas celulares", "cultivos de células", y otros de tales términos denotan

microorganismos procarióticos o líneas de células eucarióticas cultivadas como entidades unicelulares, son utilizadas intercambiablemente, 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 idéntica en morfología o en genómica o complemento de AND total al padre original, debido a mutación accidental o deliberada. La progenie 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 progenie pretendida mediante esta definición y son cubiertas por los términos anteriores.

La "homología" se refiere al porcentaje de identidad entre dos poli nucleótidos o dos porciones de polipéptido. Los dos ADN, o dos secuencias de polipéptido 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 homólogos también se refiere a secuencias que muestran identidad completa al ADN especificado o a la secuencia de polipéptido.

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 polinucleótidos o polipéptidos, 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 número 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, Dayhoff, 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 homologia local de Smith and Waterman [(1981) AVANCES EN

APPL. MATH.] 2: 482-489 para análisis de péptido. 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 homología de Smith and Waterman con una mesa de marcador por defecto y una pena de vacío de seis posiciones de nucleótido.

Otro método 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 esta suite de paquetes el algoritmo Smith-Waterman se puede emplear donde se utilizan parámetros por defecto para la mesa de conteo (por ejemplo, pena abierta de espacio de 12, pena de extensión 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 parámetros por defecto: código genético = estándar; filtro = ninguno; hebra = ambas; corte = 60; esperado = 10, Matriz = [BLOSUM62]; Descripciones = 50 secuencias; suerte por = ALTO MARCADOR; Bases de datos = no redundantes, GenBank + EMBL + DDBJ + PDB + GenBank CDS translaciones + proteína Suiza + Spupdate + PIR. Detalles de estos programas se pueden encontrar en la siguiente dirección de Internet: [http://www. \[NCBI.\] nhl. \[GOV/CGI-BIN/BLAST.\]](http://www. [NCBI.] nhl. [GOV/CGI-BIN/BLAST.])

Alternativamente, la homologia se puede determinar mediante la hibridización de poli nucleótidos bajo condiciones que forman duplex estables entre regiones homologas, seguida por la digestión con nucleasa o nucleasas específicas 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 hibridización de fragmentos que son sustancialmente homólogos y se pueden identificar en un experimento de hibridización Southern bajo, por ejemplo, condiciones estrictas como se definió para el sistema en particular.

Definir las condiciones de hibridización apropiadas esta dentro del experto en la técnica. Ver, por ejemplo, Sambrook et al., supra; clonación de ADN, supra; hibridización de ácido nucleico, supra.

Por el termino "VARIANTE DEGENERADA" se explica un poli nucleótido que contiene cambios en la secuencia de ácido nucleico de este, que codifica un polipéptido que tiene la misma secuencia de amino ácidos que el

polipéptido codificado por el poli nucleótido del cual se deriva la variante degenerada.

Las técnicas para determinar la "similaridad" de la secuencia de aminoácidos son bien conocidas en la técnica.

En general, "similaridad" significa la comparación exacta de amino ácido a amino ácido de dos o mas polipéptidos en el sitio apropiado, donde los amino ácidos son idénticos o poseen propiedades químicas y/o físicas similares tales como carga o hidrofobicidad. La así llamada "SIMILARIDAD PORCENTUAL" se puede determinar entre las secuencias de polipéptido comparadas. 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 poli nucleótidos o secuencias de polipéptido, respectivamente.

Una región "heterologa" de una construcción de AND es un segmento identificable de AND dentro o unido a otra molécula de AND que no se encuentra en asocio 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 notacionales 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 producir la replicación del segmento unido. Un vector es capaz de transferir secuencias de gen a células objetivo (por ejemplo, vectores de plasmido bacterial, vectores virales, vectores no virales, portadores particulados, y liposomas).

Típicamente, 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 términos 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 [(E.) (G.), un origen (M13) de replicación), un sitio de clonación múltiple, y un origen "MAMMALIAN" de replicación (por ejemplo, un SV40 u origen de adenovirus de replicación).

Los "ELEMENTOS DE CONTROL" del ADN se refieren colectivamente a los promotores de transcripción, elementos mejoradores de transcripción, secuencias de terminación de transcripción, secuencias de poliadenilación (localizadas en 3' hasta el codon de parada de traducción), secuencias para optimización de la iniciación de la translación (localizadas en 5' hasta la secuencia de codificación), secuencias de terminación de traducción, 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 (G.), McCaughan et al. (1995) PNAS USA 92:

5431-5435; [KOCHETOV] et al (1998) FEBSLetts. 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 transcribirá a la secuencia de codificación en el [MRNA], la cual es entonces traducida en el polipéptido 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 (covalente mente 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, material fecal, orina, medula de hueso, bilis, fluido espinal, fluido linfático, muestras de piel, secreciones externas de la piel, tractos respiratorio, intestinal, y genitourinario, lagrimas, 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 termino "etiqueta" y "etiqueta detectable" se refiere a una molécula capaz de detección, que incluye, pero no esta limitado a, isótopos radioactivos, elementos fluorescentes, quimo luminiscentes, enzimas, substratos de enzimas, cofactores de enzima, inhibidores de enzima, cromóforos, tintes, iones metálicos, soles metálicos, ligados (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 parámetros de proceso como tales podrían, 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 preferidos y los métodos se describen aquí.

Una supervisión general de la invención Central a la, presente invención es el {descubrimiento} de que las proteínas GapC son capaces de elicitar una respuesta inmune en un sujeto vertebrado. Los experimentos desarrollados en el soporte de la presente invención han demostrado que la inmunización de un rebaño lechero con proteína GapC de *S. dysgalactiae* le confieren protección contra infecciones experimentales de estos organismos, y adicionalmente, le confieren protección contra infección de *S. [UBERIS.]*

El GapC se introduce mediante un número de diferentes especies de estreptococos. Con la excepción de

varias regiones variables localizadas, las secuencias de amino ácido de las proteínas GapC producidas por aquellas cepas son altamente conservadas. Por lo tanto, es deseable construir múltiples proteínas de fusión GapC de epítopo que comprenden determinantes antigénicos tomados tanto de regiones altamente conservadas del GapC, como de regiones únicas de proteínas de GapC provenientes de varias especies de estreptococos.

Los experimentos desarrollados como soporte de la presente invención han demostrado que, tales proteínas son capaces de elicitar una amplia inmunidad contra una variedad de infecciones de estreptococos, mientras que suministran la ventaja económica adicional de minimizar el número de antígenos presentes en la formulación final, y concomitantemente reducir el costo de producción de esa formulación.

Las proteínas de fusión de epítopo múltiple GapC de la presente invención se describen mediante la formula estructural general [(A) X--(B) Y--(C) Z] que representan una secuencia de amino ácido lineal. B es una secuencia

de amino ácido de al menos cinco y no mas de 1,000 amino ácidos de un determinante antigénico proveniente de la proteína GapC, y Y es un entero de 2 o mas. A y C son cada uno diferentes de B, así como también son diferentes uno del otro y son independientemente una secuencia de aminoácido de un determinante antigénico que contiene al menos cinco y no mas de 1,000 amino ácidos no inmediatamente adyacentes a B en naturaleza. X y Z son cada uno independientemente un entero de 0 o más, en donde al menos uno de X y Z es 1 o más.

Típicamente, A, B, y C son determinantes antigénicos de las proteínas GapC de una o mas especies de bacterias. EN una modalidad preferida, A, B, y C son secuencias de amino ácido que comprenden uno o mas determinantes antsequences comprising one or more antigenic determinants from the GapC protein of one or more of the following species of streptococcus [:] [S. DYSGALACTIAE ; S. AGALACTIAE] ; S. [UBERIS] ; [S.] parauberis, y S. iniae.

A este respecto, las figures 9 hasta 13 muestran graficas de lo siguiente para proteínas GapC de estreptococos empleadas en la presente invención: hidropatia [KYTE-DOOLITTLE], promediada 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 glicosilacion predichos. Las figuras 15 hasta 19 muestran graficas de estructura secundaria de acuerdo con Chou- Fasman para las proteínas anteriormente mencionadas. Un experto en la técnica podría fácilmente utilizar la información presentada en las figuras 9 hasta 13 y 15 a 19 en vista de las enseñanzas de la presente especificación para identificar genes antigénicos que se pueden emplear en construcción de proteína quimérica de la presente invención.

Más preferiblemente, A, B, [Y/O] C incluye uno o más regiones variables de las proteínas GapC provenientes de más de una especie de estreptococo. A este respecto, las figuras 8A-8C muestran un alineamiento de secuencia de

amino ácido que ilustra regiones de homología y variabilidad que existe entre la proteína GapC de [S.] [DYS GALACTIAE, S. AGALACTIAE, S. UBERIS, S. PARAUBERIS, Y S. INIAE.]

Las secuencias de amino ácido para la proteína GapC de S. [PYOGENES] [Y S. EQUISIMILIS, S. PYOGENES] también están incluidas. En particular, varias regiones variables están localizadas en las posiciones de amino ácido 62 a 81; 102 a 112; 165 a 172; 248 a 271; y 286 a 305.

La proteína de fusión de epitopo múltiple de la presente invención también puede incluir secuencias espaciadoras interpuestas entre A, B, y/o C. Las secuencias espaciadoras son típicamente secuencia de amino ácido que van desde 1 a 1,000 amino ácidos, pueden ser iguales o diferentes a A, B, o C, y pueden ser iguales o diferentes como una a la otra.

La presente invención también puede incluir una secuencia de señal [Y/O] una secuencia de transmembrana.

Ejemplos de secuencias de señal adecuadas incluyen secuencias de señal de *E. coli* LipoF, y secuencia de señal OmpF. Ejemplos de secuencias de transmembrana adecuada se incluyen aquellas asociadas con LipoF y OmpF.

Una modalidad especialmente preferida de la presente, invención es la proteína de fusión de epitopo múltiple, Gap4. La^o secuencia de amino ácido de Gap4 (SEQ ID NO: 22), una proteína de fusión GapC de epitopo múltiple representativo, se muestra en la figura 6A-6C, como en la secuencia de polinucleótidos que la codifica (SEQ ID NO. 21). El Gap4 es una proteína quimérica de 47.905 kDa [448] amino ácidos. Los residuos 1 a 27 son idénticos a los residuos de amino ácido 1 a 27 de la secuencia de señal de *[E.] coli* LipoF. Los residuos 28 a 123 son idénticos a los residuos 1 a 96 de la proteína *S. dysgalactiae* GapC. Los residuos 124 (leucina) y 125 (ácido glutámico) son aminoácidos espaciadores. Ellos están seguidos por residuos 126 a 165, que son idénticos a los residuos 56 a 95 de *S. parauberis* así como también a los mismos residuos de *S. UBERIS*. Los residuos 166 (isoleucina) es un aminoácido espaciador.

Los residuos 167 a 208 son idénticos a los residuos 55 a 96 de la proteína GapC de *S. AGALACTIAE*].

Los residuos 209 (treonina) y 210 (serina) son amino ácidos espaciadores. Los residuos 211 a 448 son idénticos a los residuos 99 a 336 de la proteína GapC de *S. dysgalactiae*.

Como se expreso, el Gap4 tiene un residuo de cisteína presente en el extremo amino terminal de la proteína madura. La secuencia de señal LipoF y el residuo de cisteína están presentes para asegurar que la molécula quimérica este eficientemente secretada de la célula huésped bacterial y se llegue a unir a la membrana de la célula huésped por vía de la porción lipida. La proteína también se puede extraer de la superficie celular por vía de una solubilizacion diferencial con un detergente tal como Sarkosilo o [TRITONX-100&COMMAT]; (ver ejemplo 5 infra).

Las proteínas quiméricas GapC de la presente invención de fragmentos antigénicos de este pueden ser suministradas en composiciones de subunidad de vacuna. Además del uso en composiciones de vacuna, en las proteínas o anticuerpos a estos 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 un gen homólogo aislado en otras cepas bacteriales. Por ejemplo, fragmentos que comprenden al menos aproximadamente 15-20 nucleótidos, más preferiblemente al menos aproximadamente 20-50 nucleótidos, y más preferiblemente aproximadamente 60-100 nucleótidos, o cualquier entero entre estos valores, encontrara 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, las composiciones de vacuna incluyen proteínas de fusión de epítipo múltiple GapC que comprenden determinantes antigénicos de *S. [DYS GALACTIAE, S. UBERIS, S. PARAUBERIS, S. INIAE,]* y/o estreptococos

(GBS) del grupo B tales como *S. agalactiae*, se pueden utilizar para tratar infecciones de estreptococos en sujetos vertebrados que son causadas por estas u otras especies. En particular, *S. [UBERIS Y S. AGALACTIAE]* son patógenos bacterianos comunes asociados con mastitis en bovinos, equinos, ovinos y especies de cabras. Adicionalmente, los estreptococos del grupo B tales como *S. agalactiae*, son conocidos por causar numerosas otras infecciones en vertebrados, incluyendo septicemia, meningitis, bacteremia, impetigo, artritis, infecciones del tracto urinario, abscesos, aborto espontáneo etc.

De esta manera, las composiciones de vacuna que contienen proteínas GapC encontraran uso en el tratamiento y/o prevención de una amplia variedad de infecciones de estreptococo.

Similarmente, las proteínas de fusión del epítopo múltiple GapC que comprenden determinantes antigénicos derivados de otros géneros bacteriales tales como estafilococos, *Microbacterium*, *Esqueriquia*, *Pseudomonas*, *Nocardia*, *Pasteurella*, *Clostridium* y *Micoplasma*

encontraran uso para el tratamiento de infecciones bacteriales causadas por especies que pertenecen a estos géneros. Así, es fácilmente evidente que las proteínas GapC quiméricas se pueden utilizar para tratar y/o evitar una amplia variedad de infecciones bacteriales en numerosas especies.

Las proteínas de fusión del epítipo múltiple GapC de la presente invención se pueden utilizar en composiciones de vacuna bien sea solas o en combinación con otras bacterias, hongos, antígenos virales o protozoarios. Estos otros antígenos se pueden suministrar separadamente o aun como proteínas de fusión que comprenden la proteína quimérica GapC fusionada a uno o mas de estos antígenos. Por ejemplo, otras proteínas inmunogénicas provenientes de *S. uberis*, tales como el factor CAMP, cápsula de ácido hialurónico, hialuronidasa, proteína similar a R y activador de plasminógeno, se pueden administrar con la proteína GapC quimérica. Adicionalmente, las proteínas inmunogénicas provenientes de otros organismos involucrados en mastitis, tales como del género *Estafilococo*, *Corinebacterium*, *Pseudomonas*, *Nocardia*, *Clostridium*, *Microbacterium*, *Mycoplasma*, *Pasteurella*,

Prototeca, otros estreptococos, bacterias coliformes, así como también levaduras, se pueden administrar junto con las proteínas de fusión GapC descritas aquí para proporcionar un amplio espectro de protección. Así, por ejemplo, las proteínas inmunogenicas provenientes de estafilococos aureus, [STR.] agalactiae, [STR.] dysgalactiae, [STR.] zooepidemicus, Corinebacterium [PYOGENES, PSEUDOMONAS AERUGINOSA, NOCARDIA ASTEROIDES, CLOSTRIDIUM] [PERFRINGENS, ESCHERICHIA COLI, ENTEROBACTER AEROGENES] y Klebsiella spp. Se pueden suministrar junto con las proteínas de unión de plasmin GapC de la presente invención.

Producción de proteínas de fusion de epitopo multiple GapC. Las proteínas quiméricas anteriormente descritas y los fragmentos activos y análogos derivados de la misma, se pueden producir mediante métodos recombinantes como se describe aquí. Estos productos recombinantes pueden tomar la forma de unas secuencias de proteína parcial, secuencias de longitud completa, formas precursoras que incluyen secuencias de señal, o formas maduras sin señales.

Las secuencias de ADN de proteína de unión de plasmin GapC utilizadas para construir las proteínas quiméricas de la presente invención se pueden aislar mediante una variedad de métodos conocidos por aquellos expertos en la técnica. Ver, por ejemplo, Sambrook et al., supra. Métodos para aislar, clonar y secuenciar las secuencias de gen que codifica la proteína GapC proveniente de *S. dysgalactiae*, *S. [AGALACTIAE, S. UBERIS, S.] [PARAUBERIS, Y S. INIAE]* se detallan en el ejemplo 1,2 y 3, infra.

Después de aislar y clonar las secuencias de proteína GapC deseadas, las secuencias de poli nucleótido que codifican las proteínas quiméricas se construyen utilizando técnicas recombinantes estándar que incluyen amplificación PCR, digestión de endonucleasa de restricción y ligación. Ver, por ejemplo, Sambrook et al., supra. métodos para construcción de Gap4, una modalidad especialmente preferida de la presente invención, se detalla en el ejemplo 4, [INJ2RA.]

Alternativamente, las secuencias de ADN que codifican las proteínas de interés se pueden preparar sintéticamente en lugar de clonarlas. Las secuencias de ADN se pueden diseñar con los codones apropiados para la secuencia de amino ácido particular. En general, uno seleccionara los codones preferidos para los huéspedes destinados y las secuencias se utilizan para expresión. La secuencia completa se ensambla de polinucleótidos traslapados preparados mediante métodos estándar y ensamblados en una secuencia de codificación completa. Ver, por ejemplo, Edge (1981) Nature 292: 756; [NAMBAIR] et al. (1984) Sci- ence 223: [1299 ;] Jay et al. (1984) [J ; BIOL. CHEM.] 259: 6311.

Una vez las secuencias de codificación se han preparado para las proteínas deseadas, 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 un vector de clonación apropiado es materia de escogencia. Ejemplos de vectores de ADN recombinantes para clonación de células hospederas que ellas pueden transformar incluyen el bacteriófago [K] (E. coli), pBR322 (E. coli), pACYC177 (E. coli), pKT230

(bacteria gram-negativa), [PGV1 106] (bacteria gram-negativa), [PLAFRL] (bacteria gram-negativ), pME290 (bacteria gram-negativa no-E. coli), pHV14 (E. coli y Bacillus subtilis), pBD9 (Bacillus), pIJ61 [(STREPTOMYCES), PUC6 (STREPTOMYCES), YIP5 (SACCHAROMYCES), YCPL9 (NACCHAROMYCES)] y virus papiloma de bovino (células mamarias). Ver, Sambrook et [AL.,] supra; DNA Cloning, supra; B. Perbal, supra.

El gen puede ser ubicado bajo el control de un promotor, sitio de unión de ribosoma (para expresión bacterial) y, opcionalmente, un operador (colectivamente denominado aquí como elementos de "control"), de tal forma que la secuencia de ADN que codifica la proteína deseada se transcribe en el ARN en la célula hospedera transformada mediante un vector que contiene esta construcción de expresión. La secuencia de codificación puede o no puede contener un péptido de señal o una secuencia libre. Si una secuencia de señal se incluye, esta puede ser la nativa, secuencia homologa, o secuencia heterologa. Por ejemplo, la secuencia de señal LipoF se agrega a la región amino terminal de la proteína quimérica Gap4 para permitir la secreción de la proteína

después de la expresión. Ver ejemplos 4E y 5, infra. Las secuencias líder se pueden remover por el huésped en un procesamiento [POST-TRANSDUCCIONAL]. Ver, por ejemplo, Patente U. S. Nos. 4,431,739; 4,425,437; 4,338,397.

Otras secuencias regulatorias que permiten la regulación de la expresión de las secuencias de proteína relativas al crecimiento de la célula huésped también pueden ser deseables. Las secuencias regulatorias son conocidas por aquellos expertos en la técnica, e incluyen ejemplos los cuales causan la expresión de un gen a ser prendido o apagado 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 regulatorias se pueden ligar a la secuencia de codificación 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 las 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 para mantener la estructura de lectura adecuada. Esto puede ser deseable para producir mutantes o análogos de la proteína de unión plasmin GapC. Los mutantes o 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 mediante la sustitución de uno o mas nucleótidos dentro de la secuencia. Las técnicas para modificar las secuencias de nucleótidos, tales como la mutagenesis dirigida de sitio, se describen en, por ejemplo, Sambrook et al., supra; DNA Cloning, supra; Nucleic Acid Hybridization, supra.

El vector de expresión se utiliza entonces para transformar una célula huésped apropiada. Un numero de líneas celulares de mamíferos son conocidas en la técnica e incluyen líneas de células inmortalizadas disponibles de la American Type Culture Collection (ATCC), tal como, pero no limitado a, células de ovario de hámster Chino (CHO), células Hela, células de riñón de hámster bebe (BHK), células de riñón de mono (COS), células de carcinoma hepatocelular humano (por ejemplo, Hep G2), células de riñón de bovino Madin-Darby ("MDBK"), así como también otros. Similarmente, los huéspedes bacteriales tales como E. coli, Bacillus subtilis, y Streptococcus [SPP.], encontraran uso con las presentes construcciones de expresión. Los huéspedes de levadura útiles en la presente invención incluyen [INTER ALIA, SACCHAROMYCES CEREVISIAE, CANDIDA ALBICANS, CANDIDA MALTOSA,] [CANDIDA
HAUSENULA POLYNOPTA, KLUYVEROMYCES FRAGILIS, KLUYVEROMYCES LACTIS, PICHIA GUILLERIMONDI,] Pichia [PASTORIS, SCHIZOSACCHAROMYCES POMBE] y [YARROWIA] [LIPOLYTICA. INSECT] las células de insecto para uso con vectores de expresión de báculo virus incluyen, [INTER ALIA, Aedes Aegypti, Autographa Californica,] Bombyx [MORI, DROSOPHILA MELANOGASTER, SPODOPTERA FRUGIPERDA,] y Trichoplusia ni.

Dependiendo del sistema de expresión y el huésped seleccionado, las proteínas de la presente invención se producen mediante células huésped de cultivo transformadas mediante un vector de expresión descrito anteriormente bajo condiciones por medio de las cuales la proteína de interés se expresa. La proteína es entonces aislada de las células huésped y purificada. 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 son conocidos por los expertos en la técnica.

Las proteínas de la presente invención también se pueden producir mediante síntesis química tal como síntesis de péptido de fase sólida, utilizando secuencias de amino ácido conocidas o secuencias de amino ácido derivadas de las secuencias de AND 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, Solid Phase Peptide Synthesis, 2nd Ed., Pierce Chemical Co., [ROCKFORD,] IL (1984) y G. Barany y R. B. Merrifield, The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology, editors E. Gross y J. Meienhofer, Vol. 2, Academic Press, New York, (1980), pp. 3-254, para técnicas de síntesis de péptido de fase sólida; y M

[BODANSKY, PRINCIPLES OF PEPTIDE SYNTHESIS,] Springer-Verlag, Berlín [(1984)] y E. Gross y J.

Meienhofer, Eds., The Peptides: Analysis, síntesis, Biology, supra, Vol. 1, para síntesis de solución clásica. La síntesis química de los péptidos puede ser preferible si un fragmento pequeño de antígenos en cuestión es capaz de elevar una respuesta inmunológica en el sujeto de interés.

Las proteínas de unión de plasmin GapC quimérico de la presente invención, o sus fragmentos, se pueden utilizar para producir anticuerpos, tanto policlonales y monoclonales. Si los anticuerpos policlonal se desean, se

inmuniza un mamífero seleccionado, (por ejemplo, ratón, conejo, cabra, caballo, etc.) 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 los anticuerpos policlonales se utiliza, los anticuerpos policlonales se pueden purificar mediante cromatografía, de inmunoafinidad, utilizando procedimientos conocidos.

Los anticuerpos monoclonales a las proteínas de unión de plasmin GapC quimérico y a los fragmentos de este, también pueden ser fácilmente producidas por un experto en la técnica. La metodología general para la elaboración de anticuerpos monoclonales al utilizar tecnología de híbrido más bien conocida.

Las líneas celulares que producen anticuerpos inmortales se pueden crear mediante fusión celular, y

también mediante otras técnicas tales como transformación directa de linfocitos B con ADN oncogénico o transfección con virus Epstein-Barr. Ver, por ejemplo, M. Schreier et al., Hybridoma Techniques (1980); Hammering et al., MONOCLONAL ANTIBODIES Y L⁺-CELL HYBRIDOMAS (1981) ; [KENNETT] et al., Monoclonal Antibodies (1980); ver también de Patente U. S. 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; y 4,493,890. Los paneles de anticuerpos monoclonales producidos contra las proteínas de unión de plasmin GapC quimérico, o fragmentos de este, se pueden tamizar para varias propiedades; es decir, para isótopo, epítopo, afinidad, etc. Los anticuerpos Monoclonales son útiles en la purificación, utilizando técnicas de inmunoafinidad, de los antígenos individuales están dirigidos contra anticuerpos tanto policlonales como monoclonales que también se pueden utilizar para inmunización pasiva o se pueden combinar con preparaciones de subunidad de vacuna para mejorar la respuesta inmune. Los anticuerpos Policlonales y monoclonales también son útiles para propósitos de diagnóstico.

Las formulaciones de vacuna y la administración de proteínas de fusión de epítopo múltiple GapC de la presente invención se pueden formular en composiciones de vacuna, bien sea o en combinación con otros antígenos, para uso en sujetos de inmunización como se describe adelante. Los métodos de preparación de tales formulaciones se describen en, por ejemplo, [REMINGTON&APOS; S PHARMACEUTICAL SCIENCES,] Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania, 18 Edition, 1990. Típicamente, las vacunas de la presente invención se preparan como inyectable, bien sea como soluciones líquidas o suspensiones. Las formas sólidas adecuadas para la solución o la suspensión en vehículos líquidos antes de la inyección se pueden también prepara. La preparación también puede ser emulsificada o encapsulado el ingrediente activo en vehículos. El ingrediente inmunogenico activo se mezcla generalmente con un vehículo compatible farmacéuticamente, 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 o emulsificación y agentes de amortiguado de pH.

Los adyuvantes que mejoran la efectividad de la vacuna también se pueden agregar a la formulación. Los adyuvantes pueden incluir por ejemplo, dipéptidos [MURAMYL], avridina, hidróxido de aluminio, bromuro de dimetildioctadecil amonio (DDA), aceites, emulsiones de aceite en agua, saponinas, [CITOKINAS,] y otras sustancias conocidas en el arte.

La proteína de unión de plasmin GapC quimérico se puede unir 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 serum albúminas, hemocianina de lapa hueco de cerradura, moléculas de inmunoglobulina, tiroglobulina, ovalbumina, y otras proteínas bien conocidas por aquellos expertos en la técnica; polisacáridos, tales como sefarose, agarosa, celulosa, glóbulos de celulosa y similares; los aminoácidos poliméricos tales como ácido polipoliglutamico, polilisina, y similares; copolimeros de amino ácido; y partículas inactivas de virus.

Las proteínas de unión de plasmin GapC quimérico se pueden utilizar en su forma nativa o sus contenidos de contenidos de grupo funcional se pueden modificar mediante, por ejemplo, las succinilacion de residuos de lisina o la reacción con Cys-tiolactona. Un grupo [SULFOIDRILO] también se podría incorporar dentro del portador (o antígeno) mediante, por ejemplo, la reacción de unas funciones amino con 2-iminotiolano o ester de N-hidroxisuccinimida de 3- (4-ditioipiridil propionate. Los portadores adecuados también pueden ser modificados para incorporar brazos espaciadores (tales como hexametilena diamina u otras moléculas bifuncionales de tamaño similar) para unión de los péptidos.

Otros portadores adecuados para las proteínas de unión de plasmin GapC quimérico de la presente invención incluyen polipéptidos VP6 de rotavirus, o fragmentos funcionales de estos, como se describe en la Patente U. S. No. 5, 071,651. También es útil un producto de fusión de una proteína viral y proteínas quiméricas sujeto hechas mediante 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 replica el modo natural de presentación en el sujeto, lo cual eleva el estado inmunizado. Alternativamente, las proteínas de la presente invención se pueden acoplar a eritrocitos, preferiblemente los eritrocitos del propio sujeto. Los métodos de acoplamiento de péptidos a proteínas o células son conocidos por aquellos expertos en la técnica.

Adicionalmente, las proteínas de unión de plasmin GapC quimérico (o complejos de estos) se pueden formular en unas composiciones de vacuna bien sea en formas neutras o de sales. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las sales de adición ácida (formadas con los grupos amino de los polipéptidos activos) y que se forman con ácidos inorgánicos tales como, por ejemplo, ácidos clorhídrico y fosfórico, o ácidos orgánicos tales como acético, oxálico, 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, y tales bases orgánicas como isopropilamina,

trimetilamina, 2-etilamino etanol, histidina, procaína, y similares.

Las formulaciones de vacuna contendrán una "cantidad terapéuticamente efectiva" de un ingrediente activo, que es, una cantidad capaz de elicitar una respuesta inmune en un sujeto al cual la composición se administra. En el tratamiento y prevención de mastitis, por ejemplo, una "cantidad terapéuticamente efectiva" sería preferiblemente una cantidad que mejora la resistencia de la glándula mamaria a nueva infección y/o reduce la severidad clínica de la enfermedad. Tal protección se demostrara bien sea mediante reducción o falta de síntomas normalmente mostrados por un huésped infectado, una recuperación rápida de tiempo y/o conteo de células somáticas disminuidas en la leche del cuarto infectado. Por ejemplo, la capacidad de la composición para retener o llevar el conteo de células somáticas (SCC) en la leche por debajo de aproximadamente 500,000 células por ml, el valor umbral establecido por la International Dairy Federation, por encima de lo cual los animales son considerados con mastitis clínica, será indicativo de un efecto terapéutico.

~~220~~
229

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

La concentración de proteína de unión de plasmin GapC quimérico variara típicamente desde aproximadamente [1%] a aproximadamente 95% de (w/w) de la composición o aun mayor o menor si es apropiado. Con las presentes formulaciones de vacuna 5 a 500 [LLG] de ingrediente activo por ml de solución inyectada deberán ser adecuados para elevar una respuesta inmunológica cuando una dosis de 1 a 3 ml por animal se administra.

Para inmunizar un sujeto, la vacuna se administra generalmente de manera parenteral, usualmente mediante inyección intra muscular. Otros modos de administración, sin embargo, tales como el subcutáneo, intraperitoneal e inyección intravenosa también son aceptables. La cantidad a ser administrada depende del animal a ser tratado, la capacidad del sistema inmune del animal a sintetizar anticuerpos, el grado de protección deseado. Las dosis efectivas pueden ser fácilmente establecidas por un

experto en 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, al animal le pueden ser administradas tantas dosis como requiera para mantener un estado de inmunidad a la infección.

Las formulaciones de vacuna adicionales que son adecuadas para otros modos de administración incluyen supositorios y, en algunos casos, formulaciones de aerosol, intranasales, u orales, y formulaciones de liberación sostenida. Para los supositorios, la composición vehículo incluirá ligadores tradicionales y portadores, tales como, polialcalino glicoles, o [TRIGLYCERIDOS]. Tale supositorios se pueden formar de mezclas que contienen el ingrediente activo en el rango de aproximadamente 5% a aproximadamente 10% (w/w), preferiblemente aproximadamente 1% a 2%. Los vehículos orales incluyen tales excipientes normalmente empleados como, por ejemplo, grados farmacéuticos de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, celulosa de sacarina de sodio, carbonato de magnesio, y similar.

Estas composiciones de vacuna oral se pueden tomar en la forma de soluciones, suspensiones, tabletas, píldoras, cápsulas, formulaciones de liberación sostenida o polvos, y contiene desde aproximadamente 10% a aproximadamente 95% del ingrediente activo, preferiblemente aproximadamente 25% a aproximadamente 70%.

Las formulaciones intranasales usualmente incluirán vehículos que ni 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 con la invención objeto. Las formulaciones nasales también pueden contener preservativos tales como, pero no limitados a, clorobutanol y cloruro de benzalkonio. Un tenso activo puede estar presente para mejorar la absorción de las proteínas objeto mediante mucosa nasal.

Las formulaciones de liberación controlada o sostenida son hechas al incorporar la proteína en portadores o vehículos tales como liposomas, polímeros impermeables no reabsorvibles tales como copolímeros de

etilenovinil acetato y copolimeros [HYTREL (D)], polimeros hinchable tales como hidrogeles, o polimeros reabsorvibles tales como colágeno y ciertos poliacidos o poliesteres como aquellos utilizados para hacer suturas reabsorvibles. Las proteínas de unión de plasmin GapC quimérico también se pueden suministrar utilizando mini bombas implantadas, bien conocidas en la técnica.

Las proteínas de unión de plasmin GapC quimérico de la presente invención se pueden administrar por vía de un virus portador que exprese el mismo. Los virus portadores que encontraran uso con la presente invención incluyen pero no están limitados a 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 la proteína particular se inserta primero en un vector apropiado de tal forma que este es adyacente al promotor de vaccinia y las secuencias de ADN de vaccinia flanqueantes, tales como la secuencia que codifica la timidina quinaza (TK). Este vector es entonces utilizado para transfectar células que son simultáneamente infectadas con vaccinia. La recombinación homologa sirve

para insertar el promotor de vaccinia mas un gen que codifica la proteína del caso en el genoma viral. El [TKRECOMBINANT] resultante se puede seleccionar mediante cultivos de células en la presencia de 5-bromodeoxiuridina y recolectar placas virales resistentes a esta.

Una ruta alternativa de administración involucra terapia de gen o inmunización de ácido nucleico. Así, las secuencias de nucleótidos (y los elementos regulatorios que la acompañan) que codifican las proteínas de unión de plasmin GapC quimérico objetivo se pueden administrar directamente a un sujeto para la traducción in vivo de estas. Alternativamente, la transferencia del gen se puede lograr al transfectar las células o tejidos de los sujetos ex vivo y reintroducir el material transformado en el huésped. El ADN se puede introducir directamente en el organismo huésped, es decir, mediante inyección (ver Solicitud Internacional No. WO/90/11092; y Wolf et al. (1990) Science [247]: 1465-1468). La transferencia del gen mediado por liposoma también se puede lograr utilizando métodos conocidos. Vre, por ejemplo, [HAZINSLD] et al. (1991) Am. [J.]

[RESPIR.] Cell Mol. Biol. 4: 206-209; Brigham et al. (1989) Am. [J MED. SCI.] 298: [278-281;] Canonico et al. (1991) Clin. Res. 39: 219A; [Y NABEL] et al. (1990) Science 249: [1285-1288.]

Los agentes objetivo tales como los anticuerpos dirigidos contra los antígenos de superficie expresados sobre tipos de células específicas, se pueden conjugar covalentemente a la superficie liposomal de tal forma que el ácido nucleico se pueda suministrar a tejidos específicos y células susceptibles de infección.

Los ensayos de diagnóstico como se explico anteriormente, las proteínas de unión de plasmin GapC quimérico de la presente invención se pueden utilizar como diagnósticos para detectar la presencia de anticuerpos reactivos de estreptococos, por ejemplo, *S. dysgalactiae*, en una muestra biológica con el fin de determinar la presencia de infección de estreptococos. Por ejemplo, la presencia de anticuerpos reactivos con proteínas de unión de plasmin GapC quimérico se puede

detectar utilizando técnicas de electrofóresis e inmuno diagnóstico estándar, que incluyen inmuno ensayos tales como competición, reacción directa, o ensayos tipo sandwich. Tale ensayos incluyen, pero no están limitados a, Western blots; ensayos de aglutinación; etiquetados de enzima e inmuno ensayos mediados, tales como [ELISAS]; ensayos tipo biotina/avidina; radio inmunoensayos; [IMMUNOELECTROFORESIS]; [IMMUNOPRECIPITACION,] etc. Las reacciones generalmente incluyen etiquetas revelantes tales como etiquetas fluorescentes, quimoluminescentes, radioactivas, enzimáticas o moléculas de tintes, u otro métodos para detectar la formación de un complejo entre el antígeno y el anticuerpo o los anticuerpos que reaccionan con este.

Los ensayos anteriormente mencionados generalmente involucran la separación de anticuerpo no ligado en una fase líquida de un soporte de base sólida al cual los complejos de antígeno-anticuerpo se unen. Los soportes sólidos que se pueden utilizar 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 polistireno (por ejemplo, glóbulos o platos microtituladores); fluoruro de polivinilideno, papel diazotizado; membranas de nylon; glóbulos activados, glóbulos con respuesta magnética y similares.

Típicamente, un soporte sólido reacciona primero con un componente de fase sólida (por ejemplo, uno o mas proteínas de unión de plasmin GapC quimérico) bajo condiciones de unión adecuadas tales que el componente sea suficientemente inmovilizado para el soporte. Algunas veces, la inmovilización del antígeno para el soporte se puede mejorar al acoplar primero el antígeno a una proteína con propiedades de unión mejores. Las proteínas de acoplamiento adecuadas incluyen, pero no están limitadas a macromoléculas tales como serum albúminas que incluyen serum albúmina de bovino (BSA), hemocianina de linfa o keyhole, moléculas de inmunoglobulina, 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, amino ácidos poliméricos,

copolímeros de amino ácido, y similares. Tales moléculas y métodos de acoplamiento de estas moléculas a los antígenos, son bien conocidos 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] y Staros, [INTERNATIONAL R OF PEPTIDE AND PROTEIN RES.] (1987) 30: 117-124.

Después de reaccionar el soporte sólido con el componente de fase sólida, cualquier componente de fase sólida no inmovilizados se remueven del soporte al lavar, y el componente unido al soporte se pone en contacto entonces con una muestra biológica de que se sospecha que contenga porciones del ligando (por ejemplo, anticuerpos hacia los antígenos inmovilizados) bajo condiciones de unión adecuadas. Después de lavar para remover cualquier ligando no unido, una porción ligadora secundaria se agrega bajo condiciones de unión adecuadas, en donde el ligador secundario es capaz de selectivamente asociarse con el ligando unido. La presencia del ligador secundario

se puede detectar utilizando técnicas bien conocidas en el arte.

Mas particularmente, se puede utilizar el método de ELISA, en donde los pozos del plato microtitulador son recubiertos con una proteína ligadora de plasmin GapC quimérico. Una muestra biológica que contiene o que se sospecha que contiene moléculas de inmunoglobulina de proteína de unión de plasmin GapC [ANTI-QUIMERICO] se agrega entonces a los pozos de 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 ligadas y agregar una molécula de unión secundaria detectablemente etiquetada. La molécula de unión secundaria se le permite reaccionar con cualquier anticuerpos de muestra capturados, del plato lavado y la presencia de moléculas de unión secundarias detectadas utilizando métodos bien conocidos en el arte.

Así, en una modalidad particular, la presencia de ligandos de antígeno de unión de plasmin GapC anti-

quimérico de unión provenientes de una muestra biológica pueden ser fácilmente detectados utilizando un ligador secundario que comprende un anticuerpo dirigido contra los ligandos del anticuerpo. Un numero de moléculas de inmunoglobulina [(IG)] de anti-bovino son conocidas en el arte las cuales pueden ser fácilmente conjugadas a una etiqueta de enzima detectable, tal 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 ELISA tipo competitivo se pueden practicar utilizando métodos conocidos por aquellos expertos en el arte.

Los ensayos también pueden ser conducidos en solución, de tal forma que las proteínas de unión de plasmin GapC quimérico y los anticuerpos específicos para aquellas proteínas formen complejos bajo condiciones de precipitación. En una modalidad particular, las proteínas de unión de plasmin GapC quimérico se pueden unir a una partícula de fase sólida (por ejemplo, un glóbulo de agarosa o similar) utilizando técnicas de acoplamiento

conocidos en el arte, tales como mediante acoplamiento químico directo o 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 del plasmin GapC quimérico. La reticulación entre anticuerpos de unión causa la formación de agregados de complejo de partícula-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 anticuerpo-antígeno utilizando un número de métodos estándar, tal como aquellos métodos de inmuno diagnóstico descritos anteriormente.

Aun en una modalidad adicional, se puede proporcionar una matriz de inmunoafinidad, en donde la población policlonal de anticuerpos de una muestra biológica que se sospecha que contiene moléculas de unión de plasmin GapC antiquimérico es inmovilizada 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 contendrá así solo porciones de anti-estreptococos evitando propiedades de unión no específicas potenciales en el soporte de afinidad. Un número de métodos de inmunoglobulinas inmovilizantes (bien en contacto o en fragmentos específicos) a alta producción y buena retención de actividad de unión de antígeno son conocidos en la técnica. No estando limitados por ningún método particular, la proteína A inmovilizada o la proteína G se pueden utilizar para inmovilizar inmunoglobulinas.

De acuerdo con esto, una vez que las moléculas de inmunoglobulina se han inmovilizado para proporcionar una matriz de immunoafinidad, las proteínas de unión de plasmin GapC quimérico etiquetadas son puestas en contacto con los anticuerpos de unión bajo condiciones de unión adecuadas. Después de que cualquier antígeno no específicamente unido se ha lavado del soporte de immunoafinidad, la presencia del antígeno de unión se puede determinar mediante ensayo de etiqueta utilizando los métodos conocidos en el arte.

Adicionalmente, los anticuerpos levantados a proteína de unión de plasmin GapC quimérico, en lugar de proteínas de unión de plasmin GapC quimérico 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 ensayos descritos anteriormente, incluyen proteínas de unión de plasmin GapC quimérico, o anticuerpos a este, se pueden proporcionar en kits, con instrucciones adecuadas y otros reactivos necesarios, con el fin de conducir inmunoensayos como se describió anteriormente. El kit también puede contener, dependiendo del inmunoensayo particular utilizado etiquetas adecuadas y otros reactivos empacados y materiales (es decir Amortiguadores de lavado y similares). Los inmunoensayos estándar, tales como aquellos descritos anteriormente, se pueden conducir utilizando estos kits.

Depósitos de las cepas útiles en la práctica de la invención. Un depósito de cultivos biológicamente puros de las siguientes cepas se hizo con la colección de cultivos tipo Americano, 10801 Universidad Boulevard, Manassas, Virginia, bajo las provisiones del tratado de Budapest. El número de acceso indicado se asignó después de un ensayo de viabilidad exitoso, y de que se pagaron las tasas. Los depósitos designados se mantendrán mediante un periodo de treinta (30) años desde la fecha de depósito, o durante cinco (5) años después de la última solicitud de depósito, de la que sea más mayor. 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 un cultivo o cultivos viables de la misma descripción taxonómica.

Si existe discrepancia entre la secuencia presentada en la presente solicitud y la secuencia del gen de interés en los plasmidos depositados debido a errores de

secuenciación de rutina, la secuencia en el plasmido de depósito se controlará.

Fecha de depósito de plasmido de cepa bacteriana ATCC
No.

XLI Blue MRF pPolyGap. [L] May 31, 2000 PTA-1981 XLI Blue MRF pPolyGap. 2 May 31, 2000 PTA-1974 XLI Blue MRF pPolyGap. 3 May 31, 2000 PTA-1979 XLI Blue MRF pPolyGap. 4 May 31, 2000 PTA-1980 [XLI BLUE MRF] polygap4 May 31, 2000 PTA-1978. Abajo están ejemplos de modalidades específicas para llevar a cabo la presente invención. Los ejemplos se ofrecen con propósitos solamente ilustrativos, y no pretenden limitar el alcance de la presente invención de ninguna manera.

EJEMPLO 1 C. experimental. preparación de ADN cromosómico un *S. dysgalactiae* clínico aislado de un caso de mastitis de bovino (ATCC No. de acceso ATCC43078) se obtuvo de la colección de cultivos tipo Americano (10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209), y se

utilizo como fuente de ADN. El organismo fue crecido como de rutina sobre platos de agar con sangre de oveja TSA (Microbiológicos PML, Mississauga, Ontario) a 37° C durante 18 horas, o en un caldo de cultivo Todd-Hewitt (Oxoid Ltd., Hampshire, England) suplementado con 0.3% de extracto de levadura (THB-YE) a 37° C, 5% [CO₂.]

El ADN cromosómico se preparo de [*S.*] *dysgalactiae* crecido en 100 ml de THB-YE suplementado con 20 Mm. de glicina durante aproximadamente 6 horas, hasta que se alcanzaron a 600 de 0.8 a 1.0. La células fueron cosechadas y resuspendidas en 50 Mm. de EDTA, 50 Mm. de [TRIS-HCl], 0.5% de Tween-20 (Sigma, St. Louis, MO) y suplementados con RNasa A (200 mg/ml), proteinasa K (20 mg/ml), lisozima (100 mg/ml) y mutanolisina (100 [MG/ML]). (Todas las enzimas compradas a SIGMA, St. Louis, MO). Luego la lisis bacterial durante 30 minutos a 37° C con agitador vigoroso, hidrocloreidrato de guanidina y [TWEEN-20 & COMBAT;] pH 5.5, se mezclaron con el lisado para dar una concentración final de 0.8 M y 5%, respectivamente. Esta mezcla se incubo a [50° C] durante 30 minutos. El ADN cromosómico se purificó entonces utilizando un Qiagen [GENOMIC-TIP] 100g (Qiagen, Santa

Clarita, California) y se precipito utilizando 0.7 volúmenes de isopropanol. El glóbulo resultante se lavo en etanol al [70%] y se re suspendió en 0.5 ml 10 mM. [TRIS-HCl,] pH [8.] 8.

EL ADN cromosómico de [S.] [AGALACTIAE, S. UBERIS Y, S. PARAUBERIS] se aisló esencialmente como se describió anteriormente, de cepas designadas ATCC 27541, 9927, y 13386, respectivamente. El ADN cromosómico de [S.] [INIAE] también se aisló como se hizo anteriormente de una cepa designada 9117 obtenida del Hospital Mount Sinai, Universidad de Toronto, Canada.

La amplificación del ejemplo 2 y la clonación de: genes APC de S. DYSGALACTIAE, S. UBERIS, S. PARAUBERIS], [S.] agalactie y [S.] [INIAE.]

Las secuencias de polinucleótidos que codifican GapC provenientes de S. dysgalactiae, [S.] uberis, S. parauberis, [S.] agalactiae y S. [IIZIAE] se aislaron inicialmente del ADN cromosómico para amplificación PCR.

Los iniciadores utilizados para amplificar PCR los genes [GAPC] de todas las especies fueron GAPCL (SEQ I NO. 1) y gapCl r (SEQ ID NO: 2), mostrados en la tabla 1. En la tabla, el subrayado denota nucleótidos agregados a las secuencias originales (es decir, nucleótidos agregados al extremo 5 de la secuencia de hebra con sentido original y al tercer extremo de la secuencia de hebra contra sentido original, respectivamente, de la región codificadora gapC que esta siendo amplificada), y la negrita indica la localización de sitios de reconocimiento de restricción de endonucleasa.

El PCR fue llevado a cabo utilizando una polimerasa de ADN vent (New England Biolabs, Mississauga, ON, Canada). Una mezcla de reacción que contiene 0.2 u. g de ADN genómico [1PM] de cada uno de los iniciadores precedentes, 100 pm cada uno de [DATP, DTPP, DCTP] y [DGTP,] 10 Mm. Tris HCL, pH9; [1.] 5 Mm. MgCl₂, 50 Mm. HCL, 1.5 unidades de una polimerasa de ADN Taq [(PHARMACIA,) Quebec, Canada) se incubo para ciclos de amplificación de 40 segundos a 94°C, 40 segundos a 55°C, y 1 minuto, 20 segundos a 72°C, y luego para un ciclo sencillo de 10 minutos a 72°C.

Los productos de reacción del PCR resultante fueron digeridos con [NDEI] y [BAMHI]. En el caso del producto GapC del [S. DYSGALACTIAE], el fragmento se clono directamente en los mismos sitios del [PET15B] (Novagen, Madison, Wisconsin) después de que el plasmido se digirió con las mismas enzimas.

La construcción resultante se denominó [PET15BGAPC]. En el caso de las secuencias de S. agalactiae, S. uberis, S. [PARAUBERIS] y S. [IRALAE], cada una se clono primero en un pPCR-Script utilizando un protocolo de clonación descrito en el kit de clonación Script Amp-PCR (Estratagena, La Jolla, California), subsecuentemente excindido utilizando NdeI y BamHI, y finalmente re-clonado en los sitios correspondientes de pET15b utilizando protocolos de clonación convencionales (ver por ejemplo, Sambrook et al., supra).

Los plasmidos que contienen las secuencias de S. agalactiae, S. uberis, [S] [PARAUBERIS Y S. INIAE] se

designaron [PMF521C-INV, PMF521A-INV, PMF521D-INV,] y [PMF521 E-INV,] respectivamente.

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

SEQ ID	Nombre de la Secuencia	de Nucleótido (5'a 3')	NO.
gapC1	GG CGG CGG CAT ATG GTA GTT AAA GTT GGT ATT AAC GG		
gapC1r	GC GGA TCC TTA TTT AGC GAT TTT TGC AAA GTA CTC		
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 GAT TTC	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	AAA	
AAA CCA TGG TTA ACT AGT TGC TTC AAG AAC GAT TTC TAC GCC			
Gap-7	AAA AAA ACT AGT TTC TTT GCT AAA AAA GAA GCT GC	Gap-8	
AAA AAA CCA TGG CTA TTA TTT AGC GAT TTT TGC AAA ATA CTC			

de Estreptococo dysgalactiae (ver Figura 1) proteína de estreptococo dysgalactiae GapC, proteína de estreptococo agalactie gapC (ver Figura 2), proteína de estreptocococo agalactiae GapC Sh gen de gapC uberis (ver Figura 3),proteína GapC de estreptococo uberis, gen GapC de estreptococo parauberis (ver Figura 4), proteína GapC de estreptococo parauberis, gen GapC de estreptococo iralae

(ver Figura 5), *Sh. streptococcus iniae* (ver figura 5) gen GapC quimérico Gap4 de proteína gapC (ver Figura 6), proteína GapC quimérica Gap4 Ejemplo 3 secuenciación de genes gapC. Los genes aislados y clonados en los ejemplos precedentes se secuenciaron utilizando terminadores de etiqueta fluorescente sobre un secuenciador automático ABI 373 ADN (Applied Biosystems, Emeryville, California) en el instituto la planta Biotecnologica [(PBI,] Saskatoon, Saskatchewan, Canada).

Las secuencias de nucleótidos así determinadas, y las secuencias de aminoácidos correspondientes deducidas de este, se muestran en la figura 1 hasta 5.

EJEMPLO 4. Construcción de un gen quimérico [GAPC].
Un gen quimérico compuesto de secuencias de *S. dysgalactiae*, *S. parauberis*, y *S. [AGALACTIAE]* se construyo en un proceso de tres etapas utilizando pAA556, un plasmido de expresión inducible por tac estándar derivado del plasmido pGH432 que contiene la secuencia de señal del gen [E. COL 07NPF].

Las secuencias de gen [GAPC] parcial utilizadas para construir el gen quimérico se prepararon mediante amplificación PCR de secuencias de polinucleótidos seleccionadas provenientes de genes gapC genómicos aislados anteriormente, utilizando los iniciadores [GAP-1] hasta Gap-8. Las secuencias de iniciador son descritas en la tabla 1.

Después del ensamblaje, el gen quimérico, sans las señales de secuencia [07NPF], fue dividido de pAA556 e insertado en el plasmido pAA555, un derivado pGH432 que es un plasmido de expresión inducible por tac estándar y contiene la secuencia de señal del gen del E. coli ompF .

[A.] Construcción del pPolyGap. [L]. En la primera etapa, las primeras 288 bases del gen S. dysgalactiae [GAPC] se amplificaron por PCR utilizando los iniciadores [GAP-1] y Gap-2.

La amplificación de PCR se llevo a cabo como sigue:
1.6 [U. G] de ADN molde se combino en una mezcla de

reacción que contiene 20 pM de cada uno de los iniciadores [GAP-1] (SEQ ID NO: 1) y Gap-2 (SEQ ID NO: 2), 200 [; MI] cada uno de [DATP, DCTP, DGTP] y [DTTP,] 2.5mM MgSO₄, amortiguador de PCR (10 Mm. [TRIS-HCL,] pH 8.3, 50 Mm. [KCl]), y 1 polimerasa de ADN unitaria tac [FARMACIA,] Quebec, Canada).

La mezcla se amplificó para 1 ciclo de 1 minuto a [95°C,] luego para 29 ciclos de 1 minuto a [95°C], 1 minuto a 55°C, y [30] segundos a [72°C], y finalmente para un 1 ciclo de 10 minutos a 4°C.

El producto de amplificación se digirió entonces con [BAMHI] y NcoI y se insertó en los mismos sitios de un vector [PAA556]. La construcción de plasmido resultante, designada pPolyGap. [L], se ilustra en la figura [21.]

B. construcción de [PPOLYGAP]. Un producto 2 A PCR que representa las bases 170-285 del gen [GAPC] del S. [PARAUBERIS] se obtuvo entonces utilizando los iniciadores Gap-3 (SEQ ID NO: [5]) y Gap-4 (SEQ ID NO:

6). Este producto codifica para una secuencia de aminoácido idéntica a la secuencia de aminoácido correspondiente encontrada en el gen de [S.] uberis [GAPC]. La amplificación de PCR se llevo acabo esencialmente como se hizo anteriormente, con excepción del uso de 2 µg del ADN molde.

El producto PCR del S. parauberis PCR y pPolyGapIplasmido fueron ambos digeridos con [XHOI] y NcoI, y el producto PCR se ligo en sitios correpondientes en el vector.

Estas construcciones llamadas pPolyGap. 2, se ilustran en la figura 22.

C. Construcccion de [PPOLYGAP]. 3 nucleótidos [166-288] del gen [GAPC] de S. agalactiae se amplificaron utilizando iniciadores PCR Gap-5 (SEQ ID NO: 7) y Gap-6 (SEQ ID NO: 8) como en el ejemplo 4B anterior.

El producto PCR obtenido se digirió con [CLAI] y [NCOI,] luego se inserto en los mismos sitios del pPolyGap2 inmediatamente corriente debajo de la secuencia de *S. parauberis*. pPolyGap3 se diagrama en la figura 23.

[D.] Construcción de [PPOLYGAP]. 4 La etapa final de la construcción del gen quimérico involucra la inserción de las secuencias [GAPC] [S.] *dysgalactiae* restantes (nucleótidos 295-1011) en la estructura e inmediatamente corriente debajo de la secuencia de *S. agalactiae*.

La secuencia del [S.] *dysgalactiae* fue amplificada utilizando los iniciadores Gap-7 (SEQ ID NO: 9) y Gap-8 (SEQ ID NO: 10) como en el ejemplo 4A anterior. El producto de amplificación fue entonces digerido con la enzima [GARNHI/NCOI,] como fue el vector pPolyGap. 3, y el fragmento fue entonces ligado en sitios de vector correspondientes.

La etapa final resulto en el pPolyGap.plasmido. 4 contienen la construcción del gen quimérico gapC completo

que comprende el esqueleto de *S. dysgalactiae* [GAPC] con secuencias únicas de [*S. PARAUBERIS* ASI COMO TAMBIEN *S. AGALACTIAE*]. Ver figura 24.

E. clonación de gen [GAPC] quimérico en [PAA55]: (la construcción de PolyGap. 4 El gen [GAPC] construido en las etapas precedentes se dividió de [PAA556] mediante la digestión del BamH1 y Nco1 y se inserto en el plasmido [PAA555] digerido con las mismas enzimas. El pAA555 es idéntico al pAA556 excepto de que el anterior plasmido contiene la secuencia de señal LipoF, y suministra la adición de una cisteína en el extremo amino terminal de la proteína GapC madura. La cisteína N-terminal se agrego para asegurar la secreción eficiente de la proteína quimérica proveniente de la célula y ligar la membrana por vía de la porción de lípidos. La secuencia de codificación de la construcción del plasmido PolyGap4 se muestra en la figura 25.

EJEMPLO 5. Expresión y aislamiento de la proteína GapC quimérica PolyGap4, se utiliza para transformar [E.

COLI J5] en la presencia de polietileno glicol (Kurien y Scofield (1995) [BIOTEC) NIQUESLS]: 1023-1026).

Las células transformadas que llevan [✓]pPolyGap4_✓ crecen en una fase logarítmica en un medio LB a [37°C] con agitación. La expresión de la proteína GapC quimérica se introduce entonces al agregar IPTG a la concentración final de [1MM] e incubar las células a [37°C] por un periodo adicional de 4 horas.

La proteína GapC quimérica se extrae entonces de la superficie celular mediante solubilización diferencial. Las células se recolectan mediante centrifugación y resuspensión en un volumen de amortiguador de resuspensión (0.85% de solución de NaCl que contiene 0.6% sarcosil) igual a [1/LOTH] el volumen del cultivo original. La suspensión se incuba a temperatura ambiente durante 30 minutos con agitado suave. Las células se recolectan mediante centrifugación y el supernadante que contiene la proteína GapC quimérica se pasa a través de un filtro de membrana de 0.2 μ m. Las alícuotas del supernadante basteril se analizan mediante SDS-PAGE y

Western blots utilizando un anticuerpo policlonal anti-GapC de conejo.

EJEMPLO 6. inmunización de animales con vācunas de proteína de GapC quimérico se formularon de tal forma que ellos contenían [100, UG/ML] de proteína GapC quimérico purificada en el adyuvante basado en aceite VSA3 (VIDO, [SASKATOON,] Saskatchewan, Canada). El VSA3 es una combinación de [EMULSIGEN PLUS] (MVP Laboratories, Ralston, Nebraska) y bromuro de dimetildioctadecil amonio [(KODAK,] Rochester, New York).

Se obtuvieron vacas Holstein no lactantes sin historia de infección con *S. dysgalactiae*.

Dos semanas antes de la vacunación, todos los animales se trataron con 300 mg de Cefarina por cuarto [(CEPHA-DRY,] Ayerst Laboratories, Montreal, Canada), con el fin de resolver cualquier infección pre existente de la urea antes de la etapa de vacunación.

Los grupos de animales experimentales se inmunizan subcutáneamente con dos dosis de vacunas que contienen la proteína GapC o un placebo con un intervalo de tres semanas entre inmunizaciones. Diez días a dos semanas después de la segunda inmunización, los animales se exponen a unidades de formación de 500-1,000 colonias de *S. dysgalactiae* suministradas en tres cuartos con una cánula de infusión en la ubre. El cuarto cuarto de cada animal sirve como un control no infeccioso.

Todos los animales se examinan diariamente para signos clínicos de enfermedad y las muestras de todos los cuartos de ubre se recolectan cada DIA. Las muestras se observan para consistencia y título de anticuerpo, conteo de células somáticas, se determinan los números de bacterias.

resumen

EJEMPLO 7. Determinación de los anticuerpos específicos GapC Ant en suero de bovino se miden utilizando el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA). Brevemente, los platos de microtítulo (NUNC, Naperville, Illinois) se recubren al agregar 0.1

microorganismo por pozo de proteína quimérica purificada en un amortiguador de carbonato de sodio de 50mM, pH 9.6, incubado durante toda la noche a [4° C]. El líquido se remueve y los pozos se bloquean con 3% de serum albúmina de bovino durante 1 hora a [37° C]. Las diluciones seriales de suero de bovino (de 1: 4 a 1: 64,000) se agregan a los pozos que se incuban durante 2 horas a temperatura ambiente. Los pozos se aspiran, se lavan y se incuban con [100,] [MI] IgG antibovino de cabra fosfatasa-conjugada alcalina (Kirkgaard & Perry Laboratories Inc., Gaithersburg, Maryland) durante 1 hora a temperatura ambiente. Los pozos son lavados de nuevo, y [100,] [MI] de fosfato-p-nitrofenol (Sigma, St.Louis, Missouri) se agregan como un sustrato para detectar la actividad de fosfatasa alcalina. La absorbancia a 405 nanometros se registra luego de 1 hr de incubación con el sustrato a temperatura ambiente.

result?

EJEMPLO [8]. Bacteria de colonización bacterial enumerada al regar diluciones seriales [(10&APOS; A 1&APOS;)] directamente sobre platos de agar con sangre de oveja TSA seguidos por incubación durante toda la noche a

[37°C,] 5% [CO₂]. La colonización se define como >500 cfu/ml del organismo retado recuperado.

Para confirmar que la bacteria recuperada de la secreción de leche es *S. dysgalactiae*, colonias seleccionadas recuperadas de cada animal son ensayadas utilizando un ensayo API [STREP-20] [(BIOMERIEUX] SA, Hazelwood, Missouri) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El ensayo identifica especies de estreptococos de acuerdo con un perfil analítico compilado sobre la base de la actividad enzimática y la fermentación de azúcar, utilizando un índice de perfil analítico o una identificación de soporte lógico.

results.

La relación entre el título anti-GapC y la colonización de bacterias también se determino.

EJEMPLO 9. Determinación de la respuesta inflamatoria. La respuesta inflamatoria se mide como una función del conteo de célula somática de glándula mamaria es decir, linfocitos, neutrofilos, y monocitos). Los

conteos de células somáticas se miden utilizando técnicas estándar recomendadas por la Agriculture and AgriFood Canada [(IDF50B] (1985): Milk and Milk Products--Methods of Sampling in a Coulter counter). Las muestras se leen durante las [48] horas de recolección y fijación, en los días 1 hasta 7 pos reto.

Los números de células somáticas presentes en la glándula se determinan en cada DIA pos reto.

results

Aunque las modalidades preferidas de la invención objetivo se han descrito en algún detalle, se entiende que variaciones obvias se pueden hacer sin apartarse del espíritu y el alcance de la invención como se define en las reivindicaciones finales.

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido de fusión de epitopo múltiple que comprende la estructura general de formula [(I)]: (A)x--(B)y--(C)z (I) en donde (I) es una secuencia de aminoácido lineal; B comprende una secuencia aminoácido que contiene al menos cinco aminoácidos cuyos aminoácidos corresponden a un determinante antigénico de una proteína GapC; A y C comprenden cada uno una secuencia de aminoácido que es (i) diferente de B, (ii) diferente uno del otro, y (iii) una secuencia de aminoácido que contiene al menos cinco aminoácidos, cuya secuencia de aminoácido corresponde a un determinante antigénico de la proteína GapC en donde dicho determinante antigénico no es adyacente a B en naturaleza; Y es un entero de 1 o mas; y X y Z son cada uno independientemente enteros en donde $x + z$ es 1 o mas.

2. El polipéptido de fusión de epitopo múltiple de la reivindicación 1, que comprende además una secuencia de señal

3. El polipéptido de fusión de epitopo múltiple de la reivindicación 1, que comprende además una secuencia de transmembrana.

4. El polipéptido de fusión de epitopo múltiple de la reivindicación 1, en donde A, B, y/o C están ligados mediante una o mas secuencias espaciadoras, en donde dichos espaciadores (i) son secuencias de amino ácidos que van de 1 a 1,000 amino ácidos, inclusive; (ii) pueden ser iguales o diferentes a A, B, o C; y (iii) pueden ser iguales o diferentes uno del otro. *2 wals*

5. El polipéptido de fusión de epitopo múltiple de la reivindicación 1, en donde A, B, y C cada uno comprende epitopos provenientes de una o mas especies de bacterias. *2 n*

6. El polipéptido de fusión de epitopo múltiple de la reivindicación 5, en donde A, B, y C cada uno comprende ~~epitopos~~ de una o mas especies bacterianas del género estreptococo. *7, 1, 102*

7. El polipéptido de fusión de epitopo múltiple de la reivindicación 6 en donde A, B, y C comprenden cada uno epitopos de una o mas especies de bacterias seleccionadas del grupo que consiste de estreptococo dysgalactiae, estreptococo agalactiae, estreptococo uberis, estreptococo parauberis, y [STREPTOCOCCUS INIAE.]

crp 521
ip 1.2/12

8. El polipéptido de fusión de epitopo múltiple de la reivindicación 7, en donde A, B, y C comprenden cada uno secuencias de amino ácidos seleccionadas del grupo que consiste de (a) secuencias de amino ácidos mostradas en aproximadamente las posiciones de amino ácidos 61 a [81,] inclusive, de las figuras 1 hasta 5, o cualquiera de las secuencias de amino ácido que tienen al menos aproximadamente 80% de identidad con esta; (b) las secuencias de amino ácidos mostradas en las posiciones de amino ácidos aproximadas 102 a 112, inclusive, de las figuras 1 hasta 5, o cualquiera de las secuencias de amino ácido que tienen al menos aproximadamente 80% de identidad con esta; (c) las secuencias de amino ácido mostradas en las posiciones aproximadas 165 a 172,

inclusive, de las figuras 1 hasta 5, o cualquiera de las secuencias de amino ácido que tiene al menos aproximadamente [80%] de identidad con esta; (d) las secuencias de amino ácido mostradas cerca a las posiciones de amino ácido [248] a 271, inclusive, de las figuras hasta 5, o cualquier secuencia de amino ácido que tiene al menos aproximadamente 80% de identidad con este; y (e) las secuencias de amino ácido mostradas en aproximadamente las posiciones de aminoácido 286 a 305, inclusive, de las figuras 1 hasta 5, o cualquier secuencia de amino ácido que tiene al menos aproximadamente 80% de identidad con este.

*da def
no
10/10
nr.*

9. El polipéptido de fusión de epítipo múltiple de la reivindicación 8, que comprende la secuencia de amino ácido descrita en la figura 6 (SEQ ID NO: 22).

*Gap4 → pepido
polyGap4 → vector*

10. La secuencia de polinucleótidos que codifican una secuencia de polipéptido de fusión de epítipo múltiple de cualquiera de las reivindicaciones 1-9, o cumplimientos de esta.

11. Un vector recombinante que comprende: (a) un poli nucleótido aislado de la reivindicación 10; y (b) al menos un elemento de control ligado operablemente a dicho poli nucleótido aislado, por medio del cual dicha secuencia de codificación se puede transcribir y trasladar a una célula huésped.

12. Una célula huésped que comprende un vector de recombinación de la reivindicación 11.

13. Un método para producir un polipéptido de fusión de epitopo múltiple, dicho método comprende cultivar células de la reivindicación 12 bajo condiciones de producción de dicho polipéptido.

14. composición de vacuna que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable y un polipéptido de fusión de epitopo múltiple de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-9.

15. La composición de vacuna de la reivindicación 14, que comprende además un adyuvante.

16. Un método de producción de una composición de vacuna que comprende las etapas de (1) suministrar un polipéptido de fusión de epitopo múltiple de acuerdo con las reivindicaciones 1-9; y (2) combinar dicho polipéptido con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

7/10/99
NI

17. Anticuerpos dirigidos contra el polipéptido de fusión de epitopo múltiple de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-9.

cla

18. Los anticuerpos de la reivindicación 17, en donde dichos anticuerpos son policlonales.

19. Los anticuerpos de la reivindicación 17, en donde dichos anticuerpos son monoclonales.

20. Un kit ensayo de inmuno diagnostico para detectar la infección de estreptococo, dicho kit de ensayo comprende un polipéptido de fusión de epitopo múltiple de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-9, e instrucciones para conducir el ensayo de inmuno diagnostico.

NF

21. Uso de un polipéptido de fusión de epitopo múltiple de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 1-9 para la elaboración de una composición de vacuna útil para el tratamiento o para evitar la infección bacteriana en un sujeto vertebrado.

22. El uso de la reivindicación 21, en donde dicha infección bacteriana es una infección de estreptococo.

23. El uso de la reivindicación 21, en donde dicha infección bacteriana causa mastitis.

24. El uso de un poli nucleótido de acuerdo a la reivindicación 10 para la elaboración de un medicamento

útil para el tratamiento o para evitar una infección bacteriana en un sujeto vertebrado.

25. El uso de la reivindicación 24, en donde dicha infección bacteriana es una infección de estreptococo.

26. El uso de la reivindicación 24, en donde dicha infección bacteriana es una causa mastitis.

27. Un método para tratar o evitar una infección bacteriana en un sujeto vertebrado que comprende administrar a dicho sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de una composición de vacuna de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 4 o 15.

28. El método de la reivindicación 27, en donde dicha infección bacteriana es una infección de estreptococo.

29. El método de la reivindicación 27, en donde dicha infección bacteriana causa mastitis.

30. El método para tratar o evitar una infección bacteriana en un sujeto vertebrado que comprende administrar a dicho sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de un poli nucleótido de acuerdo a la reivindicación 10.

31. El método de la reivindicación 30, en donde dicha infección bacteriana es una infección de estreptococo.

32. El método de la reivindicación 30, en donde dicha infección causa.

33. Un método para detectar anticuerpos de estreptococos en una muestra biológica, que comprende:
(a) hacer reaccionar dicha muestra biológica con un polipéptido de fusión de epitopo múltiple bajo condiciones que le permitan a dichos anticuerpos de

estreptococo, cuando están presentes en la muestra biológica, unirse a dicha secuencia para formar un complejo [ANTICUERPO/ANTIGENO]; y (b) detectar la presencia o ausencia de dicho complejo y detectar de esta forma la presencia o ausencia de anticuerpos de estreptococos en dicha muestra.

34. *ing* -

Un método para detectar los anticuerpos de estreptococos en una muestra biológica que comprende: (a) hacer reaccionar dicha muestra biológica con un polipéptido de fusión de epitopo múltiple de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 1-9, bajo condiciones que le permiten a dichos anticuerpos de estreptococo, cuando están presentes en la muestra biológica, unirse a dicha secuencia para formar un complejo [ANTICUERPO/ANTIGENO]; y (b) detectar la presencia o ausencia de dicho complejo, y detectar de esta forma la presencia o ausencia de los anticuerpos de estreptococos en dicha muestra.