

**CAVELIER****ABOGADOS**

WEB SITE: www.caveller.com

E-MAIL: caveller@caveller.com

EDIFICIO SISKI  
CARRERA 4 No. 72 - 35  
BOGOTÁ 8, COLOMBIA

TELÉFONO: (57) (1) 347-3611

7-4995

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

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO

Radicación : 02112914 00000001

Folios: 101

Fecha (MD): 2002-12-17 17:01:32

Trámite : 011 PCT-PATENT 379 FASE NACI 329 COMPLETEN

Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

Trámite : 002

Evento : 001

Actuación : 329

Referencia : Expediente N. 02.112.914

Solicitante : UNIVERSITY OF SASKATCHEWAN

Asunto : Solicitud de patente para: "INMUNIZACIÓN DE GANADO LECHERO CON PROTEINA Mig.

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: 13578-841-001-1  
JBP/MRM-Id-4

## INMUNIZACIÓN DEL GANADO LECHERO CON LA PROTEÍNA Mig

La presente invención se relaciona en general con antígenos bacteriales y genes que codifican los mismos. Más particularmente la presente invención pertenece a la clonación, expresión y caracterización de la proteína Mig Fc-receptor a partir de varias especies de bacterias Streptococcus, y el uso de estas en composiciones de vacunas.

### ANTECEDENTES

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

La respuesta inflamatoria que sigue a la infección resulta en una disminución de la producción de leche lo mismo que calidad, y causa las mayores pérdidas económicas anuales en la industria lechera.

Entre las especies bacteriales más comúnmente asociadas con la mastitis están varias especies de los genes Streptococcus, incluyendo el Streptococcus aureus,

Streptococcus uberis [(UNTYPEABLE),] Streptococcus agalactiae (Lancefield. grupo [B),] Streptococcus disgalactiae (Lancefield grupo C), [STREPTOCOCCUS ZOOEPIDEMICUS, Y] los grupos Lancefield D, G, L y N de los Streptococcus. Algunas de estas especies son contagiosas (por ejemplo el S. agalactiae), mientras que otras son consideradas patógenas ambientales (por ejemplo S. [DYS GALACTIAE] y S. [UBERIS]).]

El patógeno ambiental S. uberis es responsable de cerca del 20% de todos los casos clínicos de las mastitis (Bramley, A. J. [Y DODD,] F. H. (1984) [J: DY. 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 predominante aislados a partir de glándulas mamarias durante el periodo de no lactancia (Bramley, A. J. (1984) Br. Vet. [J] 140: 328-335; Bramley y Dodd (1984) [J] [D. 51]: 481-512; Oliver, S. P. (1988) Am. J. Vet. Res. 49: 1789-1793).

La mastitis resultante de la infección con S. [UBERIS] es comúnmente [SUBCLINICAL,] caracterizada por una leche aparentemente normal con un incremento en el conteo de células somáticas debido al influjo

[OFLEUKOCYTES.] La composición química de la leche es cambiada debido a la supresión de la secreción con la transferencia de cloruro de sodio y bicarbonato des de la sangre a la leche, causando un cambio en el pH a un nivel más alcalino. La mastitis de *S. uberis* puede también tomar la forma de una condición clínica aguda, con signos obvios de enfermedad tales como coagulos o descoloración de la leche y sudorización o dureza de la glándula mamaria. Algunos casos de la enfermedad clínica pueden ser severos y la pirexia puede estar presente. Para una revisión de las manifestaciones clínicas [OF *S. UBERIS*] de mastitis, ver, Bramley (1991) Mastitis: physiology or pathology. p. 3-9. In C. Burvenich, G.

[VANDEPUTTE-VAN] Messon, y A. W. Hill (ed.), nuevas investigaciones en la patogénesis de la mastitis. [LLIJKSUNIVERSITEIT] Gent, Bélgica; y Schalm et al. (1971) La mastitis compleja - un resumen. p. [1-3.] En la mastitis bovina. Lea & Febiger, Philadelphia.

Los métodos de control antibacterial Convencionales tales como la terapia de inmersión de la teta y la terapia con antibióticos son efectivo en el control de

muchos tipos de mastitis contagiosas pero los organismos ambientales típicamente encontrados en todas las granjas lecheras son frecuentemente resistentes a tales medidas. La vacunación por lo tanto es una estrategia atractiva para impedir las infecciones de las glándulas mamarias, y se ha mostrado que es beneficiosa en el caso de algunos patógenos de mastitis contagiosa.

Sin embargo, la literatura es limitada con relación a los estudios de vacunas con los patógenos ambientales tales como *S. dysgalactiae* y [*S. UBERIS*,] y resultados variables han sido observados. En algunos casos, la inmunización ha resultado en una sensibilidad incrementada al organismo específico y en otros casos la protección de la sepa específica ha sido obtenida.

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

vacunación subcutánea con *S. uberis* vivo ha mostrado que causa una modificación dramática de la patogénesis de la mastitis con la misma sepa (Hill et al. (1994) [FEMS IMMUNOL. MED.]

[MICROBIOL. 8 :] 109-118). Animales vacunados de esta manera compartieron menor cantidad de bacteria en su leche y en muchos cuartos remanentes libres de infección.

Sin embargo, la vacunación con bacteria viva o atenuada puede colocar riesgos al receptor. Mas aún, es claro que las vacunas muertas convencionales son en general grandemente inefectivas contra la *S. uberis* and *S. agalactiae*, sea debido a la carencia de antígenos protectores o a células de crecimiento in vitro o al enmascaramiento de estos antígenos por mimica molecular.

La carencia frecuente de la existencia de vacunas para mastitis contra la *S. agalactiae* o las sepa contagiosas de streptococcus es debido en gran parte a la carencia de conocimiento con respecto a los determinantes de virulencia y los antígenos protectores 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).

La *S. dysgalactiae* es conocida que enlaza varias proteínas extracelulares y derivadas de plasma tales como la fibronectina, el fibrogen, el colágeno, [ALPHA-II-MACROGLOBULIN,] IgG, albúmina y otros compuestos. El organismo también produce la hyaluronidasa y and fibrinolysina y es capaz de adherirse e invadir células hepiteliales mamarias bovinas. Sin embargo, los papeles exactos de los componentes bacteriales responsables de estos fenotipos en patogénesis no se conoce.

Similarmemente, la patogénesis de la infección con *S. uberis* no se ha entendido grandemente. Más aún, la influencia de factores de virulencia [OF *S. UBERIS*] en mecanismos de defensa huésped y en la fisiología de la glándula mamaria no está bien definida. Los factores de virulencia conocidos asociados con *S. uberis* incluyen una cápsula de ácido halurónico (Hill, A. W. (1988) Res. Vet. Sci. 45: 400-404), hyaluronidase (Schaufuss et al. (1989) [ZENTRALBL. BAKTERIOL. SER. A 271]: 46-53), R-like protein (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) ZEHTALBL. BAKTEIOL.]

La proteína Ser. A 249: 190-194), [R-LIKE], el activador plasmogen y el factor CAMP. Sin embargo, muy poco es conocido en estos papeles en la patogeneicidad.

El uso de determinantes de virulencia a partir de Streptococcus como agentes inmunogénicos han sido propuestos. Por ejemplo, el factor CAMP de [S. UBERIS] ha mostrado que protege el sujeto vertebrado de infección por este organismo (Jiang, et al., U. S. Patent No. 5,863,543).

El antígeno [Y] del grupo de la sepa B del Streptococcus A909 (ATCC No. 27591) es un componente en el complejo marcador de proteína c que adicionalmente comprende una a y subunidad [P] (Boyle, U. S. Patent No. 5,721,339). Los subconjuntos de serotipo [LA,] II, y virtualmente todas células serotipo Ib del grupo B del Streptococcus, han sido reportados como que expresan componentes de la proteína c. el uso de la subnudad [Y] como un agente inmunogénico contra las infecciones por el

grupo Lancefield B de la infección con Streptococcus ha sido propuesto. Sin embargo, su uso para impedir o tratar las infecciones bacteriales en animales, incluyendo la mastitis en el ganado no ha sido estudiada.

La proteína del grupo A streptococcal M es considerada como uno de los factores de más virulencia de este organismo en virtud de su habilidad de impedir el ataque por fagocitos humanos (Lancefield, R. C. (1962) J. Immunol. 89: 307-313). La bacteria persiste en el tejido infectado hasta que los anticuerpos son producidos contra la molécula M. Los anticuerpos tipo específico a la proteína M son capaces de M invertir el efecto antifagocítico de la molécula y permiten una clarificación eficiente del organismo invasor.

Las proteínas M son uno de los factores de virulencia de piógenos de Streptococcus, debido a su involucramiento en mediar la resistencia a la fagocitosis (Kehoe, M. A. [(1991) VACCINE] 9: 797-806) y su habilidad para inducir unas respuestas inmunes a los potencialmente dañinos a los huéspedes por medio de su superantigenicidad y su capacidad para inducir respuestas de anticuerpo de reacción cruzada en huéspedes (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. IMMUNOPATHOL.] 61: 131-142).

Sin embargo, los obstáculos existen para usar las proteínas M intactas como vacunas. Los epítopes opsónicos de la proteína son extremadamente específicos en típico, resultan en una protección tipo específica muy estrecha.

Más aún, algunas proteínas M parecen contener epítopes que reaccionan cruzadamente con tejidos del sujeto inmunizado, causando una respuesta autoinmune muy dañina (Ver e. g. Dale, J. G. y Beachey, E. H. (1982) [R] Exp. [MED 156]: 1165-1176; Dale, J. B. y Beachey, E. H. [(1985)] [A] [EXP.] Med. 161: 113-122; Baird, R. W., Bronze, M. S., Draus, W., Hill, H. R., Veasey, L. G. y Dale, J. B. (1991) [J IMMUN. 146]: [3132-3137 ;] Bronze, M. S. y Dale, J. B. (1993) J Immun 151: 2820-2828; Cunningham, M. W. and Russell, S. M. (1983) Infect. Immun. 42: [531-538].)

Las proteínas quiméricas contienen tres diferentes dominios de enlace de fibronectina [{FNBDs}] derivados de las proteínas de enlace de fibronectina del *S. dysgalactiae* y el *Staphylococcus aureus* han sido expresadas en la superficie de células de [STAPH.] [CARNOSUS]. En este caso de una de estas proteínas, las inmunizaciones intranasales con recombinantes vivos de célula [STAPH.] [CARNOSUS] expresan la proteína quimérica sobre su superficie resultaron en una respuesta de anticuerpo mejorada al modelo inmunogénico presente dentro de la proteína de superficie (Liljeqvist, S. et al. (1999) FEBS Letters 446: 299-304).

Los receptores bacteriales Fc (partes de superficie que ligan con las moléculas de inmunoglobulina por medio de un mecanismo no inmune, por ejemplo a la porción del Fc anticuerpo) son una clase de proteínas de enlace categorizadas adicionalmente por su reactividad con diferentes clases y subclases de inmunoglobulinas de mamíferos. El receptor tipo I (también conocido como Proteína A), la más extensamente estudiada y caracterizada ha sido aislada a partir del [STAPHYLOCOCCUS AUREUS,] y liga con la IgG tipos 1,2 y 4; este tipo receptor exhibe adicionalmente una

reactividad cruzada con IgA e IgM. El receptor Fc tipo II, encontrado en unos pocos Streptococcus del grupo Lancefield A, y el receptor tipo III (también conocido como proteína G), encontrado en la mayoría de los grupos de sepas C y grupo G humanas del Streptococcus, han sido reportadas en que reaccionan con todos los cuatro grupos de IgG. En este caso del receptor tipo III, el ligado al IgG es altamente específico, la proteína no reacciona de forma cruzada con IgA o IgM. El receptor tipo IV se encuentra en ciertos Streptococcus del grupo G bovino y el receptor tipo V se encuentra en ciertas sepas [OF STREPTOCOCCUS ZOOEPIDEMICUS.] El receptor Fc tipo VI ha sido aislado de la sepa S. [ZOOEPIDEMICUS] [S212] y RSS-212, y liga el IgG de rata con una alta afinidad, por ejemplo 100 veces aquella del ligado de la proteína A y 30 a 40 veces como el ligado de la proteína G. (Boyle, et al., U. S. Patent No. 4,977,082). Para una discusión de receptores Fc, ver Langone (1982) Adv. Immunol. 32: 167 y Myhre et al. (1984) Basic Concepts of Streptococci and Streptococcal Diseases (Holm & Christensen, eds.) Redbook Ltd., Chertsey, Surrey, England.

La utilidad para las proteínas de enlace Fc han sido hasta la fecha limitadas a detección de anticuerpos y

purificación. Con respecto a las aplicaciones clínicas, el método de tratamiento de sangre extracorpórea [A] de la enfermedad autoinmune que emplea proteínas de enlace Fc para remover los complejos de anticuerpos de antígeno - anticuerpo han sido propuestos (ver por ejemplo Fahnestock, patente estadounidense No. 4,954,618).

Sin embargo, su uso en composiciones de vacunas no ha sido descrito previamente ni sugerido.

Hasta ahora, la capacidad protectora de la proteína Mig S. disgalactiae contra la mastitis no ha sido estudiada, tampoco ha sido la proteína Mig S. disgalactiae aislada o caracterizada.

#### **RESUMEN DE LA INVENCION**

De acuerdo con lo anterior, la presente invención suministra proteínas receptoras de Fc y sus usos.

En una modalidad, la invención está dirigida a una composición de vacuna que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable y una proteína receptora de Fc. En ciertas modalidades, la proteína receptora de Fc

es seleccionada a partir del grupo que consiste de: (a) Una proteína Mig del *Streptococcus disgalactiae* que comprende la secuencia de aminoácido mostrada en las posiciones de aminoácido 1 a 669.

Inclusive, de las figuras 1A-1D (SEC ID NO : 4); (b) una proteína receptora de Fc que tiene por lo menos cerca del 70% de identidad de secuencia de (a); y (c) fragmentos inmunogénicos de (a) y (b), dichos fragmentos contienen por lo menos cerca de 5 aminoácidos.

En algunas modalidades, la composición de vacuna comprende, adyuvantes.

Todavía en otras modalidades, la invención está dirigida a un método para producir una composición de vacuna. El método comprende las etapas de (a) suministrar una proteína receptora de Fc o un fragmento inmunogénico de la misma, el fragmento comprende por lo menos cerca de 5 aminoácido, y (b) combinar dicha proteína con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En otra modalidad, la invención está dirigida a un método para tratar o prevenir una infección bacteriana en

un sujeto vertebrado. El método comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de una composición de vacuna según se describió anteriormente.

En ciertas modalidades la infección bacteriana es una infección estreptococcal.

Adicionalmente, la infección bacteriana puede causar mastitis.

Todavía en otra modalidad, la invención está dirigida a un método para tratar o prevenir una infección bacteriana en un sujeto vertebrado que comprende administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de un polinucleótido que comprende una secuencia de codificación para una proteína receptora de Fc.

En ciertas modalidades, la infección bacteriana es una infección estreptococcal y puede causar mastitis.

Estas y otras modalidades de la invención serán apreciables para aquellos versados en la técnica en vista de la descripción dada aquí.

### BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Las figuras [1A-1D] ilustran la secuencia de polinucleótido que codifica la proteína *Streptococcus dysgalactiae*, y, la secuencia de aminoácido deducida de él. [(SEC ID NO): 3 y SEC ID NO: 4, respectivamente

La figura 2 presenta los siguientes resultados para el análisis de estructura de péptido de la proteína Mig *S. dysgalactiae* a: gráfico de hidropatía Kyle-Doolittle Hydropathy plot ("KD Hydrophilicity"), promediado sobre la ventana de 7; un gráfico de probabilidad de superficie Emini ("Surface Prob."); un gráfico de flexibilidad de cadena Karplus-Schulz ("Flexibilidad"); un gráfico de índice [JAMESON-WOLF ANTIGENIC], y tanto Chou- Fasman y los gráficos de estructura secundaria de [GARNIER-OSGUTHORPE-ROBSON] ("CF Alpha Helices" y "CF Beta láminas"; y "GOR Turnos", "GOR Alpha Helices", "GOR Beta láminas", y "sitios de Glicosilación Sites", respectivamente).

La figura 3 es un gráfico de estructura secundaria Chou-Fasman para la proteína Mig del *S. dysgalactiae*.

La figura 4 compara el cambio en el porcentaje de cuartos de ubre infectados con *S. disgalactiae* durante un periodo de 7 días entre tres grupos experimentales: (1) animales de control no vacunados; (2) animales vacunados con la proteína Mig; y (3) animales vacunados con GapC, una proteína de enlace de plasmina aislado de *S. disgalactiae* que fue evaluada simultáneamente.

La infección fue definida como recuperación de [OF >500 CFU DEL *S. DISGALACTIAE*] por ml de secreciones de leche.

La figura 5 ilustra la respuesta inflamatoria observada a la infección con *S. disgalactiae* graficada como cuentas de células somáticas promedio (SCC) para cada grupo experimental contra el tiempo en días luego de la invasión. En la figura, los diamantes [(-+-)] representan cuartos no vacunados y no retados, los cuadrados [(-M-)] representan los animales no vacunados retados, los triángulos [(-A-)] representan los animales vacunados con Mig y retados, y los x (-X-) representan los animales vacunados con GapC infectados.

La figura 6 ilustra las cuentas de células somáticas por cuarto de mamífero sobre el día 1 después de la infección.

En la figura la barra representa la media para cada grupo. Los cuadrados [(-)] representan animales no vacunados; los triángulos [(-△)] representan los animales vacunados con GapC y los triángulos invertidos representan los animales vacunados con Mig.

#### DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique de otra manera, técnicas convencionales de biología molecular, microbiología, tecnología de ADN recombinante e inmunología, que están dentro del experticio 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, Segunda edición (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 abreviaciones de aminoácido son usadas durante todo el texto: Alanine: Ala (A) Arginina: Arg (R) Asparagina: Asn (N) ácido Aspartico: Asp (D) Cisteina: Cis (C) Glutamina: Gln (Q) ácido Glutámico: Glu (E) Glicina: Gli (G) Histidina: His (H) Isoleucina: [ILE] [(I)] Leucina: Leu (L) Lisina: Lis (K) Metionina: Met (M) Fenilalanina : Fe (F) Prolina: Pro (P) Serina: Ser (S) Treonina: [TLIR] (T) Triptofan: Trp [(W)] Tirosina: Tir (I) Valina: Val (V)

#### 1. DEFINICIONES

Al describir la presente invención, los siguientes términos serán empleados, y se tiene el propósito que se definan como se indica más abajo.

Debe notarse que, como se usa en esta especificación y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un" "unos" y "el" incluye referentes plurales a menos que el contenido claramente dicte algo diferente. Así, por ejemplo, la referencia "un Streptococcus

[DISGALACTIAE] de proteína que liga Fc" incluye una mezcla de dos o más de tales proteínas, y el n. los términos "proteína que enlaza el receptor Fc [PROTEIN"Y"FC]," usado intercambiabilmente aquí, denota una proteína bacterial capaz de enlazar a las moléculas de inmunoglobulina en un sitio diferente del sitio de reconocimiento de antígeno, que incluye, sin limitación la región Fc de una molécula de inmunoglobulina.

Los términos "proteína Mig" y "proteína Mig de receptor Fc" y "proteína de enlace Fc Mig" (usadas intercambiabilmente" o una secuencia de nucleótido que codifica las mismas tiene el propósito de ser una proteína o una secuencia de nucleótido, respectivamente, que es derivada de un gen Mig encontrado en una variedad de especies bacteriales que incluyen, sin limitación ciertas cepas del Streptococcus del grupo A.

La secuencia de nucleótido de un gen Mig de Streptococcus representativa del S. [DISGALACTIAE] (SEC ID NO : 3), y la secuencia de aminoácido correspondiente codificada por ese gen (SEC ID NO : 4), se ilustra en las figuras [LA-1D.] sin embargo, una proteína Mig como se definió aquí no está limitada a las secuencias ilustradas

como subtipos de cada una de estas especies de *Streptococcus* son conocidas y las variaciones en las proteínas Mig ocurrirán entre ellas.

Un gen Mig derivado del [S.] *disgalactiae* se encuentra en el plásmido [PAA505MIG.]

Más aún, la proteína o secuencias de nucleótido derivadas no necesitan ser derivadas físicamente del gen descrito anteriormente, sino que pueden ser generadas de cualquier manera incluyendo por ejemplo síntesis química, aislamiento (por ejemplo del S *disgalactiae*) o por producción recombinante, con base en la información suministrada aquí. Adicionalmente el término tiene el propósito de que las proteínas que tienen secuencias de aminoácido sustancialmente homólogas (como se define más abajo) a secuencias de aminoácido contiguas codificadas por los genes que muestran actividad inmunológica y/o de enlace plasmina

Así, los términos se pretenden dar a entender la longitud completa, lo mismo que secuencias parciales y truncadas inmunogénicas y análogos activos y formas precursoras de las proteínas. También se han incluido en

el término los fragmentos de nucleótido del gen que incluye por lo menos cerca de 8 pares de base contiguas, más preferiblemente por lo menos cerca de 10 a 20 pares de base contiguas, y más preferiblemente por lo menos cerca de 25 a 50, o más, pares de base contiguas del gen o cualesquier entero entre estos valores. Tales fragmentos son útiles como probetas y en métodos de diagnóstico que se discuten mejor más adelante.

Los términos también incluye aquellas formas de posesión, lo mismo que de carencia, de una secuencia de señal, si tal está presente, lo mismo que las secuencias de ácido nucleico que codifican las mismas. Adicionalmente, el término tiene el propósito de formar de las proteínas Mig que carecen una región de anclaje de membrana, y las secuencias de ácido nucleico que codifican las proteínas con tales carencias. Tales carencias pueden ser deseables en sistemas que no suministran para la secreción de la proteína. Más aún, los dominios de enlace de receptor Fc de las proteínas, puede estar o no estar presente. Así, como por ejemplo, si la proteína de enlace Fc de Mig será usada para purificar la inmunoglobulina, el dominio de enlace Fc generalmente quedará retenido. Si la proteína es para ser usada en composiciones de vacuna, los

epítopes inmunogénicos que pueden o no incluir el dominio de enlace de receptor Fc, estarán presentes.

Los términos también incluyen las proteínas en forma neutral o en la forma de sales de adición básica o de ácido dependiendo del modo de preparación. Tales sales de adición ácido pueden involucrar grupos amino libres y las sales básicas pueden estar formadas con carboxilos libres. Las sales de adición ácidas y básicas farmacéuticamente aceptables se discuten más adelante. Adicionalmente, las proteínas pueden ser modificadas por combinación con otros materiales biológicos tales como lípidos (ambos ocurren naturalmente con la molécula u otros lípidos que no destruyen la actividad inmunológica) y sacáridos, o por modificación de cadenas laterales, tales como la acetilación de grupos amino, la fosforilación de cadenas laterales hidroxilo, la oxidación de grupos sulfidrilo, la glicoxilación de residuos de aminoácido, lo mismo que otras modificaciones de la secuencia probaría codificada.

El término por lo tanto tiene el propósito de eliminaciones, adiciones y sustituciones a la secuencia,

siempre que las funciones de polipéptido para producir una respuesta inmunológica son según se define aquí.

A este respecto, sustituciones preferidas particularmente serán generalmente conservativas en naturaleza, por ejemplo, aquellas sustituciones que tiene lugar dentro de una familia de aminoácidos. Por ejemplo, los aminoácidos son generalmente divididos en cuatro familias: (1) acídicas como aspartato y glutamato; (2) básicas [--LYSINA,] arginina, histidina; (3) no polares alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, [FENILALANINA,] metionina, triptofan; y (4) polares no cargadas - glicina, asparagina, glutamina, cistina, serina treonina, tirosina. La Fenilalanina, triptofan, y tirosina son algunas veces clasificadas como aminoácidos aromáticos. Por ejemplo, es predecible razonablemente que un reemplazo aislado del leucina con isoleucia o valina o viceversa; un aspartato con un glutamato o viceversa, una treonina con una serina o viceversa; o un reemplazo similar conservativo de un aminoácido con un aminoácido relacionado estructuralmente, no tendrán un mayor efecto sobre la actividad biológica. Las proteínas que tienen sustancialmente la misma secuencia de aminoácido que la molécula de referencia, pero poseen menores sustituciones

de aminoácido no afectan sustancialmente la afinidad de inmunogenicidad y/o enlace de plasmina de la proteína y por lo tanto dentro de la definición del polipéptido de referencia.

Por ejemplo, el polipéptido de interés puede incluir hasta cerca de 5 a 10 sustituciones de aminoácido no conservativo o conservativo, o aún entre 15 a 25 o 20 a 50 sustituciones de aminoácido conservativas o no conservativas o cualquier entero entre estos valores, siempre que la función deseada de la molécula permanezca intacta.

Similarmente, las sustituciones que ocurren en el dominio de enlace de transmembrana, si está presente, y la secuencia de señal, si está presente, normalmente no afectan la inmunogenecidad. Uno de los versados en la materia puede fácilmente determinar otras regiones de las moléculas de interés que pueden tolerar cambios por referencia a los gráficos de estructura de péptido mostrado en las figuras 2 y la figura 3 aquí.

El término proteína [TÉRMINO "STREPTOCOCCAL] Mig tiene el propósito de una proteína Mig de enlace Fc, como

se definió anteriormente, derivada de una especie streptococcal que produce la misma, incluyendo, pero no estando limitada a *S. dysgalactiae*. Por ejemplo, una "proteína *S. dysgalactiae* Mig" es una proteína de enlace Fc como se definió anteriormente, derivada de la *S. dysgalactiae*.

Las proteínas "tipo silvestre" o "nativa" o los polipéptidos se refieren a proteínas y polipéptidos aislados a partir de la fuente en la cual las proteínas ocurren naturalmente. Los polipéptidos "recombinantes" se refieren a polipéptidos producidos por técnicas de ADN recombinante; por ejemplo, producidos a partir de células transformadas por una construcción de ADN exógena que codifica el polipéptido deseado. Los polipéptidos "sintéticos" son aquellos preparados por síntesis química.

Una proteína "aislada" o polipéptido es una molécula de proteína o polipéptido generada y discreta a partir de un organismo completo con el cual la molécula se encuentra en la naturaleza; o una proteína o polipéptido libre en parte o completamente, de secuencias normalmente asociadas con este en la naturaleza; o la secuencia [A]

tal como existe en la naturaleza, pero que tiene secuencias heteorólogas (como se define más abajo) en asociación con ellas.

El término ["FUNCIONALMENTE] equivalente tiene el propósito de que la secuencia de aminoácido de una proteína Mig que enlaza Fc es una que producirá una respuesta inmunológica mejorada o sustancialmente equivalente, según se definió anteriormente, en comparación con la respuesta producida por una proteína que enlaza Fc que tiene identidad con la proteína referencia que enlaza Fc, o una porción inmunogénica de la misma.

El término "epítope" se refiere al sitio sobre un antígeno o hepteno al cual las células B específicas y/o las células T responden. El término también es usado intercambiabilmente con "determinante antigénico" o "sitio determinante antigénico". Los anticuerpos que reconocen el mismo epítope pueden estar identificados en un inmunoensayo siempre que muestra la habilidad de un anticuerpo para bloquear el enlace de otro anticuerpo al antígeno objetivo.

Los términos proteína ["INMUNOGENICA"] o polipéptido se refiere a una secuencia de aminoácido que produce una respuesta inmunológica según se describe más abajo.

Una proteína o polipéptido ["INMUNOGENICA"] como se usa aquí, incluye la secuencia de longitud completa de la proteína receptora de Fc, en cuestión, con o sin la secuencia de señal, el dominio de anclaje de membrana y/o el dominio de enlace Fc, análogos del mismo, o fragmentos inmunogénicos del mismo.

Por fragmento ["INMUNOGENICO"] se quiere decir un fragmento de una proteína receptora de Fc que incluye uno o más epítopes y por lo tanto produce la respuesta inmunológica descrita más abajo.

Tales fragmentos pueden ser identificados usando cualquier número de técnicas de mapeo de epítopo, bien conocidas en la técnica. Ver, por ejemplo, los protocolos de mapeo de epítopo en Molecular Biology, Vol. 66 (Glenn E. Morris, Ed., 1996) Humana Press, Totowa, New Jersey. por ejemplo, los epítopes lineales pueden ser determinados por ejemplo sintetizando concurrentemente grandes números de péptidos sobre soportes sólidos, los

péptidos correspondientes a porciones de la molécula de proteína y hacer reaccionar los péptidos con anticuerpos mientras que los péptidos todavía están sujetos a los soportes.

Tales técnicas son conocidas en el arte y descritas en, por ejemplo la patente estadounidense 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, epítopes conformacionales son identificados de manera fácil determinando la conformación espacial de los aminoácidos tales como por ejemplo, cristalografía de rayos X y resonancia magnética nuclear de dos dimensiones. Ver, por ejemplo, [EPITOPE MAPPING PROTOCOLS, SUPRA.] las regiones antigénicas de las proteínas también pueden ser identificadas usando gráficos estándar de antigenicidad e hidropatía, de manera que aquellos son calculados usando, por ejemplo, el programa de software Omega versión 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

perfil de antigenicidad, y las técnicas de Kyte-Doolittle, Kyte et al., [J MOL. BIOL.] (1982) 157: 105-132 para gráficos de hidropatía. Las figuras 2 y 3 ilustradas aquí de los perfiles Kyte-Doolittle para proteínas representativas están incluidas por la invención.

Los fragmentos inmunogénicos para propósitos de la presente invención, incluirán usualmente por lo menos cerca de 3 aminoácidos, preferiblemente cerca de 5 aminoácidos, preferiblemente por lo menos cerca de 10 a 15 aminoácidos y más preferiblemente de 25 o más aminoácidos de la molécula de proteína de Mig receptora de Fc pariente. No hay un límite superior crítico en la longitud del fragmento, que puede comprender cerca de la longitud completa de la secuencia de proteína, o aún una proteína de fusión que comprende dos o más epítopes de Mig.

Una "composición inmunogénica" es una composición que comprende una molécula antigénica en donde la administración de la composición a un sujeto resulta en el desarrollo en el sujeto de una respuesta humoral y/o inmunocelular a la molécula antigénica de interés.

Por composición de "subunidad de vacuna" se quiere decir una composición que contiene por lo menos un polipéptido inmunogénico, pero no todos los antígenos, derivado o homólogo a un antígeno de un patógeno de interés. Tal composición está sustancialmente libre de células patógenas intactas o partículas intactas, el lisado de tales células o partículas. Así, "composición de subunidad de vacuna" está preparada a partir de por lo menos polipéptidos inmunogénicos parcialmente purificados (preferiblemente sustancialmente purificados" del patógeno o de los análogos recombinantes del mismo. Una composición de subunidad de vacuna puede comprender la subunidad antígeno o antígenos de subunidad antígeno o antígenos de interés sustancialmente libres de otros antígenos o polipéptidos del patógeno.

Por "farmacéuticamente aceptable" o "farmacológicamente aceptable" se quiere significar un material que no es biológicamente o de alguna otra manera indeseable, por ejemplo, el material puede ser administrado a un individuo en una formulación o composición sin causarle ningún efecto biológico no deseado o una interacción de una manera deteriorante o

dañina con cualquiera de los componentes de la composición en la cual está contenida.

Una "respuesta inmunológica" a una composición o vacuna es el desarrollo del huésped de una respuesta inmune celular y/o mediada por anticuerpo a la composición o vacuna de interés. Usualmente, una "respuesta inmunológica" incluye pero no está limitada a uno o más de los siguientes efectos: la producción de anticuerpos, células B, células ayudadoras T, células supresoras T, y/o células citotóxicas T y/o células Y8T, dirigidas específicamente a un antígeno o antígenos incluidos en la composición o vacuna de interés. Preferiblemente, el huésped mostrará cualquiera de las respuestas terapéuticas o protectoras inmunológicas tal que la resistencia de la glándula mamaria a una nueva infección puede ser promovida y/o la severidad clínica de la enfermedad reducida. Tal protección será demostrada sea por una reducción o carencia de los síntomas normalmente mostrados por un huésped infectado y/o un tiempo de recuperación más rápido.

Por "[INMUNIZACION] del ácido nucleico" se quiere decir la introducción de una molécula de ácido nucleico

que codifica uno o más antígenos seleccionados dentro de una célula huésped, por la expresión in vivo de un antígeno, antígenos, un epítipo o epítopes. La molécula de ácido nucleico puede ser introducida directamente dentro de un sujeto receptor, por ejemplo por inyección, inhalación, oral, intranasal y administración mucosal y similares, o puede ser introducido ex vivo, dentro de las células que han sido removidas del huésped. En el último caso, las células transformadas son reintroducidas dentro del sujeto en donde una respuesta inmune puede ser montada en contra del antígeno codificado por la molécula del ácido nucleico.

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

Por "mastitis" se quiere decir una inflamación de la glándula mamaria en los mamíferos, incluyendo las vacas, cabras y similares, causada por la presencia del [de S.] [UBERIS.]. La infección se manifiesta a sí misma por la infiltración de células fagocíticas en la glándula.

Generalmente, 4 tipos clínicos de mastitis son reconocidos: (1) peragudo, asociado con sudor, calor, dolor, y secreción anormal en la glándula y acompañado por fiebre y otros signos de disturbio sistémico, tal como depresión marcada, pulso débil, rápido, ojos soñolientos, debilidad y anorexia completa; (2) aguda, con cambios en la glándula similar a aquellos mencionados anteriormente pero en donde la fiebre, la anorexia y la depresión son liberas a moderadas; (3) en donde no hay cambios sistémicos mostrados y los cambios en la glándula y su secreción son menos marcados; y (4) [SUBCLINICA,] en donde la reacción inflamatoria es detectable solamente por pruebas estándar para la mastitis.

Los ensayos estándar para la detección de mastitis incluyen pero no están limitados a, el ensayo de mastitis California, el ensayo de mastitis wisconsin, el ensayo [NAGASE], conteo celular electrónico y los conteos de células somáticas usados para detectar un contenido de células blancas de la sangre persistentemente altas en la leche. En general, un conteo de células somáticas de cerca de 300.000 a cerca de 500.000 células x ml o mayor, en la leche indicará la presencia de la infección. Así, una vacuna es considerada efectiva en el tratamiento y/o

prevención de la mastitis cuando, por ejemplo, el conteo de células somáticas en la leche se retiene por debajo de cerca de 500.000 células x ml. Para una discusión de mastitis y el diagnóstico de la misma, ver por ejemplo [THE MERCK VETERINARY MANUAL : A HANDBOOK OF DIAGNOSIS,] Therapy, [AND DISEASE PREVENTION AND CONTROL FOR THE VETERINARIAN, MERCK] and Co., Rahway, New Jersey, [1991.]

Por los [TERMINOS "VERTEBRADO," "SUJETO," Y "SUJETO VERTEBRADO"] se quiere significar cualquier miembro del [CHORDATA,] subfilum incluyendo, sin limitación los mamíferos tales como ganado vacuno ovino, cerdos, cabras, caballos y humanos; los animales domésticos tales como perros y gatos; y pájaros, incluyendo pájaros de juego domésticos y salvajes tales como gallos y gallinas incluyendo pollos, pavos u otros pájaros gallináceos; y peces. El término no denota una edad particular. Así, tanto adultos como animales recién nacidos, los mismo que fetos tienen el propósito de estar cubiertos.

Una molécula "de ácido nucleico" puede incluir , pero no está limitado a secuencias procarióticas, [MRNA,] eucariótico, cADN a partir de [MRNA,] eucariótico, secuencias de ADN genómico a partir de ADN eucariótico

por ejemplo mamíferos), y aún secuencias de ADN sintéticas. El término también captura las secuencias que incluyen cualquiera de los análogos de base conocidos de ADN y ARN.

Una molécula de ácido nucleico["AISLADO"] 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 desligada completamente o en parte de las secuencias normalmente asociadas con esta en la naturaleza; o una secuencia, tal como existe en la naturaleza, pero que tiene secuencias heterólogas (según se define más abajo) en asociación con ella. El término "aislada" en el contexto de un polinucleótido tiene el propósito de decir que el polinucleótido es aislado del cromosoma con el cual normalmente está asociado, y es aislado a partir de la secuencia genómica completa en la cual este ocurre normalmente.

Polinucleótido purificado se refiere a un polinucleótido de interés o fragmento del mismo que está esencialmente libre, por ejemplo, contiene menos de cerca de 50%, preferiblemente menos de cerca de 70%, y más

preferiblemente menos de cerca de 90% de la proteína con la cual el polinucleótido está asociado naturalmente. Las técnicas para purificar polinucleótidos de interés son bien conocidas en la técnica e incluye, por ejemplo, la disrupción de la célula que contiene el polinucleótido con un agente caotrópico y la separación del polinucleótido y las proteínas por cromatografía de intercambio de ion, cromatografía de afinidad y sedimentación de acuerdo con la densidad.

Una "secuencia de codificación" o una secuencia de nucleótido que codifica" una proteína particular, es una secuencia de nucleótido el cual es transcrito o traducido en un polipéptido in vitro o in vivo cuando está colocado bajo el control de elementos regulatorios apropiados. Los límites de la secuencia de codificación se determinan por un codón de inicio en el terminal 5' (amino) y una traducción en el codón de terminación en el terminal 3' (carboxi). Una secuencia de codificación puede incluir, pero no estar limitada a, secuencias procarióticas, cADN a partir de [MRNA,] eucariótico, secuencias de ADN genómico a partir de eucarióticos (por ejemplo mamíferos), y aún secuencias de ADN sintético. Una secuencia de terminación de transcripción usualmente

estará localizada en el 3' a la secuencia de codificación. Una secuencia "complementaria" es una en la cual la base nitrogenosa de una posición de nucleótido dada es el complemento de la base nitrogenosa que aparece en la misma posición en la secuencia de referencia. Para ilustrar, el complemento de adenosina es tirosina y viceversa; similarmente, la citosina es complementaria con la guanina y viceversa; así, el complemento de la secuencia de referencia 5'-ATGCTGA- sería 5'-TACGACT-3'.

Una secuencia "tipo salvaje" o "nativa", como se usa 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 Mig de la *S. disgalactiae* ilustradas en las figuras [IA-LD] (SEC [ID] NO : 4).

"Recombinante" como se usa aquí para describir una molécula de ácido nucleico significa un polinucleótido de un genómico cADN, semisintético, o sintético que, por virtud de su origen o manipulación: (1) no está asociado con todo o una porción del polinucleótido con el cual está asociado en la naturaleza; y/o (2) está ligado a un polinucleótido distinto del que con el cual se está liado

en la naturaleza. El término "recombinante" como se usa con respecto a una proteína o polipéptido significa un polipéptido producido por la expresión de un polinucleótido recombinante.

"Células huésped Recombinantes", "células huésped", "células", "líneas de células", "cultivos de células" y otros de tales términos que denotan microorganismos procarióticos o líneas de células eucarióticas cultivadas como entidades unicelulares son usadas intercambiablemente y se refieren a célula que pueden ser o han sido, usadas como receptores para los vectores recombinantes u otras transferencias de ADN e incluyen la progenie de la célula original que ha sido transfectada. Debe entenderse que la progenie de una célula parental única puede no necesariamente ser completamente idéntica en morfología o en genómica o complemento total de ADN a la original pariente, debido a mutación accidental o deliberada.

La progenie de la célula parental que son suficientemente similares a la pariente para ser caracterizada por la propiedad relevante, tal como la presencia de una secuencia de nucleótido que codifica un

péptido deseado, son incluidas en la progenie dentro del propósito de esta definición, y están cubiertas por los anteriores términos.

"homología" se refiere al porcentaje de identidad entre dos polinucleótidos o dos partes de polipéptido. Dos ADN o dos secuencias de polipéptido son "sustancialmente homólogas" una a la otra cuando la secuencia exhibe por lo menos entre 80% a 85%, preferiblemente entre cerca de 90% y más preferiblemente por lo menos cerca de 95% a 98% una identidad de secuencias sobre una longitud definida de las moléculas. Como se usa aquí, sustancialmente homólogo también se refiere a secuencias que muestran identidad completa con el ADN especificado o la secuencia de polipéptido especificada.

En general "identidad" se refiere a un nucleótido o nucleótido o aminoácido a aminoácido exacto en correspondencia con dos polinucleótidos o secuencias de polipéptido, respectivamente.

El porcentaje de identidad puede ser determinado por una comparación directa de la información de la secuencia

entre dos moléculas alineando las secuencias, contando el número exacto de empates entre las dos secuencias alineadas, dividiendo por la longitud de la secuencia más corta y multiplicando el resultado  $\times 100$ . Existen comercialmente disponibles programas de ocupador que pueden ser usados para ayudar en el análisis, tal como el ALIGN, Dayhoff, M. O. inAtlas of Protein Secuencia and Structure M. O.

[DAYHOFF ED.,] 5 Suppl. 3: [353-358,] National biomedical Research Foundation, Washington, DC, el algoritmo de homología local de Smith and Waterman (1981) Advances in Appl. Math. 2: 482-489 para análisis de péptidos. Los programas para la determinación de identidad de la secuencia de nucleótido están disponibles en el Wisconsin Secuencia Analysis Package, Versión 8 (disponible de Genetics Computer Group, Madison, WI) por ejemplo, el BESTFIT, FASTA y GAP que se basan en el algoritmo de Smith y Waterman. Estos programas son fáciles de utilizar con los parámetros base con que vienen recomendado por el fabricante y descritos en el Wisconsin Secuencia Analysis Package referido anteriormente. Por ejemplo, el porcentaje de identidad de una secuencia de nucleótido particular a una secuencia de referencia puede ser

determinado usando el algoritmo de homología de Smith and Waterman con una tabla de registros base y un espacio de penalty de seis posiciones de nucleótido.

Otro método para establecer el porcentaje de identidad en el contexto de la presente invención es el uso del paquete MPSRCH de programas protegidos por derechos de autor de la universidad de Edinburgh, desarrollados por John F. Collins y Shane S. Sturrok, y distribuidos por [INTELLIGENETICS,] Inc. (Mountain View, CA). A partir de este paquete el algoritmo de Smith-Waterman puede ser empleado donde los parámetros base son usados por la tabla de registro (por ejemplo, un porcentaje de error de 12, un error de extensión de 1 y un espacio de 6). A partir de los datos generados el valor "de case o empate" refleja la "identidad de las secuencias". Otros programas adecuados para el cálculo del porcentaje de identidad o similaridad entre secuencias son generalmente conocidos en la técnica, por ejemplo, otro programa de alineación es el BLAST, usado con parámetros base. Por ejemplo, el BLASTN y el BLASTP pueden ser usados por medio de utilizar los siguientes parámetros base: código genético = estándar; filtro = ninguno, hilo = ambos; corte = 60; expectativa = 10 [=]

[BLOSUM62]; descripciones = 50 secuencias; clasificación por = registro de precisión; bases de datos = no redundantes, GenBank + EMBL + DDBJ + PDB + GenBank CDS traducciones + proteína suiza + Spupdate + .PIR. Los detalles de estos programas pueden encontrarse en las siguientes direcciones de Internet. [http://www. \[NCBI.\] nhn. nih. \[GOV/BLAST/.\]](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/)

Alternativamente, la homología puede ser determinada por hibridación de los polinucleótidos bajo condiciones que forman dupletas estables entre regiones homólogas, seguido por la digestión con una nucleasa específica de hilo único, y la determinación del tamaño de los fragmentos digeridos. Las secuencias de ADN que son sustancialmente homólogas pueden ser identificadas en un experimento de hibridación Southern bajo, por ejemplo condiciones estrictas, como se definió para aquel sistema particular. Al definir las condiciones apropiadas de hibridización está dentro del alcance de los versados en la técnica, ver por ejemplo Sambrook et al., supra; DAN Cloning supra; Nucleic Acid Hybridization, supra.

Por el término "variante degenerada" se tiene el propósito de decir de un polinucleótido que tiene que

contiene cambios en la secuencia del ácido nucleico del mismo, que codifica un polipéptido que tiene la misma secuencia de aminoácido que el polipéptido codificado por el polinucleótido desde el cual la variante degenerada es derivada.

Las técnicas para determinar "similitudes" de secuencias de aminoácidos son bien conocidas en la técnica. En general, "similitudes" significa el aminoácido exacto frente al aminoácido de comparación de dos o más polipéptidos en el lugar apropiado, en donde los aminoácidos son idénticos o poseen propiedades similares químicas y/o físicas tales como carga o hidrofobicidad. El "porcentaje de similitud" entonces puede ser determinado entre las secuencias comparadas de polipéptidos.

Las técnicas para determinar la identidad de las secuencias de ácido nucleico y aminoácido también son bien conocidas en la técnica e incluyen determinar la secuencia de nucleótido del [MRNA] para aquel gen (usualmente vía un intermedio de cADN) y determinar la secuencia de aminoácido codificada por esta, y compara esto con una segunda secuencia de aminoácido. En general,

"identidad" se refiere a unas secuencias de polinucleótidos o polipéptidos respectivamente.

Una región "heteróloga" de una construcción de ADN es un segmento identificable de ADN dentro o ligado a otra molécula de ADN que no se encuentra en asociación con la otra molécula en la naturaleza. Así, cuando la región heteróloga codifica un gen bacterial, el gen usualmente estará rodeado por ADN que no rodea el gen bacterial en el genoma de la bacteria fuente. Otro ejemplo de la secuencia de codificación heteróloga es una construcción en donde la secuencia de codificación misma no se encuentra en la naturaleza (por ejemplo, secuencias sintéticas que tienen codones diferentes de los genes nativos). La variación alélica o de ocurrencia natural mutacional son eventos que no dan lugar a una región heteróloga de ADN como se usa aquí.

Un "vector" es una réplica, tal como un plásmido, un fago, un cósmido, al cual otro segmento de ADN puede estar ligado de modo que se da la replicación del segmento ligado. Un vector es capaz de transferir secuencias de genes a células objetivo (por ejemplo,

vectores de plásmido bacterial, vectores virales, vectores no virales, portadores particulados y liposomas.

Típicamente, los términos "construcción de vector", "vector de expresión", vector de expresión de gen", "vector de suministro de gen", "vector de transferencia de gen", y "cassette de expresión" se refieren a un conjunto que es capaz de dirigir la expresión de una secuencia o gen de interés.

Así, los términos incluyen clonación y vehículos de expresión, lo mismo que vectores virales.

Estos conjuntos incluyen un promotor que está ligado de manera operativa las secuencias o genes de interés. Otros elementos de control pueden estar presentes también. Los cassettes de expresión descritos aquí pueden ser contenidos dentro de una construcción de plásmido. En adición los componentes del cassette de expresión, la construcción de plásmido puede también incluir un origen bacterial de replicación, uno o más marcadores seleccionables, una señal que permite a la construcción de plásmido existir como un ADN de cadena única por ejemplo, un origen de replicación M13, un sitio de

clonación múltiple, un origen de mamífero de replicación (por ejemplo un SV40 o un origen de replicación adenovirus).

Los "elementos de control de ADN" se refieren colectivamente a promotores de transcripción, elementos mejoradores de transcripción, secuencias de terminación de transcripción, secuencias de poliadenilación (localizados en 3' en el codón de terminación de la traducción), secuencias para la optimización de la iniciación de la translación (localizada en el terminal 5' de la secuencia de codificación), secuencias de terminación de translación, dominios regulatorios aguas arriba, sitios de enlace de ribosomas y similares, que colectivamente suministran para la transcripción y traducción de una secuencia de codificación en una célula huésped. Ver por ejemplo, McCaughan et al. (1995) PNAS USA 92: 5431-5435; Kochetov et al (1998) FEBSLetts. 440: 351-355. No todas estas secuencias de control necesitan siempre estar presentes en un vector recombinante siempre que el gen deseado sea capaz de ser transcrito y traducido.

"operativamente enlazado" se refiere a una disposición de elementos en donde los componentes así descritos son configurados de modo que se lleva a cabo su función usual. Así, 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 requieren estar contiguos con la secuencia de codificación, siempre que ello funcione para dirigir la expresión de la misma. Así, por ejemplo, intervienen sin traslado aunque las secuencias transcritas pueden estar presentes entre un promotor y la secuencia de codificación y el promotor puede todavía ser considerado como "operativamente ligado" a la secuencia de codificación. Similarmente, "los elementos de control compatibles con la expresión 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 ARN polimerasa liga al promotor y transcribe la secuencia de codificación en el [MRNA,] que luego es traducido en el polipéptido codificado por la secuencia de docificación.

Una "célula huésped" es una célula que ha sido transformada, o es capaz de transformación, por una molécula de ácido nucleico exógeno.

Una célula ha sido "transformada" por ADN exógeno cuando tal ADN exógeno ha sido introducido dentro de la membrana de la célula. El ADN exógeno puede o no estar integrado (ligado covalentemente) en el ADN cromosomal formando el genoma de la célula. En procariótidos y levadura, por ejemplo, el ADN exógeno puede ser mantenido en un elemento episomal, tal como un plásmido. Con respecto a las células eucarióticas, una célula establemente transformada es una en la cual el ADN exógeno se ha integrado con el cromosoma de modo que es heredable por las células hijas por medio de la replicación del cromosoma. Esta estabilidad es demostrada por la habilidad de la célula eucariótica para establecer líneas de células o clones que comprenden una población de células hijas que contienen el ADN exógeno.

Como se usa aquí, "muestra biológica" se refiere a una muestra de tejido o fluido aislado de un sujeto,

incluye pero no está limitado a, por ejemplo, sangre, plasma, suero, material fecal, orina, médula de hueso, bilis, fluido espinal, fluido linfático, muestras de piel, secreciones externas de la piel, respiratoria, intestinal y tracto genitourinario, lágrimas, saliva, leche, células de sangre, órganos biopsias y también muestras de cultivos de células in vitro constituyentes que incluyen pero no se limitan al medio condicionado resultante del crecimiento de las células y tejidos en medios de cultivo, por ejemplo, células recombinantes y componentes de células.

Como se usa aquí, el término "marcador" y "marcador detectable" se refiere a una molécula capaz de ser detectada, incluyendo, pero no limitada a, isótopos radioactivos, fluoroescoras, quimioluminiscedores, enzimas, sustratos de enzimas, factores de enzima, inhibidores de enzima, cromóforos, tintas, iones de metal, soluciones de metal, ligandos (por ejemplo biotina o similares. El término "fluorescences" se refiere a una sustancia o a una porción de la misma que es capaz de exhibir fluorescencia en un rango detectable. Ejemplos particulares de marcadores que pueden ser usados bajo la invención incluyen la fluoresceína, rodamina dansila,

umbeliferona, rojo Texas, luminol, NADPH y [A- $\beta$ -] galactosidasa.

## 2. MODOS DE LLEVAR A CABO LA INVENCION

Antes de describir la presente invención en detalle, debe entenderse que esta invención no está limitada a formulaciones particulares o parámetros de procesos que pueden variar por supuesto. También debe entenderse que la terminología usada aquí tiene el propósito de describir modalidades particulares de la invención solamente, y no tienen el propósito de limitarla.

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

La parte central de la invención es el descubrimiento de que la proteína Mig de enlace Fc aislada a partir de *S. disgalactiae* es capaz de producir una respuesta inmune en un sujeto vertebrado. En particular, el gen para la proteína Mig en la *S. disgalactiae* ha sido aislada,

secuenciada y caracterizada, y la secuencia de aminoácido codificada por el gen ha sido deducida de allí. La secuencia de ADN completa para el gen Mig de [S.] disgalactiae (SEC ID NO : 3) y la secuencia de aminoácido correspondiente (SEC ID NO : 4) se muestran en las figuras [1A-] [1D.]

Como se describió en los ejemplos, el gen de longitud completa S. disgalactiae Mig ilustrado en las posiciones de nucleótido 1-2,010 inclusive, de las figuras [1A-1D,] codifica la proteína Mig de S. disgalactiae de longitud completa de 669 aminoácidos que incluye una primera región transmembrana de 24 aminoácidos (residuos 15 y 39) y una segunda región de transmembrana de 18 aminoácidos de residuos [646-664).] Las regiones de transmembrana fueron determinadas usando el programa Tmpred que predice las regiones de extensión de membrana y su orientación.

El programa usa un algoritmo basado sobre el análisis estadístico de la TMbase, una base de datos proteínas de transmembrana de ocurrencia natural, usando una combinación de varias matrices de peso para su

registro. Ver, Hofmann, [K.] & Stoffel, W. (1993) Biol. Chem. 347: 166.

El Mig de la *S. disgalactiae* tiene un peso molecular predicho de cerca de 73 kDa. (calculado usando el programa Peptide Sort del GCG Wisconsin Package, versión, suministrada por el SeqWeb secuencia analysis package, versión 1.1 del Canadian [BIOINFORMATICS] Resource).

La secuencia de longitud completa incluye un péptido de señal.

La figura 2 grafica los resultados del análisis estructural siguiente para la proteína Mig de la presente invención: hidropatía 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 glicosilación predichos.

La figura 3 grafica la estructura secundaria de acuerdo con Chou-Fasman para la proteína Mig de la

presente invención. Una persona versada en la materia puede fácilmente usar la información presentada en las figuras 2 y 3 para determinar las regiones inmunogénicas de la proteína para su uso en composiciones de vacuna.

Las proteínas de Mig receptora de Fc, incluyen sin limitación la proteína Mig de la *S. disgalactiae* fragmentos inmunogénicos de la misma o proteínas quiméricas que incluyen la misma, pueden estar provistas en composiciones de vacuna de subunidad. En adición al uso en composiciones de vacuna, las proteínas o anticuerpos de la misma pueden ser usadas como reactivos de diagnóstico para detectar la presencia de infección en un sujeto vertebrado. Similarmente, los genes que codifican las proteínas pueden ser clonados y usados para diseñar probetas para detectar o aislar genes homólogos en otras sepas bacteriales.

Por ejemplo, los fragmentos comprende por lo menos cerca de 15 a 20 nucleótidos, más preferiblemente cerca de 20 a 50 nucleótidos, y más preferiblemente cerca de 60 a 100 nucleótidos o cualquier entero entre estos valores, que encontrarán uso en estas modalidades.

Las composiciones de vacuna de la presente invención pueden ser usadas para tratar o prevenir una amplia variedad de infecciones bacteriales en sujetos vertebrados. Por ejemplo, las composiciones de vacuna incluyen, sin limitación, la proteína Mig receptora de Fc de la *S. disgalactiae*, que puede ser usada para tratar las infecciones streptococcales en sujetos vertebrados que son causadas por esta y otras especies. En particular, *S. uberis*, *S. agalactiae*, y *S. disgalactiae* son patógenos bacteriales comunes asociados con la mastitis en bovinos, equinos, ovinos y especies de cabras.

Adicionalmente, el streptococco del grupo B, tal como *S. agalactiae*, son conocidos que causan numerosas infecciones en vertebrados, incluyendo septicemia, meningitis bacteremia, impetigo, artritis, infecciones del tracto urinario, abscesos, aborto espontáneo, etc. de modo que, las composiciones de vacuna que contienen la proteína Mig receptora de Fc encontrarán uso en el tratamiento y/o prevención de una amplia variedad de infecciones streptococcales.

Similarmente, las proteínas que ligan Fc derivadas de otros géneros bacteriales tales como el Staphylococcus encontrarán el uso para tratar infecciones bacteriales causadas por especies que perteneces a esos géneros. Así, es fácilmente visualizable que las proteínas que ligan Fc a partir de una variedad de especies bacteriales pueden ser usadas para tratar y/o prevenir una amplia variedad de infecciones bacteriales en numerosas especies animales.

Las proteínas streptococcales que ligan Fc de la presente invención incluyen sin limitación la proteína Mig que liga Fc, y pueden ser usadas en composiciones de vacuna sea solas o en combinación con otros antígenos bacteriales, fungales, virales o protozoales. Estos antígenos pueden ser provistos separadamente o aún como proteínas de fusión que comprenden uno o más epítopes o una proteína que liga Fc fusionada a uno o más de estos antígenos. Por ejemplo, otras proteínas inmuogénicas de la S. uberis, tal como el factor CAMP, la cápsula de ácido hialurónico y, hiluronidasa, proteínas tipo R y activador plasmogénico, pueden ser administrados con la proteína Mig.

Adicionalmente, las proteínas inmunogénicas de otros organismos que se involucran en mastitis, tales como a partir del género *Staphylococcus*, *Cornebacterium*, *Pseudomonas*, *Nocardia*, *Clostridium*, *Micobacterium*, [MYCOPLASMA] *Pasteurella*, *Prototheca*, otros *streptococcus*, bacteria coliforme, lo mismo que levadura, pueden ser administradas junto con las proteínas que ligan Fc descritas aquí para suministrar un amplio espectro de protección. Así, por ejemplo, las proteínas inmunogénicas que sales del *Staphylococcus aureus*, [STR. AGALACTIAE, ST. DYSAGALACTIAE, STR. ZOEPIDEMICUS,] [CORYNEBACTERIUM PYOGENES, PSEUDOMONAS AERUGINOSA, NOCARDIA ASTEROIDES, CLOSTRIDIUM] [PERFRINGENS, ESCHERICHIA COLI, ENTEROBACTER AEROGENES] y *Klebsiella* spp. Pueden suministrarse junto con las proteínas que ligan Fc de la presente invención.

Adicionalmente, las proteínas Fc a partir de diferentes especies *streptococcales* pueden ser usadas juntas en las composiciones de vacuna de la presente invención. En esta modalidad, las proteínas múltiples pueden ser suministradas sea como proteínas de fusión o como antígenos discretos en las mismas o diferentes composiciones de vacuna.

La producción de proteínas que ligan Fc anteriormente descritas como proteínas del ligado Fc y fragmentos activos, análogos y proteínas quiméricas derivadas de la misma pueden ser producidos por una variedad de métodos. Específicamente, las proteínas que ligan Fc pueden ser aisladas directamente de la bacteria que expresa la misma. Esto se lleva a cabo generalmente preparando primero un extracto crudo que carece de componentes celulares y diversas proteínas extrañas. Las proteínas deseadas pueden entonces ser purificadas adicionalmente a partir de las fracciones de lisado de células por, por ejemplo cromatografía de columna, técnicas inmunoabsorbentes HPLC u otros métodos convencionales bien conocidos en la técnica.

Más particularmente, las técnicas para aislar proteínas que ligan Fc han sido descritas.

Por ejemplo, los métodos de Reis, et al. Ha sido usados para aislar un receptor de Fc homogéneo funcionalmente que tiene las propiedades de un receptor tipo III (Reis et al., (1984) [J.] Immunol. 132: 3091).

Alternativamente, las proteínas pueden ser producidas recombinantemente como se describe aquí. Como se explicó anteriormente, estos productos recombinantes pueden tener la forma de secuencias de proteínas parciales, secuencias de longitud completa, formas precursoras que incluyen secuencias de señal, formas maduras sin señales, o aún proteínas de fusión (por ejemplo con un promotor apropiado para el huésped recombinante, o con otra secuencia de subunidad antigénica para el *Streptococcus* u otro patógeno).

En una modalidad de la presente invención, la proteína Mig de la *S. digalactiae* es purificada a partir de las fracciones de lisado de células usando la cromatografía de afinidad después se produce recombinantemente la proteína. Ver por ejemplo [1A-D,] infra.

Las librerías de genes pueden ser construidas y los clones resultantes usados para transformar una célula huésped apropiada. Las colonias pueden ser combinadas y seleccionadas para clones que tienen actividad de enlace de receptor Fc, por ejemplo, para clones capaces de ligar IgG.

Alternativamente, una vez que las secuencias de aminoácido son determinadas, las probetas de oligonucleótidos que contienen los codones para una porción de las secuencias de aminoácido determinadas pueden ser preparados y usados para seleccionar librerías genómicas o de ADN para genes que codifican las proteínas sujeto. Las estrategias básicas para preparar las probetas de oligonucleótidos y librerías de ADN lo mismo que sus escogencias por hibridización de ácido nucleico son bien conocidas por aquellos versados en la técnica. Ver, por ejemplo, DNA Cloning: Vol. II, supra; Nucleic Acid Hybridization, supra ; [OLIGONUCLEOTIDE] Synthesis, supra; Sambrook et al., supra. Una vez un clon de la librería seleccionada ha sido identificado por hibridización positiva este puede ser confirmado por al análisis de restricción en enzima y el secuenciamiento de ADN que el inserto de librería particular contiene un gen de proteína que liga Fc o un homólogo del mismo. Los genes pueden entonces ser aislados adicionalmente usando técnicas estándar, y, si se desea, enseñanzas PCR o enzimas de restricción empleadas para eliminar porciones de la secuencia de longitud completa.

Similarmente, los genes pueden ser aislados directamente a través de la bacteria usando técnicas conocidas tales como extracción de fenol y la secuencia puede ser manipulada adicionalmente para producir cualesquier alteraciones deseadas.

Ver, por ejemplo Sambrook et al., supra, para una descripción de las técnicas utilizadas para obtener y aislar el ADN.

Alternativamente, las secuencias de DNA que codifican las proteínas de interés pueden ser preparadas sintéticamente en lugar de ser clonadas. Las secuencias de DNA pueden diseñadas con los codones apropiados para la secuencia particular de aminoácidos. En general, uno seleccionara los codones preferidos para el huésped propuesto se la secuencia ha de ser usada para expresión. La secuencia completa es construida a partir de oligonucleótidos que se sobreponen preparados por métodos estándar y ensamblados en una secuencia de codificación completa. Ver por ejemplo, Edge (1981) Nature 292: 756; Nambair et al.

(1984) Science 223: 1299; Jay et al. (1984) J. Biol. [CHEM.] 259: 6311.

(1984) Science 223: 1299; Jay et al. (1984) J. Biol. [CHEM.] 259: 6311.

Una vez las secuencias de codificación para las proteínas deseadas han sido preparadas o aisladas, entonces estas pueden ser clonadas en cualquier vector o replicador apropiado. Numerosos vectores de clonación son conocidos por aquellos versados en la técnica, y la selección e un vector de clonación apropiado es una cuestión de escogencia. Los ejemplos de vectores de DNA recombinantes para clonación y células huésped que ellos pueden transformar incluyen el bacteriofago [X] (E. [COLI]),] pBR322 (E. [COLI]),] pACYC177 (E. coli), pKT230 (bacteria de gramo negativo), [PGVL 106] (bacteria de gramo negativo), [PLAFRL] (bacteria de gramo negativo), pME290 (bacteria de gramo negativo que no es E. coli), pHV14 (E. coli and [BACILLUS SUBTILIS), PBD9 (BACILLUS),] pIJ61 [(STREPTOMYCES),] pUC6 [(STREPTONYCES),] YIp5 [(NACCHAROMYCES),] [YCPL9 (SACCHARONZYCES)] y virus bovino de papilloma (células mamarias). Ver, Sambrook et al., supra ; DNA Cloning, supra ; B. Perbal, supra.

El gen puede ser colocado bajo el control de un promotor, un sitio deligado de ribosoma (para la

expresión bacterial) y, opcionalmente, un operador (colectivamente referido aquí como elementos de "control"), de modo que la secuencia de DNA que codifica a la proteína deseada es transcrita en el RNA en la célula huésped transformada por un vector que contiene esta construcción de expresión. La secuencia de codificación puede o no contener un péptido de señal o una secuencia precursora. Si una secuencia de señales incluida, esta puede no ser nativa, o ser una secuencia homóloga nativa o una secuencia heteróloga. Por ejemplo, la secuencia de señal para la proteína Mig de la *S. dysgalactiae* (residuos aminoácidos 1 a 39, inclusive) puede ser usada para la secreción de la misma, como pueden un número de otras secuencias de señal, bien conocidas en la técnica. Las secuencias precursoras pueden ser removidas por el proceso post-translacional del huésped. ver, e. g., U. S. Patente Nos. 4,431,739; 4,425,437; 4,338,397.

Otras secuencias regulatorias pueden también ser deseables las cuales permiten la regulación de la expresión de secuencias de proteínas relativas al crecimiento de las células huésped. Las secuencias regulatorias son conocidas por aquellos versados en la

técnica, y algunas ejemplos incluyen aquellas que causan la expresión de un gen que se activa o se desactiva en respuesta a un estímulo químico o físico, incluyendo la presencia de un compuesto regulatorio. Otros tipos de elementos regulatorios también pueden estar presentes en el vector por ejemplo, secuencias mejoradoras.

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

Alternativamente, la secuencia de codificación puede ser clonada directamente en un vector de expresión que contiene ya las secuencias de control y un sitio de restricción apropiado.

En algunos casos puede ser necesario modificar la secuencia de codificación de modo que esta quede sujeta a las secuencias de control con la orientación apropiada; por ejemplo, para mantener el marco de lectura apropiado. También puede ser deseable producir mutantes o análogos de la proteína que liga Fc. Los mutantes análogos pueden ser preparados por la eliminación de una porción de la secuencia que codifica la proteína por la inserción de

una secuencia [AND/OR] por la sustitución de uno o más nucleótidos dentro de la secuencia. Las técnicas para la modificación de secuencias de nucleótidos tales como la mutagénesis dirigida al los sitios, son descritas en, por ejemplo, Sambrook et al., supra ; DNA Cloning, supra ; Nucleico Acido Hybridization, supra.

El vector de expresión es entonces usado para transformar una célula huésped apropiada. Un número de líneas de células mamarias son conocidas en la técnica e incluyen líneas de células inmortalizadas disponibles en el American Type Culture Collection (ATCC), tal como pero no están limitadas al ovario de células de ovario de hámster chino (CHO), células HeLa, células de riñón de hámster bebek (BHK) células de riñón de mico (COS), células de carcinoma [HEPATOCELULAR] humano (por ejemplo, Hep G2), células de riñón bovino Madin-Darby [("MDBK")] lo mismo que otras. Similarmente, los huéspedes bacteriales tal como E. coli, Bacillus [SUBTILIS, y Streptococcus

SPP.,] encontraran uso con las presentes construcciones de expresión. Lis huésped de levadura útiles en la presente invención, incluyen inter alia, Sacaromices cerevisiae, Candida [ALBICANS, CAFZDIDA MALTOSA,

HANSENULA POLIMOFA, KLUIVEROMICES FIAGILIS, KLIYVEROMICES] lactis, Pichia [GUILLERIMONDII, PICHIA PASTORIS, SCHIZOSACCHAROMYCES POMBE Y YARROWIA] lipolitica. Las células de insectos para uso con vectores de expresión de báculovirus incluyen, [INTER ALIA, AEDES] aegypti, [AUTOGRAFA CALIFORNICA, BOMBYX MORI, DROSOFILA MELANOGASTER, SPODOPTERA] frugiperda, y Tricoplusia ni dependiendo del sistema de expresión y del huésped seleccionado, las proteínas de la presente invención son producidas por el cultivo de células huésped transformadas por un vector de expresión descrito anteriormente bajo condiciones en donde la proteína de interés es expresada. La proteína es entonces aislada de las células huésped y purificada. Si el sistema de expresión secreta la proteína dentro del medio de crecimiento, la proteína puede ser purificada directamente del medio. Si la proteína no es secretada, se aísla de los lisados de células. La selección de las condiciones de crecimiento apropiadas y métodos de recuperación están dentro del versado en la técnica.

Las proteínas de la presente invención también pueden ser producidas por síntesis química tal como síntesis de péptido de fase sólida, usando secuencias de

aminoácidos conocidas o secuencias de aminoácidos derivadas de la secuencia de DNA de los genes de interés. Tales métodos son conocidos para aquellos versados 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 péptidos de fase sólida; y M. [BODANSKY,] [PRINCIPLES OF PEPTIDE SYNTHESIS,] Springer-Verlag, Berlin [(1984)] y E. Gross y J. Meienhofer, Eds., The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology, supra, Vol. 1, la síntesis de solución clásica. Las síntesis químicas de péptidos pueden ser preferibles si un fragmento pequeño del antígeno en cuestión es capaz de producir una respuesta inmunológica en el sujeto de interés.

Las proteínas que ligan Fc de la presente invención, o sus fragmentos, pueden ser usados para producir anticuerpos, tanto poligonales como monoclonales. Si el anticuerpo poligonales son deseados un mamífero seleccionado, (por ejemplo ratón, conejo, cabra, caballo, etcétera) es inmunizado con un antígeno de la presente

invención, o su fragmento, o un antígeno mutado. El suero del animal inmunizado es recogido y tratado de acuerdo con procedimientos conocidos. Ver, por ejemplo, Jurgens et al. (1985) J Chrom. 348: 363-370. Si el suero que contiene los anticuerpos poligonales es usado, los anticuerpos poligonales son purificados por cromatografía de inmuoafinidad, usando procedimientos conocidos.

Los anticuerpos momoclonables de la proteína Mig y los fragmentos de la misma pueden ser fácilmente producidos por los versados en la técnica. La metodología general para hacer anticuerpos monoclonales usando tecnología de hibridoma son bien conocidos. Las líneas de células que producen anticuerpos inmortales pueden ser creadas por fusión de células, y también por otras técnicas tales como transformación directa de linfocitos B con DNA oncogénico, o la transfección con virus Epstein-Barr . Ver, por ejemplo, M. Schreier et al., Hybridoma Techniques (1980); Hammerling et al., Monoclonal Antibodies [AND T-CELL HYBRIDOMAS (1981)] ; [KENNETT] et al., Monoclonal [SNTBODIES (1980)] ; ver tambien U. S.

Patente Números. 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 la proteína Mig, o fragmentos de la misma, pueden ser seleccionados según varias propiedades; por ejemplo, por afinidad de isótopos, epítomos, etcétera. Los anticuerpos monoclonales son útiles en la purificación usando técnicas de inmunoafinidad, o de antígenos individuales los cuales ellos pueden ser dirigidos en contra. Tanto los anticuerpos poligonales y monoclonales pueden ser usados en la inmunización pasiva o pueden ser combinados con preparaciones de subunidad de vacunas para promover la respuesta inmune. Los anticuerpos poligonales y monoclonales sin tambien útiles para propósito de diagnóstico.

Formulaciones y administración de vacuna. Las proteínas que ligan Fc de la presente invención pueden ser formuladas en composiciones de vacunas, sea solas o en combinación con otros antígenos, para uso en la inmunización de sujetos como se describe más abajo. Los métodos para preparar tales formulaciones son descritas en por ejemplo, [RENIINGTON&APOS;S FARINACEUTICAL SCIENCES, MAELC] Publishing Company, Easton,

Pennsylvania, 18 Edition, 1990. Típicamente, las vacunas de la presente invención son preparadas como inyectables, sea como soluciones líquidas o suspensiones. Las formas sólidas adecuadas para solución o suspensión en vehículos líquidos antes de la inyección pueden también ser preparadas. La preparación también puede ser emulsificada o el ingrediente activo encapsulado en vehículo liposoma. El ingrediente inmunogénico activo es generalmente mezclado con un vehículo farmacéuticamente compatible, tal como, por ejemplo, agua, salina, dextrosa, glicerol, etanol o similares, y combinaciones de los mismos. Adicionalmente, si se desea, el vehículo puede contener cantidades menores de sustancias auxiliares tales como humectantes, emulsificadores, y agentes de amortiguadores de pH.

Los adyuvantes que promueven la efectividad de la vacuna también pueden ser agregados 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, [CITOLDINAS,] y otras sustancias conocidas en la técnica.

La proteína Mig puede ser ligada a un portador para poder incrementar la inmunogenecidad de la misma. Portadores adecuados incluyen macromoléculas grandes metabolizadas lentamente tales como proteínas, que incluyen albúminas de suero , hemocianina de clave límite, moléculas de inmunoglobulina, tiroglobulina, o valbumina, u otras proteínas bien conocidas por aquellos versados en la técnica; polisacáridos, tal como sefarosa, agarosa, celulosa, pepitas de celulosa y similares; aminoácidos poliméricos tales como ácido poliglutámico, polilisina y similares; copolímeros de aminoácidos; y partículas de virus inactivo.

Las proteeinas que ligan Fc de la presente invención pueden ser usadas en su firma nativa o en su contenido de grupo funcional pueden ser modificadas, por ejemplo, la succilación de residuos de lisina o la reacción con Cys-tiolactona. Un grupo sulfidril tambien puede ser incorporado dentro del portador (o antígeno) por medio de por ejemplo la reacción de funciones de amino con 2-iminotiolano o la [n-hidroxisuccinimida] éster de [3- (4-ditiopiridil] propionato. Tales portadores tambien pueden ser modificados para incorporar brazos espaciadores (tal como [hexametileno] diamina u otras moléculas

bifuncionales o de tamaño similar para la ligación de los péptidos.

Otros portadores adecuados para las proteínas que ligan Fc de la presente invención incluyen los polipéptidos VP6 de rotavirus, o fragmentos funcionales de los mismos, como se describe en la patente estadounidense número 5,071,651. También son útiles los productos de fusión de una proteína viral y los inmunogenes sujeto hechos por métodos descritos en la patente estadounidense No. 4,722,840. Todavía otros portadores adecuados incluyen células, tales como, linfocitos, ya que la presentación en estas formas mimetizan el modo natural de presentación en el sujeto y le da crecimiento al estado inmunizado. Alternativamente, las proteínas de al presente invención pueden estar acopladas con eritrocitos, preferiblemente los eritrocitos del propio sujeto. Los métodos de acoplamiento de péptidos a proteínas o células son conocidas por aquellos versados en la técnica.

Más aún las proteínas que ligan Fc (o complejos de los mismos) pueden ser formuladas en composiciones de vacuna sea en formas neutrales o en formas salinas. Las

sales farmacéuticamente aceptables incluyen las sales de adición de ácido (formadas con los grupos amino libres de los polipéptidos activos) y los cuales sin formados con ácidos inorgánicos tales como, por ejemplo, ácidos clorhídrico o fosfórico, o tales ácidos orgánicos tales como acético, oxálico, tartárico, mandélico y similares. Las sales formadas de los grupos carboxilos libres pueden también ser derivadas a partir de bases inorgánicas tales como por ejemplo, sodio, potasio, amonio, calcio, hidróxidos férricos, o tales bases orgánicas tales como isopropilamina, [trimetilamina,] 2-etilamino etanol, histidina, procaina, y similares.

Las formulaciones de vacuna contendrán una "cantidad terapéuticamente efectiva" del ingrediente activo, esto es, una cantidad capaz de producir una respuesta inmune en sujeto al cual la composición se le administra. En el tratamiento y prevención de la mastitis, por ejemplo, una "cantidad terapéuticamente efectiva" sería preferiblemente una cantidad que promueva la resistencia de la glándula mamaria a una nueva infección y/o reducir la severidad clínica de la enfermedad. Tal protección será demostrada sea por una reducción o carencia de los síntomas normalmente mostrados por un huésped infectado,

un tiempo de recuperación mayor y/o un conteo de células somáticas inferior en la leche de la ubre infectada. Por ejemplo, la habilidad de la composición para retener o traer el conteo de células somáticas (SCC) en la leche por debajo de 500,000 células por ml, el valor umbral establecido por la International Dairy Federation, por encima del cual, los animales son considerados que tienen mastitis clínica, será indicativo de un efecto terapéutico

La cantidad exacta es fácilmente determinada por aquellos versados en la técnica usando pruebas estándar. Las concentraciones de proteína que liga FC estarán típicamente en el rango entre 1% acerca de 95% (P/P) de la composición, o aun menores si es apropiado. Con las presentes formulaciones de vacuna, 5 a 500 g de ingrediente activo por ml de solución inyectada debe ser adecuado para elevar una respuesta inmunológica cuando una dosis de 1 a 3 ml por animal es administrada.

Para inmunizar un sujeto, la vacuna generalmente se administra parenteralmente, usualmente por inyección intramuscular. Otros modos de administración, sin embargo, tales como inyecciones subcutáneas,

intraperitoneales o intravenosas tambien son aceptables. La cantidad a ser administrada depende del animal a ser tratado, la capacidad del sistema inmune del animal para sintetizar anticuerpos, y el grado de protección deseada. Las dosis efectivas pueden ser fácilmente establecidas por alguien versado en la técnica por medio de ensayos de rutina que establecen las curvas de respuesta de dosis. El sujeto es inmunizado por la administración de la vacuna en por lo menos una dosis y preferiblemente 2 dosis. Más aun, al animal se puede administrársele tantas dosis como se requiera para mantener el estado de inmunidad a la infección.

Las formulaciones de vacuna adicionales que son adecuadas por otros modos de administración incluyen supositorios, y en algunos casos formulaciones de aerosol intranasal u oral y formulaciones de liberación sostenida. Para los supositorios, la composición vehículo incluirá tradicionalmente en ligantes y portadores tales como polialkalin glicols, o triglicéridos. Tales supositorios pueden ser formados a partir de mezclas que contienen el ingrediente activo en el rango entre 0,5% a 10% (p/p), preferiblemente entre 1% acerca de 2%. Los vehículos orales incluyen los que

normalmente se emplean como excipientes, como por ejemplo, grados farmacéuticos de manitol, lactosa, almidón, magnesio, estearato, celulosa de sodio sacarina, carbonato de magnesio, y similares. Estas composiciones de vacuna oral pueden ser tomadas en al forma de soluciones, suspensiones, tabletas, píldoras, cápsulas, formulaciones de liberación sostenida, o polvos, y contienen entre 10% acerca de 95% del ingrediente activo preferiblemente entre 25% acerca de 70%.

Las formulaciones intranasales usualmente incluirán vehículos que no causen irritación a la mucosa nasal ni que causen disturbios significativos a la función ciliar. Los diluyentes tales como agua, salina acuosa, u otras sustancias conocidas pueden ser empleados con la invención objeto. Las formulaciones nasales tambien pueden contener preservativos tales como pero no limitarse a clorobutanol y cloruro de benzalkonium. Un surfactante puede estar presente para promover la absorción de las proteínas objeto por la mucosa nasal.

LLLLLas formulaciones de liberación controlada o sostenida son hechas por medio de incorporar la proteína dentro de portadores o vehículos tales como liposomas y polímeros impermeables no resorbables tales como,

copolímeros de acetato de etileno y vinilo y copolímeros y [hytrelt]], polímeros hinchables tales como hidrogeles, o polímeros resorbables tales como colágeno y ciertos poliácidos o poliésteres tales como aquellos usados para hacer suturas resorbables. Las proteínas que ligan Fc también pueden ser suministradas usando minibombas implantadas bien conocidas en la técnica.

Las proteínas que enlazan Fc en la presente invención también pueden ser administradas por medio de un virus portador que expresa la misma. Los virus portadores pueden encontrar uso con la presente invención e incluyen pero no están limitados a la vaccinia u otros virus pox, adenovirus, y virus herpes. Como vía de ejemplo, los recombinantes de virus vaccinia expresan las proteínas novedosas que pueden ser construidas como sigue. La codificación de la proteína particular es primero insertada dentro del vector apropiado de modo que este está adyacente a un promotor de vaccinia y rodea las secuencias del DNA de vaccinia, tales como las secuencias que codifican la timidina quinasa (TK). Este vector es entonces usado para transfectar las células que son infectadas simultáneamente con la vaccinia. La recombinación homóloga sirve para insertar el promotor de

vaccinia más el gen que codifica la proteína de la invención dentro del genoma viral. El TK recombinante resultante puede ser seleccionado por cultivo de células en la presencia de 5-bromodeoxiuridina y recoger las placas virales existentes en la misma.

Una ruta alternativa de administración involucra la terapia de gen o inmunización de ácido nucleico. Así, las secuencias de nucleótido (y los elementos regulatorios acompañantes) codifican las proteínas que ligan Fc del sujeto y pueden ser administradas a un sujeto en traslación in vivo del mismo. Alternativamente, la transferencia de genes puede ser llevada a cabo por medio de transfectar las células del sujeto o los tejidos ex vivo y reintroducirlos en material transformado dentro del huésped.

El DNA puede ser introducido directamente dentro del organismo huésped, por ejemplo, por inyección (ver la Publicación internacional No. WO/90/11092; y Wolf et al. (1990) [SCIENCE 247-.] 1465-1468). Liposoma- mediado por transferencia de gen también puede ser usando a cabo métodos conocidos. Ver por ejemplo, Hazinslci 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 de objetivo, tales como anticuerpos dirigidos  
contra los antígenos de superficie que expresados sobre  
los tipos de célula específicos, pueden ser conjugados  
covalentemente a la superficie liposomal de modo que el  
ácido nucleico puede ser suministrados a tejidos  
específicos y células susceptibles a la infección.

Los depósitos de sepas útiles en la práctica de la  
invención. Un depósito de cultivos puros biológicamente  
de los siguientes sepas fue hecha en el American Type  
Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas.  
El número de acceso indicado fue asignado después de los  
ensayos exitosos de viabilidad, y la tasa de requisito  
fue pagada, hecha bajo las condiciones del tratado de  
Budapest en el reconocimiento internacional del depósito  
de microorganismos para el propósito de procedimientos de  
patentes y regulaciones de la misma (tratado de Budapest)  
.Esto asegura el mantenimiento de cultivos viables  
durante un periodo de 30 años a partir de la fecha del  
depósito. Los organismos fueron hechos o están

disponibles por el ATCC bajo los términos del tratado de Budapest, lo que asegura la disponibilidad permanente y sin restricciones de la progenie de aun determinado por el comisionado de patentes y marcas de los Estados Unidos autorizado de acuerdo con la norma 35 U. S. C. No. 122 y las reglas del comisionado que la ejecutan (incluyendo 37 C. F. R. [No.1.] 12 con particular referencia a 886 OG 638). Luego de otorgares la patente, todas las restricciones sobre la disponibilidad del público del cultivo depositado serán removidas irrevocablemente.

Estos depósitos son provistos meramente como conveniencia para aquellos versados en la técnica, y no están en admisión de que un depósito sea requerido bajo la 35 U. S. C. No. 112. Las secuencias de ácidos nucleicos de estos genes, lo mismo que las secuencias de aminoácidos de las moléculas codificadas allí, son incorporadas aquí como referencia y son controladas en el evento de cualquier conflicto con la descripción hecha aquí.

El depósito de gen de plásmido bacterial de fecha ATCC No.

Sepa DH5a pAA505Mig [S. DISGALACTIAE] May 31,2000 PTA-1977 gen experimental mig. Más abajo se dan ejemplos de modalidades específicas para llevar a cabo la presente invención.

Los ejemplos son ofrecidos con propósitos ilustrativos solamente y no tienen el propósito de limitar el alcance de la presente invención de ninguna manera.

Los esfuerzos que han sido hechos para asegurar la precisión con respecto a los números usados (por ejemplo cantidades, temperatura, etcétera), pero algunos errores y desviaciones experimentales deben, por supuesto, ser permitidas a menos que se indique de otra manera, las partes o partes por peso, peso molecular es el peso molecular promedio de peso, la temperatura esta en grados centígrados y las presiones se dan o cerca de la atmosférica.

Los materiales y métodos de enzimas fueron comprados a partir de fuentes comerciales, y usados de acuerdo con las direcciones de los fabricantes.

En el aislamiento de fracciones del DNA, excepto donde se anote, todas las manipulaciones de DNA fueron hechas de acuerdo con procedimientos estándar. Ver, Sambrook et al., supra. Restricción enzymes, [T4 DNA]

ligasa, E. coli, polimerasa de DNA [I,] Klenow fragment, y otros reactivos biológicos que pueden ser comprados a partir de distribuidores comerciales y usados de acuerdo con las direcciones de los fabricantes. Los fragmentos de DNA de doble fila fueron separados con geles de agarosa

Ejemplo 1 Preparación, Amplificación, secuenciación de expresión, purificación y caracterización de la proteína de Mig receptora de Fc. Del S. DISGALACTIAE. Una preparación de el DNA del S. DVSGALACTIAE CROMOSOMAL A clínico [S.] dysgalactiae aislado de una mastitis de bovina (ATCC No. de acceso 43078) fue obtenido a partir del American Type Culture Collection (10801 University Boulevard, Manassas, VA [20110-2209),] y fue usado como una fuente de DNA. El organismo fue hecho crecer rutinariamente sobre placas de agar de sangre de oveja TSA (PML Microbiologicals, Mississauga, Ontario) a 37° C durante 18 horas en grupos in Todd-Hewitt broth (Oxoid Ltd., Hampshire, England) suplementados con extracto de levadura al 0,3% (Sigma, St. Louis, Missouri) [(THB-YE)] a 37° C, 5% [CL2.]

El DNA cromosomal fue preparado a partir del *S. dysgalactiae* crecido en 100 ml de THB-YE suplementado con 20 mM glicina durante aproximadamente 6 horas, hasta que un [AGOO] de [0,8] a 1,0 fue alcanzado. Las células fueron cosechadas y resuspendidas en 50 mM de EDTA, 50 mM de [TRIS-HCL,] al 0.5% TWEEN-20 (Sigma, St. Louis, MO) y suplementada con RNase A (200 mg/ml), proteinasa K (20 mg/ml), lysozima (100 [MG/ML]) y mutanolisina (100 mg/ml). (Sigma, St.

Louis, Missouri). Luego la lisis bacterial durante 30 minutos a 37 °C con agitación vigorosa, hidrocloreuro de guanidina and TWEEN-20, pH 5.5, fueron mezcladas con el lisado para dar una concentración final de 0.8 M and 5%, respectivamente. Esta mezcla fue incubada a [50° C] durante 30 minutos. El DNA cromosomal fue luego purificado usando Qiagen genomic-tip 100g [(QIAGEN,] Alemani) y precipitado usando 0.7 volúmenes de isopropanol. Las pepitas resultantes fueron lavadas en 70% etanol y re-suspendidas en 0.5 ml 10 mM [TRIS-HCL,] pH de 8.8.

B. Amplificación y Clonación del gen *S. [DVSGALACTIAE MIG]*. El gen Mig fue amplificado por PCR

(See Mullis et al., U. S. Patent No. 4, 683,195; Mullis, .  
 Patente estadounidense No. 4,683,202; usando un  
 imprimador delantero [MIGL] (SEQ ID NO: [1]), mostrado  
 en la tabla [1]) y el imprimador inverso miglr (SEQ ID  
 NO: 2, mostrado en la en Tabla 1). En las secuencias  
 ilustradas en la tabla 1, los subrayados denotan los  
 nucleótidos agregados a la secuencia original, y los  
 mantenidos indican la localización de restricción de  
 sitios de reconocimiento de endonucleasa . Tabla 1  
 tabulación de secuencias ID NO: NAME NUCLEOTIDO/AMINO  
 ACIDO SECUENCIA Primer rnigl 5'-G CGG CCA TGG TAG AAA ATA  
 CTA TAA CTG-3' 2 Primer rniglR 5'-ACG CCC GGG TTA GTC TTC  
 TTT ACG TTT-3' 3Streptococcus dysgalactiae strainsSDG8 fig  
 genre (ver Figure 1) 4Streptococcus dysgalactiae strain  
 SDG8 Mig proteina 5 Primer mig-3 5'-GTT GGC CTA GAT ATC  
 ACA GAA TTA CAA-3' 6 Primer mig-4 5'-AAA GCA CCC GGG CCA  
 GCC ATT ACT G-3' 7 Primer nzig-6 5'-AGG TGC TTC CCA TGG  
 AAC TGC CTG AAC T-3' 8 Primer mig-7 5'-GGC GAG AGT CTA  
 GAA ACT AAA GCG AAA AAC-3' 9 Primer mig-8 5'-GCA ATC ACC  
 AGG ATC CTC AGT AAC CAT TTC-3' 10 Primer inig-9 5'-CAG  
 GCA GTT CAT ATG GAA GCA CCT ACA GT-3' 11 Primer nzig-10  
 5'-TCC CGG AGT AGC ATT GTC AGT C-3' 12 Primer mig-11 5'-  
 GCA GCG GTC CAT ATG CCT GTT GGC CTA GAT-3' 13 Primer mig-  
 12 5'-GCC TGA ACT GGA TCC CTC AAC TGA TCT G-3' 14 Primer

Mg-7 3 5'-TTC CGT TGG ATC CTG CAA CTC CAA TTG-3' 15  
 Primer nag-14 5'-TAA GTC AAA AGC TTT GAC AAT TAG TCT T-3'  
 PCR fue llevado a cabo usando la polimerasa Vent DNA (New  
 England Biolabs, Mississauga, Ontario, Canada). 0.711g  
 del DNA genómico del *S. dysgalactiae*, [1, UM] cada uno de  
 los [MH&APOS;G7] (SEQ ID NO: 1) [77SIGL R (SEQ] ID NO:  
 2) ompromadores (ver abajo), 200 aM cada uno de los DATP,  
 dCTP, dGTP y [DTTP,] [3MM MGS04, 1X TERMOPOL] la carga  
 del PCR (New EnglandBiolabs), y 2 unidades polimerasa de  
 Vent DNA fueron combinadas. La mezcla de reacción fue  
 entonces incubada durante 3 ciclos y 1 minuto a 94°C, 3  
 minutos a 50°C, y un minuto, a 10 segundos a 72°C seguido  
 por 27 ciclos de 15 segundos a 95°C, a 30 segundos a 55°C  
 , 1 minuto a 72°C, seguido por un ciclo único de 5  
 minutos a 72°C.

El producto PCR de Mig obtenido anteriormente y el  
 vector de expresión pAA505 (VIDO, [SASKATOON,  
 Saskatchewan, Canada) fueron digeridos con enzimas de  
 restricción [NCOI AND] [SIIIAL] (Amersham Pharmacia,  
 Quebec, Canada) de acuerdo con las instrucciones del  
 fabricante y la secuencia de [MIG] fue ligada en los  
 mismos sitios del vector.

Esta construcción fue utilizada para transformar el DHI del E. coli (Life Technologies, Gaithersburg, MD). El DHI de E. coli transformado con células portadoras del vector pAA505-mig fueron designadas como [E.] coli DH5a [PAA505MIG.]

[C. SECUENCIA DE NUCLEOTIDE DEL GEN THE S. DVSGALACTIAE MIG] y la correspondiente secuencia de aminoácidos deducida . la secuencia de nucleotido en varias orientaciones del gen Mig fue determinado sobre un secuenciador automático de DNA ABI 373 (Applied [BIOSYSTEMS]) at the Plant Biotechnology Institute (PBI, Saskatoon, Saskatchewan, Canada) usando los imprimadores múltiples mostrados en al tabla 1.(Imprimadores [MIG-2] [a MIG-14].)

Las figuras 1ª a 1D ilustran las figuras de codificación del nucleotido y la secuencia de aminoácido, respectivamente para la proteína del Mig [S.] dysgalactiae (SEQ ID NO : 3 y SEQ ID NO : 4, respectivamente).

Estas secuencias fueron comparadas contra secuencias conocidas por medio del análisis BLAST

Los parámetros de búsqueda usados para analizar la secuencia de ácido nucleico fueron como sigue: .Base de datos:nt; número de cartas en la base de datos: 1,961,177,913; Números de secuencia en la base de datos: 614,801; Matrix: matrix blastn: [1-3] ; Penalties: Gap Existence : 5, [EXTENSION : 2.]. Los resultados obtenidos mostraron que el gen Mig SD8 de *S. dysgalactiae* ilustrado en las figuras [IA-ID] es homólogo a varias secuencias de nucleótidos conocida, por ejemplo, hay 98% de homología con el gen Mig para el *S. dysgalactiae* SC1 (Emb Accession No. Z29666.1 SDMIGSUP).

Los parámetros de búsqueda usados para analizar la secuencia de aminoácidos fueron como sigue; Base de datos: [NR; NUMBER] número de cartas en la base de datos: 157,988,256; número de secuencias en la base de datos: 503,479; Matrix: BLOSUM62; Penalties de Gap: Existencia: [11,] Extensión: 1. Los resultados obtenidos mostraron que la secuencia de aminoácido mig SD8 de *S. [DYSGALACTIAE]* ilustrada en las figuras 1A-1D es hasta 89% homóloga secuencias de aminoácidos conocidas.

D. Expresión y purificación de la proteína Mig de recombinante *S. [DYSGALACTIAE MIG]* El *E. coli* que contiene

la construcción preparada en el ejemplo 1Bm supra, fue hecha crecer en brooth LB que contiene 100  $\mu$ g/ml de ampicilina un Ago de aproximadamente 0,5 l. La expresión de la proteína Mig fue entonces inducida por la adición de un mM ISOPROPYL- $\beta$ , D-tiogalactosid (IPTG) (Sigma, St. Louis, MO). Seguido de 3 horas de incubación a 37°C, las células fueron cosechadas lavadas en una carga de columna (50mm) de fosfato de sodio, pH 8.0, 0.2 M [NaCl] y lisado por sonificación.

Aproximadamente 40% de la proteína recombinante estaba en la fracción soluble de la célula sonicada con una producción de aproximadamente 50 mg de la proteína recombinante por litro de cultivo en volumen, según se determino usando el kit de ensayo de proteínas DC Assay (BioRad Laboratories, Mississauga, Ontario, Canada) con albúmina de suero de bovino [ROCKFORD,] Illinois) como un estándar.

La proteína Mig recombinante fue purificada por cromatografía de afinidad usando una matrix de agarosa-IgG, con base en la habilidad de las proteínas para ligar la porción Fc de la molécula IgG. El lisado de las células fue clarificado por centrifugación y la fracción

192

soluble fue aplicada a una columna de [BLIGG] de agarosa (Sigma, St. Louis, Missouri). La columna fue lavada con 10 volúmenes de carga de columna (50 mM de fosfato de sodio pH 8.0, 0.3 M [NaCl], y la proteína fue eluida con una carga de columna más 0.1 M de glicina, pH 2.5, con una producción de fracciones de proteína no homogéneas con una concentración de Mig de aproximadamente de 10-15 mg/ml. El eluido fue dializado contra 2,000 volúmenes de [PBSA] y almacenado a -20 °C.

E. Caracterización del análisis de proteína recombinante de la proteína purificada SDS-PAGE demostrando 60% de pureza.

#### EJEMPLO 2

Inmunización con Mis e infección experimental de vacunas en ganado fueron formuladas para contener 50 mg/ml de afinidad purificada del Mig recombinante o del GapC en el adyuvante con base en aceite VSA3 (VIDO, [SASKATOON, SASKATCHEWAN,] Canadá). El VSA3 es una combinación del emulsigen [EMULSIGEN PLUSTM] (MVP Laboratories, Ralston, Nebraska) y bromuro de amonio Dimetildioctadecil [(KODAK,] Rochester, New York)..

24 Holsteins no lactantes con ninguna historia de infección por [S. DISGALACTIAE] fueron obtenidas a partir de varias fincas en Saskatchewan, Canadá. Una semana antes de la vacunación, todos los animales fueron tratados con [CEFA-DRYTM] (300 mg por cuarta parte de ubre; Ayerst Laboratories, Montreal, Canadá), para poder clarificar infección de las ubres antes de la etapa de vacunación.

Tres grupos de los ocho animales fueron inmunizados subcutáneamente con dos dosis de vacunas que contenían el Mig GapC (una proteína que liga el plásmido aislado de la bacteria de Streptococcus que fue evaluada simultáneamente), o un placebo con un intervalo de seis semanas entre las inmunizaciones. Dos semanas después de la segunda inmunización, los animales fueron expuestos a 650 unidades formadoras de colonias del S. disgalactiae suministrado en tres cuartos con cánula de infusión de ubre. El cuarto cuarto de cada animal sirvió como un control de no infección.

Todos los animales fueron examinados diariamente para signos clínicos de enfermedad y muestras de todos

los cuartos de ubre fueron recolectadas cada día. Las muestras fueron observadas en cuanto a consistencia y conteo de células somáticas lo mismo que los números bacteriales fueron determinados.

### EJEMPLO 3

Colonización Bacterial. Las bacterias fueron enumeradas por distribución de diluciones seriales [(10° a 10-3)] directamente sobre placas de agar de sangre de oveja TSA seguido durante incubación conturna a 37° C, 5% de CO<sub>2</sub>. La colonización fue definida como mayor de 500 [CFU/ML] del organismo retado recuperado.

Para confirmar que la bacteria recuperada de las secreciones se leche eran *S. dyigalactiae*, las colonias seleccionadas recuperadas de cada animal fueron ensayadas usando un ensayo de API strep-20 [(BIOMERIEUX] SA, Hazelwood, Missouri) de acuerdo con las intrusiones del fabricante. Este ensayo es un método estandarizado que combina 20 ensayos bioquímicos para actividad enzimática y fermentación de azúcar, los resultados de los cuales llevan a un perfil analítico. El perfil permite la identificación de la especie streptococcal particular

195  
195

presente sea haciendo referencia al índice de perfil analítico o usando un software de identificación.

Luego del reto con *S. disgalactiae*, los animales de todos los grupos se hizo que fueran colonizados por *S. disgalactiae* (Figura 4). Los animales inmunizados con Mig mostraron una reducción en el número de cuartos infectados en los días 3 y 4 luego del reto.

#### EJEMPLO 4

Medida de respuesta inflamatoria. La respuesta inflamatoria fue medida como una función del conteo de células somáticas (por ejemplo, linfocitos, neutrofilos, y monocitos). Los conteos de células somáticas fueron medidos en un contador Coulter usando técnicas estándar, según se recomienda por la Agriculture and Agri-Food Canada Pamphlet [IDF50B] (1985) [MILK AND MILKPRODUCTS--METHODS OF SANITIZING.] Las muestras fueron siempre leídas dentro de 48 horas después de la recolección y fijación.

El número de células somáticas presentes en la glándula fue determinada en los días 1 a 7 luego del reto. Los números de los cuartos no retados permanecieron

constantes durante todo el ensayo mientras que en el día 1, el grupo inmunizado con Mig fue menor que el grupo inmunizado con placebo (figura 5) los datos individuales de cada uno del día uno se muestran en la figura 6.

Así, la clonación, expresión y caracterización de la proteína Mig del *S. disgalactiae* son descritas, como son los métodos de usar la misma.

Aunque las modalidades preferidas de la invención objeto han sido descritas con algún detalle, se debe entender que diversas variaciones pueden ser hechas sin salirse del espíritu y alcance de la invención como se define en las reivindicaciones adjuntas.

### REIVINDICACIONES

1. Una composición de vacuna que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable y una proteína receptora de Fc.
2. La composición de vacuna de la reivindicación 1, en donde dicha proteína receptora de Fc es seleccionada a partir del grupo que consiste de:  
(a) una proteína de Mig del *Streptococcus disgalactiae* que comprende la secuencia de aminoácido mostrada en las posiciones de aminoácido 1 a 669, inclusive, de las figuras 1A-1D (SEC ID No.: 4); (b) una proteína receptora de Fc que tiene por lo menos cerca de 70% de identidad de secuencia a (a) ; y (c) fragmentos inmunogénicos de (a) y (b), dichos fragmentos comprenden por lo menos 5 aminoácidos.
3. La composición de vacuna de la reivindicación 2, en donde la proteína Mig comprende la secuencia de aminoácido de la proteína Mig del

*Streptococcus disgalactiae* ilustrada en las posiciones de aminoácido 1 a 669, inclusive, de las figuras 1A-1D (SEC ID No.: 4) o un fragmento inmunogénico de la misma, dichos fragmentos comprenden por lo menos cerca de 5 aminoácido.

4. La composición de vacuna de la reivindicación 3, en donde la proteína Mig comprende la secuencia de aminoácido de la proteína Mig de *Streptococcus disgalactiae* ilustrada en las posiciones de aminoácidos 1 a 669, inclusive, de las figuras 1A-1D (SEC ID No.:4).
5. La composición de vacuna de la reivindicación 1, que comprende adicionalmente un adyuvante.
6. Un método para producir una composición de vacuna que comprende las etapas de (a) que suministra una proteína receptora de Fc o un fragmento inmunogénico de la misma, dicho fragmento comprende por lo menos cerca de 5 aminoácidos, y (b) combinar dicha proteína con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

7. El uso de una proteína receptora de Fc para la fabricación de una composición de vacuna útil para el tratamiento o prevención de la infección bacterial en un sujeto vertebrado.
8. El uso de acuerdo con la reivindicación 7, en donde la proteína receptora de Fc seleccionada a partir del grupo que consiste de: (a) una proteína Mig de *Streptococcus disgalactiae* que comprende las secuencias de aminoácido mostradas en las posiciones de aminoácido 1 a 669, inclusive, de las figuras 1A-1D (SEC ID No.:4); (b) una proteína receptora de Fc que tiene por lo menos cerca de 70% de identidad de secuencia con (a); y (c) fragmentos inmunogénicos de (a) y (b), dichos fragmentos comprenden por lo menos cerca de 5 aminoácidos.
9. El uso de acuerdo con la reivindicación 8, en donde dicha proteína Mig comprende la secuencia de aminoácidos de la proteína Mig del *Streptococcus disgalactiae* ilustrada en las posiciones de aminoácido 1 a 669, inclusive de las figuras 1A-1D (SEC ID No.: 4) o un fragmento

inmunogénico del mismo, dicho fragmento comprende por lo menos 5 aminoácidos.

10. El uso de acuerdo con la reivindicación 9, en donde dicha proteína Mig comprende la secuencia de la proteína Mig del *Streptococcus disgalactiae* ilustrada en las posiciones de aminoácidos 1 a 669, inclusive, de las figuras 1A-1D (SEC ID No.:4).

11. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10, en donde dicha infección bacteriana es una infección Streptococcal.

12. El uso acuerdo con la reivindicación 11, en donde dicha infección bacteriana causa mastitis.

13. El uso de un polinucleótido que comprende una secuencia de codificación para una proteína receptora de Fc en la fabricación de un medicamento útil para el tratamiento o prevención de una infección bacteriana en un sujeto vertebrado.

14. El uso de acuerdo con la reivindicación 13, en donde la proteína receptora de Fc se selecciona a partir del grupo que consiste de: (a) una proteína del *Streptococcus disgalactiae* Mig que comprende las secuencias de aminoácido mostradas en las posiciones de aminoácido 1 a 669, inclusive, de las figuras 1A-1D (SEC ID No.:4); (b) una proteína receptora de Fc que tiene por lo menos 70% de identidad de secuencia con (a) y (c) fragmentos inmunogénicos de (a) y (b), dichos fragmentos comprenden por lo menos 5 aminoácidos.

15. El uso de acuerdo con la reivindicación 14 en donde la proteína Mig comprende la secuencia de aminoácidos de la proteína Mig del *Streptococcus disgalactiae* ilustrada en las posiciones de aminoácido 1 a 669, inclusive de las figuras 1A-1D (SEC ID No.:4) o un fragmento inmunogénico de la misma, dicho fragmento comprende por lo menos 5 aminoácidos.

16. El uso de acuerdo con la reivindicación 15, en donde la proteína Mig comprende la secuencia de aminoácido de la proteína Mig del *Streptococcus disgalactiae* ilustrada en las posiciones de aminoácido 1 a 669, inclusive, de las figuras 1A-1D (SEC ID No.:4).
17. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 13-16, en donde dicha infección bacterial es una infección Streptococcal.
18. El uso de acuerdo con la reivindicación 17, en donde dicha infección bacterial causa mastitis.
19. Un método para tratar o prevenir una infección bacterial 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 1 a 5.
20. El método de la reivindicación 19 en donde dicha infección bacterial es una infección Streptococcal.

21. El método de la reivindicación 20 en donde dicha infección bacteriana causa mastitis.
22. Un método para tratar o prevenir una infección bacteriana en un sujeto vertebrado que comprende administrar a dicho sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de un polinucleótido, dicho polinucleótido comprende una secuencia de codificación para una proteína receptora de Fc.
23. El método de la reivindicación 22, en donde la proteína receptora de Fc se selecciona a partir del grupo que consiste de: (a) una proteína Mig de *Streptococcus dysgalactiae* que comprende la secuencia de aminoácido mostrada en las posiciones de aminoácido 1 a 669, inclusive, de las figuras 1A-1D (SEC ID No.:4); (b) una proteína receptora de Fc que tiene por lo menos cerca de 70% de identidad de secuencia con (a); y (c) fragmentos inmunogénicos de (a) y (b), dichos fragmentos comprenden por lo menos cinco aminoácidos.

24. El método de la reivindicación 23, en donde dicha proteína de Mig comprende la secuencia de aminoácidos de la proteína Mig de *Streptococcus disgalactiae* ilustrada en las posiciones de aminoácido 1 a 669, inclusive de las figuras 1A-1D (SEC ID No.:4) o un fragmento inmunogénico del mismo, dicho fragmento comprende por lo menos cerca de 5 aminoácidos.

25. El método de la reivindicación 24 en donde dicha proteína Mig comprende las secuencias de aminoácido de la proteína Mig del *Streptococcus disgalactiae* ilustrada en las posiciones de aminoácido 1 a 669, inclusive, de las figuras 1A-1D (SEC ID No.:4).

26. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 22 a 25 en donde dicha infección bacterial es una infección Streptococcal.

27. El método de la reivindicación 26, en donde dicha infección bacterial causa mastitis,