



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 287 145**

51 Int. Cl.:

C12N 1/00 (2006.01)

C12R 1/90 (2006.01)

C12Q 1/04 (2006.01)

A61K 39/002 (2006.01)

C12N 1/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **01955123 .3**

86 Fecha de presentación : **27.07.2001**

87 Número de publicación de la solicitud: **1307537**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **07.05.2003**

54

Título: **Aislado de *Neospora caninum*.**

30

Prioridad: **28.07.2000 AU PQ9056**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.12.2007

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.12.2007

73

Titular/es: **University of Technology, Sydney
1 Broadway
Broadway, New South Wales 2007, AU**

72

Inventor/es: **Ellis, John, Timothy;
Miller, Catherine, Margaret, Douglas y
Quinn, Helen, Elizabeth**

74

Agente: **Torner Lasalle, Elisabet**

ES 2 287 145 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Aislado de *Neospora caninum*.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a un aislado de protozoo parásito atenuado novedoso y a un anticuerpo monoclonal que se une específicamente al aislado. La cepa es útil en el desarrollo de ensayos de diagnóstico para la detección de parásitos en animales. La presente invención también se refiere a una composición de vacuna que comprende un
10 aislado de protozoo parásito atenuado de la invención. La invención se refiere además a un método para diagnosticar una infección parásita que comprende detectar la presencia de un aislado de la invención. La invención también se refiere al uso del aislado de protozoo parásito de la invención en la preparación de una composición de vacuna para el tratamiento de prevención de la infección o enfermedad en un animal.

15 Finalmente, la invención se refiere al uso de un anticuerpo de la invención en la preparación de un medicamento para el tratamiento de la infección o enfermedad en un animal y en los métodos de diagnóstico de la invención.

Antecedentes de la invención

20 Apicomplexa es un filum diverso de protozoos que contiene algunos de los microorganismos más patogénicos conocidos por el hombre. Los elementos representativos incluyen taxones de los géneros bien conocidos tales como *Plasmodium*, *Babesia* y *Toxoplasma*. En 1984, un grupo de investigación de Noruega informó de un protozoo formador de quistes desconocido previamente que producía encefalitis y miositis en perros (Bjerkas *et al.* 1984). Estos signos clínicos eran consecuentes con los producidos por *Toxoplasma gondii*, un miembro ampliamente distribuido
25 de Apicomplexa. Sin embargo, a diferencia de *T. gondii*, el microorganismo no era patógeno para ratones no consanguíneos, ni estaban presentes anticuerpos específicos frente a *T. gondii* en los sueros de los perros estudiados. Esto dio lugar a investigación adicional que demostró de manera concluyente que el microorganismo era ultraestructural y antigénicamente distinto de *T. gondii* (Dubey *et al.* 1988). Por tanto, se describió *Neospora caninum* como un nuevo miembro de la familia Sarcocystidae. Poco después, se implicó a *N. caninum* como una causa de aborto en el ganado
30 (Thilstead & Dubey, 1989).

Se ha obtenido ahora un número creciente de aislados de *N. caninum*, usando tecnologías que implican predominantemente la inoculación directa de tejidos infectados en células de cultivo tisular (Dubey *et al.* 1988, Conrad *et al.* 1993), aunque se ha comprobado que los aislados bovinos son difíciles de obtener. La razón principal de esto han sido
35 los efectos perjudiciales de la autólisis sobre la viabilidad de *N. caninum* en tejidos fetales bovinos abortados. Por tanto, se prefiere el aislamiento de una población de parásitos a partir de un animal vivo.

Estudios recientes sobre las propiedades biológicas de aislados bovinos y caninos han sugerido que pertenecen a una única especie llamada *N. caninum* (Holmdahl *et al.* 1997), a pesar del hecho de que existen amplias diferencias
40 entre los aislados en sus propiedades biológicas. Estas incluyen diferencias en antigenicidad, ultraestructura, patogenicidad y heterogeneidad genética (Conrad *et al.* 1993, Marsh *et al.* 1995, Lindsay *et al.* 1995 y Atkinson *et al.* 1999).

Por tanto, no todos los aislados de *N. caninum* pueden poseer las mismas propiedades, y de hecho al menos un aislado de *N. caninum* se identificó de manera errónea como *Hammondia heydorni* previamente (Schaes *et al.* 2001). De hecho, otros autores han especulado sobre si *N. caninum* y *H. heydorni* son la misma especie o diferentes (Mehlhorn y Heydorn, 2000). *Hammondia heydorni* es también un coccidio formador de quistes que tiene un ciclo de vida que es muy similar al de *N. caninum*. Por tanto, la verdadera identidad de la especie *N. caninum* se está debatiendo
45 actualmente, y su relación con *H. heydorni* no está clara.

En el ganado, el aborto debido a infecciones por *N. caninum* se produce normalmente a la mitad o al final de la gestación, aunque no todos los fetos infectados abortaron. Muchos terneros infectados congénitamente nacen sanos e infectados de manera persistente, aunque algunos terneros infectados están enfermos en el nacimiento y mueren en el periodo neonatal con lesiones similares a las de los terneros abortados.
50

El desarrollo y uso de pruebas serológicas para el diagnóstico de la neosporosis en el ganado, junto con la identificación de animales infectados o expuestos a *N. caninum*, se ha estudiado previamente en gran detalle (Bjorkman *et al.* 1999; Atkinson *et al.* 2000a). Sin embargo, de manera significativa, no existe una vacuna eficaz contra la transmisión transplacentaria o pérdida fetal que se produce como resultado de la neosporosis y los intentos de formular una vacuna han encontrado un éxito limitado.
55

Liddel *et al.* (1999) inyectaron a ratones BALB/c hembras una preparación de lisado de taquizoíto de *N. caninum* en bruto coadministrada con el adyuvante ImmuMAXSR™. Estos ratones se aparearon posteriormente, y las hembras preñadas se expusieron a taquizoítos de *N. caninum* a los 10-12 días de gestación. Los resultados mostraron que una inyección única ofrecía protección completa contra la transmisión transplacentaria del parásito a las crías. Todas las crías en este grupo experimental estaban libres de la infección parásita. No se han notificado todavía resultados de la eficacia de esta formulación de vacuna en ganado bovino.
60

Baszler *et al.* (2000) examinaron la posibilidad de la vacunación de ratones BALB/c con antígeno de *N. caninum* soluble formulado en, o bien vesículas de tensioactivo no iónico o bien en adyuvante completo de Freund. Este enfoque dio como resultado el agravamiento de la encefalitis y la enfermedad neurológica en estos ratones. Estas observaciones se caracterizaban por el aumento de secreción de IL-4 específica de antígeno y el aumento de las proporciones de IgG1:IgG2 *in vivo*.

Adrianarivo *et al.* (1999) sometieron a prueba cuatro adyuvantes diferentes con una preparación de taquizoíto de *N. caninum* completo inactivado para determinar la inmunogenicidad. Los resultados indicaron que las respuestas inmunitarias, tal como se determinaron mediante los títulos IFAT, eran significativamente superiores en ganado infectado experimentalmente comparado con ganado inmunizado.

Adrianarivo *et al.* (2000) estudiaron el efecto de una preparación de taquizoíto de *N. caninum* inactivado en ganado preñado usando un adyuvante POLYGEN™. Se inyectaron novillos en el día 36 y en el día 65 de la gestación y se expusieron cuatro semanas más tarde a inyección intravenosa o intramuscular de taquizoítos. Tras la inmunización, los novillos desarrollaron tanto respuestas inmunitarias humorales como mediadas por células caracterizadas por un aumento en la producción de IgG1 e IFN- γ respectivamente. Sin embargo, tras una exposición con taquizoítos de *N. caninum*, no se produjo una respuesta inmunitaria mediada por células significativa. Todos los fetos del estudio, tanto de ganado control como experimental, desarrollaron lesiones características de la infección por *N. caninum*. Se concluyó que esta formulación falló en la prevención de la infección fetal en ganado preñado.

A diferencia del desarrollo de vacunas contra parásitos con microorganismo inactivado o modificadas genéticamente, están disponibles vacunas basadas en poblaciones vivas de parásitos, por ejemplo contra el aborto inducido por *Toxoplasma* en ovejas (Buxton & Innes, 1995) y parásitos *Eimeria* de las aves de corral (Shirley & Bedrnik, 1997). Sin embargo, no está disponible una vacuna viva contra *N. caninum*.

La bibliografía sobre vacunas vivas contra *N. caninum* es limitada. Atkinson *et al.* (1999) mostraron que la infección de ratones sin tratar por el aislado Nc-SweB1 de *N. caninum* los protegía parcialmente contra una infección grave por Nc-Liverpool. Lindsay *et al.* (1999) generaron mutantes sensibles a la temperatura de *N. caninum* y demostraron que podrían prevenir los signos clínicos asociados con la neosporosis en ratones.

R. Atkinson *et al.*: "Comparison of the biological characteristics of two isolates of *Neospora caninum*". Parasitology, Apr. 1999, volumen 118 (pt4), páginas 363-370 compara las propiedades genéticas y biológicas de un aislado bovino (NC-SweB1) y uno canino (NC-Liverpool) de *Neospora caninum*. Ninguno de los dos aislados está atenuado de manera natural; la infección con NC-Liverpool da como resultado que los animales se vean comprometidos rápidamente con respecto al peso mientras que la infección con NC-SweB1 produce lesiones cerebrales. Los aislados NCSweB1 y NC-Liverpool tienen ambas secuencias ITS-1 que son diferentes de la del aislado de la presente invención.

Schares, G. *et al.*: "*Neospora caninum*: Identification of 19-, 38-, and 40-kDa surface antigens and a 33-kDa dense granule antigen using monoclonal antibodies" describe el desarrollo de anticuerpos monoclonales obtenidos tras la inmunización de ratones con taquizoítos recién aislados de la cepa NC-1 de *N. caninum*. Los anticuerpos son específicos para *N. caninum* ya que no reaccionan con la cepa RH de *T. gondii*. El documento describe que no se sometió a prueba la reactividad de los anticuerpos frente a otros aislados de *N. caninum*.

En Baszler, T. V. *et al.*: "Detection of PCR of *Neospora caninum* in fetal tissues from spontaneous bovine abortions" Journal of Clinical Microbiology, 1999, volumen 37, N° 12, el autor examina la utilidad de la PCR en la detección de la infección por *N. caninum* en tejidos fetales de abortos bovinos espontáneos.

En Schares, G. *et al.*: "Bovine neosporosis: comparison of serological methods using outbreak sera from a dairy herd in New Zealand", International Journal for Parasitology, 1999, volumen 29, N° 10, páginas 1659-1667, los autores usan pruebas serológicas, incluyendo ELISA, IFAT e inmunotransferencias para identificar individuos seropositivos en un rebaño lechero.

El documento WO 99/20303 A describe vacunas que contienen *N. caninum* vivo e inactivado. No existe en el documento una descripción de una cepa de *N. caninum* atenuada de manera natural.

Adicionalmente, se han descrito métodos de diagnóstico para la detección de *N. caninum* en: Atkinson, R. *et al.* "Progress in the serodiagnosis of *Neospora caninum* infections of cattle", Parasitology Today, volumen 16, N° 3, 2000, páginas 110-114, Bjorkman, C. & Uggl, A. "Serological diagnosis of *neospora caninum* infection", International Journal for Parasitology, volumen 29, 1999, páginas 1497-1507, y en Ellis, J. T. *et al.* "Development of a single tube nested polymerase chain reaction assay for the detection of *neospora caninum* DNA", International Journal for Parasitology, volumen 29, 1999, páginas 1589-1596.

Sumario de la invención

Los presentes inventores han aislado un parásito de protozoo novedoso a partir del sistema nervioso central de un ternero lechero. El parásito se identificó basándose en varios criterios como un aislado de *Neospora caninum* y se denominó cepa "Nc-Nowra". Este aislado está atenuado de manera natural en su capacidad para provocar neosporosis en un animal de laboratorio, y por tanto es un aislado ideal para servir como base para una vacuna contra esta enfermedad.

ES 2 287 145 T3

Se depositó una muestra del aislado Nc-Nowra según las disposiciones del tratado de Budapest de 21 de junio de 2001 con los Australian Government Analytical Laboratories (Laboratorios analíticos del gobierno australiano) (AGAL) y un número de registro de AGAL acordado NM01/22338. Además, se depositó una muestra de células Vero según las disposiciones del tratado de Budapest de 21 de junio de 2001 con los Australian Government Analytical Laboratories (AGAL) y un número de registro de AGAL acordado NM01/22339.

Por consiguiente, en un primer aspecto, la presente invención proporciona un aislado de protozoo parásito atenuado de manera natural, en el que

- a) dicho aislado es el aislado depositado como el número de registro de AGAL NM01/22338, o un aislado que tiene el perfil antigénico del aislado depositado como el número de registro de AGAL NM01/22338 tal como se detecta mediante inmunotransferencia de tipo Western usando sueros obtenidos de ratones infectados de manera aguda (con una única dosis) con *Neospora caninum* Liverpool, y una secuencia ITS-1 que es similar en el 99% a la secuencia ITS-1 de *N. caninum* depositada con el número de registro de NCBI Genbank AF029702 o AF 038860, y
- b) dicho aislado se une específicamente mediante un anticuerpo monoclonal producido frente al aislado depositado como el número de registro de AGAL NM01/22338.

En una realización preferida del primer aspecto, el aislado es el depositado como número de registro de AGAL NM01/22338.

En un segundo aspecto, la presente invención proporciona un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a un aislado según el primer aspecto.

En un tercer aspecto, la presente invención proporciona una célula huésped aislada o un cultivo celular infectado con un aislado del primer aspecto. Preferiblemente, la célula huésped deriva de la muestra depositada como número de registro de AGAL NM01/22339.

En un cuarto aspecto, la invención proporciona una composición de vacuna que comprende un aislado del primer aspecto. Preferiblemente, el aislado está en forma de un parásito inactivado.

La presente invención también proporciona una composición de vacuna que comprende un extracto de un aislado según el primer aspecto. Preferiblemente, el extracto se selecciona del grupo que consiste en un lisado celular, un polipéptido antigénico y un polinucleótido que codifica para un polipéptido antigénico.

En un quinto aspecto, la presente invención proporciona el uso de un aislado de protozoo parásito según la invención en la preparación de una composición de vacuna para el tratamiento o prevención de la infección o enfermedad en un animal.

En un sexto aspecto, la presente invención proporciona el uso de un anticuerpo monoclonal según la invención para la preparación de un medicamento para el tratamiento o prevención de la infección o enfermedad en un animal.

En un séptimo aspecto, la presente invención proporciona un método para diagnosticar una infección o enfermedad producidas por parásitos en un animal, comprendiendo el método identificar la presencia del aislado según el primer aspecto de la invención en una muestra clínica del animal.

En una realización preferida del quinto, sexto o séptimo aspectos, la infección o enfermedad está producida por la presencia de *Neospora* en el animal.

Breve descripción de las figuras

Figura 1. Gráfico de dispersión que muestra lecturas de ELISA de sueros frente a *N. caninum* para vacas individuales del rebaño de estudio.

Figura 2. Diagrama de barras que muestra las respuestas de IgG (como absorbancias de ELISA) frente al antígeno de *N. caninum* en ratones infectados con o sin Nc-Nowra antes de la gestación. Se indican los grupos a los que se les administró Nc-Liverpool en el día 8 de la gestación. Sólo los ratones que recibieron Nc-Nowra antes de la gestación dieron altos títulos de IgG.

Descripción detallada de la invención

El aislado parásito de la presente invención puede usarse para desarrollar herramientas de diagnóstico o ayudas para la detección o diagnóstico de enfermedades parásitas en animales. Tales herramientas o ayudas de diagnóstico incluyen polipéptidos antigénicos derivados del aislado, anticuerpos producidos frente al aislado y sondas o cebadores moleculares derivados del genoma del aislado.

Pueden usarse técnicas de purificación de proteínas convencionales para aislar polipéptidos antigénicos de la cepa parásita novedosa de la presente invención. Tales técnicas incluyen precipitación selectiva con sustancias tales como sulfato de amonio, cromatografía en columna, métodos de inmunopurificación, y similares. Véase, por ejemplo, R. Scopes, *Protein Purification: Principles and Practice*, Springer-Verlag: Nueva York (1982). Pueden secuenciarse proteínas y secuencias de las mismas aisladas de la cepa según técnicas convencionales tal como se describe por ejemplo en Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbour Publish., Cold Spring Harbour, NY 2ª Ed (1989).

Según la invención, los anticuerpos producidos frente a la cepa son anticuerpos monoclonales, que se unen específicamente al aislado de *Neospora* de la invención.

El experto en la técnica puede obtener anticuerpos monoclonales mediante diversas técnicas. En resumen, se immortalizan células del bazo en un animal inmunizado con un inmunógeno deseado, comúnmente mediante fusión con células de mieloma (véase, Koller y Milstein, *Eur. J. Immunol.* 6:511-519 (1976)). Los métodos alternativos de immortalización incluyen la transformación con virus de Epstein Barr, oncogenes o retrovirus, u otros métodos bien conocidos en la técnica. Se examinan las colonias que surgen de las células immortalizadas individuales para detectar la producción de anticuerpos de la especificidad y afinidad deseadas para el antígeno deseado.

Los anticuerpos monoclonales, que se dirigen frente a epítopos, son particularmente útiles en diagnóstico, y los que son neutralizantes son útiles en inmunoterapia pasiva. Los anticuerpos monoclonales, en particular, pueden usarse para producir anticuerpos anti-idiotipo. Los anticuerpos anti-idiotipo son inmunoglobulinas que portan una "imagen interna" del antígeno del agente frente al que se desea protección.

Las técnicas para producir anticuerpos anti-idiotipo se conocen en la técnica. Estos anticuerpos anti-idiotipo también pueden ser útiles en el tratamiento.

Para los fines de esta invención, el término "anticuerpo", a menos que se especifique lo contrario, incluye fragmentos de anticuerpos completos que conservan su actividad de unión para un antígeno diana. Tales fragmentos incluyen fragmentos Fv, F(ab') y F(ab')₂, así como anticuerpos de cadena sencilla (scFv).

En una realización, los anticuerpos de la presente invención se unen específicamente al aislado de *Neospora* de la presente invención.

Los anticuerpos de la invención pueden unirse a un soporte sólido y/o envasarse en kits en un recipiente adecuado junto con reactivos, controles e instrucciones adecuados y similares.

Pueden generarse sondas o cebadores moleculares para detectar el aislado de la presente invención por medios sintéticos o recombinantes. Preferiblemente, el polinucleótido tiene al menos 16 nucleótidos de longitud, más preferiblemente al menos 20, 25, 30 ó 40 nucleótidos de longitud. El polinucleótido puede usarse para producir un cebador, por ejemplo un cebador de PCR, un cebador para una reacción de amplificación alternativa, o una sonda, por ejemplo, conjugada por medios convencionales con un marcador radiactivo o no radiactivo.

Puede lograrse el diagnóstico detectando la presencia del parásito o sometiendo a ensayo para detectar anticuerpos frente al parásito en el animal. Dado que ahora existe preocupación de que los humanos sean propensos a este tipo de infecciones parásitas, la presente invención incluye aplicaciones humanas.

El parásito puede detectarse cultivando el parásito a partir de una muestra clínica e identificando el parásito por microscopía, o puede identificarse mediante el uso de anticuerpos frente al parásito o detectando una parte del genoma del parásito mediante técnicas de biología molecular. La muestra clínica puede ser una biopsia, muestra de deposiciones, muestra de sangre, tejido fetal o similares. Se apreciará que el descubrimiento del parásito y su asociación con enfermedades parásitas permitirán su detección mediante cualquiera de los métodos conocidos de la técnica. También se apreciará que pueden usarse también métodos de detección molecular como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para identificar la presencia del parásito en una muestra clínica.

Se describen procedimientos inmunológicos y de inmunoensayo en general en *Basic And Clinical Immunology* 7ª Ed. (D. Stites and A. Terr ed.) 1991. Según la presente invención, los inmunoensayos pueden realizarse en cualquiera de varias configuraciones, que se tratan de manera amplia en *Enzyme Immunoassay*, E. T. Maggio, ed., CRC Press, Boca Raton, Fla. (1980); "Practice and Theory of Enzyme Immunoassays," P. Tijssen, *Laboratory Techniques In Biochemistry And Molecular Biology*, Elsevier Science Publishers B. V. Amsterdam (1985). Por ejemplo, una persona experta en la técnica entendería que las proteínas y anticuerpos según la presente invención pueden usarse en ELISA, análisis de inmunotransferencia y ensayos de aglutinación.

En resumen, los inmunoensayos para medir anticuerpos o antígenos son ensayos de unión o bien competitiva o bien no competitiva. En los ensayos de unión competitiva, el analito de muestra (por ejemplo, anticuerpos anti-*N. caninum*) compete con un analito marcado (por ejemplo, anticuerpo monoclonal anti-*N. caninum*) por sitios de unión específica sobre un agente de captura (por ejemplo, proteína de *N. caninum* aislada) unido a una superficie sólida. La concentración de analito marcado unido al agente de captura es inversamente proporcional a la cantidad de analito libre presente en la muestra.

ES 2 287 145 T3

Los ensayos no competitivos son normalmente ensayos de intercalación, en los que el analito de muestra se une entre dos reactivos de unión específicos del analito. Uno de los agentes de unión se usa como un agente de captura y se une a una superficie sólida. El segundo agente de unión está marcado y se usa para medir o detectar el complejo resultante por medios visuales o instrumentales.

Alternativamente, el inmunoensayo se lleva a cabo en fase líquida y se emplean una variedad de métodos de separación para separar el componente marcado unido de los componentes marcados no unidos. Estos métodos los conocen los expertos en la técnica e incluyen, pero no se limitan a, inmunoprecipitación, cromatografía en columna, adsorción, adición de partículas magnéticas recubiertas con un agente de unión y otros procedimientos similares.

En otro procedimiento alternativo, se lleva a cabo un inmunoensayo en fase líquida sin un procedimiento de separación. Normalmente, en estos procedimientos, la proteína sometida a ensayo u otro analito compete con un compuesto por su unión a un anticuerpo unido a un marcador. La unión del analito a un anticuerpo, pero no la unión del compuesto al anticuerpo, produce un cambio en la señal emitida por el marcador, de manera que se mide la unión sin separar el componente marcado unido del no unido.

También se usa el análisis de inmunotransferencia de tipo Western para detectar la presencia de anticuerpos frente al aislado parásito en una muestra biológica. Esta técnica es un método fiable para confirmar la presencia de anticuerpos frente a una proteína particular en la muestra.

Las composiciones de vacuna preparadas usando extractos del aislado de la presente invención pueden usarse para el tratamiento y/o prevención de infecciones parásitas, preferiblemente infecciones por *N. caninum*.

Preferiblemente, el extracto se selecciona del grupo que consiste en parásitos atenuados vivos, parásitos inactivados y fijados, lisados celulares, polipéptidos antigénicos y polinucleóticos que codifican para polipéptidos antigénicos.

Las vacunas de la invención pueden comprender un extracto en bruto del aislado parásito novedoso. También pueden usarse parásitos o células inactivadas y/o fijadas químicamente. Las vacunas también pueden comprender preparaciones polipeptídicas parcial o completamente purificadas derivadas del aislado parásito. El polipéptido puede ser un antígeno producido mediante tecnología de ADN recombinante.

Además, las secuencias polinucleotídicas derivadas del aislado parásito novedoso pueden clonarse en virus que transfectan células huésped en animales. Los virus atenuados vivos, tales como vaccinia o adenovirus, son alternativas convenientes a las vacunas debido a que son baratos de producir y se transportan y administran fácilmente. Se apreciará que los polinucleótidos derivados del aislado parásito de la presente invención también pueden incorporarse en vectores de vacuna no virales.

La preparación de vacunas que contienen un(os) polipéptido(s) inmunogénico(s) como principio(s) activo(s), se conoce por el experto en la técnica. Normalmente, tales vacunas se preparan como agentes inyectables, o bien como disoluciones líquidas o bien como suspensiones; también pueden prepararse formas sólidas adecuadas para disolución o suspensión en líquido antes de la inyección. La preparación también puede emulsionarse, o encapsularse la proteína en liposomas. A menudo, los principios inmunogénicos activos se mezclan con excipientes que son farmacéuticamente aceptables y compatibles con el principio activo. Tales excipientes son, por ejemplo, agua, solución salina, dextrosa, glicerol, etanol, o similares y combinaciones de los mismos.

Además, si se desea, la vacuna puede contener cantidades menores de sustancias auxiliares tales como agentes emulsionantes o humectantes, agentes tamponantes del pH, y/o adyuvantes que mejoran la eficacia de la vacuna.

Los ejemplos adicionales de adyuvantes y otros agentes incluyen hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio, sulfato de aluminio-potasio (alumbre), sulfato de berilio, sílice, caolín, carbono, emulsiones de agua en aceite, emulsiones de aceite en agua, dipéptido de muramilo, endotoxina bacteriana, lípido X, *Corinebacterium parvum* (*Propionobacterium acnes*), *Bordetella pertussis*, polirribonucleótidos, alginato de sodio, lanolina, lisolecitina, vitamina A, saponina, liposomas, levamisol, DEAE-dextrano, copolímeros bloqueados u otros adyuvantes sintéticos. Tales adyuvantes están disponibles comercialmente de diversas fuentes, por ejemplo adyuvante completo y adyuvante incompleto de Freund (Difco Laboratories, Detroit, Michigan).

Normalmente, se usan adyuvantes tales como Quil A, Amphigen (aceite en agua), Alhydrogel (hidróxido de aluminio), o una mezcla de Amphigen y Alhydrogel. También pueden usarse otras moléculas inmunoestimulantes tales como citocinas (por ejemplo, γ -interferón).

La proporción de inmunógeno y adyuvante puede variar en un amplio intervalo siempre que ambos estén presentes en cantidades eficaces. Por ejemplo, el hidróxido de aluminio puede estar presente en una cantidad de aproximadamente el 0,5% de la mezcla de vacuna (base de Al_2O_3). Convenientemente, las vacunas se formulan para que contengan una concentración final de inmunógeno en el intervalo de desde 0,2 hasta 200 $\mu\text{g/ml}$, preferiblemente de 5 a 50 $\mu\text{g/ml}$, lo más preferiblemente 15 $\mu\text{g/ml}$.

Tras la formulación, la vacuna puede incorporarse en un recipiente estéril que entonces se sella y se almacena a baja temperatura, por ejemplo 4°C, o puede liofilizarse. La liofilización permite un almacenamiento a largo plazo en una forma estabilizada.

ES 2 287 145 T3

Las vacunas se administran de manera convencional por vía parenteral, mediante inyección, por ejemplo, o bien por vía subcutánea o bien por vía intramuscular. Las formulaciones adicionales que son adecuadas para otros modos de administración incluyen supositorios y, en algunos casos, formulaciones orales. Para los supositorios, los aglutinantes y vehículos tradicionales pueden incluir, por ejemplo, polialquilenglicoles o triglicéridos; tales supositorios pueden formarse a partir de mezclas que contienen el principio activo en el intervalo del 0,5% al 10%, preferiblemente del 1% al 2%. Las formulaciones orales incluyen excipientes empleados normalmente de ese tipo como, por ejemplo, calidades farmacéuticas de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina de sodio, celulosa, carbonato de magnesio y similares. Estas composiciones toman la forma de disoluciones, suspensiones, comprimidos, píldoras, cápsulas, formulaciones o polvos de liberación sostenida y contienen del 10% al 95% de principio activo, preferiblemente del 25% al 70%. Cuando la composición de vacuna está liofilizada, el material liofilizado puede reconstituirse antes de su administración, por ejemplo como una suspensión. La reconstitución se efectúa preferiblemente en tampón.

Las cápsulas, comprimidos y píldoras para la administración oral a un paciente pueden proporcionarse con un recubrimiento entérico que comprende, por ejemplo, Eudragit "S", Eudragit "L", acetato de celulosa, acetato-ftalato de celulosa o hidroxipropilmetilcelulosa.

Las composiciones de vacuna de la presente invención pueden administrarse a animales propensos o en cualquier caso en riesgo de infección para provocar una respuesta inmunitaria frente al parásito y por tanto mejorar las capacidades de respuesta inmunitaria propias del animal. Tal cantidad se define que es una "cantidad inmunogénicamente eficaz". En este uso, la cantidad precisa depende del criterio del veterinario o doctor que receta e incluiría la consideración del estado de salud y peso del paciente, el modo de administración, la naturaleza de la formulación y similares.

Una variedad de regímenes de vacunación pueden ser eficaces para inmunizar ganado y otros animales. Preferiblemente, el ganado hembra se vacuna junto antes o en el momento de la cría de manera que se previene el aborto y se reduce la posibilidad de infecciones congénitas. Puede proporcionarse una segunda inmunización en otros periodos de tiempo antes y durante la gestación. Si se desea, también pueden vacunarse los terneros y machos adultos. Los animales que se han expuesto previamente a *N. caninum* o han recibido anticuerpos de calostro de la madre pueden requerir inyecciones de refuerzo. La inyección de refuerzo se fija preferiblemente para que coincida con los momentos de exposición máxima y/o riesgo de aborto.

Con el fin de que la presente invención pueda entenderse más claramente, se describirán formas preferidas con referencia a los siguientes ejemplos y dibujos.

Ejemplo 1

Aislamiento de *Neospora sp. bovina* en Nueva Gales del Sur

Se describe el aislamiento y caracterización de un parásito de *Neospora* a partir de un ternero Holstein-Friesian australiano neonato clínicamente normal. El ternero nació de una madre mantenida en un rebaño lechero comercial de ganado Holstein-friesian ubicado en la costa sur de Nueva Gales del Sur (NSW, "New South Wales"), Australia, cerca de Nowra. Este rebaño ha estado infectado endémicamente con neosporosis durante varios años y se ha estudiado de manera extensa (Atkinson *et al.* 2000b). En primer lugar, se identificó que la madre era serológicamente positiva con un título IFAT de 1280 para *N. caninum* en marzo de 1995, habiendo abortado previamente en enero de 1994 pero no desde entonces. El ternero, que era seropositivo para el antígeno de *N. caninum* mediante inmunotransferencia de tipo western, se mantuvo sano y no mostró signos clínicos de infección por *N. caninum* antes de su sacrificio (departamento de agricultura de NSW) con fenobarbital potenciado intravenoso (Euthetal) mediante punción yugular con una aguja de calibre 21 y una jeringuilla de 20 ml, dosificada para ser eficaz. Tras el sacrificio, se extrajeron el cerebro, la médula espinal (incluyendo los segmentos torácicos T10 a T15) después de la disección de los tejidos del cráneo y la región cervical y la exposición del sistema nervioso central (SNC) usando una sierra y cuchillas óseas. Con la excepción de un segmento de 3 cm de diámetro de la corteza cerebral frontal izquierda que se fijó en formalina al 10% para el procesamiento histológico, se colocaron los tejidos del SNC inmediatamente en solución salina con antibiótico (NaCl al 0,9% que contenía penicilina y estreptomina) y se homogeneizaron. Se añadió entonces tripsina al 0,005% y se incubó el homogeneizado durante 30 min a 37°C. Se centrifugó el homogeneizado durante 10 min a 1200 g y se resuspendió en solución salina con antibiótico. Se lavó el sedimento dos veces en solución salina con antibiótico con centrifugación.

Para el cultivo tisular, se resuspendió el sedimento en 8 ml de medio de cultivo tisular y se colocó usando una técnica aséptica en un matraz que contenía una monocapa de células Vero (Barber *et al.* 1995). Desgraciadamente, los cultivos se contaminaron y se descartaron.

Se inyectaron por vía intraperitoneal homogeneizados en solución salina con antibiótico en ratones deficientes en el receptor del interferón gamma (IFN- γ RKO, 129/Sv) con una aguja de calibre 23. Se inyectó a los ratones un homogeneizado de, o bien extracto de cerebro infectado (6 ratones) o de médula espinal (6 ratones) y después se monitorizaron diariamente para detectar signos clínicos de enfermedad. Se observaron signos clínicos que sugerían neosporosis incluyendo pelaje erizado, apariencia letárgica acurrucada y pérdida de peso (Atkinson *et al.* 1999), en ambos grupos de ratones (inyectados con el extracto de cerebro y médula espinal) en el plazo de 23 días tras la inoculación con el homogeneizado. Se sacrificaron los ratones con dióxido de carbono y se extrajeron sus cerebros y se procesaron como anteriormente para la infección de células en cultivo tisular con tejido cerebral bovino, usando sin

embargo volúmenes más pequeños. También se pasaron homogeneizados de cerebro de nuevo a ratones deficientes para IFN- γ RKO sin tratar, que desarrollaron signos clínicos de neosporosis a los 23 días tras la infección. Un tercer pasaje en ratones dio como resultado que se observaran signos clínicos a partir de los 10 días tras la infección.

5 Los exámenes histopatológicos, realizados por el departamento de agricultura de NSW, de secciones múltiples de cerebro del ternero clínicamente normal identificaron una encefalitis no supurativa multifocal muy leve caracterizada por focos raros de gliosis e infiltración perivascular. No se observaron elementos parásitos, sin embargo, las lesiones se consideraron consecuentes con la infección cerebral intrauterina muy leve con *N. caninum* (Boulton *et al.* 1995). El examen histológico del cerebro de 5 ratones inoculados con homogeneizados cerebrales de terneros identificó
10 una encefalitis no supurativa multifocal leve en los 5, identificándose 2 estructuras apicomplejas que se asemejan a taquizoítos de *N. caninum* en la sección de tejido de corioide cerebral de un único ratón. La inmunohistoquímica realizada sobre esta sección identificó una tinción de inmunoperoxidasa positiva con antisueros anti-*Neospora*.

15 Las células Vero infectadas con homogeneizados cerebrales de uno de estos ratones dieron como resultado la proliferación de taquizoítos a los 14 días tras la infección. Se ha logrado ahora de manera satisfactoria el crecimiento *in vitro* de estos parásitos durante 15 meses. Se identificó el aislado como un miembro del género *Neospora* por las razones explicadas a continuación y se denominó Nc-Nowra, por la ubicación geográfica del rebaño de estudio.

Ejemplo 2

20 Caracterización de los microorganismos aislados

Microscopía electrónica. Se recuperaron taquizoítos del cultivo *in vitro* y se examinaron mediante microscopía electrónica de transmisión. Se fijaron los taquizoítos en glutaraldehído al 2,5%, paraformaldehído al 2% en tampón fosfato pH 7,2 durante 2 horas; se lavaron tres veces con tampón cacodilato 0,1 M y se fijaron posteriormente en tetróxido de osmio acuoso al 1%. Tras eliminar el fijador en exceso lavando con agua, se deshidrataron los parásitos en etanol, se transfirieron a acetona anhidra y se infiltraron y embebieron en resina Epon. Se cortaron los bloques y se examinaron las secciones ultrafinas con un microscopio electrónico de transmisión JEM 1010. Se identificaron los taquizoítos como *N. caninum* en virtud de su tamaño, forma y estructuras internas que incluyen la presencia de
30 orgánulos intracelulares característicos tales como roptries densos a los electrones (Speer *et al.* 1999).

Inmunotransferencia de tipo Western. Se analizaron por inmunotransferencia de tipo Western lisados de taquizoítos de Nc-Nowra, Nc-Liverpool y la cepa ME49 de *T. gondii* usando sueros obtenidos de ratones infectados de manera aguda con Nc-Liverpool (Atkinson *et al.* 1999). El perfil antigénico detectado para Nc-Nowra era similar, pero no idéntico, al obtenido de Nc-Liverpool. El perfil antigénico no poseía similitud con el mostrado por *T. gondii*.
35

PCR y secuenciación del ADN: Se realizó amplificación por PCR del ADN genómico de Nc-Nowra usando ADN preparado mediante técnicas convencionales, a partir de taquizoítos cultivados *in vitro*. Se usaron los cebadores Tim3 y Tim11 y se analizaron los productos de amplificación mediante electroforesis en gel de agarosa (Payne y Ellis, 1996). La PCR amplificó específicamente una secuencia espaciadora transcrita interna (ITS1), que era similar en tamaño a la obtenida del ADN de Nc-Liverpool. Se purificó el producto de PCR usando un kit de purificación de Qiagen y se secuenció el ADN mediante secuenciación cíclica usando los cebadores Tim3 y Tim11. Una secuencia consenso derivada para la ITS-1 de Nc-Nowra era similar en el 99% a la notificada previamente para *N. caninum* (AF029702 y AF038860 por ejemplo).
45

Ejemplo 3

Taquizoítos de Nc-Nowra usados en una prueba serológica tal como un ELISA

50 Un rebaño lechero, ubicado en las Southern Highlands de NSW, contenía 177 reses Friesians con una historia de aborto, registrándose 37 abortos en 18 meses que se extendían entre 1999/2000. Había dos perros y numerosos zorros en esta propiedad, y se diagnosticó previamente *N. caninum* en esta propiedad mediante examen de autopsia de fetos abortados realizado por el departamento de agricultura de NSW. El rebaño se vacuna completa y regularmente contra la leptosporidiosis. Se extraía sangre del rebaño lechero para investigación rutinaria de la causa de los abortos
55 y se examinaron estos sueros para detectar anticuerpos frente a Nc-Nowra usando un protocolo de ELISA indirecto desarrollado en la UTS y descrito a continuación.

Se recuperaron taquizoítos de Nc-Nowra del cultivo *in vitro* y se redujeron a extractos proteicos mediante resuspensión en tampón de lisis (Tris 20 mM pH 7,5, NaCl 150 mM, Triton X-100 al 1%, PMSF 1 mM, DTT 2 mM, benzimidina HCl 1 mM) y rotura mediante sonicación a 50 W/20 KHz durante 10-20 segundos. Se dializó la preparación resultante frente a PBS durante toda la noche a 4°C con un cambio del tampón. Se determinó la concentración de proteína usando el ensayo de unión al colorante Bradford (Biorad). Se recubrieron placas de 96 pocillos Nunc con antígeno diluido hasta 1 μ g/pocillo en tampón carbonato a 4°C durante toda la noche. Se lavaron las placas tres veces con PBS/Tween al 0,03% y se añadió a los pocillos el suero bovino de prueba diluido en tampón 2 de ELISA (Tween al 0,3%, hemoglobina bovina al 0,05%). Los sueros usados procedían de ganado lechero que era propenso al aborto.
65 Se incubaron de nuevo las placas durante toda la noche a 4°C y se lavaron entonces tres veces con PBS/Tween al 0,03%. Se diluyó conjugado de anti-IgG bovina-fosfatasa alcalina 1:6.000 en tampón 2 y se incubaron las placas a 37°C durante 3 horas. Se lavaron las placas con PBS/Tween al 0,03% y se añadió 1 mg/ml de p-nitrofenilfosfato en

ES 2 287 145 T3

tampón carbonato. Se incubaron las placas a 37°C durante 30 min y se leyó la absorbancia a 405 nm en un lector de placas de ELISA de Biorad. Se identificó un suero positivo al ser 2 desviaciones estándar mayor que el resultado de D.O. negativo medio (de 20 sueros).

5 *Resultados.* Se usó lisado en bruto de Nc-Nowra en un ELISA para examinar un rebaño lechero que se sospechaba que contenía vacas positivas para *N. caninum*. En la figura 1 se presenta un gráfico que muestra un resumen de las lecturas de D.O. obtenidas del ELISA del rebaño. Cuatro (4) vacas de 177 (2,3%) en el rebaño eran seropositivas para *N. caninum* usando este ensayo. Había una alta correlación entre las absorbancias de ELISA obtenidas usando el ELISA de Nc-Nowra y los resultados de un kit de ELISA de *N. caninum* comercial, que detectó 16 de 177 (9%) vacas como seropositivas en el rebaño. El kit comercial también se basa en un antígeno de lisado en bruto, sin embargo se usa el aislado de *N. caninum* NC-1. Éste se aisló en los EE.UU. y tiene propiedades biológicas diferentes al aislado de Nc-Nowra.

Ejemplo 4

15

Extracto celular de Nc-Nowra usado para inducir una respuesta inmunitaria en un animal

Se dividieron treinta (30) ratones QS en 10 grupos iguales, cada uno de los cuales recibió uno de los siguientes tratamientos, con 4 semanas de diferencia:

20

Grupo	Tratamiento
1.	Ninguno
2.	Adyuvante incompleto de Freund (FIA) solo
25 3.	FIA + Nc-Nowra

25

Dos (2) semanas después de la segunda inyección, se sacrificaron los ratones mediante asfixia por CO₂, se sangraron y se extrajeron sus bazos para un ensayo de proliferación celular.

30

Se preparó un extracto de Nc-Nowra de la siguiente manera y se usó para, o bien inyección en animales, o bien para ELISA. Se recuperaron taquizoítos de Nc-Nowra de cultivo *in vitro* y se redujeron a extractos proteicos mediante resuspensión en tampón de lisis (Tris 20 mM pH 7,5, NaCl 150 mM, Triton X-100 al 1%, PMSF 1 mM, DTT 2 mM, benzimidina HCl 1 mM) y rotura mediante sonicación a 50 W/20 KHz durante 10-20 segundos. Se dializó la preparación resultante frente a PBS durante toda la noche a 4°C con un cambio de tampón. Se determinó la concentración de proteína usando el ensayo de unión a colorante Bradford (Biorad).

35

Se sometieron a ensayo mediante ELISA los sueros, preparados mediante procedimientos convencionales, usando el siguiente método. Se recubrieron placas de 96 pocillos Nunc con extracto de antígeno Nc-Nowra diluido hasta 1 µg/pocillo en tampón carbonato a 4°C durante toda la noche. Se lavaron las placas tres veces con PBS/Tween al 0,03% y se añadió a los pocillos suero de ratón diluido en tampón 2 de ELISA (Tween al 0,3%, hemoglobina bovina al 0,05%). El suero usado procedía de ratones de los grupos de tratamiento descritos anteriormente. Se incubaron de nuevo las placas durante toda la noche a 4°C y se lavaron entonces tres veces con PBS/Tween al 0,03%. Se diluyó conjugado de anti-IgG de ratón-fosfatasa alcalina 1:6.000 en tampón 2 y se incubaron las placas a 37°C durante 3 horas. Se lavaron las placas con PBS/Tween al 0,03% y se añadió 1 mg/ml de p-nitrofenilfosfato en tampón carbonato. Se incubaron las placas a 37°C durante 30 minutos y se leyó la absorbancia a 45 nm en un lector de placas de ELISA de Biorad.

45

Se realizaron ensayos de proliferación celular sobre células de bazo de ratón tal como sigue. Se colocaron individualmente los bazos en medio de lavado (DMEM que contenía penicilina y estreptomycin, DMEM/PS) y se forzaron a través de un tamiz desechable de nylon de 70 µm para producir una suspensión de células únicas. Se concentraron las células por centrifugación y se resuspendieron en 2 ml de tampón de lisis celular rojo y se dejaron a temperatura ambiente durante 1 min. Se diluyó el tampón de lisis con más DMEM/PS, se centrifugó y se resuspendieron los sedimentos en DMEM/PS nuevo para el recuento. Se añadieron 1 x 10⁴ células por pocillo de cada suspensión por triplicado a los pocillos de una placa de microtitulación. Se añadió a las células antígeno estimulante a una concentración de 10 µg/pocillo para el lisado Con A y Nc-Nowra. Se incluyó un blanco (que no contenía células). Se incubaron las células a 37°C en 5% de CO₂ durante 4 días. Se añadió entonces BrdU y se incubaron las células durante 4 horas adicionales. Se sedimentaron las células hasta el fondo de la placa de microtitulación mediante centrifugación, se recogieron los sobrenadantes para un ensayo de citocinas y se secaron y fijaron las células. Se detectó entonces la incorporación de BrdU usando un kit de inmunoensayo comercial (Roche) que abarcaba un conjugado de anti-BrdU-POD.

60

Resultados. Se observó un aumento en la absorbancia en las muestras de suero tomadas en cada punto del tiempo, lo que indica que se estaba produciendo una respuesta de IgG en los ratones frente a un extracto de antígeno en bruto de Nc-Nowra. Esta respuesta era significativamente mayor que la observada en ratones no inyectados o ratones inyectados con el adyuvante solo. El transcurso del tiempo mostró una respuesta de IgG significativa a y después de 6 semanas tras la inyección en los ratones que recibieron el extracto de Nc-Nowra.

65

ES 2 287 145 T3

Un extracto en bruto de Nc-Nowra, cuando se usó como un antígeno estimulante, también estimuló la proliferación celular en células del bazo de ratones, mostrando que se inducía una respuesta inmunitaria mediada por células.

Ejemplo 5

Nc-Nowra es sólo levemente patogénica en el ratón

Se realizó un experimento sencillo para investigar la patogenicidad de Nc-Nowra en ratones BALB/C. Este modelo se ha usado previamente para investigar la patogenicidad de *N. caninum* (Nc-Liverpool y Nc-SweB1) *in vivo* (Atkinson *et al.* 1999). Se inyectó por vía intraperitoneal a grupos de ratones hembra o bien solución salina, 10^6 taquizoítos crecidos *in vitro* (Nc-Liverpool o Nc-Nowra) o bien 10^4 (Nc-Nowra). Se pesaron los ratones diariamente y se sacrificaron cuando lo dictaron los signos clínicos (para aliviar el sufrimiento innecesario) o al final del experimento en el día 31 tras la infección. Se extrajeron los cerebros de todos los ratones del experimento, se fijaron en formalina al 10% y se examinaron patológicamente.

Resultados. Todos los ratones inyectados con solución salina sobrevivieron hasta el final del experimento y ganaron peso regularmente durante este periodo de tiempo. Los ratones a los que se les administró Nc-Liverpool se volvieron rápidamente erizados y letárgicos y el sacrificio de los ratones afectados comenzó en el día 20 tras la infección. En el día 30, sólo 4 de 9 ratones quedaban en este grupo. Los ratones a los que se les administró Nc-Nowra no resultaron afectados tan rápidamente, sobreviviendo 7 de 17 ratones hasta el día 31 tras la infección.

En las secciones histológicas de 3 de los ratones inyectados no se identificaron lesiones histológicas significativas (no se examinaron más ratones en este grupo). Se identificaron lesiones de gravedad variable y se caracterizaron como encefalitis de multifocal no supurativa a necrotizante en 5 de 8 ratones que recibieron 10^4 Nc-Nowra, los 9 ratones que recibieron 10^6 Nc-Nowra y los 9 ratones que recibieron 10^6 Nc-Liverpool. Se clasificaron las lesiones en cuanto a su gravedad según los estudios previos (Atkinson *et al.* 1999), considerándose que 4 de los ratones que recibieron 10^4 Nc-Nowra, 4 de los ratones que recibieron 10^6 Nc-Nowra y los 9 ratones que 10^6 Nc-Liverpool tenían lesiones de moderadas a graves. Estos hallazgos muestran que, como Nc-SweB1, que también se aisló del ganado bovino (Stenlund *et al.* 1997), Nc-Nowra es menos patogénico en los ratones BALB/C, comparado con Nc-Liverpool.

Cinco (5) ratones BALB/C inyectados i.p. con cerebro infectado por Nc-Nowra de un ratón deficiente se mantuvieron en estado sano durante 7 meses, y no mostraron signos clínicos de neosporosis. Estos ratones se seroconvirtieron a antígeno de *N. caninum* (mediante inmunotransferencia de tipo Western). Tras el sacrificio, el análisis de la patología cerebral mostró lesiones cerebrales leves consecuentes con la infección por *N. caninum*. No se observaron estadios parásitos durante los análisis patológicos.

Ejemplo 6

Una infección viva producida por Nc-Nowra puede evitar la neosporosis en ratones infectados con Nc-Liverpool

Se recogieron taquizoítos del aislado de Nc-Nowra de un cultivo *in vitro* de células Vero y se diluyeron en solución salina al 0,9% hasta una concentración de 10^5 /ml. Diez ratones BALB/c se infectaron subcutáneamente con 10^4 taquizoítos por ratón. Quince ratones adicionales se inyectaron con solución salina al 0,9% únicamente. Tres semanas tras la infección, los diez ratones infectados con Nc-Nowra y los diez de los ratones a los que se inyectó solución salina se infectaron con 10^6 taquizoítos de Nc-Liverpool recuperados del cultivo celular. A los cinco ratones restantes a los que se inyectó solución salina se les inyectó de nuevo solución salina. Los ratones se monitorizaron diariamente para determinar los signos clínicos (erizado y letárgico) y se pesaron diariamente desde el día 13 i.p. Se sacrificaron los ratones tras la pérdida del 20% de su peso corporal. Se recogió sangre de todos los ratones y los cerebros de una selección de cada grupo. Se dejó que la sangre coagulara, se centrifugó y se eliminó el suero. Los cerebros se fijaron en formalina al 10% y se enviaron al departamento de agricultura de NSW e para realizar un examen patológico.

Resultados

Grupo 1

Inyectado con solución salina y expuesto a Nc-Liverpool (control positivo, n = 10)

Se observaron signos clínicos en los ratones infectados sólo con Nc-Liverpool en el día 14 i.p. y el sacrificio de los ratones comenzó el día 21. Los diez ratones de este grupo murieron entre el día 21 y el día 25 i.p.

Grupo 2

Infectado con Nc-Nowra y expuesto a Nc-Liverpool (n = 10)

Por el contrario, sólo 2 ratones de los ratones infectados con Nc-Nowra/Nc-Liverpool desarrollaron signos clínicos y estos se sacrificaron en los días 19 y 20. Ambos ratones eran pequeños y ligeros de peso para su edad al comienzo del experimento. Tales ratones normalmente sucumben rápidamente a la neosporosis y se incluyeron como un control positivo interno. Los otros ocho ratones de este grupo permanecieron sanos durante la totalidad del experimento y

ES 2 287 145 T3

no mostraron signos asociados normalmente con la infección por *N. caninum*, tales como la pérdida de peso, inclinación de la cabeza o descoordinación motora. Se concluyó que la infección por Nc-Nowra había inducido inmunidad protectora frente a los signos clínicos de neosporosis asociados con la infección por Nc-Liverpool.

5 Grupo 3

Inyectado con solución salina y al que no se administró exposición a parásito (control negativo, n = 5)

Todos los ratones de este grupo permanecieron sanos.

10

Patología del cerebro

Se cortaron cinco (5) cortes del orden de micras de los cerebros, se tiñeron con H y E y se examinaron para determinar la evidencia de lesiones cerebrales. Las lesiones se clasificaron en una escala de 0 a 5, siendo 5 el tipo más grave de lesión. La puntuación promedio para los cerebros infectados por Nc-Liverpool (Grupo 1) examinados fue de 3,5, mientras que la puntuación promedio para los cerebros infectados por Nc-Nowra/Nc-Liverpool (Grupo 2) examinados fue de 1,5. Se concluyó que la infección anterior por Nc-Nowra había reducido significativamente la puntuación de lesión cerebral en este experimento.

15

20 Ejemplo 7

La infección anterior por Nc-Nowra no tiene efecto en el tamaño de la camada en el ratón QS en periodo de gestación

A ratones QS hembra de cinco (5) semanas de edad se les inyectaron subcutáneamente 10^4 taquizoítos de Nc-Nowra derivados *in vitro*. Tres semanas después, se sincronizó la ovulación en todos los ratones mediante dos inyecciones de hormonas (PMSG y CGh) administradas con 48 horas de diferencia. En el día 8 de gestación, a 1 de los grupos de tratamiento se les administraron 10^6 taquizoítos de Nc-Liverpool. Todos los ratones se sacrificaron en el día 14 de gestación y se analizaron los sitios de implantación uterina para determinar los fetos viables.

25

Resultados: La siguiente tabla resume los grupos de tratamiento y los tamaños medios de camada obtenidos. No se encontraron diferencias significativas en el tamaño medio de camada entre los grupos de tratamiento, lo que indica que Nc-Nowra no produce una pérdida fetal en este modelo. Tratamiento Tamaño medio de camada (D.E) Número de ratones en el grupo Ninguno 15,2 (1,18) 23 Nc-Nowra 16,9 (1,73) 12 Nc-Nowra/Nc-Liverpool 17,3 (1,45) 19

30

35

Tratamiento	Tamaño medio de camada (D.E)	Número de ratones en el grupo
Ninguno	15,2 (1,18)	23
Nc-Nowra	16,9 (1,73)	12
Nc-Nowra/Nc-Liverpool	17,3 (1,45)	19

40

45

Se sometió a ensayo el suero de todas las madres sacrificadas en el día 14 para determinar la IgG frente al antígeno de *N. caninum* usando el método ELISA descrito en el ejemplo 4. Los ratones infectados con Nc-Nowra mostraron altos niveles de IgG frente a *N. caninum*, mientras que los ratones en otros grupos, no (figura 2).

50

50 Ejemplo 9

Infección de ratones QS en periodo de gestación con Nc-Nowra

Se aparearon ratones QS hembra de nueve (9) semanas de edad tras la sincronización de la ovulación con 2 inyecciones de hormonas (PMSG y CGh) con 48 horas de diferencia. En el día 8 de gestación, a los ratones se les administró o bien una inyección subcutánea de solución salina (grupo control), 1×10^4 o 1×10^6 taquizoítos de Nc-Nowra derivados del cultivo tisular. Todos los ratones se sacrificaron en el día 14 de gestación y se analizaron los sitios de implantación uterina para determinar los fetos no viables. Se realizaron análisis estadísticos utilizando un Análisis de Varianza.

55

60

Se preparó ácido nucleico total de tejido fetal extirpado mediante métodos convencionales que implicaban la lisis en tampón que contenía SDS, EDTA y proteinasa K, seguido por extracción con fenol-cloroformo y precipitación en etanol. Se analizaron estos ADN para determinar la presencia de ADN de *N. caninum* mediante PCR usando cebadores que se diseñaron para que fueran específicos para *N. caninum* a partir de la secuencia de ITS1 notificada anteriormente (Payne y Elis, 1996). La reacción de PCR se calentó a 95°C durante 2 min, después se sometió a 35 ciclos de 95°C 45 s, 50°C 45 s y 72°C durante 2 min. La reacción se trató entonces a 72°C durante 5 min para permitir que se completara la extensión del cebador.

65

ES 2 287 145 T3

Resultados: La siguiente tabla resume los resultados de este experimento. La inyección a los ratones con Nc-Nowra en el día 8 de gestación no produjo signos clínicos de la enfermedad y no se produjo pérdida fetal significativa ($p = 0,3355$).

Grupo	Media en % de reabsorciones / camada (D.E.)
Solución salina	6,813 ± 3,535
1 x 10 ⁴ Nc-Nowra	26,75 ± 24,43
1 x 10 ⁵ Nc-Nowra	7,243 ± 3,626

No se obtuvo ningún producto de PCR específico de *N. caninum* a partir de estos ADN fetales, lo que demuestra que no hay evidencia de infección por *N. caninum* en el día 14 de gestación. El control positivo (ADN de *N. caninum*) dio la banda requerida de aproximadamente 400 pb. Este estudio no excluye la posibilidad de que pueda detectarse *N. caninum* en fetos de más tiempo o crías usando un diseño experimental similar con Nc-Nowra.

Durante toda esta memoria descriptiva, se entenderá que la palabra “comprender”, o variaciones tales como “comprende” o “que comprende”, supone la inclusión de un elemento, número entero o etapa establecidos, o un grupo de elementos, números enteros o etapas, pero no la exclusión de ningún otro elemento, número entero o etapa, o grupo de elementos, números enteros o etapas.

Cualquier discusión de documentos, leyes, materiales, dispositivos, artículos o similares que se haya incluido en la presente memoria descriptiva es únicamente para fines de proporcionar un contexto para la presente invención. No debe considerarse como un reconocimiento de que cualquiera o todos estos contenidos forman parte de la base de la técnica anterior o eran el conocimiento general común en el campo relevante de la presente invención, tal como existía en Australia antes de la fecha de prioridad de cada reivindicación de esta solicitud.

Bibliografía

Andrianarivo AG, Choromanski L, McDonough SP, Packham AE & Conrad PA. (1999) Immunogenicity of a killed whole *Neospora caninum* tachyzoite preparation formulated with different adjuvants. *International Journal for Parasitology* 29,1913-1625.

Andrianarivo AG, Rowe JD, Barr BC, Anderson ML, Packham AE, Sverlow KW, Choromanski L, Loui C, Grace A & Conrad PA. (2000) A POLYGEN™-adjuvanted killed *Neospora caninum* tachyzoite preparation failed to prevent foetal infection in pregnant cattle following i.v/i.m experimental tachyzoite challenge. *International Journal for Parasitology* 30, 985-990.

Atkinson R, Harper PAW, Ryce C, Morrison DA & Ellis JT. (1999) Comparison of the biological characteristics of two isolates of *Neospora caninum*. *Parasitology* 118, 363-370.

Atkinson R, Harper PAW, Reichel MP & Ellis JT. (2000a) Progress in the serodiagnosis of *Neospora caninum* infections of cattle. *Parasitology Today* 16,110-114.

Atkinson RA, Cook RW, Reddacliff L, et al. (2000b) Seroprevalence of *Neospora caninum* infection following an abortion outbreak in a New South Wales dairy herd. *Australian Veterinary Journal* 78, 262-266.

Barber JS, Holmdahl OJM, Owen MR et al. (1995) Characterisation of the first European isolate of *Neospora caninum* (Dubey, Carpenter, Speer, Topper y Uggla). *Parasitology* 111, 563-568.

Baszler TV, McElwain TF & Mathison BA. (2000) Immunization of BALB/c mice with killed *Neospora caninum* tachyzoite antigen induces a Type 2 immune response and exacerbates encephalitis and neurological disease. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 7, 893-898.

Bjerkas I, Mohn SF & Presthus J (1984) Unidentified cyst-forming sporozoan causing encephalomyelitis and myositis in dogs. *Zeitschrift fur Parasitenkunde* 70, 271-274.

Bjorkman C & Uggla A. (1999) Serological diagnosis of *Neospora caninum* infection. *International Journal for Parasitology* 29, 1497-1507.

Boulton JG, Gill PA, Cook RW, et al. (1995) Bovine *Neospora* abortion in north-eastern New South Wales. *Australian veterinary journal* 72, 119-120.

Buxton D & Innes EA. (1995) A commercial vaccine for bovine toxoplasmosis. *Parasitology* 110 Suppl: S11-6.

ES 2 287 145 T3

Conrad PA, Barr BC, Sverlow KW, Anderson M, Daft B, Kinde H, Dubey JP, Munson L & Ardans A. (1993). *In vitro* isolation and characterization of a *Neospora* sp. from aborted bovine fetuses. *Parasitology* 106, 239-249.

5 **Dubey JP, Carpenter JL, Speer CA, Topper MJ & Uggla A. (1988)** Newly recognized fatal protozoan disease of dogs. *Journal of the American Veterinary Medicine Association* 192, 1269-1285.

Holmdahl J, Bjorkman C, Stenlund S, Uggla A & Dubey JP. (1997) Bovine *Neospora* and *Neospora caninum* - one and the same. *Parasitology Today* 13, 40-41.

10 **Liddell S, Jenkins MC, Collica CM & Dubey JP. (1999)** Prevention of vertical transfer of *Neospora caninum* in BALB/c mice by vaccination. *Journal of Parasitology* 85, 1072-1075.

15 **Lindsay DS, Lenz SD, Cole RA, Dubey JP & Blagburn BL. (1995)** Mouse model for central nervous system *Neospora caninum* infections. *Journal of Parasitology* 81, 313-315.

Lindsay DS, Lenz SD, Blagburn BL & Brake DA. (1999) Characterization of temperature-sensitive strains of *Neospora caninum* in mice. *Journal of Parasitology* 85, 64-67.

20 **Marsh AE, Barr BC, Sverlow K, Ho M, Dubey JP & Conrad PA. (1995)** Sequence analysis and comparison of ribosomal DNA from bovine *Neospora* to similar coccidial parasites. *Journal of Parasitology* 81, 530-535.

Mehlhorn H & Heydorn AO. (2000) *Neospora caninum*: Is it really different from *Hammondia heydorni* or is it a strain of *Toxoplasma gondii*? An opinion. *Parasitology Research* 86, 169-178.

25 **Payne S & Ellis J. (1996)** Detection of *Neospora caninum* DNA by the polymerase chain reaction. *International Journal for Parasitology* 26, 347-351.

30 **Schares G, Heydorn AO, Cüppers A, Conraths FJ & Mehlhorn H. (2001)** *Hammondia heydorni*-like oocysts shed by a naturally infected dog and *Neospora caninum* NC-1 cannot be distinguished. *Parasitology Research in press*.

Shirley MW & Bedrnik P. (1997) Live attenuated vaccines against avian coccidiosis-success with precocious and egg-adapted lines of *Eimeria*. *Parasitology Today* 13, 481-484.

35 **Speer CA, Dubey JP, McAllister MM, et al. (1999)** Comparative ultrastructure of tachyzoites, bradyzoites, and tissue cysts of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*. *International Journal for Parasitology* 29, 1509-1519.

Stenlund S, Bjorkman C, Holmdahl OJM, Kindahl H & Uggla A. (1997) Characterisation of a Swedish bovine isolate of *Neospora caninum*. *Parasitology Research* 83, 214-219.

40 **Thilsted JP & Dubey JP (1989)** Neosporosis-like abortions in a herd of dairy cattle. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 1, 205-209.

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Aislado de protozoo parásito atenuado de manera natural, en el que

- 5 a) dicho aislado es el aislado depositado como el número de registro de AGAL NM01/22338, o un aislado que tiene el perfil antigénico del aislado depositado como el número de registro de AGAL NM01/22338 tal como se detecta mediante inmunotransferencia de tipo Western usando sueros obtenidos de ratones infectados de manera aguda con *Neospora caninum* Liverpool, y una secuencia ITS-1 que es similar en el 99% a la secuencia ITS-1 de *N. caninum* depositada con el número de registro de NCBI Genbank AF029702 o AF 038860, y
- 10 b) dicho aislado se une específicamente mediante un anticuerpo monoclonal producido frente al aislado depositado como el número de registro de AGAL NM01/22338.

15 2. Anticuerpo monoclonal, que se une específicamente a un aislado según la reivindicación 1, que está depositado como el número de registro de AGAL NM01/22338.

3. Célula huésped aislada o cultivo celular infectado con un aislado según la reivindicación 1.

20 4. Célula huésped aislada o cultivo celular según la reivindicación 3, en el que la célula huésped es una célula Vero.

5. Célula huésped aislada o cultivo celular según la reivindicación 4, que deriva de la muestra depositada como el número de registro de AGAL NM01/22339.

25 6. Composición de vacuna que comprende el aislado según la reivindicación 1.

7. Composición de vacuna según la reivindicación 6, en la que el aislado está en forma de un parásito inactivado.

30 8. Composición de vacuna que comprende un extracto de un aislado según la reivindicación 1.

9. Composición de vacuna según la reivindicación 8, en la que el extracto se selecciona del grupo que consiste en lisados celulares, polipéptidos antigénicos y polinucleótidos que codifican para polipéptidos antigénicos.

35 10. Método para diagnosticar una infección parásita, comprendiendo el método detectar la presencia de un aislado según la reivindicación 1 en una muestra clínica del animal.

11. Método según la reivindicación 10, en el que la muestra clínica se selecciona del grupo que consiste en una biopsia, una muestra de deposiciones, una muestra de sangre y tejido fetal.

40 12. Aislado de protozoo parásito según la reivindicación 1, para su uso como una composición de vacuna para el tratamiento o prevención de la infección o enfermedad en un animal.

13. Anticuerpo según la reivindicación 2, para su uso en el tratamiento de la infección o enfermedad en un animal.

45 14. Anticuerpo según la reivindicación 2, para su uso en un método según la reivindicación 10 ó 11.

15. Método o uso según una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 14, en el que la infección o enfermedad está producida por la presencia de *Neospora* en el animal.

50 16. Método o uso según una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 15, en el que el animal es un ser humano o animal de ganado.

55 17. Método o uso según la reivindicación 16, en el que el animal de ganado es una vaca.

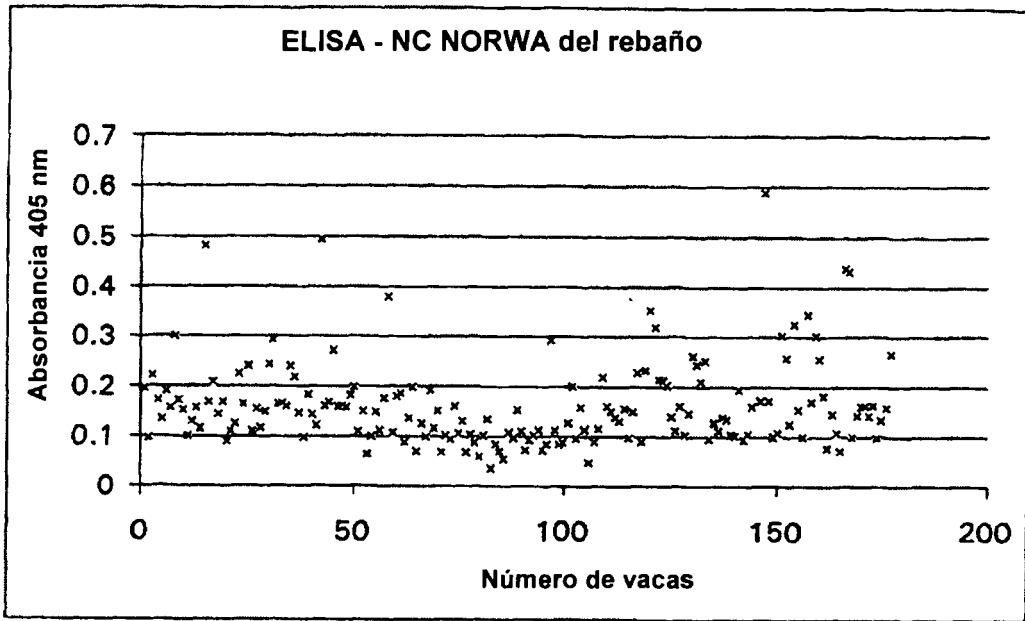


Figura 1

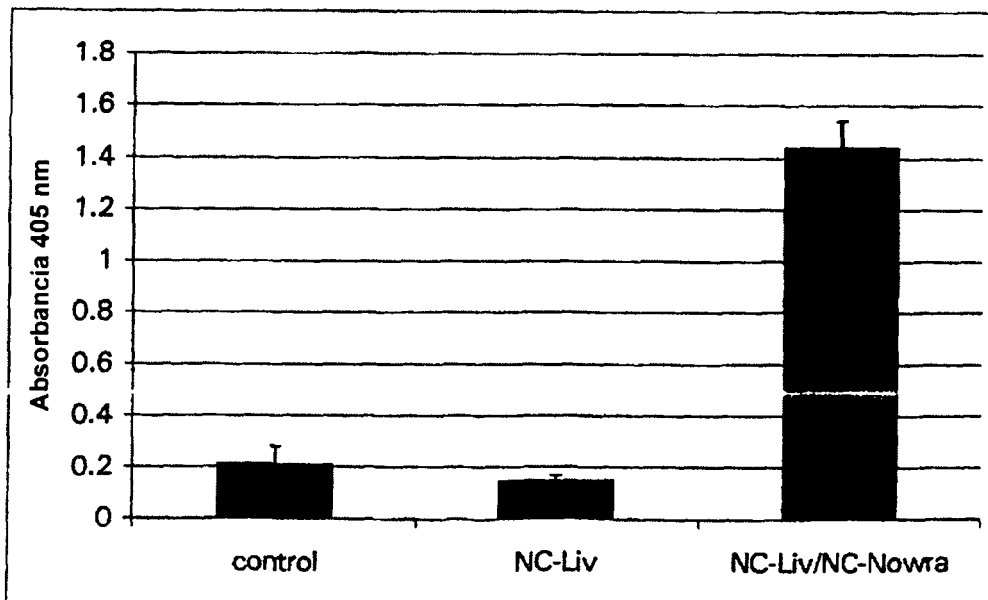


Figura 2