(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 320 348**

(51) Int. Cl.:
C07K 14/44 (2006.01)
C12N 15/30 (2006.01)
A61K 39/018 (2006.01)
G01N 33/569 (2006.01)
C07K 16/20 (2006.01)
C12N 15/10 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Número de solicitud europea: **04784633 .2**
(96) Fecha de presentación : **21.09.2004**
(97) Número de publicación de la solicitud: **1670820**
(97) Fecha de publicación de la solicitud: **21.06.2006**

(54) Título: **Antígenos para vacuna contra la teileriosis.**

(30) Prioridad: **22.09.2003 US 504428 P**
14.07.2004 US 22605

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
21.05.2009

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
21.05.2009

(73) Titular/es:
International Livestock Research Institute (ILRI)
P.O. Box 30709
00100 Nairobi, KE
THE INSTITUTE FOR GENOMIC RESEARCH

(72) Inventor/es: **Taracha, Evans;**
Gardner, Malcolm, J. y
Nene, Vishvanath

(74) Agente: **Ponti Sales, Adelaida**

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).

Venta de fascículos: Oficina Española de Patentes y Marcas. Pº de la Castellana, 75 – 28071 Madrid

DESCRIPCIÓN

Antígenos para vacuna contra la teileriosis.

Antecedentes de la invención

La teileriosis es un grupo de síndromes que afecta a las reses, las ovejas, las cabras y los búfalos domésticos y está causada por los parásitos hematozoos del género *Theileria* transmitidos por las garrapatas. Las enfermedades más importantes económicamente incluyen la fiebre de la Costa Este (FCE), la fiebre Mediterránea, y la teileriosis maligna. La FCE, causada por *Theileria parva* (*T. parva*), afecta a 30 millones de reses en África oriental, central y del sur. La fiebre Mediterránea, causada por *T. annulata* se da en el norte de África, el sur de Europa, Oriente Próximo, Oriente Medio y el Extremo Oriente asiáticos con una población de 200 millones de reses y búfalos en riesgo. La teileriosis maligna causada por *T. lestoquardi* afecta a ovejas y cabras en el sur de Europa, norte de África, Oriente Próximo y Medio y el sur de Rusia y los estados vecinos. Estos parásitos pertenecen al mismo grupo apicomplexa que *Plasmodium falciparum*, *Toxoplasma gondii*, *Cytoxauzoon spp*, *Eimeria spp* y *Babesia spp*, con un ciclo vital que posee los componentes de los artrópodos y los mamíferos, en los que se desarrollan estadios asexuales y sexuales, respectivamente. Las fases patógenas de los parásitos *Theileria* son diferentes. *T. parva* causa un desorden linfoproliferativo en el que los linfoblastos infectados con esquizontes son responsables de la patogénesis de la enfermedad. *T. parva* se conoce por causar una respuesta linfoproliferativa en animales infectados que se parece a diversos linfomas de células T, leucemias y otros cánceres linfocíticos. Por otro lado, la enfermedad anémica causada por *T. lestoquardi* y *T. sargenti* se debe a eritrocitos infectados con piroplasmas, mientras que ambos esquizontes y piroplasmas de *T. annulata* son patógenos que resultan en síndromes linfoproliferativos y anémicos, respectivamente.

Actualmente, la teileriosis se controla principalmente mediante el control de las garrapatas utilizando acaricidas, tales como las clorotetraciclinas (utilizadas primero como profilácticos), hidroxinaftoquinona, menoctona y sus dos análogos, parvacuona y bupavacuona, y a través de los protocolos de vacunación "infección y tratamiento" de animales en riesgo. Tales protocolos de vacunación se consideran efectivos cuando un animal vacunado de esta manera no desarrolla la enfermedad FCE tras la exposición subsecuente a *T. parva* infeccioso. Debido al coste y los problemas de resistencia de la garrapata y de la polución ambiental, el control de estas enfermedades a través de la destrucción acaricida de las garrapatas no es sostenible.

La vacunación, por otra parte, aunque efectiva, se presenta con ciertas deficiencias asociadas con el uso de vacunas vivas. Debido a la facilidad de transmisión de *T. annulata*, la sangre infectada se utilizaba originalmente para inmunizar al ganado mediante el empleo de parásitos de baja virulencia como agente inmunizante. Sin embargo, tales inmunizaciones estaban todavía acompañadas de episodios de infección clínicamente detectables. Con la ventaja del cultivo *in vitro* de *T. annulata* (Sharma y col. (1998) Vet. Parasito/. 79, 135041) y el desarrollo de una gran parte de las técnicas de cultivo en los 1960, se hizo un progreso significativo en la creación de una estrategia de inmunización más práctica. Actualmente, los cultivos de pasajes de *T. annulata* atenuada se utilizan rutinariamente en los programas de vacunación nacional en los países afectados. Por el contrario, esfuerzos similares para inmunizar al ganado contra *T. parva* han resultado ineficientes. Esto se atribuye al fallo de los parásitos de *T. parva* para inducir inmunidad. Además, se requiere un número mucho más elevado de células infectadas con *T. parva* para infectar al ganado de manera fiable, puesto que los esquizontes de *T. parva* se transmiten a una frecuencia baja y las células donantes son rechazadas antes de que se dé la transmisión. *T. lestoquardi* también ha sido cultivada *in vitro* y los estudios han demostrado que se pueden utilizar parásitos atenuados para inmunizar animales con cierto grado de éxito.

Dados los fracasados intentos para inmunizar el ganado con *T. parva* atenuada, los subsecuentes esfuerzos se han centrado en el uso de parásitos virulentos con quimioterapia suplementaria. El fundamento de esta infección y el método de tratamiento (MTI) es permitir el establecimiento de la infección y la supresión del desarrollo de la enfermedad clínica mediante la administración de fármacos teilericidas. Se encontró que los animales así inmunizados estaban protegidos contra el desarrollo de la enfermedad cuando se exponían al parásito homólogo. Esta estrategia de inmunización se ha sometido a sucesivos refinamientos incluyendo el uso de extractos estabilizados y crioconservados de garrapatas trituradas que contienen esporozoitos (la fase infectiva del parásito para los linfocitos del ganado) para estandarizar la dosis de inmunización-infección, así como la administración simultánea de fármaco. Otras mejoras de esta aproximación a la inmunización implican la identificación y uso de una combinación de reservas de parásitos para ampliar el espectro de inmunización de la vacuna contra varias poblaciones del parásito *T. parva*. También se practica el uso de reservas de parásitos locales para inmunizar en las áreas donde han sido aislados. El MTI de inmunización contra *T. parva* se ha probado extensivamente en condiciones de laboratorio y campo y ahora se despliega en la región afectada para controlar la FCE.

El MTI tiene varias limitaciones prácticas que dificultan su aplicación como medida de control sostenible contra la FCE en aquellas áreas geográficas más afectadas por la enfermedad. Estando vivo, requiere una cadena de refrigeradores fríos, que no es práctica en África. El MTI puede también causar la enfermedad clínica si la aplicación del fármaco es inadecuada y tiene el potencial de inducir nuevas cepas de parásito en las áreas bajo la campaña de inmunización. El coste (10-20 US$ por inmunización) de esta vacuna corriente está bien por encima del presupuesto de los granjeros de recursos insuficientes con ganado afectado por la FCE, debido tanto al coste de los fármacos como a la necesidad de un veterinario entrenado para administrar la vacuna. Debido a estos asuntos asociados con el protocolo de vacunación MTI, un gran acuerdo de inversión ha sido poner en investigación el desarrollo de una vacuna que sea sostenible y asequible.

Se han identificado los antígenos de muchos protozoos parásitos que inducen una respuesta de anticuerpos protectora contra el desarrollo de enfermedades. Por ejemplo, la importante proteína de superficie de los merozoitos de la especie *Plasmodium* ha mostrado ser una diana de grado variable de inmunidad protectora contra las fases sanguíneas asexuales de malaria en roedores y humanos. La vacunación de ratones con P230 purificado, la importante proteína de superficie de la malaria de roedor *Plasmodium yoelii*, ha resultado en parasitemias reducidas en comparación con controles sometidos a vacunación intravenosa con una dosis letal de eritrocitos parasitados (Holder y col. 1981. Nature 294:361). Los ratones han sido también protegidos contra *P. yoelii* mediante una transferencia pasiva de un anticuerpo monoclonal (Mab) específico para P230 (Majarian y col. 1984. J. Immunol. 132:3131). Los ratones también han sido inmunizados contra la infección de *Plasmodium chabaudi* adami (malaria de roedores), mediante inmunización pasiva con un anticuerpo monoclonal específico para la molécula homóloga de 250 kDa de esta especie *Plasmodium* (Lew y col. 1989. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:3768).

Una glicoproteína de 67 kDa (p67) de la superficie del esporozoito *T. parva* se ha aislado (patente americana 5273744) y utilizado en una variedad de protocolos de inmunización, con poco éxito reportado hasta ahora, en el desarrollo de niveles prácticos de resistencia a la enfermedad mediadas por inmunidad. Sin embargo, las reses que se recuperan de una infección sencilla con esporozoitos de *T. parva* resisten la infección al someterse a una exposición homóloga. Tales animales tienen una débil respuesta de anticuerpos y células T a p67. Existe la necesidad de identificar los antígenos de *T. parva* que pueden inducir los linfocitos T citotóxicos $CD8^+$ restringidos por MHC de clase I específicos de antígeno (CTLs).

McKeever y Morrison (1998; International Journal of Parisotology 28: 693-706) describen una subunidad de vacuna de primera generación para la fiebre de la Costa Este basada en el antígeno de la superficie del esporozoito p67 de *Theileria parva* que está entrando en los ensayos de campo preliminares.

Resumen de la invención

En un aspecto, la presente invención proporciona un polipéptido aislado que comprende una secuencia representada por Nº ID SEC: 1, o cualquiera de los N^{os} ID SEC de 4 a 7.

En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica, que comprende un polipéptido de la presente invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Se proporciona, en otro aspecto de la presente invención, una composición inmunogénica que comprende un polipéptido de la presente invención y, opcionalmente, un adyuvante, siendo la composición inmunogénica.

En otro aspecto, la presente invención proporciona una vacuna, que comprende uno o más polipéptidos de la presente invención y, opcionalmente, un adyuvante; donde se diga polipéptido es inmunogénico.

Se proporciona, en otro aspecto, un método para producir un polipéptido que estimula un linfocito citotóxico específico del antígeno *T. parva* (CTL), que comprende el cultivo de una célula huésped, en donde dicha célula huésped comprende un vector que contiene una construcción recombinante que comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido de acuerdo con la presente invención, unido operativamente a una secuencia de control de expresión, en donde dicha célula huésped se cultiva bajo condiciones efectivas para producir un polipéptido codificado por un polinucleótido, y recoger el polipéptido.

Además, se proporciona en otro aspecto de la presente invención un anticuerpo específico para el polipéptido de la presente invención.

Se proporciona, en otro aspecto de la presente invención, un kit para detectar la presencia de *T. parva* en una muestra sospechosa de contener *T. parva*, o para purificar *T. parva* de una muestra que contenga *T. parva*, que contiene un anticuerpo de acuerdo con la presente invención.

En otro aspecto, la presente invención proporciona el uso de un polipéptido de acuerdo con la presente invención, o un vector que comprenda una construcción recombinante que contenga un polinucleótido que codifica a un polipéptido de acuerdo con la presente invención, unido operativamente a una secuencia de control de expresión, o una célula huésped que contenga un vector que comprenda una construcción recombinante que contenga un polinucleótido que codifica un polipéptido de acuerdo con la presente invención, unido operativamente a una secuencia de control de expresión, en la preparación de un medicamento para la prevención y/o tratamiento de la infección por *T. parva*.

La presente invención proporciona, en otro aspecto, un procedimiento para preparar un anticuerpo policlonal, que comprende inmunizar un animal con uno o más polipéptidos de la presente invención; y la recuperación del suero del animal.

La presente invención proporciona, en otro aspecto, un método para preparar un anticuerpo policlonal, que consiste en inmunizar un animal con una célula huésped; donde se dice célula huésped, comprende un vector que contiene una construcción recombinante que contiene un polinucleótido que codifica un polipéptido de acuerdo con la presente invención, unido operativamente a una secuencia de control de expresión; y la recuperación del suero del animal.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para preparar un anticuerpo monoclonal, que comprende:

(a) inmunizar a un animal con un polipéptido de acuerdo con la presente invención,

(b) recuperar las células del animal que producen el anticuerpo que se une al polipéptido,

(c) preparar un hibridoma con las células aisladas en (b), y

(d) recuperar un anticuerpo monoclonal del hibridoma que se una al polipéptido en (a).

En otro aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento para preparar un anticuerpo monoclonal, que comprende:

(a) inmunizar un animal con una célula huésped; en donde dicha célula huésped comprende un vector que contiene una construcción recombinante que comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido de acuerdo con la presente invención, unido operativamente a una secuencia de control de expresión.

(b) recuperación de las células del animal que producen el anticuerpo que se une a un polipéptido producido por la célula huésped,

(c) preparación de hibridomas con las células aisladas en (b), y

(d) recuperación de un anticuerpo monoclonal del hibridoma que une al polipéptido en (b).

Se proporciona, en otro aspecto de la presente invención, el uso de un anticuerpo de acuerdo con la presente invención en la preparación de una composición para el diagnóstico de infección por *T. parva* en una muestra.

Se proporciona, en otro aspecto de la presente invención, una vacuna que comprende un vector que contiene una construcción recombinante que comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido de acuerdo con la presente invención, unido operativamente a una secuencia de control de expresión.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un vector que contiene una construcción recombinante que comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido de acuerdo con la presente invención, unido operativamente a una secuencia de control de expresión.

La descripción está relacionada con, por ejemplo, procedimientos para la identificación de antígenos de parásitos, tales como antígenos de *Theileria parva*, que estimulan respuestas de linfocitos T citotóxicos específicos de antígeno (CTL) (por ejemplo, para inducir inmunoprotección contra *T. parva* en especies bovinas); y composiciones identificadas mediante este procedimiento (por ejemplo, que pueden ser usadas para generar una respuesta protectora en el ganado, para resistir el desarrollo de la enfermedad de FCE, cuando son infectados subsecuentemente con material *T. parva* infeccioso). Más particularmente, el procedimiento incluye pasos en los que secuencias de polinucleótidos que codifican al antígeno candidato se identifican mediante alineamiento convencional de secuencias nucléicas y programas de análisis, que han sido ajustados utilizando información de secuencias de polinucleótidos, que utilizan secuencias de polinucleótidos que se conoce que codifican antígenos de *T. parva* que estimulan las CTLs de manera específica al antígeno. Los antígenos y epítopos candidatos y las secuencias de nucleótidos que codifican o resultan en la producción de estos antígenos y/o epítopos candidatos, que fueron identificados, se pueden utilizar, por ejemplo, para estimular las CTLs y para inmunizar satisfactoriamente al ganado contra la infección con la exposición subsecuente a *T. parva* expresando tales antígenos.

En otro refinamiento de las propiedades antigénicas de los polipéptidos codificados por secuencias de nucleótidos identificadas de tal manera, las secuencias de nucleótidos se transfectan en células en donde la estimulación de los linfocitos que responden a las células transfectadas por estos nucleótidos que codifican al antígeno parásito se mide de una manera de alto rendimiento, mediante la liberación de factores solubles, tales como el interferón gamma, utilizando tanto un ensayo elispot de anticuerpo o un bioensayo empleando células endoteliales. El uso de fibroblastos de piel inmortalizados (iSF, del inglés: *immortalized skin fibroblast*) de animales no consanguíneos que se han recuperado de una exposición, como células que presentan el antígeno, confirma la identificación del antígeno, especialmente donde los genes de clase I MHC bovinos clonados no están disponibles para la co-transfección en células COS-7.

Un aspecto mencionado aquí es un polipéptido aislado, que comprende una secuencia representada por uno de Nº ID SEC: 1 hasta Nº ID SEC: 7. Tales polipéptidos aislados se refieren a veces en el presente documento como "polipéptidos descritos aquí". En las realizaciones, un polipéptido aislado descrito en el presente documento está en cantidades detectables en aislados de *T. parva*; y/o consiste en un antígeno de *T. parva*.

Otro aspecto mencionado en el presente documento es una composición farmacéutica, que comprende un polipéptido descrito en el presente documento y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable. Otro aspecto mencionado aquí es una composición inmunogénica, que comprende uno o más polipéptidos descritos aquí y, opcionalmente, un adyuvante. La composición inmunogénica puede estimular las células T citotóxicas específicas al polipéptido; y/o

contener un epítopo que estimula las células T citotóxicas específicas de *T. parva*. Otro aspecto mencionado en el presente documento es una vacuna, que consiste en uno o más polipéptidos descritos aquí y, opcionalmente, un adyuvante. En una realización, la vacuna protege a un animal contra la infección de *T. parva*.

Otro aspecto mencionado en el presente documento es un polinucleótido aislado que comprende:

(a) una secuencia representada por uno de Nº ID SEC:25 hasta Nº ID SEC:31;

(b) una secuencia que sea al menos un 90% idéntica a una secuencia de (a);

(c) una secuencia que se hibrida bajo condiciones de elevada astringencia, a un polinucleótido que comprende una secuencia de (a);

(d) una secuencia que codifica un polipéptido representado por las secuencias de Nº ID SEC:1 a Nº ID SEC:7; o

(e) un complemento de cualquiera de (a), (b), (c) o (d). Tales polinucleótidos aislados se refieren a veces en el presente documento como "polinucleótidos descritos aquí".

Otros aspectos descritos en el presente documento incluyen una composición farmacéutica que comprende un polinucleótido descrito en el presente documento y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable; una construcción recombinante que comprende un polinucleótido descrito aquí, que está unido operativamente a una secuencia de control de expresión; y un vector que contiene dicha construcción. El término "unido operativamente" se refiere a una unión funcional entre una secuencia de control de expresión de un ácido nucleico (tal como un promotor, o un chip de expresión de sitio de unión a factores de trascripción) y una segunda secuencia de ácido nucleico, en donde la secuencia de control de expresión dirige la trascripción del ácido nucleico que corresponde a la segunda secuencia. Un vector mencionado en el presente documento puede además consistir en una o más secuencias que codifican un marcador de selección; y el vector puede consistir en un plásmido, un bacteriófago, un minicromosoma o un vector de un virus eucariótico. El marcador de selección puede ser una secuencia de nucleótidos que, cuando se incorpora y expresa, proporciona resistencia a un antibiótico como la geneticina (G418), la penicilina, la tetraciclina, u otros tipos de marcadores de selección tales como resistencia a metotrexato, expresión de un gen de la metalotioneína o un gen de la luciferasa. Otro aspecto mencionado en el presente documento es una célula huésped (por ejemplo, una célula procariótica o una célula eucariótica) que comprenda un polinucleótido o un vector descrito aquí. Otro aspecto mencionado en este documento es un procedimiento para producir un polipéptido que estimula a linfocitos citotóxicos específicos del antígeno de *T. parva* (CTL), que comprende el cultivo de una célula huésped mencionada aquí en condiciones efectivas para producir un polipéptido codificado por el polinucleótido, y la recogida del polipéptido.

Otro aspecto mencionado en el presente documento es un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo policlonal o un anticuerpo monoclonal) específico para un polipéptido descrito aquí. En una realización, el anticuerpo está acoplado a un vehículo y/o una etiqueta.

Otro aspecto mencionado en este documento es un procedimiento para preparar un anticuerpo policlonal, que comprende inmunizar un animal no humano con uno o más polipéptidos descritos aquí o con células que contienen polinucleótidos o vectores descritos aquí. Otro aspecto descrito aquí es un procedimiento para preparar un anticuerpo monoclonal, que comprende (a) inmunizar un animal no humano con un polipéptido descrito aquí; (b) recuperar las células del animal no humano que producen anticuerpos que se unen al polipéptido; (c) preparar un hibridoma con las células aisladas en (b), y (d) recuperar un anticuerpo monoclonal a partir del hibridoma que se une al polipéptido en (a). Otro aspecto mencionado aquí es un procedimiento para preparar un anticuerpo monoclonal, que comprende: (a) inmunizar un animal no humano con una célula huésped que contiene un polinucleótido o vector descrito aquí; (b) recuperar las células del animal no humano que producen el anticuerpo que se une a un polipéptido producido por la célula huésped; (c) preparar hibridomas con las células aisladas en (b), y (d) recuperar un anticuerpo monoclonal a partir del hibridoma que se une al polipéptido en (b).

Otro aspecto mencionado aquí es un kit para detectar la presencia de *T. parva* en una muestra sospechosa de contener *T. parva*, o para purificar *T. parva* de una muestra que contiene *T. parva*, que comprende un anticuerpo mencionado aquí. La detección de *T. parva* en una muestra puede requerir lisis celular o solubilización de la membrana celular mediante métodos estándar, tales como, pero no limitados a, el uso de detergentes no desnaturalizante o los parecidos. El kit puede además comprender medios para realizar un ensayo de unión a enzima o transferencia Western para detectar la presencia de *T. parva*; y/o medios para unir el anticuerpo a *T. parva* en la muestra, y para liberar al organismo del anticuerpo.

Otro aspecto mencionado en el presente documento es un método para proteger un animal contra la infección por *T. parva*, que consiste en administrar al animal un polipéptido descrito aquí bajo condiciones efectivas para que el animal genere un anticuerpo protector contra el polipéptido, o efectiva para el animal para generar CTLs específicas para el antígeno de *T. parva*. Otro aspecto mencionado aquí es un procedimiento para proteger un animal contra la infección de *T. parva*, que comprende la administración al animal de una célula que contiene un polinucleótido o vector de los que se describen aquí, bajo condiciones efectivas para el animal para generar un anticuerpo protectivo contra el polipéptido codificado por el polinucleótido (expresado a partir del polinucleótido), o efectivas para el animal

para generar las respuestas de CTL CD8+ y el auxiliar CD4+ específicos del antígeno *T. parva*. Una "respuesta de CTL CD8+" significa que la estimulación de las CTL CD8+ puede detectarse midiendo la liberación de un factor, tal como un factor soluble u otra respuesta como la lisis de la célula que muestra al antígeno.

Otro aspecto mencionado aquí es un procedimiento para detectar una infección patogénica por protozoo en un sujeto, que consista en poner en contacto los monocitos de la sangre periférica del sujeto con linfocitos T citotóxicos estimulados por el péptido-antígeno, en donde los linfocitos T citotóxicos se obtienen de un animal al que se le han administrado uno de los polipéptidos descritos aquí, bajo condiciones efectivas para el animal para generar las CTLs específicas del antígeno de *T. parva*, o efectivas para el animal para generar la respuesta de linfocitos T citotóxicos CD8+ y el auxiliar CD4+ específico del antígeno de *T. parva*. Otro aspecto mencionado en el presente documento es un procedimiento para detectar *T. parva* en una muestra sospechosa de contener *T. parva*, que comprende detectar en la muestra un polinucleótido descrito aquí. Cualquiera de los procedimientos mencionados aquí, incluyendo estos procedimientos de detección, pueden ser procedimientos de alto rendimiento.

Otro aspecto mencionado en este documento es un procedimiento para identificar *T. parva* en una muestra sospechosa de contener *T. parva*, que consiste en poner en contacto la sangre con un anticuerpo mencionado aquí, bajo condiciones efectivas para el anticuerpo para unirse específicamente a su antígeno conocido, y detectar la presencia de anticuerpo unido. En las realizaciones que se mencionan en el presente documento, la detección se lleva a cabo mediante inmunoensayo enzimático, radioinmunoensayo, inmunoensayo por fluorescencia, floculación, aglutinación de partículas, microfluorimetría de flujo, un ensayo de competición, o ensayo cromogénico *in situ*; el anticuerpo es tanto un anticuerpo monoclonal o un anticuerpo policlonal; el ensayo es cuantitativo; o el ensayo es de alto rendimiento.

Otro aspecto mencionado en este documento es un procedimiento para la identificación de antígenos de parásito, seleccionados a partir antígenos candidatos, que son dianas de los linfocitos T citotóxicos u otras respuestas inmunes, que comprenden el co-cultivo de líneas celulares de fibroblastos inmortalizados transfectados con el ADN-c recogido de un patógeno, con clones de las líneas de células T citotóxicas, generadas en un animal que ha sido inmunizado, mediante infección y tratamiento con el patógeno y probando el sobrenadante del co-cultivo para la presencia de un factor soluble, tal como una citoquina, por ejemplo, el interferón gamma; el patógeno es un organismo protozoario (por ejemplo, un organismo del género Theileria, tal como *T. parva*); la línea de los fibroblastos es de origen bovino; o la línea de los fibroblastos de origen bovino presenta antígenos de MHC de clase I.

En otra realización, los polinucleótidos codifican al antígeno de *T. parva*, un procedimiento para la identificación de antígenos de parásito candidatos, que son dianas de linfocitos T citotóxicos u otras respuestas inmunes, que consisten en utilizar un barrido del genoma convencional y métodos de alineamiento tales como "GlimmerM" y "phat" en los que la información sobre la secuencia de los antígenos candidatos que causan la estimulación de las CTLs se utiliza para refinar el barrido del genoma y los métodos de alineamiento. Esta identidad de secuencia puede ser optimizada mediante comparación de secuencias y algoritmos de alineamiento conocidos en el campo (ver Gribskov y Devereus, Sequence Analysis Primer, Stockton Press, 1991 y las referencias citadas en el mismo) y calculando la diferencia en porcentaje entre las secuencias de nucleótidos mediante, por ejemplo, el algoritmo de Smith-Waterman como está implementado por ejemplo en el programa de software BESTFIT utilizando los parámetros por defecto (por ejemplo, Grupo de Computación Genética de la Universidad de Wisconsin).

Una realización adicional mencionada en el presente documento es un procedimiento de utilización de secuencias de nucleótidos, que se ha demostrado que codifican antígenos de *T. parva* que estimulan las CTLs, para identificar otros antígenos estimuladores de las CTLs candidatos a partir de la información de la secuencia de nucleótidos, tales como secuencias de cóntigos o la secuencia completa del genoma aisladas de un organismo utilizando técnicas tales como la hibridación bajo condiciones muy astringentes, o bajo otras condiciones que permitan la identificación de secuencias con un 95%-97% de homología con secuencias conocidas.

Como se conoce que la *T. parva* causa una respuesta linfoproliferativa en animales infectados que se parece a varios linfomas de células T, leucemias y otros cánceres linfocíticos, las proteínas de *T. parva* ahora identificadas, por ejemplo podrían tener utilidad en la formulación de composiciones contra el cáncer, por ejemplo, proteínas antigénicas podrían tener utilidad en esquemas de prevención, a través de los cuales antígenos radiactivamente marcados competirían por los sitios de unión intracelulares o extracelulares para destruir las células que sufren linfoproliferación. Los antígenos de *T. parva* mencionados en el presente documento son también candidatos para un procedimiento para prevenir la linfoproliferación mediante la ayuda en la identificación y preparación de pequeñas moléculas que manipulen las vías de señalización dirigidas por proteínas de parásito.

Descripción de los dibujos

Fig. 1 es una gráfica que demuestra la detección por elispot de IFN-gamma de la respuesta de CTL restringidas por BoLA de clase I a células infectadas por esquizontes.

Los TpM autólogos se pre-incubaron en placas elispot con anticuerpos monoclonales específicos para BoLA de clase I, BoLA de clase II o CD21 bovinas (control isotipo) antes de la adición de CTL policlonales específicos de esquizontes. Las células se co-cultivaron durante 20 horas antes de que las placas fuesen reveladas. La producción de IFN-gamma se presenta como el número medio de células que forman manchas (CFM)/pocillo.

Fig. 2A es una gráfica que indica la sensibilidad del elispot de IFN-gamma para detectar el reconocimiento de los CTL de células infectadas por esquizontes cuando se varía el aporte de CTL en respuesta a TpM titulado en células COS-7; La Fig. 2B es una gráfica que indica la habilidad de la prueba de elispot para detectar respuestas a números muy pequeños de TpM, utilizando un aporte de CTL de 10.000/pocillo. La Fig. 2C muestra el efecto de titular TpM en células COS-7, cuando SF o iSF primarios autólogos se examinaron y se encontró que no tenían efecto en el fondo o en la sensibilidad del ensayo de elispot. La producción del IFN-gamma se presenta como el número medio de células que forman manchas (CFM)/pocillo.

Fig. 3 es una gráfica que muestra los resultados generados cuando los fibroblastos de piel inmortalizadas transfectadas con Tp2 seleccionados (iSF) se utilizaron para estimular las líneas de CTL policlonales CD8+ de BW002, BW014 y el clón nº 10 de D409. El reconocimiento del gen nº 5 seleccionado (conocido también como, Tp2) que transfecta iSF mediante las líneas de CTL policlonales CD8+ de BW002 (BW2), BW014 (BW14) y el clón nº 10 de D409, se cuantificó mediante el co-cultivo de las células transfectadas con CTLs. Las iSF se transfectaron con genes seleccionados, cultivados con CTL y el reconocimiento se evaluó mediante elispot de IFN-gamma. Las respuestas se presentaron como el número medio de células que forman manchas (CFM)/pocillo.

Fig. 4 es una gráfica que indica la lisis de iSF autóloga (BW002) y alogénica (BV050) mediante la línea de CTL CD8+ policlonal BW002 específica de esquizontes. El Tp5 que transfectó a iSF autóloga también sirvió como control negativo. Se evaluó la restricción de BoLA de clase I mediante preincubación de iSF transfectada con Tp2 con un mAc de MHC de Clase I anti-BoLA (bloqueo de clase I). Los datos se expresan como el porcentaje de células que se han lisado.

Fig 5A, Fig. 5B, y Fig 5C indican las respuestas específicas de las células T CD8+ con Tp2 que siguen a una infección del ganado inmune. Tres reses inmunes a FCE, 5A (BW002), 5B (BW013), y 5C (BW014), de los que se han generado líneas CTL específicas de esquizonte y han mostrado reconocer Tp2, se infectaron con una dosis letal de esporozitos de *T. parva* (Mugaga). La sangre periférica se recogió diariamente entre los días 7-13 tras la infección, y se purificaron las células T CD8+ y los monocitos. Las respuestas a los péptidos Tp2 que contienen los epítopos de CTL previamente identificados (positivos o "ve") o los péptidos de control se evaluaron mediante co-cultivo de las células T CD8+ y los monocitos en presencia de 1 mg/ml de péptido y midiendo la liberación de IFN-gamma mediante Elispot. Las respuestas a TpM autólogo se incluyeron como control positivo. Las respuestas se presentan como el número medio de células que forman manchas (CFM)/pocillo.

Fig. 6 es una gráfica que muestra la cartografía de los epítopos de CTL con Tp2 utilizando péptidos sintéticos. Se sintetizaron ochenta y cuatro péptidos dodecaméricos que se solapaban mediante dos aminoácidos y que abarcaban la longitud entera de Tp2 y se utilizaron a una concentración final de 1 ug/ml para estimular iSF autólogos. El reconocimiento de iSF estimulado con péptido mediante líneas policlonales CD8+ de BW013 y BW014, y el clón nº 10 de D409, evaluado mediante elispot IFN-gamma., indicó que el péptido nº. La producción de IFN-gamma se presenta como el número medio de células que forman manchas (CFM)/pocillo

Fig. 8 es una gráfica de datos que indica la lisis de iSF autólogos estimulados por el péptido sintético Tp2 mediante el clón nº 10 de CTL de D409 específico para esquizontes. Los iSF de D409 se estimularon durante toda la noche con el epítopo Tp2 que contiene el péptido dodecamérico nº 77; (Nº ID SEC: 14) o con un péptido dodecamérico control nº 36; (Nº ID. SEC: 15) a una concentración final de péptido de 1 ug/ml. Los TpM autólogos y alogénicos (4229) se incluyeron como un control positivo y negativo. Los datos de expresan como el porcentaje de células estimuladas con péptido que se lisaron.

Fig. 9 es una gráfica que indica la lisis de iSF autólogos estimulados por el péptido sintético Tp2 mediante la línea CTL CD8+ policlonal de BW014 específica de esquizonte. Los iSF de BW014 se estimularon durante toda la noche con el péptido nonamérico con el epítopo Tp2 nº75, (Nº ID. SEC: 16) o un péptido control nonamérico de Tp2 nº76, (NºID SEC: 17) a una concentración final de péptido de 1 ug/ml. Los TpM autólogos y alogénicos (F100) se incluyeron como controles positivo y negativo. Los datos de expresan como el porcentaje de células estimuladas con el péptido que se lisaron.

Fig. 10 muestra la longitud mínima del epítopo Tp2.1 que estimula a CTL, presente en el polipéptido Tp2 como se establece mediante el uso de los grupos de péptidos superpuestos en el ensayo de Elispot. Los fibroblastos inmortalizados autólogos (iSF) o las células P815, expresan de manera estable HD6 BoLA de Clase I (P815-HD6) o JSP-1 (P815-JSP-1) se estimularon con polipéptidos nonaméricos solapados representados por el Nº ID SEC: 4, 16, y 17 y el octámero Nº ID SEC: 18. Las células estimuladas se probaron para la liberación de IFN-gamma utilizando el ensayo de Elispot. Las respuestas se presentan como los números medios de células que forman manchas (CFM)/pocillo.

Fig. 11 muestra la mínima longitud de los epítopos Tp2.2 que estimulan CTL, presente en el polipéptido Tp2 como se establece mediante el uso de grupo de péptidos solapados en un ensayo de Elispot. Los fibroblastos inmortalizados autólogos (iSF) o células P815, que expresan de manera estable HD6 BoLA de Clase I (P815-HD6) o JSP-1 (P815-JSP-1) se estimularon con polipéptidos nonaméricos representados mediante Nº SEC ID: 5 (Epítopo 2 Tp2 (Tp2.2)) y 16 (péptido sintetizado nº 75, residuos de aminoácidos 97-105 de Tp2), y el octámero con Nº ID SEC: 21 (residuos de aminoácidos 97-104 de Tp2). Los péptidos mostrados en la figura, de izquierda a derecha, son Nº ID SEC: 20, SEC: 5 y NO: 16. Las células estimuladas se probaron para la liberación de IFN-gamma utilizando el ensayo de Elispot. Las respuestas se presentan como los números medios de células que forman manchas (CFM)/pocillo.

Fig. 12 muestra la longitud mínima de los epítopos Tp2.3 que estimulan CTL, presente en el polipéptido TP2 como se establece mediante el uso de grupos de péptidos que se solapan en un ensayo Elispot. Los fibroblastos inmortalizados autólogos (iSF) o células P815, que expresan de manera estable HD6 BoLA de Clase I (P815-HD6) o JSP-1 (P815-JSP-1) se estimularon con polipéptidos decaméricos solapados representados mediante Nº ID SEC: 13 (un péptido de Tp2) y 20 (residuos de aminoácidos 49-58 de Tp2), y el undecámero con Nº ID SEC: 6 (epítopo 3 de Tp2 (Tp2.3). Los péptidos mostrados en la figura, de izquierda a derecha, son Nº ID SEC: 13, SEC: 6 y SEC: 20. Las células estimuladas se probaron para la liberación de IFN-gamma utilizando el ensayo de Elispot. Las respuestas se presentan como los números medios de células que forman manchas (CFM)/pocillo.

Fig. 13 muestra la longitud mínima de los epítopos Tp2.4 que estimulan CTL, presente en el polipéptido TP2 como se establece mediante el uso de grupos de péptidos que se solapan en un ensayo Elispot. Los fibroblastos inmortalizados autólogos (iSF) o células P815, que expresan de manera estable HD6 BoLA de Clase I (P815-HD6) o JSP-1 (P815-JSP-1) se estimularon con polipéptidos dodecaméricos que se solapan representados mediante el Nº ID SEC: 8 (un péptido de Tp2), 22 (residuos de aminoácido 97-104 de Tp2), 23 (residuos de aminoácido 28-39 de Tp2) y la secuencia undecamérica Nº ID SEC:7 (epítopo 4 de Tp2 (Tp2.4)). Los péptidos mostrados en la figura, de izquierda a derecha, son Nº ID SEC: 22, SEC: 8 y SEC: 23 y Nº:7. Las células estimuladas se probaron para la liberación de IFN-gamma utilizando el ensayo de Elispot. Las respuestas se presentan como los números medios de células que forman manchas (CFM)/pocillo.

Fig. 14 es una gráfica que indica la lisis de iSF autólogos estimulados con péptido Tp2 mediante PBMC estimuladas con TpM. Las PBMC de BW002 se recogieron 14 días tras la infección y se co-cultivaron durante 7 días con TpM autólogo. Las células se probaron para su utilidad para lisar iSF autólogos estimulados con el péptido Tp2 utilizando un ensayo de liberación de Cromo^{51}. Los iSF se estimularon durante toda la noche con un péptido dodecamérico de Tp2 que se sabe que contiene un epítopo de CTL (nº 43; positivo (péptido +ve)) o un péptido de control dodecamérico Tp2 (nº 40; péptido control) a una concentración de 1 ug/ml. TpM autólogo y alogénico (F100) se incluyó como controles positivo y negativo. Los datos se expresan como el porcentaje de células estimuladas con péptido que se rompen.

Fig. 15A y Fig. 15B representa una fotografía de un gel de agarosa que muestra la expresión de la proteína antígeno Tp2 de *T. parva*. La proteína recombinante se aisló mediante Ni-NTA agarosa y se migró en geles SDS-PAGE al 12%. En la figura 15A las proteínas que están presentes en el gel se tiñen con azul Coomassie. En la figura 15B se utiliza un anticuerpo anti-etiqueta-His para teñir específicamente la proteína expresada Tp2 etiquetada con His (inmunotransferencia).

Fig. 16 es una fotografía de un análisis SDS-PAGE (12,5%) de una sobre-expresión del recombinante Tp3 en *E. coli*.

El ORF (marco abierto de lectura) del Tp3 con dianas 5' *BamH* I y 3'*BGII* I se amplificó mediante PCR y se clonó en un vector plasmídico pQE-16 (Qiagen) a partir del cual el fragmento DFHR se eliminó utilizando BamHI y BgIII. El plásmido recombinante se transformó en la cepa JM109 de *E. coli* y las bacterias se plaquearon en agar. Se seleccionaron dos colonias (Tp3-1 y Tp3-2) para la sobre-expresión como se describe en la sección de Ejemplos. Tp3-1 se expresó en medio LB (Tp3-Ia) o en 2X YT (Tp3-1b) mientras Tp3-2 se expresó sólo en medio LB. Las alícuotas de las midi-preps de los cultivos se separaron utilizando electroforesis en gel SDS-PAGE (12,5%) Las proteínas en el gel resultante se tiñeron con azul de Coomassie. Se utilizó como control una proteína de 50 kDa irrelevante (TLTF). El carril PM es el marcador de tamaño indicado en kiloDaltons (kDa).

Fig. 17 es una fotografía de un análisis SDS-PAGE (12,5%) del recombinante Tp6. Un fragmento parcial (70%) de Tp6 se amplificó mediante PCR y se clonó en un vector plasmídico pQE-16 (Qiagen). El plásmido recombinante se transformó en *E. coli* JM109. Se identificaron varias colonias para sobre-expresión. La proteína se purificó utilizando un anticuerpo anti-etiqueta-his y luego se analizó utilizando electroforesis SDS-PAGE, seguida de la tinción de las proteínas en el gel de poliacrilamida con azul de Coomassie. Los marcadores de tamaño se indican en kiloDaltons (kDa).

Fig. 18 indica el nivel de respuesta de CTL a varios antígenos Tp, siguiendo protocolos de inmunización VC (mediado por viruela de canario)/VAM (mediado por el vector del virus vaccinia Ankara modificado). Los datos indican la producción de CD8 (CTLs) específicas de antígeno *T. parva* en los animales que siguen los protocolos de inmunización con vectores virales de la viruela de canario, que expresan el antígeno de *T. parva*. Las respuestas se presentan como los números medios de células que forman manchas (CFM)/pocillo.

Fig. 19 indica el nivel de respuesta de CTL a varios antígenos Tp, siguiendo protocolos de inmunización ADN/VAM. Los datos indican la producción de CD8 (CTLs) específicas de antígeno *T. parva* en los animales que siguen los protocolos de inmunización con vectores virales de Vaccinia (Ankara) modificada, que expresan el antígeno de *T. parva*. Las respuestas se presentan como los números medios de células que forman manchas (CFM)/pocillo.

Fig. 20 indica los datos de control para protocolos de inmunización VC/VAM y ADN/VAM, en los que a las reses se le suministraron inyecciones de tampón salino fosfato en lugar de antígenos Tp. Los datos experimentales de control para medir el desarrollo de CTLs después de la inmunización indican una falta de células CD8+ específicas de antígeno de *T. parva* en los animales inmunizados con PBS. Las respuestas se presentan como el número medio de células que forman manchas (CFM)/pocillo.

Descripción detallada

Los linfocitos T citotóxicos CD8+ restringidos por MHC de clase I (CTLs) son responsables de proteger al ganado contra una infección letal con Theileria parva (*T. parva*), esporozoitos (Morrison, Taracha y McKeever, 1995). Estas CTLs están dirigidas hacia células infectadas por esquizontes, que éstas reconocen y lisan. Los antígenos de esquizontes que son reconocidos por estas CTLs $CD8^+$ son los candidatos principales para la inclusión en una vacuna de subunidad para la prevención de la enfermedad de la Fiebre de la Costa Este (FCE).

Los ejemplos del presente documento ilustran la identificación de una variedad de antígenos que son adecuados para su uso en vacunas de subunidades.

Se proporcionan polinucleótidos, y nuevos procedimientos para su identificación, que codifican proteínas y péptidos que son dianas de linfocitos T $CD8^+$ citotóxicos específicos de antígeno que han mostrado ser protectores frente a una infección de FCE en experimentos de transferencia adoptiva de células. La inmunización experimental de ganado con estos antígenos o sistemas celulares con vectores virales recombinantes que producen estos antígenos, ha estimulado la producción de respuestas de las células T específicas de antígeno en los animales inmunizados.

Las proteínas identificadas mediante el nuevo procedimiento pueden ser también utilizadas como antígenos para estimular la producción de anticuerpos. Tales anticuerpos son útiles para la detección de la presencia de un antígeno estimulador, en tejidos y fluidos animales. La presencia de tal antígeno indicaría infección del animal mediante organismos que producen o llevan al antígeno. Por ejemplo, en una realización mencionada en el presente documento la infección de un animal mediante *T. parva* se detecta mediante anticuerpos producidos como resultado de utilizar los péptidos codificados mediante secuencias de polinucleótidos, como antígenos para estimular la producción de tales anticuerpos.

El genoma nuclear de *T. parva* consiste en 4 cromosomas y tiene aproximadamente 8,2 Mb de longitud. El genoma de *T. parva* se secuenció utilizando una estrategia de "*shotgun*" de genoma completo. El ADN genómico de *T. parva* (clón Muguga) se cortó y clonó dentro de vectores plasmídicos. Se secuenciaron ambos extremos de clones seleccionados al azar. Se obtuvieron un total de 152.226 secuencias con una longitud leída media de 623 nt, equivalente a una cobertura de 9,48 veces asumiendo un tamaño del genoma de 10 Mb. El montaje de las secuencias con "TIGR Assembler" produjo un grupo de cóntigos preliminares que representaba el 95% de la secuencia del genoma para comenzar el proceso de identificación de antígenos de esquizontes. Los cóntigos preliminares se cargaron en una base de datos y se sometieron a un proceso automático que buscaba los cóntigos de *T. parva* contra una base de datos no redundante de proteínas extraídas del GenBank (llamado "nraa". Los resultados de la búsqueda se utilizaron para producir un grupo de modelos genéticos que codificaban proteínas similares a aquellas en otros organismos. Este grupo de modelos genéticos y datos de la secuencia de 164 clones de ADN-c, se utilizaron para entrenar a los programas buscadores de genes "GlimmerM" y "phat", que se utilizaron subsecuentemente contra todos los cóntigos preliminares para producir modelos genéticos para la secuencia genómica preliminar completa. Un programa llamado "Combiner" se utilizó entonces para evaluar los modelos genéticos predichos, el ADN-c y los alineamientos de proteínas para producir modelos genéticos consenso.

Las proteínas codificadas mediante los genes de *T. parva* fueron sometidos a varios análisis tal como búsqueda en base de datos ("blastp"), predicciones de péptidos señal y anclas señal ("SignalP 2.0"), y dominios transmembrana ("TMHMM"). Los resultados se revisaron y se seleccionó un grupo de unos 55 genes que codificaban a antígenos candidatos para hacer un barrido de inmunogenicidad, así como se probaron mediante estimulación de líneas de células T citotóxicas clonadas. Cuando estas secuencias de genes se exploraron, esto llevó a la identificación de los antígenos aquí referidos como Tp2 (Nº ID SEC: 1), Tp3 (Nº ID SEC: 2), y Tp6 (Nº ID SEC: 3). Las secuencias de ácido nucleico que codifican a Tp2, Tp3 y Tp6 se representan por los N^{os} ID SC: 25, 26 y 27 respectivamente.

Los antígenos candidatos codificados mediante secuencias de polinucleótidos, clonados a partir de genes expresados de *T. parva*, se confirmaron mediante la utilización de líneas celulares de fibroblastos de piel bovina clonadas inmortalizadas para estimular la activación de los linfocitos T CD8+ citotóxicos mediante antígeno cuando la estimulación se mide mediante la liberación de factores solubles, más específicamente el interferón gamma. La descripción también está relacionada con composiciones aisladas mediante procedimientos que incluyen uno o más de estos pasos particulares y el uso de estas composiciones: para estimular o inducir células T citotóxicas, como reactivos de diagnóstico para la detección de enfermedad o de respuesta inmune, en kits o en procedimientos o ensayos en "chip" de alto rendimiento, para la detección de o expresión de ácidos nucleicos homólogos o idénticos. En otras realizaciones preferidas, los antígenos identificados son útiles para la inmunización de animales para la producción de CTLs que reconocen *T. parva*.

La presente descripción identifica a grupos de secuencias de polinucleótidos que codifican antígenos de *T. parva* útiles para una variedad de aplicaciones.

Los ácidos nucleicos descritos en el presente documento pueden consistir en un ácido nucleico recombinante. Por el término "ácido nucleico recombinante" en este documento se quiere decir ácido nucleico, originalmente formado *in vitro* o en un cultivo celular, en general, mediante la manipulación de ácidos nucleicos mediante endonucleasas y/o exonucleasas y/o polimerasas y/o ligasas y/o recombinasas, para producir un ácido nucleico que no se encuentra normalmente en la naturaleza. Así, un ácido nucleico aislado, en una forma lineal, o un vector de expresión formado

in vitro mediante ligación de moléculas de ADN, que normalmente no están unidas, se consideran recombinantes para los propósitos mencionados aquí. Se entiende que una vez que un ácido nucleico recombinante se hace y se introduce en una célula huésped u organismo, éste se replicará no recombinantemente, es decir, utilizando la maquinaria celular *in vivo* de la célula huésped en lugar de las manipulaciones *in vitro*; sin embargo, tales ácidos nucleicos, una vez que se producen recombinantemente, aunque se repliquen subsecuentemente de manera no recombinante, se considerarán todavía recombinantes para los propósitos mencionados en este documento.

Además, como resultado de la degeneración del código genético, se puede producir una multitud de secuencias de nucleótidos que se basan en las secuencias que se proporcionan en el presente documento y los correspondientes péptidos, polipéptidos o proteínas. Algunas de estas secuencias de nucleótidos tendrán sólo una mínima homología con las secuencias descritas aquí; sin embargo, la materia descrita en este documento contempla específicamente todas y cada posible variación de la secuencia de nucleótidos que pudiera hacerse mediante selección de combinaciones basadas en posibles elecciones de codón. Estas combinaciones se hacen de acuerdo con el triplete estándar del código genético como se aplica a las secuencias de nucleótidos de péptidos, polipéptidos o proteínas que ocurren naturalmente, y todas tales variaciones deben considerarse como específicamente descritas en este documento. Las variantes de nucleótido recombinante son polinucleótidos suplentes que codifican una proteína particular. Estos deben ser sintetizados, por ejemplo, haciendo uso de la "redundancia" en el código genético. Diferentes substituciones de codón, tales como cambios sinónimos (silenciosos) que producen sitios de restricción específicos o mutaciones de uso específico del codón, pueden introducirse para optimizar el clonaje en un plásmido o vector viral o la expresión en un sistema huésped procariótico o eucariótico respectivamente.

Es posible producir los polinucleótidos descritos aquí, o porciones de los mismos, completamente mediante química sintética. Tras la síntesis, la secuencia de aminoácidos puede utilizarse sola o unida a una secuencia preexistente e insertada en uno de los muchos vectores de ADN y sus respectivas células huésped, utilizando técnicas bien conocidas en el campo. Además, la química sintética puede utilizarse para introducir mutaciones específicas en la secuencia de nucleótidos. Alternativamente, una porción de secuencia en la que se desea una mutación se puede sintetizar y recombinarse con una porción de una secuencia genómica o recombinante existente.

Los péptidos y polipéptidos descritos aquí pueden producirse también, completamente o en parte, mediante química sintética, utilizando procedimientos convencionales.

Las secuencias de nucleótidos que codifican un péptido, polipéptido o proteína pueden unirse a una variedad de otras secuencias de nucleótidos mediante técnicas de ADN recombinante bien establecidas (Sambrook J. y col. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Sprin Harbor, N. Y.; or Ausubel F. M. y col. (1989) Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York City). Secuencias útiles incluyen un surtido de vectores de clonaje tales como plásmidos, cósmidos, derivados de fago lambda, fagémidos y los similares. Los vectores de interés incluyen vectores para replicación, expresión, generación de sondas, secuenciación, y los parecidos. En general, los vectores de interés pueden contener un origen de replicación funcional en al menos un organismo, sitios de restricción convenientes sensibles a endonucleasas, y marcadores seleccionables para uno o más sistemas de células huésped.

Otro aspecto descrito en el presente documento es proporcionar para la hibridación sondas que sean capaces de hibridarse con secuencias de antígeno que ocurren naturalmente o secuencias de nucleótidos que codifican el péptido, polipéptido o proteína revelados. La astringencia de las condiciones de hibridación determinará si la sonda identifica sólo a la secuencia nativa de nucleótido o a las secuencias de moléculas estrechamente relacionadas. Si las secuencias de nucleótidos degeneradas mencionadas aquí se utilizan para la detección de secuencias relacionadas, éstas deberían contener preferentemente al menos el 50% de los nucleótidos de las secuencias presentadas aquí.

"Sondas" son secuencias de ácido nucleico de longitud variable, preferentemente entre al menos unos 10 y como mucho sobre unos 6.000 nucleótidos, dependiendo del uso. Éstas se usan en la detección de secuencias de ácido nucleico idénticas, similares o complementarias. Sondas de mayor longitud se obtienen normalmente de una fuente natural o recombinante, son altamente específicas y más lentas de hibridar que los oligómeros. Estas pueden ser de cadena simple o doble y estar diseñadas para tener especificidad en las técnicas de PCR, hibridación basada en membrana o similares a ELISA.

Las sondas de hibridación mencionadas aquí pueden derivarse de los polinucleótidos representados por los Nº ID SEC: 25-31, o a partir de las secuencias genómicas próximas o incluidas que comprenden regiones sin traducir tales como los promotores, los potenciadores e intrones. Tales sondas de hibridación pueden estar marcadas con las moléculas reporteras adecuadas. Los medios para producir sondas de hibridación específicas incluyen marcaje de oligos, nick translation (marcaje por translación de rotura), marcaje terminal o amplificación por PCR utilizando un nucleótido marcado. Alternativamente, la secuencia de ADN-c puede clonarse en un vector para la producción de la sonda de ARN-m. Tales vectores son conocidos en el campo, están disponibles comercialmente y se pueden utilizar para sintetizar sondas de ARN *in vitro* mediante la adición de una ARN polimerasa apropiada tal como T7, T3 o SP6 y nucleótidos marcados. Varias compañías (tales como Pharmacia Biotech, Piscataway, N.J.; Promega, Madison, Wis.; US Biochemical Corp, Cleveland, Ohio; etc.) suministran kits comerciales y protocolos para estos procedimientos.

Las secuencias de nucleótidos (por ejemplo, Nº ID SEC: 25-42, 45-48, 51 y 53) se pueden utilizar para generar sondas para cartografiar la secuencia genómica nativa. La secuencia puede cartografiarse en un cromosoma particular o a una región específica del cromosoma utilizando técnicas bien conocidas. Éstas incluyen la hibridación *in situ* de dispersiones cromosómicas, preparaciones cromosómicas clasificadas por citometría de flujo, o construcciones cromosómicas artificiales, tales como cromosomas artificiales de levadura (YACs), cromosomas artificiales de bacterias (BACs), construcciones P1 de bacterias o bibliotecas de cDNA de cromosomas sencillas.

La hibridación *in situ* de preparaciones cromosómicas y las técnicas de cartografiado físico, tales como el análisis de ligamiento utilizando los marcadores cromosómicos establecidos, son de un valor incalculable para la cartografía genética en extensión a otros organismos, incluyendo parásitos intracelulares. Las secuencias de nucleótidos descritas en el presente documento pueden utilizarse también para detectar diferencias en la localización cromosómica de las secuencias de nucleótidos debidas a translocación, inversión, o recombinación.

Otros aspectos mencionados aquí incluyen el uso de las secuencias descritas o de ácidos nucleicos recombinantes derivados de los mismos para producir péptidos purificados. Las secuencias de nucleótidos como se revelan aquí pueden utilizarse para producir una secuencia de aminoácido utilizando procedimientos bien conocidos de tecnología de ADN recombinante. Goeddel (Gene Expression Technology, Methods and Enzymology [1990] Vol 185, Academic Press, San Diego, Calif) es una entre muchas publicaciones que enseñan la expresión de una secuencia de nucleótidos aislada y purificada. El aminoácido o péptido puede expresarse en varias células huésped, tanto procarióticas como eucarióticas. Algunos vectores de expresión son vectores virales tales como los vectores basados en el virus Vaccinia, los vectores basados en el virus de viruela aviar, y los vectores virales adeno-asociados, entre otros (Dunachie y col. (2003) J Exp Biol 206, 3771-9). Las células huésped pueden ser de la misma especie de la que deriva la secuencia de nucleótidos, como los fibroblastos, los linfocitos o similares, o células o líneas celulares, tales como las células P815, de una especie diferente. Las secuencias descritas o los ácidos nucleicos recombinantes se pueden introducir en las células huésped mediante varios procedimientos, conocidos por aquellos entrenados en el campo, tales como procedimientos que impliquen transfección. La transfección es el proceso mediante el cual las secuencias de ácido nucleico (al igual que proteínas y oligonucleótidos) se introducen mediante procesos bioquímicos o físicos. Los procedimientos bioquímicos incluyen procedimientos mediados por DEAE-dextrano, fosfato de calcio, y el liposoma (tal como la lipofección). Los procedimientos de transfección física incluyen la microinyección directa de materiales, el reparto biolístico de partículas, por ejemplo una "pistola genética" (ambos procedimientos distribuyen los materiales mediante la perforación mecánica de la membrana celular), y electroporación. La electroporación expone a las células diana a breves pulsos eléctricos definidos para crear poros transitorios que permiten a los ácidos nucleicos y proteínas cruzar la membrana celular.

Otros aspectos más mencionados en el presente documento utilizan estos péptidos purificados para producir anticuerpos u otras moléculas capaces de unirse a los péptidos. Estos anticuerpos o agentes de unión pueden entonces usarse para explorar células para localizar la distribución celular de los péptidos o proteínas. Los anticuerpos son también útiles para la purificación por afinidad de los péptidos o proteínas producidas recombinantemente. Tales anticuerpos son también útiles como reactivos de diagnóstico para la detección cualitativa y cuantitativa de las enfermedades protozoarias o en ensayos y pruebas mediadas por anticuerpos.

Los antígenos de *T. parva* revelados pueden también utilizarse como una ayuda para el diagnóstico o en procedimientos que miden la presencia de linfocitos citotóxicos de *T. parva* en animales inmunizados o infectados mediante el co-cultivo de células mononucleares recogidas de un animal sospechoso de tener una infección debida a *T. parva*, con células T citotóxicas específicas del antígeno de *T. parva*, bajo condiciones de cultivo estándar para cultivos de células de mamífero. Preferiblemente, las células no nucleares se incuban en un medio de cultivo que contiene un indicador que se libera tras la muerte celular, tal como el Cr^{51}. Este es un procedimiento que se conoce bien en el campo.

Las secuencias de nucleótidos descritas pueden usarse individualmente, o en conjunto, en pruebas o ensayos para detectar los niveles expresión de péptido, polipéptido o proteína. La forma de tales procedimientos cualitativos o cuantitativos puede incluir análisis por northern, transferencia de mancha u otras tecnologías basadas en membranas, tecnologías de aspilla, patilla o chip (del inglés, *dip stick, pin, o chip)*, PCR, ELISAs u otras tecnologías de múltiples formatos de muestra.

Un "oligonucleótido" u "oligómero" es una extensión de residuos de nucleótido que tiene un número suficiente de bases para ser usadas en una reacción de polimerasa en cadena (PCR, del inglés: polymerase chain reaction). Estas cortas secuencias se basan en (o se diseñan a partir de) secuencias genómicas o de ADN-c y se usan para amplificar, confirmar, o revelar la presencia de ADN o ARN idéntico, similar o complementario en un tejido o célula particular. Los oligonucleótidos u oligómeros comprenden porciones de secuencias de ADN que tienen al menos sobre 10 nucleótidos y como mucho 50 nucleótidos, preferentemente sobre 15 a 30 nucleótidos. Estos pueden estar sintetizados químicamente y se pueden utilizar como sondas.

Un ADN o ARN "complementario" es una secuencia que es 100% idéntica a la cadena a la cual es complementaria.

Los polinucleótidos descritos aquí pueden ser usados por sí mismos como sondas. Secuencias adicionales de polinucleótido se pueden añadir a los extremos de (o en el interior de) las secuencias de polinucleótidos ejemplificadas de

modo que los polinucleótidos que son más largos que las secuencias ejemplificadas pueden también ser usadas como sondas. Así, los polinucleótidos aislados que comprenden una o más de las secuencias ejemplificadas están dentro del alcance de la descripción. Los polinucleótidos que tienen menos nucleótidos que los polinucleótidos ejemplificados pueden usarse también y se contemplan dentro del alcance de la descripción. Por ejemplo, para algunos propósitos, podría ser útil usar una secuencia conservada de un polinucleótido ejemplificado en donde la secuencia conservada contiene una porción de una secuencia ejemplificada. Así, los polinucleótidos descritos aquí pueden ser usados para encontrar genes homólogos (total o parcialmente).

Las sondas mencionadas en el presente documento pueden estar compuestas por ADN, ARN, o ANP (ácido nucleico peptídico). La sonda tendría normalmente al menos sobre 10 bases, normalmente al menos sobre 17 bases, y puede tener hasta 100 bases o más. Las sondas más largas pueden utilizarse fácilmente, y tales sondas pueden ser, por ejemplo de varias kilobases de longitud. La secuencia de la sonda está diseñada para que sea al menos substancialmente complementaria a una porción de un gen que codifica una proteína de interés. La sonda no necesita tener una complementariedad perfecta a la secuencia con la que se hibrida. Las sondas pueden ser marcadas utilizando técnicas que son bien conocidas por aquellos entrenados en el campo.

Una aproximación para el uso de las sondas, supone primero identificar los segmentos de ADN que son homólogos con las secuencias de nucleótidos descritas, usando, por ejemplo, análisis por transferencia Southern de un banco de genes. Así, es posible, sin la ayuda de un análisis biológico, saber de antemano la actividad probable de muchos nuevos polinucleótidos, y de los productos de genes individuales expresados mediante un polinucleótido dado. Tal análisis proporciona un procedimiento rápido para identificar composiciones valiosas comercialmente.

Un procedimiento de hibridación útil de acuerdo con la descripción, normalmente incluye los pasos iniciales de aislar la muestra de ADN de interés y purificarla químicamente. Se pueden utilizar tanto las células lisadas o los ácidos nucleicos totalmente fraccionados aislados de las células. Las células se pueden tratar utilizando las técnicas conocidas para liberar su ADN (y/o) ARN. La muestra de ADN se puede cortar en trozos con una enzima de restricción apropiada. Los trozos que puedan ser de interés, se pueden aislar a través de electroforesis en un gel, normalmente agarosa o acrilamida. Los tozos de interés se pueden transferir a una membrana para inmovilización.

La técnica de hibridación particular no es esencial para la descripción. Como se hacen mejoras en las técnicas de hibridación, éstas pueden aplicarse fácilmente.

La sonda y la muestra se pueden combinar en una disolución tamponada de hibridación y mantenerse a una temperatura adecuada hasta que ocurra la hibridación. Después, la membrana se limpia de materiales extraños, dejando la muestra, y las moléculas de sonda unidas se detectan y cuantifican normalmente mediante autorradiografía y/o contaje del líquido de centelleo. Como es bien conocido en el campo, si la molécula de sonda y la muestra de ácido nucleico hibridan mediante la formación de un enlace fuerte no covalente entre las dos moléculas, se podría asumir razonablemente que la sonda y la muestra son esencialmente idénticas o muy similares. El marcador detectable de la sonda proporciona un medio para determinar de una manera conocida si la hibridación ha ocurrido.

En el uso de los segmentos de nucleótidos como sondas, la sonda particular se marca con cualquier marcador adecuado conocido por aquellos entrenados en el campo, incluyendo marcadores radiactivos y no radiactivos. Los marcadores radiactivos típicos incluyen P^{32}, S^{35} o los similares. Los marcadores no radiactivos incluyen, por ejemplo, ligandos como la biotina o tiroxina, al igual que enzimas como las hidrolasas y las peroxidasas, o varios compuestos quimioluminiscentes como la luciferina, o fluorescentes como la fluoresceína y sus derivados. Además, las sondas pueden hacerse inherentemente fluorescentes como se describe en la Aplicación Internacional Nº WO 93/16094.

Se pueden emplear varios grados de astringencia en la hibridación. A condiciones más astringentes, mayor es la complementariedad que se requiere para la formación del dúplex. La astringencia se puede controlar mediante la temperatura, la concentración de la sonda, la longitud de la sonda, la fuerza iónica, el tiempo, y los similares. Preferentemente, la hibridación se dirige bajo condiciones de astringencia media a elevada mediante técnicas bien conocidas en el campo, como se describe, por ejemplo, en Keller, G. H., M. M. Manak (1987) DNA Probes, Stockton Press, New York, N. Y., pp. 169-170.

Como se utiliza en el presente documento condiciones de “astringencia media a elevada” para la hibridación se refiere a condiciones que alcanzan el mismo, o sobre el mismo, grado de especificidad en la hibridación que las condiciones descritas aquí. Ejemplos de condiciones de astringencia media a elevada se proporcionen en este documento. Específicamente, la hibridación de ADN inmovilizado en transferencias de Southern con sondas específicas del gen marcadas con P^{32} se lleva a cabo empleando procedimientos estándar (Sambrook y col. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, Vol. 1, 2, 3). En general, la hibridación y los subsecuentes lavados se llevan a cabo bajo condiciones de astringencia media a elevada que permiten la detección de las secuencias diana con homología a las secuencias ejemplificadas aquí. La hibridación específica de una variante bajo condiciones astringentes significa que la cadena complementaria requerida para la formación del dúplex, es tal que se puede distinguir una variante. Para sondas de genes de ADN de doble cadena, la hibridación se puede llevar a cabo

durante la noche a 20-25ºC. por debajo de la temperatura de fusión (Tm) del ADN híbrido en SSPE 6 x, disolución de Denhardt 5 x, SDS 0,1%, ADN desnaturalizado 0,1 mg/ml. La temperatura de fusión se describe mediante la siguiente fórmula de Beltz y col. (1983) Methods Enzymol 100, 266-85:

$$Tm = 81{,}5^{o}C + 16{,}6 \text{ Log } [Na^{+}] + 0{,}41 (\% \text{ G} + \text{C}) - 0{,}61 (\% \text{ formamida}) - 600/\text{longitud del dúplex en pares de bases.}$$

Los lavados normalmente se pueden llevar a cabo como sigue:

(1) Dos veces a temperatura ambiente durante 15 minutos en SSPE 1x, SDS 0,1% (lavado de baja astringencia)

(2) Una vez a Tm-20ºC durante 15 minutos en SSPE 0,2x, 0,1% SDS (lavado de astringencia moderada).

Para las sondas de oligonucleótidos, la hibridación normalmente se lleva a cabo durante la noche a 10-20ºC por debajo de la temperatura de fusión (Tm) del híbrido en SSPE 6x, disolución de Denhardt 5x, SDS 0,1%, ADN desnaturalizado 0,1 mg/ml. La Tm para las sondas de oligonucleótidos se determinó mediante la fórmula de Suggs y col. (1981):

$$Tm(^{o}C) = 2(\text{número de pares de bases T/A}) + 4(\text{número de pares de bases G/C})$$

En general, la sal y/o temperatura se pueden alterar para cambiar a astringencia. Con un fragmento de ADN de más de unas 70 bases de longitud, se pueden utilizar las siguientes condiciones: 1. Baja: SSPE 1 ó 2x, temperatura ambiente Baja: SSPE 1 ó 2x, 42ºC. Moderado: SSPE 0,2x ó 1x, 65ºC. Alta: SSPE 0,1x, 65ºC.

La formación del híbrido y la estabilidad dependen en la complementariedad entre las dos cadenas de un híbrido, y, como se indica más arriba, se puede tolerar un cierto grado de mal emparejamiento. Por tanto, las secuencias de polinucleótido descritas en este documento, incluyen mutaciones (tanto simples como múltiples), deleciones, e inserciones en las secuencias descritas, y combinaciones de las mismas, en donde las mutaciones mencionadas. Inserciones y deleciones permiten la formación de híbridos estables con un polinucleótido diana de interés. Las mutaciones, inserciones y deleciones pueden producirse en una secuencia de polinucleótido dada utilizando procedimientos estándar conocidos en el campo. Otros procedimientos se harán conocidos en el futuro.

Las variaciones por mutación, inserción y deleción de las secuencias de polinucleótido descritas aquí pueden utilizarse de la misma manera que las secuencias de polinucleótido ejemplificadas hasta que las variantes tengan una similitud esencial con la secuencia original. Como se utiliza en este documento, la similitud substancial de la secuencia hace referencia a la extensión de nucleótidos (por ejemplo para codificar un polipéptido descrito en este documento). Preferentemente, esta similitud mayor al 50%; más preferiblemente, esta similitud mayor al 75%, y la más preferida es una similitud superior al 90%. El grado de similitud necesaria para la variante funcione en la capacidad que se pretende, dependerá del uso que se pretenda para la secuencia. Los mutantes, variantes o fragmentos pueden incluir modificaciones a la cadena principal, añadir funciones, derivatizar grupos funcionales, y los fragmentos pueden tener tamaños en el rango de una longitud mínima de 11 aminoácidos hasta la longitud completa de 265 aminoácidos. Variantes activas de las secuencias del polipéptido descritas aquí son aquellas variantes que funcionan de manera similar al polipéptido original con respecto a las CTLs específicas de antígeno estimulante, en estimular la producción de o reaccionar con un anticuerpo del polinucleótido original, o en provocar inmunidad protectora frente a un antígeno mencionado aquí, tal como un antígeno de *T. parva*. Es habitual por alguien entrenado en el campo hacer mutaciones, mutaciones por inserción o por deleción que están diseñadas para mejorar la función de las secuencias o proporcionar, sino, una ventaja metodológica.

Tecnología de PCR. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una síntesis cebada, enzimática repetitiva de una secuencia de ácidos nucleicos. Este procedimiento es bien conocido y comúnmente utilizado por aquellos entrenados en el campo (ver las patentes americanas números 4.683.195, 4.683.202 y 4.800.159; Saiki y col. (1985) Science 230, 1350-4). La PCR se basa en la amplificación enzimática de un fragmento de ADN de interés que está flanqueado por dos cebadores de oligonucleótidos que se hibridan a cadenas opuestas de la secuencia diana. Los cebadores se orientan con los extremos 3' apuntándose respectivamente. Ciclos repetidos de desnaturalización por calor de la hebra molde, el emparejamiento de los cebadores con sus secuencias complementarias, y la extensión de los cebadores emparejados con una polimerasa ADN, resultan en la amplificación del segmento definido por los extremos 5' de los cebadores de la PCR. Puesto que el producto de extensión de cada cebador puede servir como molde para otro cebador, en cada ciclo esencialmente se duplica la cantidad de fragmentos de ADN producidos en el ciclo anterior. Esto resulta en la acumulación exponencial de los fragmentos diana específicos, hasta un incremento de varios millones de veces en pocas horas. Utilizando una ADN polimerasa termostatable, como la Taq polimerasa, que se aísla de la bacteria termofílica *Thermus aquaticus*, los procesos de amplificación pueden ser completamente automatizados. Otras enzimas que se pueden utilizar son conocidas por aquellos entrenados en el campo.

Las secuencias de polinucleótidos descritas en este documento (y las porciones de las mismas tales como regiones conservadas y porciones que sirven para distinguir estas porciones de las secuencias conocidas previamente) se pueden utilizar como y/o utilizarse en el diseño de, cebadores para amplificación por PCR. Al llevar a cabo la amplificación por

PCR, se puede tolerar un cierto grado de mal emparejamiento entre el cebador y el molde. Por tanto, las mutaciones, deleciones e inserciones (especialmente adiciones de nucleótidos al extremo 5') de los polinucleótidos ejemplificados pueden utilizarse de esta manera. Las mutaciones, inserciones y deleciones se pueden producir en un cebador dado mediante procedimientos conocidos para alguien entrenado en el campo.

Los genes con la longitud completa pueden clonarse utilizando una secuencia parcial de nucleótidos y varios procedimientos conocidos en el campo. Goienda y col. (1993; PCR Methods Applic 2:318-22) describe "la PCR con diana de restricción" como un procedimiento directo que utiliza secuencias universales para recuperar la secuencia desconocida adyacente a un locus conocido. La PCR inversa puede utilizarse para adquirir secuencias desconocidas comenzando por los cebadores basados en una región conocida. (Triglia T. y col. (1998) Nucleic Acids Res 16:8186).

CLONTECH PCR-Select™ cDNA Substraction (Clontech Laboratories, Inc., Palo Alto, Calif) es también otro medio mediante el cual los genes expresados de manera diferencial pueden ser aislados. El procedimiento permite el aislamiento de transcritos presentes en una población de ARN-m que carece, o se encuentra en número reducido, de una segunda población de ARN-m. Los transcritos raros se pueden enriquecer hasta en 1000 veces.

Los polinucleótidos descritos aquí se pueden definir de acuerdo a varios parámetros. Una característica es la actividad biológica de los productos proteicos como se identifican aquí. Las proteínas y genes descritos aquí se pueden definir mediante sus secuencias de aminoácidos y nucleótidos. La secuencia de las moléculas pueden definirse en términos de homología a ciertas secuencias ejemplificadas al igual que en términos de la habilidad para hibridar con, o amplificarse por, ciertas sondas y cebadores ejemplificados. Otros cebadores y sondas pueden construirse fácilmente por aquellos entrenados en el campo de modo que secuencias alternas de polinucleótidos que codifican las mismas secuencias de aminoácidos pueden utilizarse para identificar y/o caracterizar genes adicionales. Las proteínas descritas en este documento pueden también identificarse basándose en la inmunorreactividad con ciertos anticuerpos.

Los polinucleótidos y proteínas descritas aquí incluyen porciones, fragmentos, variantes y mutantes se las secuencias completas al igual que fusiones y moléculas quiméricas, de modo que la proteína codificada retiene una actividad biológica característica de las proteínas identificadas en el presente documento. Tal como se usan aquí, los términos "variantes" o "variaciones" de genes incluyen secuencias de nucleótido que codifican las mismas proteínas o que codifican proteínas equivalentes que tienen una actividad biológica equivalente. Como se utiliza en este documento, el término "proteínas equivalentes" se refiere a proteínas que tienen la misma, o esencialmente la misma, actividad biológica que las proteína ejemplificadas.

Variaciones de los genes se pueden construir fácilmente utilizando técnicas estándar tales como mutagénesis dirigida y otros métodos para generar mutaciones puntuales y mediante barajamiento del ADN, por ejemplo. Además, los fragmentos de genes y proteínas pueden hacerse utilizando exonucleasas, endonucleasas y proteasas comercialmente disponibles de acuerdo con los procedimientos estándar. Por ejemplo, las enzimas como Bal31 se pueden utilizar para cortar sistemáticamente nucleótidos de los extremos de los genes. También, los genes que codifican fragmentos pueden obtenerse utilizando varias enzimas de restricción. Las proteasas se pueden utilizar para obtener directamente fragmentos activos de estas proteínas. Por supuesto, las técnicas moleculares para clonar polinucleótidos y producir constructos de genes de interés son también conocidos en el campo. También pueden aplicarse las técnicas de evaluación *in vitro*, tales como MAXYGENs "Molecular Breeding".

Un "marcador seleccionable" es un gen cuya expresión permite a uno identificar células que han sido transformadas o transfectadas con un vector que contiene el gen marcador.

Las moléculas "reporteras" son grupos químicos utilizados para marcar una secuencia de ácidos nucleicos o aminoácidos. Estos incluyen, pero no se limitan a, radionucleidos, enzimas, agentes fluorescentes, quimioluminiscentes o cromogénicos. Las moléculas reporteras se asocian con, establecen la presencia de, y pueden permitir la cuantificación de una secuencia de ácido nucleico o aminoácido particular.

Una "porción" o "fragmento" de un polinucleótido o ácido nucleico comprende toda o cualquier parte de la secuencia de nucleótido que tiene menos de 6 kb de nucleótidos, preferentemente menos de sobre 1 kb que puede ser utilizada como una sonda. Tales sondas se pueden marcar con moléculas reporteras utilizando la *nick translation*, la reacción de relleno con Klenow, la PCR u otros procedimientos bien conocidos en la materia. Tras hacer una prueba para optimizar las condiciones de reacción y para eliminar los falsos positivos, las sondas de ácido nucleico pueden ser utilizadas en hibridaciones Southern, northern o *in situ* para determinar si el ADN o ARN diana están presentes en una muestra biológica, tipo celular, tejido, órgano y organismo.

Un "polipéptido" comprende una proteína, un oligopéptido o fragmentos peptídicos de los mismos. Los términos polipéptido, péptido y proteína se utilizan intercambiablemente en el presente documento.

Un "polipéptido mutante, variante, o modificado" incluye cualquier polipéptido codificado mediante una secuencia de nucleótidos que ha sido mutada a través de inserciones, deleciones, substituciones, o similares.

Las moléculas "quiméricas" son polinucleótidos o polipéptidos que se han creado mediante combinación de una o más secuencias de nucleótidos o péptidos (o sus partes). En el caso de secuencias de nucleótidos, tales secuencias combinadas se pueden introducir en un vector apropiado y expresarse para dar lugar a un polipéptido quimérico el cual

se espera que sea diferente de la molécula nativa en una o más de las siguientes características: localización celular, distribución, afinidad de unión a ligando, afinidad intercatenaria, tasa de degradación/recambio, señalización, etc.

"Activo" es aquel estado que es capaz de ser útil o de llevar a cabo algún papel. Se refiere específicamente a aquellas formas, fragmentos o dominios de una secuencia de aminoácidos que muestran una actividad biológica y/o inmunogénica característica de péptidos, polipéptidos o proteínas que ocurren naturalmente. Por ejemplo, la presente descripción se relaciona con fragmentos activos de polipéptidos (por ejemplo representados por los Nº ID SEC: 1-7). Cada uno de estos fragmentos activos retiene al menos un epítopo de un polipéptido más grande.

"Que ocurren naturalmente" hace referencia a un polipéptido producido por células que no han sido genéticamente diseñadas o que han sido genéticamente diseñadas para producir la misma secuencia que la que se produce naturalmente.

"Derivado" hace referencia a aquellos polipéptidos que han sido químicamente modificados mediante técnicas como ubicuitinación, marcado, PEGilación (derivación con polietilén glicol) e inserción química o substitución de aminoácidos tales como la ornitina que normalmente no se da en proteínas.

"Variante polipeptídica recombinante" hace referencia a cualquier polipéptido que difiere de los péptidos, polipéptidos o proteínas por inserciones, deleciones y/o substituciones.

Las "substituciones" de aminoácidos se definen como reemplazamientos de aminoácidos uno a uno. Estos son conservadores en la naturaleza cuando el aminoácido substituido tiene una estructura y/o propiedades químicas similares. Ejemplos de reemplazamientos conservativos son substitución de leucina por una isoleucina o valina, un aspartato por un glutamato, o una treonina con una serina.

Las "inserciones" o "deleciones" de aminoácidos son cambios a, o en, una secuencia de aminoácidos. Estos típicamente caen en el rango de 1 a 5 aminoácidos. La variación permitida en una secuencia particular de aminoácido puede determinarse experimentalmente mediante la producción del péptido sintéticamente o haciendo las inserciones, deleciones o substituciones sintéticamente de los nucleótidos en la secuencia utilizando técnicas de ADN recombinante.

Un "oligopéptido" es una extensión corta de residuos de aminoácido y puede expresarse a partir de un oligonucleótido. Tal secuencia comprende una extensión de residuos de aminoácido de al menos unos 5 aminoácidos y normalmente sobre 17 o más aminoácidos, típicamente al menos de 9 a 13 aminoácidos, y de suficiente longitud para mostrar actividad biológica o inmunogénica.

Un "estándar" es una medida cuantitativa o cualitativa de comparación. Preferiblemente, se basa en un número estadísticamente apropiado de muestras y se crea para usarlo como base de comparación cuando se llevan a cabo análisis de diagnóstico, se realizan ensayos clínicos, o se siguen perfiles de tratamiento de pacientes. Las muestras de un estándar particular pueden ser normales o similarmente anormales.

Un anticuerpo o "partes de unión específica" quieren decir cualquier molécula de anticuerpo o fragmento de una molécula de fragmento que unirá a un antígeno u otros ligandos tales como lectinas u otras moléculas. Las "partes de unión específica" incluyen, pero no se limitan a, fragmentos de anticuerpo tales como los fragmentos Fab, fragmentos Fab'(2), fragmentos de la región Fc. Las regiones determinantes de la complementariedad (RDCs), fragmentos Fv, fragmentos de cadena simple Fv (scFV, del inglés: simple chain Fv), y fragmentos del sitio de unión del antígeno.

Un "antígeno" es una macromolécula que se reconoce mediante anticuerpos o células inmunes y puede desencadenar una respuesta inmune. Usualmente, un antígeno es una proteína o un polisacárido, pero puede ser cualquier tipo de molécula, incluso una pequeña molécula se acopla a un vehículo.

Una célula T citotóxica "específica de antígeno" es un linfocito T que puede reconocer y matar a otras células que se expresan como antígeno, normalmente en conjunción con un tipo o clase de moléculas referidas por aquellos familiarizados con el tema, como moléculas de Clase I del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) (del inglés: *major histocompatibility complex*). Tales células T citotóxicas también se refieren como "CD8+" (CD8 positivas) o CTLs, por aquellos familiarizados con el tema.

Un "epítopo" o "determinante antigénico" es una región o sección de un antígeno que es aproximadamente la mínima longitud de la secuencia antigénica que desencadenará una respuesta inmune, como se mide mediante el desarrollo de una respuesta del anticuerpo, el desarrollo de células T específicas de antígeno T, u otras respuestas celulares inmunes cuantificables. Por ejemplo, un epítopo puede ser un sitio en un antígeno reconocido por un anticuerpo.

Un "epítopo" de célula T es un determinante antigénico reconocido y unido mediante el receptor de la célula T. Los epítopos reconocidos mediante el recepto de la célula T normalmente se localizan en la parte interior, no expuesta del antígeno, y se vuelve accesible a los receptores de la célula T tras el procesamiento proteolítico del antígeno.

Un protocolo "efectivo" de inmunización es uno en el que un animal se protege contra la infección, al menos cuantificable en cierto grado, cuando se expone al agente infeccioso específico para el cual fue inmunizado.

Un “refuerzo” o una “administración de refuerzo”, es una administración de un inmunógeno o antígeno que se da a un animal en un periodo de tiempo, normalmente semanas o meses, tras la primera administración del mismo inmunógeno, con propósito de estimular una respuesta de antígeno específica.

Una condición “efectiva” o estado “efectivo” es aquella situación en la que un proceso biológico puede tener lugar. Tal proceso puede ser, por ejemplo, el estado en el que una respuesta inmune se puede desarrollar, o una proteína se puede expresar a partir de una célula viva.

Un “vehículo farmacéuticamente aceptable” es un agente vehículo, normalmente, pero no limitado a, un soluto o líquido proporcionado por un agente inmunizante para que pueda ser administrado al animal. Tal vehículo puede ser agua, disolución salina, dextrosa, gliceroles, alcoholes, aceites, substancias basadas en aceites, a los que se añade un agente inmunizante. Un vehículo farmacéuticamente aceptable puede también ser un substrato sólido, tal como microbolas que absorben el agente inmunizante o una sustancia que liberará el agente inmunizante durante el tiempo, tal como un implante biodegradable. Un vehículo también puede ser una combinación de los vehículos mencionados más arriba, pero no se limita a tales sustancias.

Un “Ensayo Elispot” o “ensayo elispot” es el nombre corto procedente del inglés “*Enzyme-linked ImmunoSpot Assay*” (Ensayo Inmunospot unido a enzima), que hace referencia a un procedimiento basado en anticuerpo para detectar la secreción de factores solubles liberados por las células. Originalmente se desarrolló como un procedimiento para detectar células B que secretan anticuerpo, más tarde el procedimiento se adaptó para determinar la reacción de las células T con un antígeno específico, normalmente representada como un número de células activadas por millón.

“Condiciones efectivas” para el cultivo de células o líneas celulares hace referencia a aquellas condiciones que permiten que las células respondan de una manera que imita o es igual a como sería la repuesta si las células estuvieran respondiendo *in vivo*.

“Recoger” células u otros materiales significa separar y colectar aquellas células a partir de una mezcla de una fuente para su utilización en otro protocolo.

Un “adyuvante” es una sustancia mezclada con un agente inmunizante que aumenta la capacidad de un animal para responder al agente inmunizante de manera que la respuesta inmune es de mayor grado que si el adyuvante no estuviera presente. La respuesta inmune no es contra el adyuvante, sino contra el agente inmunizante o antígeno que está mezclado con el adyuvante.

Un “anticuerpo protector” es un anticuerpo que, cuando se expresa en un animal, dispone a ese animal en un estado en el cual no contraerá una enfermedad causada por el agente al cual se une el anticuerpo.

Una célula “antígeno-específica”, es una célula tal como una célula T citotóxica, que se une sólo, o sustancialmente sobre todo, a la molécula o antígeno específico para el que expresa receptores, normalmente como resultado de una respuesta inmune.

Una “composición inmunogénica” es una molécula o mezcla de moléculas que, cuando se administra a un animal, hará que el sistema inmune de ese animal se vuelva activo y produzca moléculas o células inmunes. Una composición también puede ser inmunogénica en condiciones *in vitro* que son tales que imitan o se parecen a las condiciones que ocurren *in vitro* en un animal.

“Estimular” células T u otras células del sistema inmune, significa que las células T u otras células del sistema inmune de un organismo, reaccionan ante un estímulo de una manera mesurable, tal como mediante la secreción de una molécula u hormona, podrían volverse activas y matar o lisar otras células, o mediante la experimentación de un cambio en el estado del ciclo celular o similar.

Un “bioensayo de MHC de clase II bovino”, significa un ensayo que mide la presencia de un factor soluble derivado de células T, tal como liberación de interferón (IFN-gamma) de células T respondiendo a una estimulación específica a través de la capacidad de IFN-gamma para inducir y aumentar la expresión de moléculas de clase II en células endoteliales bovinas. Las células endoteliales bovinas no expresan moléculas de clase II de manera constitutiva a menos que sean provocadas por señales externas como IFN-gamma.

Una “vacuna”, es una composición que, cuando se administra a un animal, provoca que el sistema inmune del animal produzca moléculas de anticuerpo o células inmunes, tales como células T antígeno-específicas, que reaccionan con una sustancia antigénica que está en la composición y hacen a ese animal resistente a infecciones u otras patologías causadas por organismos que llevan o producen la sustancia antigénica.

Una “composición farmacéutica” es un material que tiene un efecto mesurable en un animal en el cual se administra. Este efecto es de una naturaleza que normalmente se considera buena o deseable para el animal, tal como un efecto curativo o protector. Una composición farmacéutica podría ser una composición terapéutica, o una composición utilizada con propósitos de diagnóstico.

Puesto que la lista de términos técnicos y científicos no lo puede abarcar todo, cualquier término no definido se debe interpretar como que tiene el mismo significado que comúnmente entiende alguien experimentado en la materia. Además, las formas singulares "un", "una", "el" y "la" incluyen referentes plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

La descripción no se limita sólo a las secuencias, variantes, formulaciones o métodos particulares descritos. Las secuencias, variantes, formulaciones y metodologías podrían variar, y la terminología utilizada aquí tiene el propósito de describir realizaciones particulares. La terminología y las definiciones no pretenden ser limitantes.

Debido a la redundancia del código genético, una variedad de secuencias de ADN diferentes pueden codificar las secuencias de aminoácidos codificadas por las secuencias de polinucleótidos aquí descritas. La creación de estas secuencias alternativas de ADN que codifican proteínas con la misma, o esencialmente la misma, secuencia de aminoácidos se encuentra muy dentro de la habilidad de una persona entrenada en la materia. Estas variantes de secuencias de ADN están dentro del campo de la descripción. Como se utiliza aquí, referencia a "esencialmente la misma" secuencia se refiere a secuencias que tienen sustituciones, deleciones, adiciones, o inserciones de aminoácidos que no afectan materialmente la actividad biológica. Los fragmentos que conservan la actividad biológica característica también se incluyen en esta definición.

La descripción comprende proteínas variantes o equivalentes (y secuencias de nucleótidos que codifican proteínas equivalentes) que tienen la misma actividad biológica o similar que la proteínas codificadas por los polinucleótidos ejemplificados. Las proteínas equivalentes tendrán similitud de aminoácidos con una proteína (o péptido) ejemplificada. La identidad de aminoácidos es típicamente mayor de alrededor del 60%. Preferiblemente, la identidad de aminoácidos será mayor del 75%. Más preferiblemente, la identidad de aminoácidos es mayor de alrededor del 80%, y todavía más preferentemente mayor de alrededor del 90%. Lo más preferiblemente, la identidad de aminoácidos es mayor de alrededor del 95%. (Asimismo, los polinucleótidos que codifican los polipéptidos de interés también tendrán las identidades correspondientes en estos rangos preferidos). Estas identidades se determinan utilizando técnicas estándar de alineamiento para determinar la identidad de aminoácidos. La identidad/similitud/homología de aminoácidos será mayor en regiones críticas de la proteína incluyendo aquellas regiones responsables de la actividad biológica o que están involucradas en la determinación de la configuración tridimensional que es en última instancia responsable de la actividad biológica. En este aspecto, ciertas sustituciones de aminoácidos son aceptables y se pueden esperar si estas sustituciones ocurren en regiones las cuales no son críticas para la actividad o son sustituciones conservativas de aminoácidos las cuales no afectan la configuración tridimensional de la molécula. Por ejemplo, los aminoácidos podrían ubicarse en las siguientes clases: apolares, polares sin carga, básicos, y ácidos. Las sustituciones conservativas a través de las cuales un aminoácido de una clase es reemplazado por otro aminoácido del mismo tipo se encuentran dentro del ámbito de la descripción mientras que la sustitución no altere materialmente la actividad biológica del compuesto. Más abajo se encuentra una lista de ejemplos de aminoácidos pertenecientes a varias clases:

Apolares - Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Met, Phe, Trp, polares sin carga Gly, Ser, Thr, Cys, Tyr, Asn, Gln

Ácidos - Asp, Glu Básicos Lys, His

En algunos casos, también se pueden hacer sustituciones no conservativas.

Como se utiliza aquí, la referencia a polinucleótidos "aislados" y/o proteínas "purificadas" se refiere a estas moléculas cuando no están asociadas con otras moléculas con las cuales se encontrarían por naturaleza. Por lo tanto, referencia a "aislado" y/o "purificado" significa la implicación de la "mano del hombre" como se describe aquí. Referencia a proteínas, genes, y construcciones génicas "heterólogas" también significa la implicación de la "mano del hombre".

También hay vectores proporcionados que contienen las moléculas de ácido nucleico aquí descritas. El término "vector" hace referencia a un vehículo, preferiblemente una molécula de ácido nucleico, el cual puede transportar las moléculas de ácido nucleico. Cuando el vector es una molécula de ácido nucleico, las moléculas de ácido nucleico están unidas covalentemente al ácido nucleico vector. Con este aspecto, el vector incluye un plásmido, fago de cadena simple o doble, un vector viral de ADN o ARN de cadena simple o doble, o cromosomas artificiales tales como BAC, PAC, YAC, o MAC.

Un vector se puede mantener en la célula huésped como un elemento extracromosómico donde se replica y produce copias adicionales de las moléculas de ácido nucleico. Alternativamente, el vector podría integrarse en el genoma de la célula huésped y producir copias adicionales de las moléculas de ácido nucleico cuando la célula huésped se replica.

Hay vectores proporcionados para el mantenimiento (vectores de clonación) o vectores para la expresión (vectores de expresión) de las moléculas de ácido nucleico. Los vectores pueden funcionar en células procariotas o eucariotas o en ambas (vectores lanzadera).

Los vectores de expresión contienen regiones reguladoras que actúan en *cis* (secuencias de control de expresión) que están unidas operativamente en el vector a las moléculas de ácido nucleico de manera que se permite la transcripción de las moléculas de ácido nucleico en una célula huésped. Las moléculas de ácido nucleico se pueden introducir

en la célula huésped con una molécula de ácido nucleico distinta capaz de afectar en la transcripción. Por lo tanto, la segunda molécula de ácido nucleico podría proporcionar un factor que actúa en *trans* que interacciona con la región de control reguladora en *cis* para permitir la transcripción de las moléculas de ácido nucleico del vector. Alternativamente, la célula huésped podría proporcionar un factor que actúa en *trans*. Finalmente, un factor que actúa en *trans* se podría producir a partir del propio vector. Se entiende, sin embargo, que en algunas realizaciones, la transcripción y/o traducción de las moléculas de ácido nucleico puede ocurrir en un sistema libre de células.

La secuencia reguladora a la cual se pueden unir de manera operable las moléculas de ácido nucleico aquí descritas incluye promotores para dirigir la trascripción de ARNm. Éstos incluyen, pero no se limitan a, el promotor a la izquierda del bacteriófago lambda, los promotores lac, TRP, y TAC de *E. Coli*, los promotores tempranos y tardíos de SV40, el promotor inmediato temprano del CMV, los promotores tempranos y tardíos de adenovirus, y repeticiones terminales largas de retrovirus.

Además de las regiones control que promueven la trascripción, los vectores de expresión también podrían incluir regiones que modulan la trascripción, tales como sitios de unión del represor y potenciadores. Entre los ejemplos se incluyen el potenciador de SV40, el potenciador inmediato temprano de citomegalovirus, el potenciador de polioma, potenciadores de adenovirus, y potenciadores de la LTR retroviral.

Además de contener sitios para el inicio y control de la trascripción, los vectores de expresión también pueden contener secuencias necesarias para la terminación de la trascripción y, en la región transcrita, un sitio de unión a ribosomas para la traducción. Entre otros elementos controladores de la regulación de la expresión se incluyen los codones de iniciación y terminación así como las señales de poliadenilación. La persona medianamente experimentada en la materia sería consciente de las numerosas secuencias reguladoras que son útiles en los vectores de expresión. Tales secuencias reguladoras se describen por ejemplo, en Sambrook y col., Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., (1989).

Para expresar una molécula de ácido nucleico se pueden utilizar varios vectores de expresión. Entre tales vectores se incluyen vectores cromosómicos, episomales, y derivados de virus, por ejemplo vectores derivados de plásmidos bacterianos, de bacteriófagos, de episomas de levadura, de elementos cromosómicos de levadura, incluyendo cromosomas artificiales de levaduras, de virus tales como baculovirus, papovavirus tales como SV40, virus vaccinia incluyendo la cepa del virus vaccinia Ankara modificado (MVA), adenovirus, virus de la viruela incluyendo el virus de la viruela aviar en aves de corral (FP9) y el virus de la viruela del canario, virus de la pseudorabia, y retrovirus. También se pueden derivar vectores a partir de combinaciones de estas fuentes tales como aquéllos derivados de elementos genéticos de plásmidos y bacteriófagos, por ejemplo, cósmidos y fagémidos. Vectores de clonación y de expresión apropiados para huéspedes procarióticos y eucarióticos se describen en Sambrook y col., Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., (1989).

La secuencia reguladora podría proporcionar la expresión constitutiva en una o más células huésped (es decir, específicas de tejido) o podría proporcionar la expresión inducida en uno o más tipos de células mediante temperatura, un aditivo nutricional, o un factor exógeno tal como una hormona u otro ligando. Varios de los vectores que proporcionar expresión constitutiva e inducida en huéspedes procarióticos y eucarióticos son bien conocidos por aquellos medianamente experimentados en la materia.

Las moléculas de ácido nucleico se pueden insertar en un ácido nucleico del vector mediante metodología bien conocida. Generalmente, la secuencia de ADN que se expresará en última instancia se une al vector de expresión cortando la secuencia de ADN y el vector de expresión con una o más enzimas de restricción y luego uniendo los fragmentos. Los procedimientos para la digestión con enzimas de restricción y la ligación son bien conocidos para aquellos medianamente experimentados en la materia.

El vector que contiene la molécula de ácido nucleico apropiada se puede introducir en una célula huésped apropiada para su propagación o expresión utilizando técnicas bien conocidas. Las células bacterianas incluyen, pero no se limitan a; *E. coli*, *Streptomyces sp*., y *Salmonella typhimurium*. Las células eucariotas incluyen, pero no se limitan a, levadura, células de insectos tales como *Drosophila*, células animales tales como células COS y CHO, fibroblastos, fibroblastos de la piel, fibroblastos de la piel inmortalizados y células vegetales.

Como se describe aquí, puede ser deseable expresar el péptido como una proteína de fusión. Por consiguiente, la descripción proporciona vectores de fusión que permiten la producción de los péptidos. Los vectores de fusión pueden aumentar la producción de una proteína recombinante, aumentar la solubilidad de la proteína recombinante, y ayudar en la purificación de la proteína actuando por ejemplo como un ligando para purificación por afinidad. Se podría introducir un sitio de corte proteolítico en el sitio de la región de fusión para que en última instancia se pueda separar el péptido deseado de la región de fusión. Enzimas proteolíticas incluyen, pero no se limitan a, factor Xa, trombina, y enteroenzima. Entre los vectores de expresión de proteínas de fusión típicos se incluyen pGEX (Smith y col., Gene 67:31-40 (1988)), pMAL (New England Biolabs, Beverly, Mass.) y pRIT5 (Pharmacia, Piscataway, N.J.) los cuales fusionan glutatión S-transferasa (GST), proteína de unión a maltosa E, o proteína A, respectivamente, con la proteína diana recombinante. Ejemplos de vectores de expresión inducible de proteínas de no fusión en *E. coli* adecuados incluyen pTrc (Amann y col, Gene 69:301-315 (1988)) y pET 11d (Studier y col, Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185:60-89 (1990)).

La expresión de proteínas recombinantes se puede maximizar en bacterias huéspedes proporcionando un fondo genético en donde la célula huésped tiene una capacidad alterada para cortar proteolíticamente la proteína recombinante. (Gottesman, S., Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990) 119-128). Alternativamente, la secuencia de la molécula de ácido nucleico de interés se puede alterar para proporcionar el uso preferencial de codones para una célula huésped específica, por ejemplo *E. coli* (Wada y col., Nucleic Acids Res. 20:2111-2118 (1992)).

Las moléculas de ácido nucleico también se pueden expresar mediante vectores de expresión que sean operativos en levaduras. Ejemplos de vectores para la expresión en levaduras, por ejemplo *S. cerevisiae*, incluyen pYepSecl (Baldari, y col, EMBO J. 6:229-234 (1987)), pMFa (Kujan y col, Cell 30:933-943(1982)), pJRY88 (Schultz y col, Gene 54:113-123 (1987)), y pYES2 (Invitrogen Corporation, San Diego, Calf.).

Las moléculas de ácido nucleico también se pueden expresar en células de insecto utilizando, por ejemplo, vectores de expresión de baculovirus. Entre los vectores de baculovirus disponibles para la expresión de proteínas en células de insecto cultivadas (por ejemplo, células Sf9) se incluyen la serie pAc (Smith y col, Mol. Cell Biol. 3:2156-2165 (1983)) y la serie pVL (Lucklow y col. Virology 170:31-39 (1989)).

En ciertas realizaciones, las moléculas de ácido nucleico aquí descritas se expresan en células de mamífero utilizando vectores de expresión de mamíferos. Entre los ejemplos de vectores de expresión de mamíferos se incluyen pCDM8 (Seed, B. Nature 329:840 (1987)) y pMT2PC (Kaufman y col., EMBO J. 6:187-195 (1987)).

Los vectores de expresión aquí listados se proporcionan como modo de ejemplo sólo de los vectores bien conocidos disponibles para aquéllos medianamente expertos en la materia que serían útiles para expresar las moléculas de ácido nucleico. La persona medianamente experimentada en la materia sería consciente de otros vectores adecuados para la propagación o expresión mantenida de las moléculas de ácido nucleico aquí descritas. Éstos se encuentran por ejemplo en Sambrook, J., Fritsh, E. F., y Maniatis, T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989.

La descripción también abarca vectores en los cuales las secuencias de ácido nucleico aquí descritas se clonan en el vector en orientación reversa, pero unidos operativamente a una secuencia reguladora que permite la transcripción de ARN antisentido. Por tanto, un tránscrito antisentido se puede producir en todas, o en una porción, de las secuencias de la molécula de ácido nucleico aquí descritas, incluyendo ambas regiones codificantes y no codificantes. La expresión de este ARN antisentido está sujeta a cada parámetro descrito más arriba en relación a la expresión del ARN sentido (secuencias reguladoras, expresión constitutiva o inducida, expresión específica de tejido).

La descripción también hace referencia a células huésped recombinantes que contienen los vectores aquí descritos. Las células huésped por lo tanto incluyen células procariotas, células eucariotas inferiores tales como levaduras, otras células eucariotas tales como células de insectos, y células eucariotas superiores tales como las células de mamífero.

Las células huésped recombinantes se preparan introduciendo en las células las construcciones de vector aquí descritas mediante técnicas fácilmente disponibles para la persona medianamente experimentada en la materia. Éstas incluyen, pero no se limitan a, transfección con fosfato de calcio, transfección mediada por DEAE-dextrana, transfección mediada por lípidos catiónicos, electroporación, transducción, infección, lipofección, y otras técnicas tales como aquéllas que se encuentran en Sambrook, y col. (Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989).

Las células huésped pueden contener más de un vector. Por lo tanto, se pueden introducir diferentes secuencias de nucleótidos en diferentes vectores de la misma célula. De manera similar, las moléculas de ácido nucleico se pueden introducir o bien solas o bien con otras moléculas de ácido nucleico que no estén relacionadas con las moléculas de ácido nucleico tales como aquéllas que proporcionan a los vectores de expresión factores que actúan en *trans*. Cuando se introduce más de un vector en una célula, los vectores se pueden introducir de manera independiente, cointroducir o unir al vector de la molécula de ácido nucleico.

En el caso de vectores bacteriófagos y virales, éstos se pueden introducir en las células como virus empaquetados o encapsulados mediante procedimientos estándar para infección y transducción. Los vectores virales pueden ser de replicación competente o de replicación defectiva. En el caso en el cual la replicación viral es defectiva, la replicación ocurrirá en células huésped que proporcionan funciones que complementan los defectos.

Los vectores generalmente incluyen marcadores selectivos que permiten la selección de la subpoblación de células que contienen las construcciones de los vectores recombinantes. El marcador se puede encontrar en el mismo vector que contiene las moléculas de ácido nucleico aquí descritas o podría estar en un vector diferente. Entre los marcadores se incluyen genes con resistencia a tetraciclina o ampicilina para células huésped procariotas y con resistencia a dihidrofolato reductasa o neomicina para células huésped eucariotas. Sin embargo, cualquier marcador que proporciona selección para un rasgo fenotípico será efectivo.

Mientras que las proteínas maduras se pueden producir en bacterias, levaduras, células de mamíferos, y otras células bajo el control de las secuencias reguladoras apropiadas, también se pueden utilizar sistemas de transcripción

y traducción libres de células para producir estas proteínas utilizando ARN derivado de las construcciones de ADN aquí descritas.

Cuando se desea la secreción del péptido, lo cual es difícil de conseguir con múltiples dominios transmembrana que contienen proteínas tales como péptidos de unión a MHC de clase I, se incorporan señales de secreción apropiadas en el vector. La secuencia señal puede ser endógena de los péptidos o heteróloga de estos péptidos.

La proteína expresada se puede aislar de la célula huésped mediante procedimientos de disrupción estándar, incluyendo congelación-descongelación, sonicación, disrupción mecánica, utilización de agentes lisantes y similares. El péptido se pueden entonces recuperar y purificar mediante métodos de purificación bien conocidos incluyendo precipitación con sulfato de amonio, extracción ácida, cromatografía de intercambio aniónico o catiónico, cromatografía en fosfocelulosa, cromatografía de interacción hidrofóbica, cromatografía de afinidad, cromatografía de hidroxiapatita, cromatografía en lectina, o cromatografía líquida de alta eficacia.

Se entiende también que dependiendo de la célula huésped en la producción recombinante de los péptidos aquí descritos, los péptidos pueden tener varios patrones de glicosilación, dependiendo de la célula, o podrían no estar glicosilados como cuando se producen en bacterias. Además, los péptidos podrían incluir en algunos casos una metionina inicial modificada como resultado de un proceso mediado por el huésped.

Hay muchos métodos para introducir un gen o polinucleótido heterólogo en una o varias células huésped en condiciones que permitan un mantenimiento y una expresión estable del gen o polinucleótido. Estos métodos son bien conocidos por aquellos experimentados en la materia. Genes sintéticos, tales como, por ejemplo, aquellos genes modificados para aumentar la expresión en un huésped heterólogo (tal como mediante la utilización de un codón preferido o mediante la utilización de potenciadores colindantes, en dirección 5', o en dirección 3') que son funcionalmente equivalentes a los genes (y los cuales codifican proteínas equivalentes) se pueden utilizar también para transfectar huéspedes. Métodos para la producción de genes sintéticos son bien conocidos en la materia. Se pueden utilizar huéspedes recombinantes para la expresión o propagación de los genes y polinucleótidos aquí descritos. Los genes y polinucleótidos dentro del rango de la descripción se pueden introducir en una gran variedad de huéspedes microbianos o vegetales, tales como células bacterianas, levaduras, células de insectos, cultivos de células vegetales o vegetales, células de mamíferos. Por ejemplo, se pueden expresar ácidos nucleicos de *T. parva* en un baculovirus (BV) recombinante con un promotor optimizado y una región de iniciación de la traducción unida de manera operable para el ácido nucleico de *T. parva*. En una realización preferida, los promotores optimizados y una región de iniciación de la traducción se unen de manera operable al ácido nucleico de *T. parva*. En una realización, se pueden transformar células huésped de insecto con un baculovirus que exprese ácidos nucleicos de *T. parva*. En todavía otra realización, células huésped Tn5 (Trichoplusia ni o High Five™) se pueden transformar con un baculovirus que exprese ácidos nucleicos de *T. parva*.

La "proteína recombinante" de *T. parva*, es una proteína fabricada utilizando técnicas recombinantes, es decir, a través de la expresión de una ácido nucleico recombinante como se describe más arriba. Una proteína recombinante se distingue de una proteína que ocurre de manera natural por al menos una o más características. Por ejemplo, la proteína se puede aislar o purificar de algunas o todas las proteínas y componentes con los cuales se asocia normalmente en su huésped de tipo silvestre, y por lo tanto puede ser sustancialmente pura. Por ejemplo, una proteína aislada se acompaña de por lo menos parte del material con el cual se asocia normalmente en su estado natural, preferiblemente constituyendo por lo menos alrededor del 0,5%, más preferiblemente por lo menos alrededor del 5% del peso de la proteína total en una muestra dada. Una proteína sustancialmente pura comprende por lo menos alrededor del 75% del peso de la proteína total, siendo preferido por lo menos alrededor del 80%, y siendo particularmente preferido por lo menos alrededor del 90%. La definición incluye la producción de una proteína de un organismo en un organismo diferente o célula huésped. De manera alternativa, la proteína se puede fabricar a una concentración significativamente más elevada que la que se ve normalmente, mediante la utilización de un promotor inducible o un promotor de alta expresión, de manera que la proteína se fabrica a niveles de concentración aumentados. Alternativamente, la proteína podría estar en una forma en la que no se encuentra normalmente por naturaleza, como con la adición de un marcaje en el epítopo o con sustituciones, inserciones y/o deleciones de aminoácidos, como se trata más abajo.

Incluidas en los "polipéptidos antígenos de *T. parva*" están las variantes polipeptídicas de *T. parva*. Estas variantes se ubican en una o más de tres clases: variantes sustitucionales, insercionales o delecionales. Estas variantes se preparan normalmente mediante mutagénesis de sitio específico de nucleótidos en el ADN que codifica un polipéptido antígeno de *T. parva*, utilizando mutagénesis por casete o por PCR, mutagénesis de barrido, transposición genética u otras técnicas bien conocidas en la materia, para producir ADN que codifica la variante, y a partir de entonces expresar el ADN en el cultivo de células recombinantes como se detalla más arriba. Sin embargo, se podrían preparar fragmentos de polipéptidos de *T. parva* variantes con hasta alrededor de 100-150 residuos mediante síntesis *in vitro* utilizando técnicas establecidas. Las variantes de secuencias de aminoácidos se caracterizan por la naturaleza predeterminada de la variación, una característica que las distingue de una variación alélica o interespecífica en la secuencia de aminoácidos del polipéptido antígeno de *T. parva* que ocurre naturalmente.

Mientras que el sitio o la región para introducir una variación en la secuencia de aminoácidos está predeterminado, la mutación *per se* no necesita estar predeterminada. Por ejemplo, a fin de optimizar el rendimiento de una mutación en un sitio determinado, se podría llevar a cabo una mutagénesis aleatoria en el codón o región diana y se puede hacer un barrido de las variantes del polipéptido antígeno de *T. parva* para la combinación óptima de la actividad deseada.

Las técnicas para realizar mutaciones en sitios determinados en un ADN de secuencia conocida son bien conocidas. Por ejemplo, las variaciones se pueden hacer utilizando mutagénesis sitio-dirigida mediada por oligonucleótidos, [Carter y col., Nucl. Acids Res., 13:4331 (1986); Zoller y col., Nucl. Acids Res., 10:6487 (1987)], mutagénesis por casete [Wells y col., Gene, 34:315 (1985)], mutagénesis de selección de sitios de restricción [Wells y col., Philos. Trans. R. Soc. London SerA, 317:415 (1986)] mutagénesis por PCR, o se pueden realizar otras técnicas conocidas sobre el ADN clonado para producir ADN variante del polipéptido antígeno de *T. parva*. También se pueden emplear análisis de aminoácidos scanning para identificar uno o más aminoácidos a lo largo de una secuencia contigua. Entre los aminoácidos scanning se encuentran aminoácidos neutros y relativamente pequeños. Tales aminoácidos incluyen alanina, glicina, serina, y cisteína. Típicamente la alanina es un aminoácido scanning preferido dentro de este grupo porque elimina la cadena lateral más allá del carbono-beta y tiene menos probabilidad de alterar la conformación de la cadena principal de la variante. [Cunningham y Wells, Science, 244: 1081-1085 (1989)]. También se prefiere típicamente la alanina porque es el aminoácido más común. Además, se encuentra frecuentemente en posiciones tanto ocultas como expuestas [Creighton, The Proteins, (W.H. Freeman & Co., N.Y.); Chothia, J. Mol. Biol; 150:1 (1976)]. Si la sustitución de alanina no proporciona cantidades adecuadas de variante, se puede utilizar un aminoácido isostérico. Se realiza un barrido de los mutantes o variaciones utilizando un elispot y/o bioensayos para la actividad y/o propiedades del polipéptido antígeno de *T. parva* como se describe aquí.

La descripción también proporciona fragmentos de los péptidos antígenos, además de proteínas y péptidos que comprenden y consisten en tales fragmentos, particularmente aquéllos que comprenden los residuos identificados en Nº ID. SEC: 4-7. Los fragmentos a los cuales se refiere la invención, sin embargo, no deben ser interpretados como fragmentos envolventes que podrían ser descritos públicamente con anterioridad a la presente invención.

Como se utiliza aquí, un fragmento se comprende de al menos alrededor de 8, 10, 12, 14, 16, o más residuos de amino ácidos contiguos de un péptido antígeno. Tales fragmentos se pueden elegir basándose en la capacidad para retener una o más de las actividades biológicas del péptido antígeno o se podrían elegir por la capacidad para realizar una función, por ejemplo unirse a un sustrato o actuar como un inmunógeno. Los fragmentos particularmente importantes son fragmentos biológicamente activos, péptidos que son, por ejemplo, de alrededor de 8 o más amino ácidos de longitud. Tales fragmentos comprenderán típicamente un dominio o motivo del péptido antígeno, por ejemplo, un sitio activo, un dominio transmembrana o un dominio de unión a sustrato. Además, posibles fragmentos incluyen, pero no se limitan a, fragmentos que contienen un dominio o motivo, fragmentos de péptidos solubles, y fragmentos que contienen estructuras inmunogénicas. Los dominios y sitios funcionales predichos son fácilmente identificables mediante programas informáticos bien conocidos y fáciles de conseguir para aquéllos experimentados en la materia (por ejemplo, análisis con PROSITE).

El software, "Glimmer" versión 1,0 y 2,0 (Gene Locator and Interpolated Markov Modeler), se utiliza para encontrar genes en ADN, utilizando modelos interpolados de Markov (IMMs, del inglés "Interpolated Markov Models") para identificar las regiones codificantes y distinguirlas del ADN no codificante. La aproximación por IMM, descrita en Salzburg y col., 1998, NAR 26:544, y Delcher y col., 1999, NAR 27:4636 utiliza una combinación de modelos de Markov desde de 1er orden hasta de 8º orden, ponderando cada modelo de acuerdo a su poder predictivo. Glimmer 1,0 y 2,0 utilizan modelos de Markov no homogéneos 3-periódicos en sus IMMs. Glimmer y otras aplicaciones de software que utilizan IMM tales como GlimmerM y GlimmerHMM, (Pertea, M., y Salzberg, S.L. Current Protocols in Bioinformatics, 2002.) se han utilizado para encontrar los genes del cromosoma 2 del parásito de la malaria, *P. falciparum*. GlimmerM se describe en S.L. Salzberg, M. Pertea, A.L. Delcher, M.J. Gardner, y H. Tettelin, "Interpolated Markov models for eukaryotic gene finding", Genomics 59 (1999), 24-31. El sistema Glimmer consiste en dos programas principales. El primero de éstos es el programa de entrenamiento, *build-imm* que toma un conjunto de secuencias de entrada y construye y saca los IMM de las mismas. Estas secuencias pueden ser genes completos o sólo marcos abiertos de lectura parciales. Para un genoma nuevo, estos datos de entrenamiento pueden consistir en aquellos genes con muchas coincidencias en la base de datos así como en marcos abiertos de lectura muy largos que estadísticamente son casi con certeza genes. El segundo programa es glimmer, el cual utiliza estos IMM para identificar genes putativos en un genoma completo. Hay un programa Perl disponible que utilizará predicciones de Glimmer para recurrir al programa BLAST y buscar cualquier base de datos de proteínas instalada localmente.

"Combiner" (J. E. Allen, M. Pertea, S. L. Salzberg, Genome Research, 14(1), 2004) es un programa que utiliza los datos de salida de buscadores de genes, programas de predicción de sitios de corte y empalme y alineamientos de secuencias para predecir modelos de genes. El programa proporciona una vía automatizada para aprovechar los muchos métodos satisfactorios para la predicción computacional de genes y puede proporcionar mejoras sustanciales de precisión en comparación con un programa de predicción de genes individual. Estas aplicaciones de software pueden incorporar información que permitirá a una persona experimentada en la materia identificar secuencias candidatas para los polipéptidos codificantes de interés.

Los polipéptidos a menudo contienen otros aminoácidos además de los 20 aminoácidos comúnmente referidos como los 20 aminoácidos naturales. Además, muchos aminoácidos, incluyendo los aminoácidos terminales, se pueden modificar mediante procesos naturales, tales como procesamiento y otras modificaciones postraduccionales, o mediante técnicas de modificación química bien conocidas en la materia. Las modificaciones comunes que ocurren de manera natural en antígenos peptídicos se describen en textos básicos, monografías detalladas, y en literatura de investigación, y son bien conocidas por aquellos experimentados en la materia.

Las modificaciones conocidas incluyen, pero no se limitan a, acetilación, acilación, ribosilación de ADP, amidación, unión covalente de flavina, unión covalente de la fracción hemo, unión covalente de un nucleótido o derivado de nucleótido, unión covalente de un lípido o derivado de lípido, unión covalente de fosfatidilinositol, entrecruzamiento, ciclización, formación de puentes de disulfuro, desmetilación, formación de entrecruzamientos covalentes, formación de cistina, formación de piroglutamato, formilación, carboxilación gamma, glicosilación, formación de anclaje de GPI, hidroxilación, iodinación, metilación, miristoilación, oxidación, procesamiento proteolítico, fosforilación, prenilación, racemización, selenación, sulfación, adición de aminoácidos a proteínas mediada por ARN de transferencia, tal como arginilación, y ubiquitinación.

Tales modificaciones son bien conocidas por aquéllos experimentados en la materia y han sido descritas en mucho detalle en la literatura científica. Varias modificaciones particularmente conocidas, glicosilación, unión de lípidos, sulfación, carboxilación gamma de residuos de ácido glutámico, hidroxilación y ribosilación de ADP, por ejemplo, se describen en la mayoría de los textos básicos, tales como Proteins-Structure and Molecular Properties, 2ª edición, T. E. Creighton, W. H. Freeman and Company, New York (1993). Hay muchos trabajos de revisión detallados disponibles sobre este tema, tales como los realizados por Wold, F., Posttranslational Covalent Modification of Proteins, B. C. Johnson, Ed., Academic Press, New York 1-12 (1983); Seifter y col. (Meth. Enzymol. 182: 626-646 (1990)) y Rattan y col. (Ann. N.Y Acad. Sci. 663:48-62 (1992)).

Por consiguiente, los péptidos antígeno aquí mencionados también abarcan derivados o análogos en los cuales un residuo aminoácido sustituido no es uno codificado por el código genético, en el cual se incluye un grupo sustituyente, en el cual el péptido antígeno maduro se fusiona con otro compuesto, tal como un compuesto para aumentar la vida media del péptido antígeno (por ejemplo, polietilenglicol), o en el cual los aminoácidos adicionales se fusionan con un péptido antígeno maduro, tal como una secuencia líder o secretoria para la purificación del péptido antígeno maduro o una secuencia pro-proteína.

Aunque la secuencia de aminoácidos u oligopéptidos utilizada para inducción de anticuerpos no requiere actividad biológica, tiene que ser inmunogénica. Un péptido, polipéptido, o proteína utilizada para inducir anticuerpos específicos podría tener una secuencia de aminoácidos con por lo menos cinco aminoácidos y preferiblemente por lo menos 10 aminoácidos. Se podrían fusionar genética o químicamente tramos cortos de la secuencia de aminoácidos con aquéllos de otra proteína tal como la hemocianina de la lapa californiana, y utilizar los péptidos quiméricos para la producción de anticuerpos. Alternativamente, el oligopéptido podría tener una longitud suficiente para contener un dominio completo.

Anticuerpos específicos para péptidos, polipéptidos, o proteínas se podrían producir mediante la inoculación de un animal no humano apropiado con un fragmento antigénico del péptido, polipéptido, o proteína. La producción de anticuerpos no sólo incluye la estimulación de una respuesta inmune mediante inyección en animales no humanos, sino también procesos análogos tales como la producción de anticuerpos sintéticos, el cribado de librerías de inmunoglobulinas recombinantes para moléculas de unión específica (Orlandi R. y col. [1989] PNAS 86:3833-3837, o Huse W. D. y col. [1989] Science 256:1275-1281), o la estimulación *in vitro* de poblaciones de linfocitos. La tecnología actual (Winter G. y Milstein C. [1991] Nature 349:293-299) proporciona una serie de reactivos de unión altamente específica basados en los principios de formación de anticuerpos. Estas técnicas se podrían adaptar para producir moléculas las cuales se unen específicamente a péptidos antígeno. Anticuerpos u otras moléculas apropiadas generadas contra un fragmento del péptido inmunogénico u oligopéptido específico se pueden utilizar en análisis Western, ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISA) o pruebas similares para establecer la presencia o cuantificar las cantidades de péptido, polipéptido, o proteína en células, tejidos, órganos, u organismos normales, enfermos, o transformados, así como suspensiones líquidas que contienen dicho péptido, polipéptido, o proteína.

La descripción también proporciona anticuerpos que se unen selectivamente a uno de los péptidos aquí descritos, una proteína que comprenda dicho péptido, así como variantes y fragmentos de los mismos. Como se utiliza aquí, un anticuerpo se une selectivamente a un péptido diana cuando se une al péptido diana y no se une significativamente a proteínas no relacionadas. Todavía se considera que un anticuerpo se une selectivamente a un péptido aunque también se una a otras proteínas que no son sustancialmente homólogas con el péptido diana siempre que tales proteínas compartan homología con un fragmento o dominio del péptido diana del anticuerpo. En este caso, se entendería que la unión del anticuerpo al péptido es todavía selectiva a pesar de un cierto nivel de reactividad cruzada.

Como se utiliza aquí, un anticuerpo se define en términos consistentes con lo que se reconoce en la materia: son proteínas multisubunidad producidas por un organismo mamífero en respuesta a una infección por un antígeno. Los anticuerpos aquí mencionados incluyen anticuerpos policlonales y anticuerpos monoclonales, así como fragmentos de tales anticuerpos, incluyendo, pero no limitándose a, Fab o $F(ab')_2$, y fragmentos de Fv.

Se conocen muchos métodos para generar y/o identificar anticuerpos para un péptido diana dado. Varios de estos métodos se describen en Harlow, Antibodies, Cold Spring Harbor Press, (1989).

En general, para generar anticuerpos, se utiliza un péptido aislado como inmunógeno y se administra a un organismo mamífero, tal como una rata, conejo o ratón. Se puede utilizar la proteína completa, un fragmento del péptido antigénico o una proteína de fusión. Fragmentos particularmente importantes son aquéllos que cubren dominios funcionales, tales como los dominios identificados en las figuras, y dominios con homología o divergencia de secuencias

entre la familia, tales como aquéllos que se pueden identificar fácilmente utilizando métodos de alineamiento de proteínas como se presentan en las Figuras.

Los anticuerpos se preparan preferiblemente a partir de regiones o fragmentos discretos de las proteínas antigénicas. Los anticuerpos se pueden preparar a partir de cualquier región del péptido como se describe aquí. Sin embargo, las regiones preferidas incluirán aquéllas involucradas en función/actividad y/o interacción de antígeno/pareja de unión.

Un fragmento antigénico típicamente comprenderá por lo menos 8 residuos de aminoácidos contiguos. El péptido antígeno puede comprender, sin embargo, por lo menos 10, 12, 14, 16 o más residuos de aminoácidos. Tales fragmentos se pueden seleccionar basándose en una propiedad física, tal como que los fragmentos correspondan a regiones que se localizan en la superficie de la proteína, por ejemplo, regiones hidrofílicas o se pueden seleccionar basándose en la unicidad de la secuencia.

La detección de un anticuerpo o péptido aquí descrito se puede facilitar acoplando (es decir, uniendo físicamente) el anticuerpo o péptido a una sustancia detectable. Entre los ejemplos de sustancias detectables se incluyen varias enzimas, grupos prostéticos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes, materiales biolumuniscentes, y materiales radiactivos. Entre los ejemplos de enzimas adecuadas se incluyen peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa, o acetilcolinesterasa; entre los ejemplos de complejos de grupos prostéticos adecuados se incluyen estreptavidina/biotina y avidina/biotina; entre los ejemplos de materiales fluorescentes adecuados se incluyen umbelliferona, fluoresceína, isocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilamino fluoresceína, cloruro de dansilo o ficoeritrina, un ejemplo de material luminiscente incluye el luminol; entre los ejemplos de materiales bioluminiscentes se incluyen luciferasa, luciferina, y aecuorina, y entre los ejemplos de material radiactivo adecuado se incluyen ^{125}I,^{131}I,^{35}S o ^{3}H.

Los anticuerpos se pueden utilizar para aislar una de las proteínas aquí descritas mediante técnicas estándar, tales como cromatografía de afinidad o inmunoprecipitación. Los anticuerpos pueden facilitar la purificación de la proteína natural de células y de la proteína producida de manera recombinante expresada en células huésped. Además, tales anticuerpos son útiles para detectar la presencia de una de las proteínas aquí descritas en células o tejidos para determinar el patrón de expresión de la proteína en varios tejidos de un organismo y a lo largo del desarrollo de esquizontes. Tales anticuerpos se pueden utilizar para detectar una proteína *in situ*, *in vitro*, o en un lisado de células o sobrenadante a fin de evaluar la abundancia y el patrón de expresión. También, tales anticuerpos se pueden utilizar para evaluar la distribución anormal de tejido o expresión anormal durante el desarrollo o progresión de una infección por protozoos. La detección de anticuerpos en fragmentos circulantes de la proteína completa se puede utilizar para identificar recambio.

Además, los anticuerpos se pueden utilizar para evaluar expresión en estados de enfermedad tales como en fases activas de la enfermedad o en linfocitos recogidos de animales infectados. Datos experimentales han mostrado expresión de antígenos de *T. parva*, utilizando anticuerpos dirigidos contra tales antígenos, en linfocitos bovinos, infectados con *T. parva*. Si una enfermedad se caracteriza por una mutación específica en la proteína se pueden utilizar anticuerpos específicos para esta proteína mutante para hacer ensayos para la presencia de la proteína mutante específica.

Los usos diagnósticos se pueden aplicar, no sólo en la realización de pruebas genéticas, sino también en la monitorización de una modalidad de tratamiento. Por consiguiente, cuando el objetivo del tratamiento es en última instancia prevenir o controlar la infección se pueden utilizar anticuerpos dirigidos contra la proteína o fragmentos relevantes para monitorizar la eficacia terapéutica.

Los anticuerpos también son útiles para inhibir la función de la proteína, por ejemplo, bloquear la unión del péptido antigénico a una pareja de unión tal como un sustrato. Estos usos también se pueden aplicar en un contexto terapéutico en el cual el tratamiento supone la inhibición de la función de la proteína. Un anticuerpo se puede utilizar, por ejemplo, para bloquear la unión, por tanto modulando (agonizando o antagonizando) la actividad de los péptidos. Los anticuerpos se pueden preparar contra fragmentos específicos que contienen sitios requeridos para la función o contra la proteína intacta que se asocia con una célula o membrana celular. Véase Nº ID. SEC: 1-7 para información estructural relacionada con las proteínas aquí descritas.

La descripción también abarca kits para la utilización de anticuerpos para detectar la presencia de una proteína en una muestra biológica. El equipo puede comprender anticuerpos tales como un anticuerpo marcado o que se puede marcar y un compuesto o agente para detectar proteína en una muestra biológica; medios para determinar la cantidad de proteína en la muestra; medios para comparar la cantidad de proteína en la muestra con un estándar; e instrucciones de uso. Tal equipo se puede suministrar para detectar una única proteína o epítopo o se pueden configurar para detectar uno de los múltiples epítopos, tal como en un chip de expresión para detección de anticuerpos. Los chips de expresión se describen en detalle más abajo para chips de expresión de ácidos nucleicos y se han desarrollado métodos similares para chips de expresión de anticuerpos.

Las proteínas aquí descritas se pueden utilizar en ensayos relacionados con la información funcional proporcionada en las Figuras; por ejemplo, para estimular líneas de células T citotóxicas CD8+, para obtener anticuerpos o provocar otra respuesta inmune; como un reactivo (incluyendo el reactivo marcado) en ensayos diseñados para determinar cuantitativamente los niveles de proteína (o su pareja de unión o ligando) en fluidos biológicos; y como marcadores para tejidos en los cuales la proteína correspondiente se expresa preferentemente (o bien constitutivamente o bien en una fase particular de la diferenciación o desarrollo tisular o en un estado de enfermedad). Cuando la proteína se

une o se une potencialmente a otra proteína o ligando (tal como, por ejemplo, en una interacción enzima-proteína efectora o interacción enzima-ligando), se puede utilizar la proteína para identificar inhibidores de la interacción de unión. Cualquiera de estos usos o todos se pueden desarrollar en grado reactivo o en formato de equipo para su comercialización como productos comerciales.

Los métodos para realizar los usos listados más arriba son bien conocidos por aquéllos experimentados en la materia. Entre las referencias que describen tales métodos se incluyen "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", 2ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Sambrook, J., E. F. Fritsch y T. Maniatis eds., 1989, y "Methods in Enzymology. Guide to Molecular Cloning Techniques", Academic Press, Berger, S. L. and A. R. Kimmel eds., 1997.

Los usos potenciales de los péptidos aquí descritos se basan fundamentalmente en la fuente de la proteína así como en la clase/acción de la proteína. Por ejemplo, antígenos aislados de *T. parva* y sus ortólogos en protozoos sirven como dianas para identificar agentes para utilizar en aplicaciones terapéuticas para mamíferos, por ejemplo una droga animal, particularmente en la modulación de una respuesta biológica o patológica en una célula, tejido, o protozoo que expresa un antígeno inmunogénico. Datos experimentales han mostrado que los antígenos aquí descritos se expresan en linfocitos de huéspedes infectados, como se indica mediante análisis de citometría de flujo. Tales usos se pueden determinar fácilmente utilizando la información proporcionada aquí, la que se conoce en la materia, y la experimentación rutinaria.

La linfoblastosis es una condición que describe la multiplicación o la proliferación de linfocitos. A menudo la linfoblastosis ocurre cuando se estimulan ciertos linajes de linfocitos, tales como aquéllos de las vías inmunológicas mediadas por células T, mediante un antígeno. Otras veces, la linfoblastosis puede ser el resultado de procesos patológicos tales como una infección viral u otra infección patogénica o como resultado de tumorogénesis.

Para realizar los ensayos aquí mencionados, tales como ensayos para detectar un patógeno, por ejemplo, detectando la presencia y/o expresión de un polipéptido aquí descrito en el patógeno, a veces es deseable inmovilizar o bien la proteína antígeno, o fragmento, o bien su molécula diana para facilitar la separación de los complejos de las formas no acomplejadas de una o ambas proteínas, así como para dar cabida a la automatización del ensayo.

En los ensayos aquí mencionados se pueden utilizar técnicas para inmovilizar proteínas en matrices. En una realización, se puede suministrar una proteína de fusión la cual añade un dominio que permite que la proteína se una a la matriz. Por ejemplo, las proteínas de fusión glutatión S-transferasa se pueden adsorber en bolas de glutatión sefarosa (Sigma Chemical, St. Louis, Mo.) o placas de microtitulación derivatizadas de glutatión, las cuales se combinan entonces con los lisados celulares (por ejemplo, marcados con ^{35}S) y el compuesto candidato, y la mezcla se incuban en condiciones propicias para la formación del complejo (por ejemplo, en condiciones fisiológicas de sales y pH). Tras la incubación, se lavan las bolas para eliminar cualquier marcador no unido, y se inmoviliza la matriz y el radiomarcador se determina directamente, o en el sobrenadante después de que se disocien los complejos. Alternativamente, los complejos se pueden disociar de la matriz, separar por SDS-PAGE, y, a partir del gel, cuantificar el nivel de proteína de unión a antígeno que se encuentra en la fracción de las bolas utilizando técnicas de electroforesis estándar. Por ejemplo, se puede inmovilizar o bien el polipéptido o bien su molécula diana utilizando la conjugación de biotina y estreptavidina usando técnicas bien conocidas en la materia. Alternativamente, los anticuerpos que reaccionan con la proteína pero los cuales no interfieren con la unión de la proteína a su molécula diana se pueden derivatizar a los pocillos de la placa, y atrapar la proteína en los pocillos mediante la conjugación del anticuerpo. Las preparaciones de la proteína de unión al antígeno y del compuesto candidato se incuban en los pocillos presentadores de proteína antigénica y la cantidad de complejo atrapado en el pocillo se puede cuantificar. Entre los métodos para detectar tales complejos, además de aquellos descritos más arriba para los complejos inmovilizados por GST, se incluyen inmunodetección de complejos utilizando anticuerpos que reaccionan con la molécula diana de la proteína antígeno, o los cuales reaccionan con la proteína antígeno y compiten con la molécula diana, así como ensayos ligados a enzimas los cuales se basan en la detección de actividad enzimática asociada con la presencia de la molécula diana.

Las proteínas antigénica aquí mencionadas también son útiles para proporcionar una diana para diagnosticar una enfermedad o una enfermedad mediada por el péptido. Por consiguiente, la descripción proporciona métodos para detectar la presencia, o los niveles, de la proteína (o ARNm codificante) en una célula, tejido, u organismo. Datos experimentales han mostrado expresión en linfocitos de bovino infectados con *T. parva*. El método implica contactar una muestra biológica con un compuesto capaz de interaccionar con la proteína antígeno de manera que la interacción se pueda detectar. Tal ensayo se puede suministrar en formato de detección única o en formato de multidetección tal como un chip de expresión de anticuerpos.

Un agente para detectar una proteína en una muestra es un anticuerpo capaz de unirse selectivamente a la proteína. Una muestra biológica incluye tejidos, células y fluidos biológicos aislados de un sujeto, así como tejido, células y fluidos presentes en el sujeto.

Otro aspecto aquí mencionado es un equipo para purificar *T. parva* a partir de una muestra con *T. parva*, que comprende un anticuerpo mencionado aquí. El equipo podría además comprender medios para realizar un ensayo ligado a enzima o transferencia Western para detectar la presencia de *T. parva*; y/o medios para unir el anticuerpo a *T. parva* en la muestra, y para liberar al organismo del anticuerpo.

Los péptidos aquí descritos también proporcionan dianas para diagnosticar la actividad de parásitos activos o enfermedad, en un animal con un péptido variante, particularmente actividades y condiciones que se conocen para otros miembros de la familia de proteínas a la cual pertenece el mismo. Por lo tanto, el péptido se puede aislar de una muestra biológica y someter a ensayo para la presencia de una mutación genética que resulte en un péptido aberrante. Esto incluye sustitución, deleción, inserción, reordenación (como resultado de casos de corte y empalme aberrantes), y modificación post-traduccional inapropiada de aminoácidos. Entre los métodos analíticos se incluyen movilidad electroforética alterada, digestión tríptica del péptido alterada, actividad enzimática alterada en ensayos basados en células o libres de células, alteración en el patrón de unión al sustrato o anticuerpo, punto isoeléctrico alterado, secuenciación directa de aminoácidos, y cualquiera de las otras técnicas de ensayo útiles para la detección de mutaciones en una proteína. Tal ensayo se puede suministrar en formato de detección única o en formato de multidetección tal como un chip de expresión de anticuerpos.

Entre las técnicas *in vitro* para detección de péptidos se incluyen ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISAs), transferencias Western, inmunoprecipitaciones e inmunofluorescencia utilizando un reactivo de detección, tal como un anticuerpo o un agente de unión a proteínas, así como métodos que representan realizaciones aquí descritas. Alternativamente, el péptido se puede detectar *in vivo* en un sujeto introduciendo en el sujeto un anticuerpo anti-péptido marcado u otros tipos de agentes de detección. Por ejemplo, el anticuerpo se puede marcar con un marcador radioactivo cuya presencia y localización en un sujeto se puede detectar mediante técnicas de imagen estándar. Tales métodos se pueden utilizar para detectar la variante alélica de un péptido expresada en un sujeto infectado y métodos los cuales detectan fragmentos de un péptido en una muestra.

Los usos diagnósticos se pueden aplicar, no sólo en pruebas genéticas, sino también en la monitorización de una modalidad de tratamiento. Por consiguiente, cuando el objetivo del tratamiento es en última instancia prevenir o controlar la infección, se pueden utilizar anticuerpos dirigidos contra la proteína o fragmentos relevantes para monitorizar la eficacia terapéutica.

La descripción también abarca kits para utilizar anticuerpos para detectar la presencia de una proteína en una muestra biológica. El equipo puede comprender anticuerpos tales como un anticuerpo marcado o que se puede marcar y un compuesto o agente para detectar proteína en una muestra biológica; medios para determinar la cantidad de proteína en una muestra, medios para comparar la cantidad de proteína en la muestra con un estándar; e instrucciones de uso. Tal equipo se puede suministrar para detectar una única proteína o epítopo o se pueden configurar para detectar uno de los múltiples epítopos, tal como en un chip de expresión para detección de anticuerpos. Los chips de expresión se describen en detalle más abajo para chips de expresión de ácidos nucleicos y se han desarrollado métodos similares para chips de expresión de anticuerpos.

La presente descripción además proporciona moléculas de ácido nucleico aisladas que codifican un péptido antígeno de *T. parva* para la proteína aquí descrita (secuencia de ADNc, del tránscrito y genómica). Tales moléculas de ácido nucleico consistirán en, esencialmente consisten en, o comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica uno de los péptidos enzimas aquí descritos, una variante alélica del mismo, o un ortólogo o parálogo del mismo.

Como se utiliza aquí, una molécula de ácido nucleico "aislada" es una que se separa de otro ácido nucleico presente en la fuente natural del ácido nucleico. Preferiblemente, un ácido nucleico "aislado" está libre de secuencias las cuales flanquean el ácido nucleico por naturaleza (es decir, secuencias localizadas en los extremos 5' y 3' del ácido nucleico) en el ADN genómico del organismo del cual se deriva el ácido nucleico. Sin embargo, pueden haber algunas secuencias de nucleótidos flanqueantes, por ejemplo hasta alrededor de 5 KB, 4 KB, 3 KB, 2 KB, o 1 KB o menos, particularmente secuencias contiguas que codifican un péptido o secuencias que codifican un péptido en el mismo gen pero separadas por intrones en la secuencia genómica. Lo importante es que el ácido nucleico se aísle de secuencias flanqueantes remotas y sin importancia de manera que se pueda someter a las manipulaciones específicas aquí descritas tales como expresión recombinante, preparación de sondas y cebadores, y otros usos específicos de las secuencias de ácidos nucleicos.

Además, una molécula de ácido nucleico "aislada", tal como una molécula tránscrito/ADNc, puede estar sustancialmente libre de otro material celular, o medio de cultivo cuando se produce mediante técnicas recombinantes, o precursores químicos u otras sustancias químicas cuando se sintetiza químicamente. Sin embargo, la molécula de ácido nucleico se puede fusionar con otras secuencias codificantes o reguladoras y todavía considerarse aislado.

Por ejemplo, las moléculas de ADN recombinante contenidas en un vector se consideran aisladas. Más ejemplos de moléculas de ADN aisladas incluyen moléculas de ADN recombinante mantenidas en células huésped heterólogas o moléculas de ADN purificadas (parcialmente o sustancialmente) en solución. Moléculas de ARN aisladas incluyen transcritos de ARN *in vivo* o *in vitro* de las moléculas de ADN aisladas aquí descritas. Las moléculas de ácido nucleico aisladas aquí descritas además incluyen tales moléculas producidas sintéticamente.

El ácido nucleico podría ser de doble cadena, de cadena simple, o contener porciones de ambas secuencias de doble cadena o cadena simple. Como se apreciará por aquéllos experimentados en la materia, la representación de una cadena simple ("Watson") también define la secuencia de la otra cadena ("Crick"); por tanto las secuencias representadas en las figuras también incluyen el complemento de la secuencia.

Como se describe aquí, no se necesita el 100% de identidad entre el ARN y el gen diana para practicar la presente invención. Por lo tanto la invención tiene la ventaja de ser capaz de tolerar las variaciones de secuencia que se podrían

esperar debidas a una mutación genética, polimorfismos, o divergencia evolutiva. Las moléculas de ARNi aquí mencionadas no se limitan a aquéllas dirigidas al polinucleótido o gen completo. El producto génico se puede inhibir con una molécula de ARNi dirigida a una porción o fragmento de los polinucleótidos ejemplificados; también se prefiere una homología alta (90-95%) o mayor identidad, pero no es necesariamente esencial, para tales aplicaciones.

Por consiguiente, la descripción proporciona moléculas de ácido nucleico que consisten en, consisten esencialmente en, o comprenden, la secuencia de nucleótidos mostrada en Nº ID. SEC: 25-31 o cualquier molécula de ácido nucleico que codifica una proteína codificada por Nº ID. SEC: 25-31.

El término "que consiste esencialmente en", cuando se utiliza en el contexto de biopolímeros, hace referencia a una secuencia la cual es intermedia entre el número de residuos (aminoácidos o, en este caso, nucleótidos) abarcados por el término "que consiste en" y la mayor longitud abarcada por el término "que comprende". Los residuos además de los residuos abarcados por el lenguaje "que consiste en" no afectan a las características básicas y novedosas (es decir, en el caso de un polinucleótido, la capacidad de codificar un péptido funcional, o de unirse específicamente a un ácido nucleico de interés) de la molécula abarcada por el lenguaje "que consiste en".

La descripción además proporciona moléculas de ácido nucleico que codifican fragmentos de los péptidos aquí descritos así como moléculas de ácido nucleico que codifican variantes obvias de las proteínas enzimas aquí mencionadas que se describen más arriba. Tales moléculas de ácido nucleico podrían ser naturales, tales como variantes alélicas (mismo *locus*), parálogos (*locus* diferente), y ortólogos (organismo diferente), o se podrían construir mediante métodos de recombinación de ADN o mediante síntesis química. Tales variantes no naturales se podrían fabricar mediante técnicas de mutagénesis, incluyendo aquéllas aplicadas a moléculas de ácido nucleico, células u organismos. Por consiguiente, como se trata más arriba, las variantes pueden contener sustituciones, deleciones, inversiones e inserciones de nucleótidos. Puede ocurrir variación tanto en una como en ambas regiones codificantes y no codificantes. Las variaciones pueden producir sustituciones conservativas y no conservativas de aminoácidos.

La descripción además proporciona fragmentos del epítopo de las proteínas antígeno y las moléculas de ácido nucleico que codifican los antígenos, proporcionados en la descripción de los experimentos de mapeo de epítopo descritos más abajo. Una región que codifica un epítopo comprende una secuencia de nucleótidos contigua mayor de 12 o más nucleótidos. Además, un fragmento podría ser de por lo menos 30, 40, 50, 100, 250 o 500 nucleótidos de longitud. La longitud del fragmento se basará en su uso previsto. Por ejemplo, el fragmento puede codificar regiones del péptido que llevan el epítopo, o puede ser útil como sondas y cebadores de ADN. Tales fragmentos se pueden aislar utilizando la secuencia de nucleótidos conocida para sintetizar una sonda de oligonucleótidos. Se puede utilizar entonces una sonda marcada para hacer un barrido de una librería de ADNc, librería de ADN genómico, o ARNm para aislar el ácido nucleico correspondiente a la región codificante. Además, los cebadores se pueden utilizar en reacciones de PCR para clonar regiones específicas del gen.

Una sonda/cebador típicamente comprende sustancialmente un oligonucleótido o par de oligonucleótidos purificados. El oligonucleótido comprende una región de secuencia de nucleótidos que se hibrida en condiciones severas con por lo menos alrededor de 12, 20, 25, 40, 50 o más nucleótidos consecutivos.

Se pueden identificar ortólogos, homólogos, y variantes alélicas utilizando métodos bien conocidos en la materia. Como se describe en la Sección de Péptidos, estas variantes comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica un péptido que tiene típicamente un 60-70%, 70-80%, 80-90%, y más típicamente por lo menos alrededor de un 90-95% o más de homología con la secuencia de nucleótidos en las hojas de Figuras o un fragmento de esta secuencia. Tales moléculas de ácido nucleico se pueden identificar fácilmente como capaces de hibridarse en condiciones entre moderadas y severas, con la secuencia de nucleótidos mostrada en las hojas de Figuras o un fragmento de la secuencia. Se pueden identificar variantes alélicas fácilmente por el *locus* genético del gen codificante. El gen que codifica la enzima novedosa aquí descrita se localiza en un componente del genoma que se ha mapeado en los cromosomas 1 y 2 de *T. parva* lo cual se respalda en múltiples líneas de evidencia, tales como datos de mapas STS y BAC.

Las moléculas de ácido nucleico aquí descritas son útiles como sondas, cebadores, intermedios químicos, y en ensayos biológicos. Las moléculas de ácido nucleico son útiles como sondas de hibridación para ARN mensajero, tránscrito/ADNc y ADN genómico para aislar ADNc y clones genómicos completos que codifican el péptido descrito en Nº ID. SEC: 4-7 y para aislar ADNc y clones genómicos que corresponden a variantes (alelos, ortólogos, etc.) que producen los mismos péptidos mostrados en Nº ID. SEC: 1-7 o péptidos relacionados.

La sonda puede corresponder a cualquier secuencia a lo largo de toda la longitud de las moléculas de ácido nucleico proporcionadas en la información de la ID. SEC. Por consiguiente, se podría derivar a partir de regiones 5' no codificantes, la región codificante, y regiones 3' no codificantes. Sin embargo, como se trata, los fragmentos no deben interpretarse como fragmentos envolventes descritos previamente a la presente invención.

Las moléculas de ácido nucleico también son útiles como cebadores de PCR para amplificar cualquier región dada de una molécula de ácido nucleico y son útiles para sintetizar moléculas antisentido con la longitud y secuencia deseadas.

Las moléculas de ácido nucleico también son útiles para la construcción de vectores recombinantes. Entre tales vectores se incluyen vectores de expresión que expresan una porción de las secuencias del péptido, o todas. Entre los

vectores también se incluyen vectores de inserción, utilizados para integrarse en otra secuencia de molécula de ácido nucleico, tal como en el genoma celular, para alterar la expresión *in situ* de un gen y/o producto génico. Por ejemplo, una secuencia codificante endógena se puede reemplazar mediante recombinación homóloga por toda o parte de la región codificante que contiene una o más mutaciones específicamente introducidas.

Las moléculas de ácido nucleico también son útiles para la expresión de porciones antigénicas de las proteínas.

Las moléculas de ácido nucleico también son útiles como cebadores para determinar las posiciones cromosómicas de las moléculas de ácido nucleico mediante métodos de hibridación *in situ*. Los genes que codifican los antígenos novedosos aquí descritos se localizan en un componente del genoma que se ha mapeado en el cromosoma 1 de *T. parva* (Tp2).

Las moléculas de ácido nucleico también son útiles en la fabricación de vectores con las regiones reguladoras de genes de las moléculas de ácido nucleico aquí descritas.

Las moléculas de ácido nucleico también son útiles para diseñar antígenos correspondientes a todo, o parte, del ARNm producido a partir de las moléculas de ácido nucleico aquí descritas.

Las moléculas de ácido nucleico también son útiles para fabricar vectores que expresan parte de los péptidos, o todos.

Las moléculas de ácido nucleico también son útiles para construir células huésped que expresan parte de las moléculas de ácido nucleico y péptidos, o todas.

Las moléculas de ácido nucleico también son útiles como sondas de hibridación para determinar la presencia, nivel, forma y distribución de la expresión de ácidos nucleicos. Tales sondas se podrían utilizar para detectar la presencia, o determinar los niveles, de una molécula de ácido nucleico específica en células, tejidos, y organismos. El ácido nucleico cuyo nivel se determina puede ser ADN o ARN. Por consiguiente, las sondas correspondientes a los péptidos aquí descritos se pueden utilizar para evaluar la expresión y/o el número de copias de un gen en una célula, tejido, u organismo dado. Estos usos son relevantes para el diagnóstico de trastornos que suponen un aumento o descenso de la expresión de la proteína antígeno en relación a los resultados normales.

Entre las técnicas *in vitro* para la detección de ARNm se incluyen hibridaciones Northern e hibridaciones *in situ*. Entre las técnicas *in vitro* para la detección de ADN se incluyen hibridaciones Southern e hibridaciones *in situ*.

Se pueden utilizar sondas como parte de un equipo para pruebas de diagnóstico para identificar células o tejidos que expresan una proteína antígeno de *T. parva*, tal como midiendo un nivel de un ácido nucleico que codifica el antígeno en una muestra de células de un sujeto, por ejemplo ARNm o ADN genómico, o determinando si se ha mutado un gene antígeno.

La descripción abarca kits para detectar la presencia de un ácido nucleico antígeno en una muestra biológica. Por ejemplo, el equipo puede comprender reactivos tales como una ácido nucleico o agente marcado o que se puede marcar capaz de detectar un ácido nucleico antígeno en una muestra biológica; y medios para comparar la cantidad de ácido nucleico antígeno en la muestra con un estándar. El compuesto o agente se puede empaquetar en un contenedor adecuado. El equipo además puede comprender instrucciones para la utilización del equipo para detectar ARNm o ADN de la proteína antígeno.

La descripción además proporciona kits de detección de ácidos nucleicos, tales como chips de expresión o microchips de expresión de moléculas de ácido nucleico que se basan en la información de la secuencia proporcionada en Nº ID. SEC: 25-31.

Como se utiliza aquí "Chips de expresión" o "Microchips de expresión" se refiere a un chip de expresión de polinucleótidos u oligonucleótidos distintos sintetizados sobre un sustrato, tal como papel, nailon, u otro tipo de membrana, filtro, chip, placa de vidrio, o cualquier otro soporte sólido adecuado. En una realización, el microchip de expresión se prepara y se utiliza de acuerdo a los métodos descritos en Patente Americana Nº 5.837.832, Chee y col., Solicitud de Patente Internacional 95/11995 (Chee y col.), Lockhart, D. J. y col. (1996; Nat. Biotech. 14: 1675-1680) y Schena, M. y col. (1996; Proc. Natl. Acad. Sci. 93: 10614-10619). En otras realizaciones, tales chips de expresión se producen mediante los métodos descritos por Brown y col., Patente Americana Nº 5.807.522.

El microchip de expresión o equipo de detección se compone preferiblemente de un gran número de secuencias únicas de ácido nucleico de cadena simple, normalmente u oligonucleótidos antisentido sintéticos o fragmentos de ADNcs, fijados en un soporte sólido. Los oligonucleótidos son preferiblemente de alrededor de 6-60 nucleótidos de longitud, más preferiblemente de 15-30 nucleótidos de longitud, y lo más preferiblemente de alrededor de 20-25 nucleótidos de longitud. Para un cierto tipo de microchip de expresión o equipo de detección, podría ser preferible utilizar oligonucleótidos de sólo 7-20 nucleótidos de longitud. El microchip de expresión o equipo de detección podría contener oligonucleótidos que cubren la secuencia 5' o 3' conocida, oligonucleótidos secuenciales los cuales cubren la secuencia completa; u oligonucleótidos únicos seleccionados de áreas particulares, a lo largo de la longitud de la

secuencia. Los polinucleótidos utilizados en el microchip de expresión o equipo de detección podrían ser oligonucleótidos que son específicos para un gen o genes de interés.

A fin de producir oligonucleótidos con una secuencia conocida para un microchip de expresión o equipo de detección, típicamente se examina el gen o genes de interés (o un ORF identificado en la descripción) utilizando un algoritmo informático el cual empieza en el extremo 5' o 3' de la secuencia de nucleótidos. Los algoritmos típicos identificarán entonces oligómeros de longitud definida que son únicos del gen, tienen un contenido de GC dentro de un rango adecuado para hibridación, y carecen de una estructura secundaria predicha que podría interferir con la hibridación. En ciertas situaciones podría ser apropiado utilizar pares de oligonucleótidos en un microchip de expresión o equipo de detección. Los "pares" serán idénticos, excepto por un nucleótido que preferiblemente se localiza en el centro de la secuencia. El segundo oligonucleótido en el par (desapareado por uno) sirve como control. El número de pares de oligonucleótidos podría estar en un rango de entre dos y un millón. Los oligómeros se sintetizan en áreas designadas sobre un sustrato utilizando un proceso químico dirigido por luz. El sustrato podría ser papel, nailon u otro tipo de membrana, filtro, chip, placa de vidrio o cualquier otro soporte sólido adecuado.

En otro aspecto, un oligonucleótido se podría sintetizar sobre la superficie del sustrato utilizando un procedimiento de acoplamiento químico y un aparato de inyección de tinta, como se describe en la Solicitud de Patente Internacional 95/251116 (Baldeschweiler y col.). En otro aspecto, se podría utilizar un chip de expresión "reticulado" análogo a una transferencia de puntos (o líneas) para organizar y unir fragmentos de ADNc u oligonucleótidos a la superficie de un sustrato utilizando un sistema de vacío, procedimientos de unión termal, UV, mecánica o química. Un chip de expresión, tal como aquellos descritos más arriba, se podría producir a mano o utilizando dispositivos (aparatos de transferencia de líneas o de transferencia de puntos), materiales (cualquier soporte sólido adecuado), y máquinas (incluyendo instrumentos robóticos) disponibles, y podría contener 8, 24, 96, 384, 1536, 6144 o más oligonucleótidos, o cualquier otro número entre dos y un millón el cual es apto para la utilización eficiente de la instrumentación disponible comercialmente.

A fin de llevar a cabo análisis de muestras utilizando un microchip de expresión o equipo de detección, el ARN o ADN de una muestra biológica se hace en sondas de hibridación. Se aísla el ARNm, y se produce ADNc y se utiliza como molde para fabricar ARN antisentido (ARNa). El ARNa se amplifica en presencia de nucleótidos fluorescentes, y las sondas marcadas se incuban con el microchip de expresión o equipo de detección para que las secuencias de la sonda se hibriden con los oligonucleótidos complementarios al microchip de expresión o equipo de detección. Las condiciones de incubación se ajustan para que la hibridación ocurra con emparejamientos complementarios precisos o con varios grados de menor complementariedad. Tras la eliminación de las sondas no hibridadas, se utiliza un escáner para determinar los niveles y patrones de fluorescencia. Se examinan las imágenes escaneadas para determinar el grado de complementariedad y la abundancia relativa de cada secuencia de oligonucleótidos en el microchip de expresión o equipo de detección. Las muestras biológicas se podrían obtener a partir de cualquier fluido corporal (tal como sangre, orina, saliva, flema, jugos gástricos, etc.), células cultivadas, biopsias, u otras preparaciones de tejido. Se podría utilizar un sistema de detección para medir la ausencia, presencia, y cantidad de hibridación para todas las secuencias distintas simultáneamente. Estos datos se podrían utilizar para estudios de correlación a gran escala sobre las secuencias, patrones de expresión, mutaciones, variantes, o polimorfismos entre las muestras.

Utilizando tales chips de expresión, la descripción proporciona métodos para identificar la presencia o expresión de las proteínas/péptidos antígenos aquí descritos. En detalle, tales métodos comprenden incubar una muestra a analizar con una o más moléculas de ácido nucleico y realizar un ensayo de unión de la molécula de ácido nucleico con componentes de la muestra a analizar. Tales ensayos típicamente supondrán chips de expresión que comprenden muchos genes, por lo menos uno de los cuales es un gen aquí descrito y/o alelos del gen de la enzima aquí descrito. Las figuras e información asociada más abajo proporcionan información sobre la secuencia del epítopo y microvariación en cepas de *T. parva* que se han encontrado en el gen que codifica el antígeno aquí descrito.

Las condiciones para incubar una molécula de ácido nucleico con una muestra a analizar varían. Las condiciones de incubación dependen del formato empleado en el ensayo, los métodos de detección empleados, y el tipo y naturaleza de la molécula de ácido nucleico utilizada en el ensayo. Una persona experimentada en la materia reconocerá que cualquiera de los formatos de los ensayos de hibridación, amplificación o chips de expresión comúnmente disponibles se puede adaptar fácilmente para emplear los fragmentos novedosos del genoma de *T. parva* aquí descritos. Ejemplos de tales ensayos se pueden encontrar en Chard, T, An Introduction to Radioimmunoassay and Related Techniques, Elsevier Science Publishers, Amsterdam, The Netherlands (1986); Bullock, G. R. y col., Techniques in Immunocytochemistry, Academic Press, Orlando, Fla. Vol. 1 (1982), Vol. 2 (1983), Vol. 3 (1985); Tijssen, P., Practice and Theory of Enzyme Immunoassays: Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Elsevier Science Publishers, Amsterdam, The Netherlands (1985).

Las muestras a analizar aquí descritas incluyen extractos de células, proteínas o membranas de células. La muestra a analizar utilizada en el método descrito más arriba variará según el formato del ensayo, la naturaleza del método de detección y los tejidos, células o extractos utilizados como muestra para someter a ensayo. Los métodos para preparar extractos de ácidos nucleicos o de células son bien conocidos en la materia y se pueden adaptar fácilmente a fin de obtener una muestra compatible con el sistema utilizado.

En otra realización, se proporcionan kits los cuales contienen los reactivos necesarios para llevar a cabo los ensayos aquí descritos.

Específicamente, la descripción proporciona un equipo compartimentado para recibir, en confinamiento, uno o más contenedores el cual comprende: (a) un primer contenedor que comprende una o más moléculas de ácido nucleico que se pueden unir a un fragmento del genoma de *T. parva* aquí descrito; y (b) uno o más contenedores que comprenden uno o más de los reactivos siguientes: reactivos de lavado, reactivos capaces de detectar la presencia de un ácido nucleico unido.

En detalle, un equipo compartimentado incluye cualquier equipo en el cual los reactivos se contienen en contenedores separados. Tales contenedores incluyen contenedores de vidrio pequeños, contenedores de plástico, tiras de plástico, vidrio o papel, o de un material absorbente tal como sílice. Tales contenedores le permiten a uno transferir reactivos eficientemente de un compartimento a otro de manera que no haya contaminación cruzada entre las muestras y reactivos, y los agentes o soluciones de cada contenedor se pueden añadir de manera cuantitativa de un compartimento a otro. Tales contenedores incluirán un contenedor el cual aceptará la muestra a analizar, un contenedor el cual contiene la sonda de ácido nucleico, contenedores los cuales contienen reactivos de lavado (tales como tampón fosfato salino, tampones Tris, etc.), y contenedores los cuales contienen los reactivos utilizados para detectar la sonda unida. Una persona experimentada en la materia reconocerá fácilmente que el gen de la enzima aquí descrito, previamente no identificado, se puede identificar de manera rutinaria utilizando la información de la secuencia aquí descrita y se puede incorporar fácilmente en uno de los formatos de equipo establecidos los cuales son bien conocidos en la materia, particularmente chips de expresión.

Los antígenos de *T. parva* aquí mencionados pueden inducir, *in vivo*, células T citotóxicas CD8+ antígeno-específicas para la inmunización profiláctica del ganado para la prevención de la enfermedad de la Fiebre de la Costa Este. Además, también se podrían inducir CTLs específicas de los siguientes parásitos metazoos mediante composiciones identificadas de acuerdo a los métodos aquí mencionados: *Plasmodium falciparum* (el cual causa malaria), *Schistosoma mansoni* (el cual causa esquistosomiasis), y *Trypanosoma cruzi* (el cual causa enfermedad de Chagas), *Giardia lamblia*, *Entoemeba histolytica*, *Cryptospiridium spp*., *Leishmania spp*., *Brugia spp*., *Wuchereria spp*., *Onchocerca spp*., *Strongyloides spp*., Coccidia, *Haemanchus spp*., *Ostertagia spp*., *Trichomonas spp*., *Dirofilaria spp*., *Toxocara spp*., *Naegleria spp*., *Pneumocystis carinii*, *Ascaris spp*., otro *Trypanosoma spp*., otro *Schistosome spp*., otra *Plasmodium spp*., *Babesia spp*., *Theileria spp*., incluyendo pero no limitándose a *T. parva*. *T. lawrencei*, *T. annulata*, *T. hirci*, *T. ovis*, *T. lastoguardi*, *T. orientalis*, *T. buffeli* y *T. taurotragi*;, *Babesia spp*., incluyendo, pero no limitándose a *B. bigemina*, *B. divergens*, *B. major*, *B. bovis*, *B. motasi*, *B. ovis*, *B. cabelli*, *B. equii*, *B. traumani*. *B. canis*. *B. gibsoni*, *B. felis*, y *B. microfti*; *Adelina spp*., incluyendo, pero no limitándose a *A. delina*, *A. castana*, *A. picei*, *A. palori*, y *A, triboli*, *Anisakis* y *Isospora beli*.

A continuación se encuentran ejemplos los cuales ilustran procedimientos para practicar la invención. Estos ejemplos no se deberían interpretar como limitantes. Todos los porcentajes son por peso y todas las proporciones de mezclas de disolventes son por volumen a menos que se indique lo contrario. Como se utiliza aquí y además se define más abajo, "ácido nucleico" podría referirse a ADN o ARN, o moléculas las cuales contienen ambos ribonucleótidos y desoxiribonucleótidos. Los ácidos nucleicos incluyen ADN genómico, ADNc, y oligonucleótidos incluyendo ácidos nucleicos sentido y antisentido. Tales ácidos nucleicos también podrían contener modificaciones en el esqueleto ribosafosfato para aumentar la estabilidad y vida media de tales moléculas en ambientes fisiológicos.

Ejemplos

Secuenciación del genoma, anotación preliminar, selección de genes que codifican antígenos

El genoma nuclear de Theileria parva genoma consiste en 4 cromosomas y tiene aproximadamente una longitud de 8.2 Mb. Los loci Tp2, Tp3, y Tp6 loci se localizan en el Cromosoma 1. El genoma de *T. parva* se secuenció utilizando una estrategia de shotgun de genoma completo. El ADN genómico de *T. parva* (clon Muguga) se fragmentó y se clonó en vectores plasmídicos. Se secuenciaron ambos extremos de los clones seleccionados aleatoriamente. Se obtuvo un total de 152.226 secuencias con una longitud promedio de 623 nt, equivalente a una cobertura de 9.48X asumiendo un tamaño de genoma de 10 Mb. Ensamblamiento de las secuencias con "TIGR Assembler" produjo un grupo de cóntigos preliminares que representa el 95% de la secuencia genómica.

Los cóntigos preliminares se introdujeron en una base de datos y se sometieron a un proceso automatizado proceso que comparaba los cóntigos de *T. parva* contra una base de datos nonredundante de proteínas extraídas del GenBank (denominada nraa). Los resultados de la búsqueda se utilizaron para producir un conjunto de modelos de genes de *T. parva* gene que codificaban proteínas similares a las de otros organismos. Este conjunto de modelos de genes se utilizó para entrenar los programas de búsqueda de genes "GlimmerM" y "phat", que a continuación se ejecutaron contra todos los cóntigos preliminares para producir modelos de genes para la secuencia del genoma completo preliminar.

Las proteínas codificadas por los genes predichos de *T. parva* genes se sometieron a una serie de análisis como la búsqueda en bases de datos ("blastp"), predicciones de péptido señal y señal de anclaje ("SignalP 2.0"), y dominios transmembrana ("TMHMM"). Los resultados se revisaron y un grupo de ~55 genes que codificaban antígenos candidatos encoding se seleccionaron mediante cribado de su inmunogenicidad. Tras cribado de estas secuencias génicas, se consiguió la identificación de antígenos conocidos como Tp2, Tp3, y Tp6.

Clonaje de genes seleccionados por cribado de antígenos conocidos

1.1 *Extracción de ARN*

Un millón de células de *T. parva* (cepa Muguga)-infectadas se lavaron con 1 ml de solución Salina Tamponada con Fosfato (PBS) y se centrifugaron a 15.000 rpm durante 10 segundos. Después de eliminar el sobrenadante, se resuspendieron las células en 1 ml de RNAzol® mediante pipeteo. Luego se añadieron 100 μPl de cloroformo y se mezcló brevemente con ayuda del agitador. El tubo se centrifugó rápidamente a 15.000 rpm durante 15 min a 4ºC y se transfirieron 400 μl de la fase superior acuosa a un nuevo tubo Eppendorf™. Se añadió un volumen de 0,7 de Iso-propanol, se mezcló mediante agitación mecánica y se centrifugó de nuevo a 15.000 rpm durante 10 min a 4ºC. Después de eliminar el sobrenadante, el sedimento se lavó con 300 μl de etanol al 70%. Después de centrifugar a 15.000 rpm durante 5 min a 4ºC, se aspiró el etanol al 70% y el sedimiento se redisolvió en 60 μl de agua sin RNasa. La concentración del ARN se determinó mediante un espectrofotómetro.

1.2 *RT-PCR en una sola etapa*

Se utilizó un equipo de Qiagen® One-step RT-PCR para amplificar los genes seleccionados a partir del ARN obtenido anteriormente. Los cebadores se diseñaron para amplificar la región codificante de los genes seleccionados de esquizontes. Los cebadores sentido 5' (FW) se indican en la Tabla 1 y los cebadores de sentido 3' (RV) en la Tabla 2, y los cebadores sentido 5' internos en la Tabla 3. Los componentes se mezclaron para una reacción de 50 μl para cada grupo de cebadores. Se realizó una mezcla de reacción madre (tampón de RT-PCR 5x 10 μl; mezcla de dNTPs 2 μl; mezcla enzimática 2 μl; inhibidor de RNasa 1 μl; molde de ARN 1 μl; agua 32 μl) excepto los cebadores y se dispensó en los tubos marcados, y luego se añadió 1 μl de cada uno de los correspondientes cebadores FW1 y RV1. Las mezclas se cubrieron con aceite mineral y se colocaron en un minitermociclador MJ Research y se pusieron en marcha los siguientes programas:

50ºC 30 minutos; 95ºC 15 minutos; 35 veces de ciclos de: 94ºC 30 segundos, 55ºC 30 segundos, 72ºC 1 minuto; y por último 72ºC 10 minutos, o

50ºC 30 minutos; 95ºC 15 minutos; 35 veces de ciclos de: 94ºC minuto, 55ºC 1 minuto, 72ºC 1 minuto, y por último 72ºC 10 minutos, o

45ºC 30 minutos; 95ºC 15 minutos; 35 veces de ciclos de: 94ºC 10 segundos, 55ºC 1 minuto, 68ºC 3 minutos; y por último 68ºC 10 minutos.

TABLA 1

Gen (Antígeno)	Cebador (sentido 5')
N° ID SEC:1; Tp2	N° ID SEC 34:GCCGCCACCATGAAATTGGCCGCCAGATTAATTAGCC
N° ID SEC:1; Tp3	N° ID SEC 35:GCCGCCACCATGAAATTAAATACTATCGCAATAGCCTTT
N° ID SEC:1; Tp6	N° ID SEC 36:GCCGCCACCATGGCTCAGATTCCTGTTGATAAATTCG

TABLA 2

Gen (Antígeno)	Cebador (sentido 3')
N° ID SEC:1; Tp2	N° ID SEC 37: CTATGAAGTGCCGGAGGCTTCTCC
N° ID SEC:1; Tp3	N° ID SEC 38: TTAGGATTTTTTATTATCGTCTGGACTC

N° ID SEC:1; Tp6	N° ID SEC 39: TTATTTATCAGTTGAGAGTAAGAGAGTATTA

TABLA 3

Gen (Antígeno)	Cebador (sentido 5')
N° ID SEC:1; Tp2	N° ID SEC40: TCCATGTAAATGGAAAGAAGATTATC
N° ID SEC:1; Tp3	N° ID SEC 41: GGAACTCAGGCAGGTTGAATCTCTTC
N° ID SEC:1; Tp6	N° ID SEC42: CCGCTAAGGAAGTGGCTAACATTC

1.3 *Electroforesis, aislamiento y purificación de productos de PCR*

A la reacción de PCR finalizada, se añadieron 10 μl de tampón de carga 6X y se cargaron en un gel de agarosa al 0,7% que contenía 0,5 μg/ml de Bromuro de Etidio. La electroforesis se realizó a 150 voltios durante 30 minutos. El ADN se visualizó con luz ultravioleta y se recortaron del gen las bandas de tamaños esperados y se transfirieron a tubos adecuadamente marcados. Se extrajo el ADN del fragmento recortado con un equipo QIAquick Gel Extraction de Qiagen. Al fragmento recortado del gel se añadió tampón QG (tres volúmenes del peso del gel) y se incubó a 50ºC con agitación intermitente hasta su disolución.

El gel disuelto se transfirió a una columna de centrifugación QIAquick en un buo de recolecta preparado de 2 ml, se añadieron 750 μl de una vez y se centrifugó durante 1 minuto para la unión a la columna hasta que toda la solución del gel haya sido introducida. Se descartó el flujo a través y la columna se reintrodujo en el tubo recolecta vacío. La columna se lavó con 750 μl de tampón de lavado PE y se centrifugó durante 1 minuto. Se descartó el flujo a través y se centrifugó de nuevo 1 minuto para secarla. La columna se transfirió a un tubo Eppendorf™ de 1,5 ml que contenía 5 μl de Acetato sódico 3 M y luego se pipetearon 50 μl de tampón EB en la columna y se dejó reposar durante 1 minuto antes de centrifugarlo durante 1 minuto. El ADN eluido se precipitó mediante adición de 150 μl de etanol, se mezcló bien y se incubó a 20ºC durante 20 minutos. El tubo se centrifugó en una microcentrífuga a 15.000 rpm durante 15 min a 4ºC. El sobrenadantes se aspiró y el sedimento residual se lavó con 300 μl de etanol al 70%. El tubo se centrifugó de nuevo en una microcentrífuga enfriada a 15.000 rpm a 4ºC. El sobrenadante se aspiró de nuevo y el sedimento se secó. El ADN se resuspendió en 8 μl de agua y 1 μl se migró en un gel para valorar la calidad y cualidad.

1.4 *Ligación*

Después de determinar la concentración de los fragmentos, se realizó un ajuste de modo que la reacción de ligación estuviera a una proporción molar de 1:10 (vector: inserto); -- (pTargeT vector (Promega, 20 ng/ul) 1 ul; fragmento 1-7 ul (dependiendo de la concentración de los fragmentos); tampón de ligación 10x 1 ul; T4 ADN ligasa 1 ul; agua a un volumen final de 10 ul).

Después de la incubación a 4ºC durante la noche, la ligasa se inactivó mediante incubación del tubo a 70ºC durante 30 minutos se precipitó con etanol. Los sedimentos se reconstituyeron con 10 μl de agua.

1.5 *Transformación*

Se utilizaron células electro-competentes de la cepa JM109 de *E. coli* para la transformación con las muestras del la ligación. La preparación para la electroporación se realizó mediante enfriamiento de la cubeta de 0,2 cm BIO-RAD® *E. coli* Pulser®en hielo, descongelando las células en hielo, ajustando el equipo de electroporación a 2.5 KV, 2000 mega y 25PF. Cinco μl de la ligación se añadieron a 50 μl de células competentes, y a continuación se transfirieron rápidamente a cubetas enfriadas en hielo, golpeando firmemente sobre papel para asegurarse que todas las células

estuvieran en la base sin dejar ningún vacío. La cubeta se limpió y secó y se realizó un pulso hasta que se produjo una señal PLS y una alarma que anunciaba el éxito del pulso. Las células electroporadas se resuspendieron inmediatamente en 1 ml de medio 2xYT y a continuación se transfirieron a un tubo Falcon 2059 y se incubaron durante 1 hora a 37ºC con agitación. Cuando finalizó la incubación, las células se plaquearon en placas 2xYT con 60 ug/ml de Xgal, 0,1 mM IPTG, y 50 ug/ml de Ampicilina a diversas diluciones. Las placas se incubaron a 37ºC durante toda la noche.

1.6 *Cribado de las colonias mediante PCR*

Placas de microtitulación con fondo en V se utilizaron para el cribado de las colonias. La mezcla de reacción de PCR se preparó de modo que cada pocillo tuviera 25 μl de [mezcla de tampón PCR 1x 23,75 μl; cebador específico sentido 5' 0,5 μl; cebador específico del vector sentido 3' 0,5 μl; Taq polimerasa 0,25 μl]. Para cribar los plásmidos que contenían el gen seleccionado, se utilizaron cebadores específicos del gen (IF1, Tabla 3). El cebador específico del vector de sentido 3' tenía la secuencia NºID SEC: 44 (5'GAGCGGATAACATCACACAGG3').

Con una punta estéril, se tocó una colonia, y a continuación se tocó la placa madre con la misma punta en un lugar numerado (para su identificación) y por último se colocó en el pocillo correspondiente, dejándolo allí hasta que se llenaron todos los pocillos.

Con una pipeta, se mezclaron los contenidos de los pocillos y se retiró la punta. Se colocó una gota de aceite mineral en cada pocillo.

La placa se colocó en un minitermociclador MHJ Research y se puso en funcionamiento con los siguientes ciclos. 95ºC 5 minutos; 94ºC 20 segundos; 55ºC 20 segundos; 72ºC 30 segundos; a continuación se llevó al paso 2 durante 34 ciclos más; 72ºC 5 minutos; y por último a 10ºC como tiempo de espera. Al término de la PCR, se retiró la placa y se añadieron 5 μl de tampón de carga 6X a cada pocillo. Los productos se migraron en un gel de agarosa al 25. Los clones positivos de las placas principales se identificaron y se tomó una muestra para cultivo de 25 ml durante toda la noche.

1.7 *Midi- prep*

Después del cultivo de 25 ml durante toda la noche, las células se centrifugaron en un tubo Falcon a 3.000 rpm durante 10 min a 4ºC y se procesaron según protocolo del equipo de purificación de plásmidos QIAGEN® HiSpeed™. El sedimento celular se resuspendió en 4 ml de tampón P1, se añadieron 4 ml de tampón P2, se mezcló bien mediante inversión 6 veces y se dejó a temperatura ambiente durante 5 min. Se prepararon los cartuchos QIAfilter enroscando el tapón en la boquilla de salida y colocándolo en un tubo adecuado. Se añadieron 4 ml de tampón P3 frío al lisado y se mezcló inmediata pero suavemente mediante inversión 6 veces. El lisado neutralizado se vertió en el tubo del cartucho y se dejó reposar durante 10 minutos. Mientras tanto, se equilibró una columna Speed mini con 4 ml de tampón QBT y se dejó pasar el tampón por gravedad. Se retiró el tapón de la boquilla de salida y se insertó suavemente el émbolo para filtrar el líquido equilibrado HiSpeed. El lisado aclarado se dejó entrar en la resina por gravedad y luego se lavó con 20 ml de tampón QC. El ADN se eluyó con 5 ml de tampón QF en un tubo Falcon nuevo, seguido de la adición de 3,5 ml de isopropanol al 100% y de su mezcla. A continuación se centrifugó a 3500 rpm durante 30 minutos a 4ºC, se eliminó el sobrenadante, se resuspendió en 1,5 ml de etanol al 70% y luego se transfirió a un tubo Eppendorf™ de 2 ml. El tubo se centrifugó a 15000 rpm durante 10 minutos a 4ºC, se aspiró y se secó y luego se reconstituyó el ADN con 50 μl de agua. Una muestra de 1 μl se migró en un gel de agarosa para su valoración cuantitativa y cualitativa y otros 10 μl se utilizaron para secuenciación y ensayos *in vitro* (Elispot y bioensayo).

1.8 *Secuenciación*

Se determinó la secuencia nucleotídica de los plásmidos pTargeT mediante un ABI PRISM® 3700 ADN Analyzer (Applied Biosystems) con un cebador específico del vector de sentido 5' de Nº ID SEC:43; 5'ACGCCAGGATTTTCC CAGTCACG3' y un cebador específico del vector de sentido 3' NºID SEC: 44; 5'GAGCGGATAACATCACA CAGG3'.

Inmunización y detalles del ganado

Las 11 reses utilizadas en este ejemplo eran de raza pura *Bos indicus* (Boran), raza pura *Bos taurus* (Friesian) o híbridos. Los detalles de los animales se muestran en la Tabla 4. Las reses seronegativas, según se determinó por la presencia de Anticuerpo contra *T. parva* en el suero, se inmunizaron mediante infección y tratamiento contra contra solución madre de Muguga de *T. parva* mediante inoculación simultánea de esporozoitos y oxitetraciclina de acción prolongada a 20 mg/Kg peso corporal (Radley y col., (1975) Vet Rec 96, 525-7). Los esporozoitos criopreservados (concentrado estabilizado #4133) se descongelaron y se diluyeron 1/20 tal como se describió anteriormente. A los animales se se les administró inyecciones subcutáneas de 1 ml de esporozoitos diluidos 2 cm por encima del nódulo linfático parotideo derecho. Diariamente, se realizó un control a los animales de su temperatura rectal y desde el día 5 post-estímulo se obtuvieron biopsias de nódulo linfático con una aguja de calibre 21G. Las preparaciones de la biopsia

se tiñeron con Giemsa y se examinaron para la presencia de células infectadas con esquizontes y se valoraron en una escala del 1-3. Los animales que padecían reacciones moderadas se trataron con Buparvaquone (Butalex, Mallinckrodt Veterinary Ltd, UK).

TABLA 4

Animal #	Raza	Fecha de nacimiento	Progenitor#	Progenitora#
BV050	Boran	09/12/99	291	2772
BV057	Boran/Jersey	03/07/00	NK	AT230
BV115	Friesian	NK	NK	NK
BW002	Jersey	NK	NK	NK
BW012	Boran/Friesian	18/08/00	Mystig	1507
BW013	Guernsey/Ayshire	08/09/00	D14	D646
BW014	Guemsey/Ayshire	15/09/00	D14	D638
BX063	Boran	11/04/01	282	BN59
BX065	Boran	03/04/01	282	BN59
D409	Guernsey	06/12/85	1422	D23
F100	Boran	17/03/88	103	1130

Establecimiento de TpM

Antes de la inmunización, se recogió sangre venosa de 11 animales, que se indican en la Tabla 3, y monocitos de sangre periférica, (PBMC), se prepararon tal como se describió anteriormente (Godeeris & Morrison, 1986. PBMC purificados se ajustaron a $4x10^6$/ml en medio CTL (RPMI-1640 sin HEPES suplementado con suero bovino fetal al 10% (FBS); analizados para BVDV y micoplasma spp.). Se añadieron glutamina 2 mM, $5x10^{-5}$M 2-mercaptoethnol y antibióticos al medio de cultivo y a cada pocillo de una placa de 24 pocillos (Costar, Corning, NY) se añadió 1 ml del medio de cultivo, y se infectaron *in vitro* con sporozoitos de *T. parva* (Muguga). Las líneas celulares infectadas se mantuvieron en medio TpM (RPMI-1640 suplementado con 10% Fetaclone II (Hyclone, UK; analizado para BVDV& Mycoplamsa spp.), 100 iU/ml Penicilina, 100 mg/ml Estreptomicina, 50 mg/ml Gentamicina, $5x10^{-5}$M 2-mercaptoetanol and 2 mM L-Glutamina) y se realizaron pasajes a 1/5 tres veces por semana.

Generación de cultivos en volumen de CTL específicos de T. parva

Se recogió sangre venosa de animales inmunizados 4 semanas post-inmunización. Se prepararon PBMC tal como se describió anteriormente (Goddeeris & Morrison, 1988). Los PBMC se ajustaron a $4x10^6$/ml en medio CTL (RPMI-1640 sin HEPES suplementado con suero bovino fetal al 10% (FBS); analizados para BVDV y micoplasma spp.). Se añadió glutamina 2 mM, $5x10^{-5}$M 2-mercaptoetanol y antibióticos tal como se describió anteriormente) y a cada pocillo de una placa de 24 pocillos (Costar, Corning, NY, USA). Los PBMC se co-cultivaron con células infectadas por *T. parva* (TpM) autólogas irradiadas (50 Gy) a $2x10^5$/pocillo y se incubaron durante 7 días a 37ºC en atmósfera humidificada con CO_2 al 5%. Las células se cosecharon por aspiración y las células muertas se eliminaron por centrifugación en Ficoll-Paque Plus (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden). Después de un lavado en medio CTL, las células se añadieron a las placas de 24 pocillos ($3x10^6$/pocillo) y se co-cultivaron con PBMC irradiado (células de relleno) a $1x10^6$/pocillo y TpM a $2x10^5$/pocillo durante 7 días como antes. Las células viables se cosecharon tal como se describió anteriormente, se ajustaron a $2x10^6$/pocillo y se estimularon con TpM irradiadas a $2x10^5$/pocillo y $2x10^6$/pocillo de PBMC autólogas irradiadas como células de relleno.

Ensayo de liberación de Cromo 51

TpM autólogas y alogénicas en fase logarítmica de crecimiento se resuspendieron a $2x10^7$/ml en medio de citotoxcidad (medio RPMI-1640 con 5% Fetaclone II). Se mezclaron 100 μl de las células diana con 100 μl (100 μci)de Cr51-cromato sódio y se incubaron durante 1 hora a 37ºC.

Las células se lavaron 3 veces con 7 ml de medio de citotoxicidad mediante centrifugación a 1500 rpm durante 7 min a TA y se resuspendieron a $1x10^6$/ml. Las células viables se recogieron de las líneas estimuladas con TpM al cabo de 7 días de la estimulación (células efectoras) y se resuspendieron en medio de citotoxicidad a $2x10^7$/ml. Se distribuyeron por duplicado diluciones sucesivas de un factor dos de células efectoras por duplicado (100 μl/pocillo) en placas de cultivo de fondo plano de mitad de área (A/2) de 96 pocillos (Costar,Corning, NY, USA) lo que dió como resultado un rango de concentraciones de células efectoras de $4x10^6$ a $2,5x10^5$/pocillo. Se añadieron células diana a cada pocillo que contenía células efectoras (50 μl/pocillo) lo que dió como resultado proporciones de células diana del orden de 80:1 a 5:1. En pocillo separados por triplicados se añadieron células diana a 100 μl de medio de citotoxicidad o 1% Tween20 para cuantificar la liberación de marcaje espontánea y máxima. Las placas se incubaron durante 4 horas a 37ºC en atmósfera de humedad con CO_2 al 5%. Las células se resuspendieron en los pocillos mediante pipeteo repetido y se sedimentaron mediante centrifugación a 180xg a temperatura ambiente. 75 μl de los sobrenadantes se transfirieron de cada pocillo a los viales de muestra (Milian, Geneva, Switzerland) y se realizó el contaje de las emisiones gamma en un contador gamma (Micromedic MEplus, TiterTek, Huntsville, AL, USA). Los resultados se calcularon y expresaron como porcentaje de citotoxicidad (= 100 x (liberación a analizar-liberación espontánea)/(liberación máxima -liberación espontánea).

La evidencia para la lisis restringida a la clase I MHC se valoró mediante la capacidad de los anticuerpos monoclonales para reconocer la clase I MHC bovina con el fin de inhibir la lisis. Las células se prepararon para el ensayo de citotoxicidad tal como se describió anteriormente excepto que las células diana se resuspendieron a doble densidad ($2x10^6$/ml) y se añadieron 25 μl en primer lugar a la placa. 25 μl de medio de citotoxicidad o de anticuerpo monoclonal (mAb; IL-A88 diluido 1/15 en medo de citotoxicidad) se añadieorn a las células diana y se incubaron durante 30 min a temperatura ambiente. Se realizaron diluciones seriadas de células efectoras tal como se describió más arriba.

Generación de líneas y clones de anticuerpos policlonales CTL CD8+ específicos para T. parva

Se recogieron las células viables de los cultivos estimulados con TpM al cabo de 7 días después de la infección y se aislaron células T CD8+ mediante selección positiva por citometría de flujo (FACStar Plus, BD Biosciences, San Jose, CA, USA) o con selección negativa con Dynabeads (Dynal Biotech, Bromborough, UK).

Selección positiva: Las células se ajustaron a $2x10^7$/ml en anticuerpo monoclonal estéril IL-A105 (específico para CD8 bovino) diluido a 1/100 y se incubaron durante 30 minutos a 4ºC. Las células se lavaron dos veces con medio de cultivo frío y se resuspendieron a $2x10^7$/ml en inmunoglobulinas polivalentes de cabra estériles conjugadas con FITC (Sigma). Las células se lavaron dos veces con medio frío antes de pasarlas por un clasificador de células FACStar Plus y se recogieron las células CD8+ FITC+.

Selección negativa: Las células se ajustaron a $2x10^7$/ml en mAbs IL-A12 (específico para CD4 bovino) y GB21A 15 (específico para gamma-delta-TCR bovino) diluidos 1/100 y se incubaron durante 30 minutos a 4ºC. Las células se lavaron dos veces con PBS frío y ser resuspendieron a $1,4x10^7$/ml en PBS estéril con Dynabeads IgG anti-ratón según las instrucciones del fabricante. Las células y las bolas se agitaron en un orbital durante 30 min a 4ºC y se recogieron las Dynabeads con las células adheridas con ayuda de un Concentrador de Partículas Magnético Dynal (MPC) durante 5 min, el sobrenadante se recogió, se transfirió a otro tubo de muestra y las células unidas a las Dynabeads se recogieron mediante otra incubación con un 20 Dynal MHC. El sobrenadante se descartó y las células se lavaron dos veces con medio completo.

Clonaje: las células T CD8+ enriquecidas mediante cualquiera de los procedimientos descritos anteriormente se ajustaron a 30, 10, y 3 células/ml y se distribuyeron en placas de de cultivo de base redonda de 96 pocillos que contenían $2x10^4$ TpM autólogas irradiadas, $5x10^3$ PBMC autólogas irradiadas y 5 U/ml de IL-2 recombinante humana (HuIL-2; Sigma, Poole, UK) en un volumen final de 200 μl/pocillo. Las placas se incubaron a 37ºC en un incubador en ambiente de humedad y CO_2 al 5%. Los pocillos que mostraron un crecimiento celular significativo se seleccionaron para el análisis de la lisis de TpM autólogas en un ensayo de liberación de Indium oxina (In^{111}). El ensayo de liberación de In^{111} se realizó tal como se describió más arriba para el Cr^{51} excepto que las células diana se marcaron mediante adición de 5Ci de In^{111}/1x106 células y la incubación se realizó durante 15 minutos a 37ºC. Las células se lavaron cinco veces con medio de citotoxicidad y se resuspendieron a $1x10^5$/ml y se añadieron 50 μl/pocillo a las placas de fondo redondo de 96 pocillos. Se transfirieron 100 μl de células que mostraron un crecimiento significativo a placas de cultivo de fondo redondo de 96 pocillos (Greiner) y se centrifugaron (180xg) durante 5 min. Las células se resuspendieron a 100 μl/pocillo en medio de citotoxicidad y se transfirieron a pocillos que contenían células diana marcadas. Las placas se centrifugaron tal como se describió más arriba para sedimentar las células antes de incubarlas durante 4 horas a 37ºC en atmósfera de humedad y CO_2 al 5%.

Las poblaciones de CTL que presentaron una actividad lítica sobre las células infectadas autólogas y originadas de las diluciones celulares que proporcionaron un aumento del crecimiento celular en al menos el 30% de los pocillos, ya que así tienen una probabilidad elevada de convertirse en clones, se seleccionaron mediante expansión. Las células restantes se recogieron de cada pocillo y se resuspendieron en medio de cultivo (sin HEPES) a una concentración estimada de entre 500 y 500 células/ml. Se distribuyeron 100 μl de una suspensión celular en las placas de fondo redondo de 96 pocillos, 100 μl de TpM irradiadas autólogas a $5x10^4$ en medio que contenía 5 U/ml de HuIL-2. Entre los días 14 y 21 después de la estimulación, se subcultivaron clones y líneas de CTL policlonales en placas de cultivo

de fondo redondo de 96 pocillos mediante co-cultivo de 5000 CTL/pocillo con 25.000 TpM irradiadas autólogas y 5 U/ml de HuIL-2 en un volumen final de 200 μl/pocillo.

Establecimiento y mantenimiento de fibroblastos de piel bovinos

Se practicó una biopsia de piel asépticamente de las orejas de las reses y se colocó en un tubo Falcon de 50 ml que contenía solución de Elsevier. En la campana de flujo laminar del laboratorio, se colocó la biopsia en placas de Petri estériles (Sterilin) con 1 ml de Tripsina-EDTA al 0,25%. La muestra se cortón con un escalpelo estéril en piezas pequeñas y se colocó en un tubo Falcon de 50 ml con Tripsina-EDTA. La preparación se colocó en un incubador durante 1-1,5 h a 37ºC con agitación continua y ligera. Ello facilita el desprendimiento de las células. La digestión se paró con adición de 1 ml de FBS inactivado por calor. La suspensión celular se centrifugó durante 10 min a 200 g y el sedimento celular se resuspendió en 6 ml de medio mínimo esencial de Dulbecco, DMEM (Gibco-BRL, Paisley, UK) suplementado con 10% de suero bovino fetal inactivado por calor (FBS) (Hyclone, Logan, UT), 400 IU/ml de penicilina, 300 μg/ml de estreptomicina y L-glutamina 2 mM. Esta suspensión celular se sembró en cantidades de 5 ml en frascos de 25-cm^2 y se incubó a 37ºC en atmósfera de humedad y CO_2 al 5%. Los cultivos se examinaron microscópicamente cada 4 días para su crecimiento y se remplazó la mitad del medio con medio fresco hasta que el crecimiento de las colonias fue evidente. Una vez identificadas las colonias positivas, éstas se lavaron con PBS/EDTA sin Ca^{2+} ni Mg^{2+} (EDTA al 0,02%) y se desengancharon mediante incubación de 2 min a 37ºC con solución de Tripsina-EDTA que contenía 2,5 mg/ml de tripsina y 0,2 mg/ml de EDTA en HBSS (Sigma).

Después de un lavado con medio completo DMEM que contenía FBSal 10%, los fibroblastos de piel (SF, del inglés *skin fibroblasts*) se pasaron a frascos de cultivo de 25 cm^2 (Costar). Las células se mantuvieron en medio completo DMEM con FBS al 10%, 200 UI de penicilina, 100 μg/ml de estreptomicina y L-glutamina 2 mM y se realizó un pasaje cada tres días a una proporción de 1:3. Las células se expandieron en frascos de cultivo de tejidos de 75 cm^2 (Costar) hasta alcanzar la confluencia de 3-4x10^6 células/frasco.

De forma regular se preparó un banco de células congeladas en nitrógeno líquido con viales de 2x10^6 células en FBS y DMSO al 10%.

Establecimiento y mantenimiento de células endoteliales de testículo bovino

Se establecieron líneas EC de arteria pulmonar o vena testicular bovina tal como se describió por Byrom y Yunker (1990 Cytotechnology 4, 285-90) con las modificaciones de Mwangi y col (1998) Vet Parasitol. 79, 1-17). En resumen, la vena se colocó en tampón de lavado que consistió en PBS sin Ca2+ ni Mg2+ suplementado con 400 IU/ml de penicilina, 400 μg/ml de estreptomicina y 5 μg/ml de fungizona. Los vasos se cortaron longitudinalmente, se lavaron dos veces antes de trocearse en fragmentos de 1 cm^2 y luego se colocaron con el lumen hacia abajo sobre una gota de colagenasa (1 mg/ml) y se incubaron durante 1 hora a 37ºC. La suspensión celular se centrifugó durante 5 min a 200 g y se resuspendió en 24 ml de DMEM completo (Gibco-BRL, Paisley, UK) con 20% de suero bovino fental inactivado por calor (FBS) (Hyclone, Logan, UT), 400 IU/ml penicilina, 300 μg/ml streptomicina, 5 mg/ml fungizona, 300 μg/ml de suplemento de crecimiento endotelial (Sigma, St Louis, MO) y 2 mM de L-glutamina.

Un ml de la suspensión celular se sembró en cada pocillo de una placa de cultivo de tejidos de 24 pocillos (Costar, Cambridge, MA, USA).

Una vez confluentes, las monocapas en cada pocillo se lavaron con PBS/EDTA (0,02% de EDTA) sin Ca2+ ni Mg2+ y se desengancharon mediante 2 min de incubación a 37ºC con solución de tripsina/EDTa al 0,25% que contenía 2,5 mg/ml de tripsina y 0,2 mg/ml de EDTA en HBSS (Sigma). Después de un lavado con DMEM que contenía FBS al 10%, las células se pasaron a frascos de cultivo de tejidos de 25 cm^2 (Costar). Las células se mantuvieron en medio DMEM completo con 10% de FBS, 200 IU/ml penicilina, 100 μg/ml streptomicina, 2,5 mg/ml de fungizona, L-glutamina 2 mM y se pasaron cada 3 días a una proporción de 1:3. Las células se expandieron en frascos de cultivo de tejidos de 75 cm^2 (Costar) hasta alcanzar la confluencia entre 3-4x10^6 células por frasco. De forma regular se preparó un banco de células en nitrógeno líquido con 2x10^6 células por vial de congelación. Las células se obtuvieron de los viales de nitrógeno líquido y se pasaron a frascos de 75 cm^2 y se utilizaron entre el cuarto y décimo pasaje.

Inmortalización de fibroblastos de piel y de células endoteliales bovinas

Las células se inmortalizaron con el gen de la región temprana de SV40 mediante transfección de un plásmido de expresión psvNeo (código ATCC 37150). El producto se suministra en forma seca y congelada y se resuspende completamente con la adición de 300 μl de 2XYT con ampicilina. La suspensión de 300 μl se subcultiva en 6 ml y se subdivide en 3 ml cada uno. Los cultivos se incuban durante toda la noche a 37ºC y se subcultivan de nuevo en 50 ml de 2XYT con ampicilina durante toda la noche a 37ºC. Se realizaron maxipreps de psvNeo para utilizar en las inmortalizaciones. El ADN plasmídico para la transfección se estandarizó a 2 mg/ml.

La mezcla de ADN se preparó con 5 μl de ADN y 495 μl de DMEM con antibióticos pero sin suero. Se preparó una solución de trabajo del reactivo de transfección Fugene (Roche) mezclando 15 μl de Fugene con 485 μl de DMEM.

La mezcla se realizó en tubos de criopreservación de 2 ml estériles y apirgógenos, sin ADNasa ni RNasa. El Fugene diluido se añadió al ADN diluido gota a gota con tamborileo constante en el extremo del tubo. Se dejó formar el complejo Fugene-ADN a temperatura ambiente durante 30 min.

Las células se cultivaron en placas de 6 pocillos (Costar) a una densidad de 2x105 células por pocillo y se crecieron a confluencia durante toda la noche a 37ºC, en un incubador en atmósfera de humedad con CO_2 al 5%. El medio de cultivo se retiró completamente de las monocapas a ser transfectadas. Se añadió entonces el complejo Fugene-ADN con suavidad sobre la monocapa. Se incubaron las placas a 37ºC, CO_2 al 5% en atmósfera de humedad con CO_2 al 5% durante 3-4 horas. El complejo de transfección se eliminó, se añadió medio DMEM fresco con suero fetal bovino al 10% y se cultivó durante otras 72 h. Las células de cada pocillo se lavaron con PBS/EDTA, se desengancharon con Tripsina/EDTA, se lavaron y resuspendieron en DMEM completo y se subcultivaron en frascos T-25 (Costar). Después de la incubación durante 2-3 horas, se eliminó el medio DMEM normal y se reemplazó con un medio DMEM de selección con 10% FCS y 0,5 μg/ml de G418 (2,5 μg/ml de G418 para células endoteliales) y se volvió a incubar. Después de observar una tasa elevada de muerte celular, se reemplazó la mitad del medio con medio de selección nuevo hasta que las colonias en crecimiento fueron evidentes.

Este proceso requirió de 3-4 semanas dependiendo de las líneas celulares. Las colonias positivas se subcultivaron en placas de 24 pocillos y luengo en frascos de T-25. La inmortalización se confirmó analizando la expresión del antígeno T largo con un anticuerpo anti-SV40 conjugado con HRP. La expansión y mantenimiento posteriores de las células se llevó a cabo en medio DMEM completo.

Transfección de células COS-7 e inmortalización de fibroblastos de piel con una librería de ADNc de esquizontes

Las células COS-7 e iSF se mantuvieron en frascos T75 y T150 con DMEM suplementado con 10% FCS, glutamina 2 mM, y antibióticos (medio TC) tal como se describió anteriormente. Las células se dividieron a 1:4 cada 3 días. El día antes a la transfección, las células se recogieron mediante retirada del medio, lavado con PBS e incubación con Tripsina-EDTA al 0,25% durante 5 min a 37ºC. Una vez que las células se desengancharon se añadió medio TC y se recogieron las células en éste. Se lavaron las células mediante centrifugación a 1200 rpm durante 10 min y se resuspendieron en medio TC. Se realizó un contaje de la viabilidad celular y se ajustó la densidad a $2{,}0x10^5$ células/ml, se dispensaron las células a 100 μl/pocillo en placas de TC con fondo redondo de 96 pocillos y se incubaron durante toda la noche a 37ºC en un incubador en atmósfera de humedad y CO_2 al 5%.

El ADN se preparó para transfecciones simples de SF o dobles (co-transfecciones de ADNc de esquizontes y ADNc de BoLA) de células COS. 6 μl de ADNc de esquizonte y 6 μl de ADNc de BoLA clase I (para co-transfecciones) a 50 ng/μl en dH_2O se añadieron a 150 μl de DMEM no suplementado en una placa de fondo redondo de 96 pocillos. El reactivo de transfección FuGENE 6 se precalentó a 37ºC. Se añadieron de 0,45 a 0,9 μl de Fugene 6 a cada pocillo para las transfecciones simples y dobles respectivamente. Los contenidos de los pocillos se mezclaron mediante ligera agitación con un Dynatech Varishaker durante 1 min y se incubaron a TA durante 20 minutos. El medio de las placas de 96 pocillos que contenía células COS y SF se retiró y se añadió cada complejo de transfección a los pocillos del triplicado (50 μl/pocillo). Las células se incubaron durante 4 horas a 37ºC en un incubador en atmósfera de humedad con CO_2 al 5%. El complejo de transfección se retiró y se reemplazó con 200 μl/pocillo de DMEM suplementado tal como se describió anteriormente y se incubó durante 24 o 48 horas a 37ºC en un incubador en atmósfera de humedad con CO_2 al 5%.

Detección del reconocimiento de CTL de las células SFy COS-7 transfectadas mediante Elispot con IFN-gamma

24 horas después de la transfección, se retiró el medio de los pocillos que contenían las células transfectadas, se lavaron éstas con PBS (200 μl/pocillo) y se desengancharon mediante adición de 100 μl/pocillo de Tripsina-EDTA tal como se describió anteriormente. Una vez las células desenganchadas, se transfirieron los contenidos de los pocillos a placas de fondo redondo de 96 pocillos con 100 μl/pocillo de RPMI frío sin HEPES suplementado con FCS al 10% (medio CTL). Las células se centrifugaron a 1200 rpm durante 15 min; el sobrenadante se retiró y las células se resuspendieron en 50 μl/pocillo en medio CTL específico de esquizontes, generado y mantenido tal como se describió anteriormente, luego se recogieron las células 7-14 días después de la estimulación, se transfirieron a tubos de policarbonato, se sedimentaron a 1200 rpm durante 10 min y se resuspendieron a $2x10^5$/ml en medio CTL suplementado con 5 U/ml de HuIL-2 (Sigma). Placas de Elispot (Millipore Corporation, Bedford, MA, USA) se recubrieron con 50 μl/pocillo con 2 μg/ml de mAB IFN-gamma anti-bovino murino (CC302; Serotec, UK) y se incubaron durante toda la noche a 4ºC. Los pocillos se lavaron dos veces con RPMI-1640 no suplementado y se bloquearon con 200 μl/pocillo de RPMI-1640 suplementado con FBS al 10% e incubación a 37ºC durante 2 horas. El medio de bloqueo se retiró y se reemplazó con 50 μl/pocillo de CTL y 100 μl/pocillo de células transfectadas. Como control positivo, TpM irradiadas se diluyeron seriadamente en células COS o SFa una densidad de $4x10^5$ células/ml cada una. Se añadieron las poblaciones que contenían un 32, 16, 8, 4, 2, y 1% de TpM a 50 μl/pocillo a los pocillos con CTL. Las placas se incubaron en atmósfera de humedad a 37ºC durante 20 horas. Después de la incubación, los contenidos de los pocillos se retiraron y los pocillos se lavaron cuatro veces con agua destilada estéril suplementada con Tween 20 al 0,05% por pocillo y la placa se agitó en un agitador durante 30 segundos entre cada lavado. El proceso se repitió cuatro veces más, con PBS suplementado con Tween 20 (PBS-T). Los pocillos se incubaron a continuación con 100 μl/pocillo de antisuero de conejo IFN-gamma anti-bovino diluido 1/1500 en PBS-T suplementado con BSA al 0,2% (PBS/BSA)

durante 1 hora a temperatura ambiente. Los pocillos se lavaron 4 veces con PBS-T antes de ser incubados durante 1 hora a temperatura ambiente con 100 μl/pocillo de IgG monoclonal murina anti-conejo conjugado con fosfatasa alcalina (Sigma) diluida 1/2000 en PBS-T/BSA. El sustrato tamponado Fast BCIP/NBT (Sigma) se obtuvo disolviendo 1 tableta en 10 ml de dH_2O y filtrándolo con 0,2 μm. Las placas se lavaron seis veces tal como se describió más arriba con PBS-T, se añadieron 100 μl/pocillo de sustrato BCIP/NBT y se incubaron 10 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad. A continuación, se eliminó el sustrato, se lavaron los pocillos con cantidades copiosas de H_2O y se secaron las placas al aire a temperatura ambiente en oscuridad. Por último, se realizó una lectura de placas automatizada con un lector de elispot (AID Diagnostica, Strasberg, Alemania).

Bioensayo para activación de CTL activación basado en la inducción rápida de la expresión de MHC de clase II por las células endoteliales bovinas constitutivamente negativas

Las células endoteliales se desengancharon de los frascos de cultivo de tejidos de 75-cm^2 mediante tratamiento con tripsina/EDTA tal como se describió. Se sembraron $2{,}5x10^4$ células en cada pocillo de una placa de 48 pocillos en 1 ml de DMEM completo y se incubaron durante toda la noche. Los sobrenadantes sin células derivados del co-cultivo de líneas celulares T CD8+ específicas de *T. parva* y SFtransfectados con los genes a analizar o con IFN-gammag bovino recombinante (rBoIFN-gammag, cedido por Ciba-Geigy, Basel, Suiza) se dispusieron en pocillos duplicados en un volumen final de 160 μl/pocillo. Al cabo de 48 horas a 37ºC, se retiraron los sobrenadantes de los cultivos y las monocapas se lavaron con medio FACS 3X (RPMI 1640 suplementado con 2%-suero de caballo sin globulinas y azida sódica al 0,1%). Las células endoteliales se marcaron en hielo durante 30 min con 100 μl de un cóctel de anticuerpos que contenía volúmenes iguales de anticuerpos monoclonales específicos de clase II MHC bovina (mABs) J11, R1 e IL-A21 (cada uno a una dilución de 1/500 de fluido ascítico). Al cabo de 3 lavados en medio FACS, se añadieron 100 μl de Ig anti-ratón de cabra conjugada con FITC (Sigma) diluída a 1/200 en medio FACS. Después de una incubación a 4ºC durante 30 min y tres lavados más en medio FACS, se desengancharon las células tal como se describió anteriormente y se determinó la expresión de clase II MHC de superficie mediante citometría de flujo, con un FACS FACScan (Becton-Dickinson, Sunnyvale, CA, USA). El porcentaje de células que expresan clase II MHC se determinó mediante comparación con EC no estimuladas y marcadas de igual manera.

Se generaron líneas CTL CD8+ específicas de *T. parva* y se mantuvieron con los procedimientos ya descritos. Los sobrenadantes a ensayo se recogieron de placas de fondo redondo de 96 pocillos (Costar) 48 horas después de la re-estimulación de las líneas de células T restantes ($2x10^4$ células/pocillo) con $4x10^5$ células COS-7 co-transfectadas con el gen KN104 y el(los) gen (genes) a ensayo o con SFautólogos confluentes transfectados con dichos genes en un volumen final de 200 μl durante 24 horas. Estos ensayos se realizaron al menos por duplicado.

Si se requiere, la clase I MHC se bloqueó con un anticuerpo específico (IL-A88) para analizar la restricción de clase I MHC de las líneas CTL. Los sobrenadantes de controles negativos se obtuvieron de co-cultivos de CTL con células SFo OS-7 no transfectadas. Los sobrenadantes de controles positivos se obtuvieron de co-cultivos de CTL con proporciones variables de TpM autólogas irradiadas.

Detección de la lisis de CTL de células iSF y COS-7 transfectadas

Se sembraron células iSF autólogas o COS-7 en placas de 6 pocillos (Costar) a una densidad de 2,5x105/pocillo y se incubaron durante 2 horas a 37ºC para permitir su adherencia. Para las transfecciones simples de iSF, se añadieron 2 μg de ADNc test o control a 1 ml de DMEM no suplementado con 3 μl del reactivo de transfección FUGENE 6 y se incubaron durante 40 min. Para las células COS-7, se añadieron 2 μg de ADNc test o control con 2 μg de ADNc de clase I BoLA a 1 ml de DMEM con 6 μl de FUGENE. Se añadió 1 ml del complejo ADN/Fugene por pocillo de COS-7 o iSF adherentes. Las placas se incubaron durante 4 horas a 37ºC, el complejo de transfección se retiró y se reemplazó con 2 ml/pocillo de DMEM completo y se volvieron a incubar las placas durante 20 horas más a 37ºC. Las células transfectadas se recogieron mediante eliminación del medio, lavado con PBS, desprendimiento de células por Tripsina-EDTA y lavado con DMEM completo. Las células transfectadas y TpM se marcaron con cromo51 y se valoró a continuación la capacidad de las líneas CTL específicas de esquizontes (6-8 días post-estimulación) para lisar estas dianas, tal como se describió más arriba.

Optimización del Elispot con IFN-gamma para el reconocimiento de antígenos diana por las CTL específicas de antígenos diana

La capacidad del elispot de IFN-gamma para detectar el reconocimiento de TpM por CTL se valoró en primer lugar con una línea CTL policlonal CD8+ de animales F100. Catorce días después de la estimulación, se añadieron las CTL (5000/pocillo) a los pocillos del elispot recubiertos/bloqueados que contenían 25.000 esquizontes autólogos irradiados y se valoró la formación de manchas de IFN-gamma al cabo de 20 horas de incubación (Fig. 1). La preincubación de TpM durante 30 min con un mAb contra BoLA clase I inhibió completamente la respuesta IFN-gamma, mientras que los mAbs contra MHC clase II o el antígeno irrelevante CD21 no tuvieron ningún efecto (Fig. 1). No se observó casi ninguna liberación espontánea de IFN-gamma por parte de CTL cultivadas sin TpM. Esta línea de TpM no expresaba constitutivamente TpM y no se observaron manchas de IFN-gamma que pudieran atribuirse a TpM (resultados no mostrados).

En un intento de replicar la transfección transitoria, en donde las CTL podrían ser co-cultivadas con COS-7 o iSF de los cuales solo una proporción pequeña de células podría expresar el antígeno diana, se titularon las TpM en COS-7 o iSF y se co-cultivaron con CTL en placas de elispot con IFN-gamma (Fig. 2A, Fig 2B and Fig. 2C). La población estimuladora se fijó al inicio a 40.000/pocillo, con sólo la proporción de TpM y COS-7/SF variables. Se eligió esta población celular de inicio para reflejar el número de APC que podría co-cultivarse con CTL después de una transfección transitoria. Inicialmente, se probaron diferentes inicios de CTL contra las titulaciones de TpM con el fin de identificar el número inicial de CTL mínimo requerido para detectar respuestas significativas para un 1-3% de TpM (Fig 2A). Un número inicial de CTL de 10.000/pocillo se determinó como óptimo ya que podía provocar respuestas significativas en al menos un 1% de TpM, lo que era prácticamente factible para lograr dicho número de CTl para experimentos de cribado.

Se realizaron experimentos de titulación adicionales con clones de CTL de F100 para confirmar que con estos números iniciales de CTL y APC se lograba o excedía un nivel de sensibilidad deseado del elispot de IFN-gamma (Fig. 2 B). Con todos los clones analizados, el elispot de IFN-gamma podía detectar el reconocimiento de células diana cuando constituían únicamente un 0,1% del total de la población celular. El ensayo de elispot funcionó bien con un bajo ruido de fondo y alcanzó los requisitos de sensibilidad cuando se titularon las TpM en células COS-7 pero fue importante determinar que el ensayo se realizó también cuando las TpM se titularon en iSF autólogos. La Fig 2C muestra los resultados del co-cultivo de la línea de CTL policlonal CD8+ F100 con TpM diluidas en células COS-7, SF primarios autólogos e iSF. Ni los cultivos primarios de SF ni los iSF afectaron los niveles de fondo ni la sensibilidad del ensayo del elispot.

Las conclusiones de que iSF eran adecuadas APC y de que el elispot se había optimizado suficientemente con la utilización de TpM se validaron rápidamente mediante la identificación de antígenos de esquizonte diana de CTL inicialmente con células Tp1 y y COS-7 y luego con Tp2 con iSF. El efecto de un ADN de entrada reducido tras el subsiguiente reconocimiento de las células COS-7 ye iSF transfectadas con el antígeno diana se comparó utilizando Tp1 y Tp2 y los resultados mostraron el reconocimiento de las células COS-7 o BW014transfectadas con el antígeno diana cuando únicamente se utilizó 1 ng/pocillo del antígeno diana para transfectar. La respuesta aumentó con la concentración del ADN diana a un máximo de 50 ng/pocillo. Este resultado validó la utilización de genes test o de los agrupados de ADNc a 100 ng/pocillo para la transfección de COS-7 y de iSF. La identificación de Tp2 después del cribado de los genes seleccionados con BW002, BW013 y BW014 CD8+ CTL y del clon #10 de D409 CTL.

Tp2 se identificó gracias al cribado iSF autólogas transfectadas con el gen seleccionado con CTL de BW002 (BW2), BW014 (BW14) y D409 (Figura 3). El gen seleccionado #5 se reconoció específicamente por todas las CTL y se denominó Tp2. iSF transfectadas con Tp2 también se lisaron específicamente por CTL valorado por los ensayos de liberación de Cr51 (figura 4).

La restricción del reconocimiento de Tp2 se valoró mediante la introducción de mAbs de clase I anti-BoLA bloqueantes. Los mAb anti-clase I resultaron en la inhibición de la lisis. La introducción de unmAB (IL-A13) que se une específicamente a la molécula de clase I BoLA w7 también inhibió la lisis de dianas transfectadas con Tp2 por un clon CLT de D409, lo que sugiere que el reconocimiento está restringido por w7.

Identificación de dianas de antígenos de esquizontes de T. parva dianas para CTL

La identificación del antígeno Tp2 de esquizonte diana para CTL se realizó mediante el ensayo que utiliza líneas celulares de fibroblastos de piel inmortalizados (iSF). El efecto de una reducción del ADN introducido al inicio tras el reconocimiento subsiguiente de las células COS-7 y de iSF transfectadas con el antígeno diana se comparó con la utilización de Tp1 y Tp2. Los resultados muestran reconocimiento de las células COS-7 o BW014 transfectadas con el antígeno diana cuando se utiliza únicamente 1 ng/pocillo de ADN del antígeno diana para transfectar. La respuesta aumentó con la concentración máxima del ADN diana a 50 ng/pocillo. Este resultado validó la utilización de genes test o agrupados de ADNc a 100 ng/pocillo para la transfección de COS-7 e iSF. El análisis de BW002 autólogos transfectados con Tp2 y alogénicos transfectados con Tp2, BV050 iSF, requiere la línea CD8+ CTL policlonal BW002 específica de esquizontes, lo que indica una lisis de la línea BW002 transfectada con Tp2. Además, cuando las células diana transfectadas con Tp2 se preincubaron con un anticuerpo monoclonal (mAb) anti-BoLA, no ocurrió lisis; lo que indicaba la eliminación mediada por CTl de restricción MHC clase I de las iSF transfectadas (Fig. 4).

Detección de las respuestas de células T CD8+ ex vivo específicas de Tp2 a partir de reses inmunes después de un estímulo con esporozoitos de T. parva

Las reses, BW002, BW013 and BW014, cuyas líneas de CTL específicas de esquizontes habían demostrado reconocer Tp2, se estimularon con una dosis letal de esporozoitos de *T. parva* (Muguga). Los esporozoitos criopreservados (Estabilizados #4133) se descongelaron y diluyeron a 1/20 tal como se describió anteriormente. Los animales se estimularon mediante inyección subcutánea de 1 ml de esporozoitos diluidos 2 cm por encima del nódulo linfático parotideo derecho. Los animales se controlaron diariamente para ver los cambios en la temperatura rectal y a partir del día 5 post-estímulo se realizaron biopsias del nódulo linfático con una aguja de calibre 21G. Las preparaciones de biopsias teñidas con Giemsa se examinaron para la presencia de células infectadas con esquizontes y se valoraron en una escala de 1-3. Los animales se sangraron el día 2 y diariamente desde el día 6 al 13 y se aislaron los PBMC tal

como se describió anteriormente. Las células T CD8+ y los monocitos CD14+ se purificaron de los PBMC mediante clasificación de células magnética según las instrucciones del fabricante (Miltenyi Biotec, Gergisch 25 Gladbach, Germany). Las células T CD8+ se clasificaron indirectamente con un anticuerpo monoclonal específico para CD8 bovino (IL-A105) seguido de una incubación con microbolas de IgG anti-ratón de cabra (Miltenyi Biotec). Los monocitos se clasificaron directamente mediante incubación con microbolas CD14 (Miltenyi Biotec). Los PBMC y las células T CD8+ se añadieron a los pocillos ($2{,}5x10^5$/pocillo) las placas de Elispot recubiertas/bloqueadas y se estimularon con TpM autólogos ($2{,}5x10^4$/pocillo) o péptidos Tp2 (1 mg/ml de concentración final). Los monocitos purificados se añadieron adicionalmente ($2{,}5x10^4$/pocillo) a los pocillos que contenían péptido y células T CD8+. Se incubaron 30 placas y se revelaron tal como se describió anteriormente. Con el fin de obtener respuestas de CTL específicas de Tp2, se estimularon los PBMC con TpM autólogo 14 días después del estímulo tal como se describió más arriba. Las células viables se cosecharon 7 días después del estímulo y se valoró la actividad lítica contra iSF autólogos estimulados con el péptido TpM y Tp2 tal como se describió anteriormente.

Fig. 5A, Fig. 5B, y Fig. 5C ilustran las respuestas de células T CD8+ después del estímulo de reses inmunes. Tres reses inmunes ECF (BW002, BW013, BW014), de las cuales se generaron líneas CTL específicas de esquizontes y mostraban que reconocían Tp2, se estimularon con una dosis letal de esporozoitos de *T. parva* (Muguga). Se recogió sangre periférica diariamente entre el día 7-13 post-estímulo, y se purificaron las células T CD8+ y los monocitos. Las respuestas a péptidos Tp2 que contenían los epítopos de CTL previamente identificados o los péptidos controles se valoraron mediante co-cultivo de células T CD8+ y monocitos en presencia de 1 Kg/ml de péptido y se cuantificó la liberación del elispot de IFN-gamma. Las respuestas a TpM autólogos se incluyeron como un control positivo.

Cartografía de los epítopos de CTL Tp2

Se sintetizó una librería partida PepSet A de 84 péptidos para cubrir la longitud completa de la proteína Tp2 (Mimotopos). El reconocimiento de los péptidos Tp2 se valoró mediante elispot de IFN-gamma con iSF autólogos como células presentadoras de antígeno.

Fig. 6 muestra los resultados del cribado de Tp2 PepSet con líneas de CTL policlonal CD8+ BW002, BW013, BW014 CD8+ y el clon#10 de CTL D409. La línea policlonal BW002 respondió a un solo péptido #43; (Nº ID SEC:8 CSHEELKKLGML) cuando los péptidos se utilizaron a una concentración de 1 pg/ml. CTL BW0013 respondió significativamente a dos pares de péptidos solapantes; péptidos #53 y 54 (Nº ID SEC: 9 FKSSHGMGKVGKRY) péptidos #78 y 79 (Nº ID SEC: 11 FAQSLVCVLMKCRG). La CTL BW014 también respondió a los péptidos #78 y 79, lo que sugiere la existencia de un epítopo común. Ello no fue quizás sorprendente ya que BW013 y BW014 compartían un progenitor. El clon CTL D409 restringido a w7 respondió a los péptidos #77 y 78,Nº ID SEC: 12 (KCFAQSLVCVLMKC),lo que sugiere un epítopo solapante. Con el fin de definir el epítopo de longitud mínima para el epítopo CTL Bw013 y BW014, todos los posibles nanómeros, decámeros y undecámeros abarcando el Nº ID SEC: 9 (FKSSHGMGKVGKRY) y el Nº ID SEC: 11 (FAQSLVCVLMKCRG) se sintetizaron y cribaron por elispost de IFN-gamma. BW013 respondió al undecámero de Nº ID SEC:6 (KSSHGMGKVGK) y no a una secuencia más corta, lo que sugiere que éste era el epítopo. Los resultados del cribado de los 6 nanómeros posibles de Nº ID SEC: 11 (FAQSLVCVLMKCRG) se muestran en la Fig 7. Los resultados demostraron que tanto las CTL BW013 como BW014 respondieron únicamente al nanómero de Nº ID SEC: 4 (QSLVCVLMK), lo que sugiere que este epítopo era el de longitud mínima. Los péptidos también se cribaron con el clon D409 #10 y se halló que únicamente se reconoció el péptido nanómero de Nº ID SEC: 5 (FAQSLVCVL). Este epítopo se denomino epítopo 2 de Tp2 (Tp2.2). Los ensayos de liberación de Cr^{51} se realizaron con iSF autólogos estimulados con el péptido. Las Fig. 8 y Fig. 9 muestran que tanto las CTL BW014 como D409 CTL lisaron iSF estimuladas con el péptido Tp2 con niveles de lisis comparables a TpM. La lisis fue muy específica con casi un 100% de lisis de iSF estimulados con el péptido Tp2 75BNº ID SEC: 4 (QSLVCVLMK) niveles de fondo de lisis de iSF estimulados con el péptido tp2 76BNº ID SEC: 17 (SLVCVLMKC). Nº UID SEC: 4 (QSLVCVLMK) se denominó epítopo 1 de Tp2 (Tp2.1). El cribado subsiguiente con experimentos similares con grupos de péptidos también identificó el epítopo 4 (Tp2.4), Nº IS SEC: 7 (SHEELKKLGML) y el epítopo 3 de Tp2 (Tp2.3), Nº ID SEC: 6, (KSSHGMGKVGK). LosiSF pulsados con el péptido y los transfectantes P815 de clase I BoLA se prepararon como dianas para los ensayos de liberación de $Cromo^{51}$ mediante incubación de iSF 2x106 o células P815 durante toda la noche en frascos de cultivo de tejidos T25 (Costar) con péptidos Tp2 diluidos a 1 mg/ml en DMEM completo. Las células se recogieron, se marcaron y se analizaron tal como se describió más arriba.

Identificación de epítopos mínimos de CTl para Tp2 con librerías de péptidos sintéticos

Las librerías de péptidos (Cleaved PepSets; Mimotopes, Clayton, Australia) se generaron para el epítopo de CTL Tp2-HD6 restringido. Las librerías PepSet contenían péptidos de 12 meros, 11 meros, 10 meros y 9 meros ajustados por 2 aminoácidos de las secuencias proteicas. Sin embargo, los péptidos se prepararon mediante truncaciones de los 12 meros del extremo N-terminal y se suministraron liofilizados con cada tubo que contenían las truncaciones de 12 meros y de 9, 10, 11 meros con el mismo extremo C terminal. Los péptidos se disolvieron en 400 ml de acetonitrilo/agua de grado para síntesis de ADN al 50% (v/v) (Applied Biosystems, Warrington, UK). Para facilitar la disolución, los tubos se mantuvieron en un baño sonicador durante 2 x10 min. Los péptidos se alicuotaron en tubos de cripreservación marcados (Greiner) y se guardaron a 20ºC. Para el cribado con las CTL, los péptidos se prepararon a 10 mg/ml en RPMI-1640 completo y se añadieron 10 ml a pocillos triplicados de una placa de Elispot, recubierta, lavada y bloqueada tal como se describió más arriba. Células iSF autólogas o P815 que expresaban establemente HD6

de clase I BoLA (P815-HD6) o JSP-1 (P815-JSP-1) se ajustaron a una densidad de $4x10^5$/ml y se añadieron 50 ml a los pocillos que contenían los péptidos. A las placas incubadas a 37ºC durante 1 hora antes de poner las CTL, se prepararon tal como se describió más arriba para el cribado de transfectantes, se le añadió las CTL a 50 ml/pocillo. Las placas se incubaron durante 20 horas a 37ºC y luego se revelaron tal como se describió más arriba. Según los resultados del cribado con los PepSets de Tp2, se sintetizaron péptidos de 9, 10 y 11 meros con el fin de definir los epítopos de CTL para Tp2, figuras 10, 11, 12 y 13. Los péptidos se prepararon y cribaron con un elispot de IFN-gamma tal como se describió más arriba.

La Tabla 5 resume la información de los epítopos de longitud mínima de Tp2, tanto en términos de secuencia aminoacídica como de las secuencias nucleotídicas correspondientes.

TABLA 5

Polipéptidos antigénicos de T. parva	Epítopos (de antígenos) de CTL	
	Secuencia de aa	Secuencia de DNA
Tp2\(N° ID SEC: 1)		
(Tp2.1)	N°ID SEC:4 QSLVCVLMK	N°ID SEC:28
(Tp2.2)	N°ID SEC:6 KSSHGMGKVGK	CAAAGCCTAGTGTGCGTATTAATGAAA
(Tp2.3)	N°ID SEC:5 FAQSLVCVL	N°ID SEC:29
(Tp2.4)	N°ID SEC:7 SHEELKKLGML	TTTGCACAAAGCCTAGTGTGCGTATTA
		N°ID SEC:30
		AAATCATCACATGGTATGGGAAAGGTAGGAAAA
		N°ID SEC:31
		AGTCATGAAGAACTAAAAAAATTGGGAATGCTA

Cinética de las respuestas de células T CD8+ específicas de Tp2 de reses inmunes después de un estímulo con esporozoitos de T. parva

Las reses BW002, BW013 and BW014, cuyas líneas CTL habían reconocido Tp2, se estimularon con una dosis letal de esporozoitos de *T. parva* (Muguga) y las respuestas de PBMC y de células T CD8+ purificadas contra los péptidos TpM y Tp2 se cuantificaron longitudinalmente. Todos los animales fueron consistentemente resistentes al estímulo sin experimentar fiebre ni parasitosis detectables (resultados no mostrados). La Fig 5A, Fig. 5B, y Fig. 5C, muestran las respuestas de células T CD8+ específicas contra TpM y Tp2. A partir del día 9 después del estímulo, las células T CD8+ respondieron específicamente a los péptidos Tp2 que contenían los epítopos CTL identificados anteriormente. Las respuestas aumentaron rápidamente excediendo la respuesta a TpM y se mantuvieron durante el período de observación (día 13 post-infección). La frecuencia de la respuesta al epítopo Tp2 de las células CD8+ fue máxima a aproximadamente 1:500 para BW002 (Fig.5A) y BW014 (Fig. 5B), la respuesta específica de BW013 a Tp2 fue significativamente más débil (Fig. C). La cinética de esta respuesta es comparable con la descrita previamente para CTL específicas de esquizontes en la linfa eferente de después del estímulo de reses inmunes con esporozoites de *T. parva*.

Se realizaron intentos para detectar respuestas líticas a Tp2 directamente en sangre periférica después del estímulo, pero fallaron (resultados no mostrados). A continuación, se realizó un experimento para expandir en primer lugar el número de CTL específicas mediante una estimulación *in vitro* con células que presentaban una actividad citotóxica extremadamente elevada contra TpM y contra fibroblastos pulsados con un péptido de Tp2 conocido por contener un epítopo de CTL (Fig. 14). Estos resultados proporcionaron la primera evidencia directa en animales inmunes de que Tp2 podía estar implicado en la protección contra ECF.

Optimización del Elispot de INF-gamma para el reconocimiento de antígenos diana mediante CTL específicos de esquizontes

La capacidad del elispot de IFN-gamma para detectar el reconocimiento de TpM por las CTL se valoró en primer lugar con una línea de CTL policlonal CD8+ del animal F100. Catorce días después de la estimulación, se añadieron CTL (5000/pocillos) a los pocillos recubiertos/bloqueados del elispot que contenían 25.000 esquizontes autólogos

irradiados y se valoró la formación de elispot IFN-gamma a las 20 horas de incubación. El co-cultivo de CTL con TpM dió como resultado la liberación significativa de IFN-gamma. La pre-incubación de las CTL durante 30 min con un mAb contra la clase I BoLA inhibió completamente la respuesta IFN-gamma mientras que los mAbs contra la clase II MHC o el antígeno CD21 irrelevante no tenía efecto. De modo significativo, no hubo casi liberación espontánea de IFN-gamma de las CTL cultivadas sin TpM. Esta línea TpM no expresaba constitutivamente la TpM y no se le pudo atribuir manchas gamma a la TpM.

En un intento de replicar la situación de transfección transitoria, en donde CTL se co-cultivaría con COS-7 o iSF de los cuales únicamente una proporción pequeña de células expresaría el antígeno diana, la TpM se tituló en COS-7 o iSF y se co-cultivó con CTL en placas de elispot de IFN-gamma. La población estimuladora se fijó a una concentración inicial de 40.000/pocillo, siendo sólo variables las proporciones de TpM y COS-7/SF. Esta concentración de inicial se adoptó ya que se pensó que reflejaba el número de APC que podría co-cultivarse con CTL después de una transfección transitoria. Inicialmente, se probaron diferentes concentraciones de inicio de CTL contra las titulaciones de TpM con el objetivo de identificar la concentración inicial mínima de CTL requerida para detectar las respuestas significativas a 1-3% de TpM. Se determinó una concentración inicial de CTL de 10.000/pocillo como la óptima ya que podía provocar respuestas significativas contra menos de un 1% de TpM y era una concentración factible prácticamente para alcanzar dicho número de CTL para experimentos de cribado. Experimentos de titulación posteriores se realizaron con clones de CTL de F100 para confirmar que estas concentraciones de inicio de CTL y APC permitían lograr un nivel de sensibilidad deseado o superior del elispot de IFN-gamma. Con todos los clones analizados, el elispot de IFN-gamma podía detectar todavía el reconocimiento de células diana cuando constituyeron únicamente el 0,1% de la población celular total. El ensayo del elispot funcionó bien con poco ruido de fondo y alcanzó los requisitos de sensibilidad cuando TpM se tituló en células COS-7, pero también es importante remarcar que el ensayo funcionó bien cuando TpM se tituló en SF autólogos. El hecho de que los cultivos SF fueran primarios o se tratara de iSF no afectó significativamente los niveles de ruido de fondo o la sensibilidad del elispot.

Adelantándose al inicio del cribado para antígenos diana de CTL por la transfección transitoria de células COS-7 e iSF, las eficiencias de la transfección de COS-7 e iSF en placas TC de 96 pocillos se valoraron con el gen reportero GFP. Mientras que hubo una variación considerable en las eficiencias de transfección entre las líneas celulares y entre experimentos, COS-7 se transfectó consistentemente mejor que iSF con eficiencias que variaban del 5-50%, mientras que para la transfección de iSF el intervalo se halló entre 0,5-20%.

La eficiencia de transfección de iSF se valoró como bastante buena como para permitir la presentación e identificación de ADNc de esquizontes transfectados.

Evaluación del Bioensayo de Elispot de IFN-gamma como un sistema de lectura complementario para el reconocimiento de CTL de antígenos diana

EC vasculares bovinas se tiñeron para MHC clase II de superficie después del cultivo durante 48 horas en presencia de medio que contenía IFN-gamma recombinante. Se determinó la sensibilidad hacia rBoIFN-gamma y se halló que era de 100 a 10 pg/ml. Las comparaciones se realizaron entre el bioensayo IFN-gamma y el elispot mediante co-cultivo de CTL específicos de *T. parva* con un número fijado de iSF autólogos que contenían diversas proporciones de TpM autólogos diana y fibroblastos de piel. Hubo una buena correlación entre los dos ensayos. Ambos ensayos detectaron la producción de IFN-gamma en co-cultivos que contenían un porcentaje de TpM tan bajo como el 1%.

Secuencias nucleotídicas y aminoacídicas deducidas y la identidad putativa de los antígenos candidatos

Después de la confirmación de los 5 candidatos como antígenos diana de CTL, se secuenciaron los ADNc individuales y se confirmó que pertenecían al origen de *T. parva* gracias al análisis de bases de datos de la secuencia genómica de *T. parva*. Se realizó una búsqueda en BLAST (Altschul *et al* 1990) con bases de datos del ADN y de la proteína y se identificaron homólogos de algunos de los antígenos identificados. Se realizaron análisis mediante SignalP (Nielsen y col. (1997), Int J Neural Syst. 8, 581-99) y Tmpred (http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html) para predecir la presencia de un péptido señal y un dominio transmembrana. El Nº ID SEC: 25-31 indican el ADN y el NºID SEC:1-7, las secuencias de proteína deducidas de los cinco antígenos candidatos.

Expresión de la proteína Tp2, Tp3 y Tp6 de plásmidos de ADN recombinantes

Las pautas abiertas de lectura de los genes de antígenos candidatos de *T. parva* se amplificaron mediante PCR con Taq polimerasa (Promega, Madison, WI USA 53711) a a partir de los genes de longitud completa originales en sus plásmidos respectivos en pcDNA3. Tanto los cebadores de sentido 5' como los 3' contenían dianas de restricción (Tabla 6). El producto de la amplificación de Tp2 fue de 0,8 Kb de tamaño, según se cuantificó por electroforesis PAGE. Los productos de PCR se digirieron con las enzimas de restricción respectivas y se ligaron en los vectores de expresión etiqueta-His bacterianos, pQE30 (Qiagen, 28159 Avenue Stanford, Valencia, CA91355) o PET28 (Novagen, Madison, WI 53719 USA). Las secuencias cebadoras para e clonaje se proporcionan en la Tabla 6 (cebadores para el clonaje de secuencias de genes Tp), Tabla 7 (cebadores para la adición de las secuencias de expresión-"etiqueta"), y la Tabla 8 (cebadores para la amplificación de secuencias Tp3-etiqueta y Tp6-etiqueta).

TABLA 6

Gen (plásmido)	Cebador sentido 5'	Cebador sentido 3'
Tp2 (pDiana)	Nº ID SEC: 32: GGTAATTGTAGTCATGAAGAAC	Nº ID SEC: 32: TTTACTAATACCACCAAGACCGTG
Tp3 (pDiana)	Nº ID SEC: 45: CGCGGATCCGCCACCATGAAATTAA ATACTATC	Nº ID SEC: 46: CGCCTCGAGGGATTTTTTATTATCGT CTGGAC
Tp6 (pDiana)	Nº ID SEC: 47: CGCGCTAGCGCCGCCACCATGGCTC AGATTCCT	Nº ID SEC: 48: GCGCTCGAGTTTATCAGTTGAGAGTA AGAGAG

TABLA 7

Añadir etiqueta	Cebador sentido 5'	Cebador sentido 3'
	Nº ID SEC: 49:nºID SEC:50:CGCCTCGAGTCCTACATACCATCTGCCGAAAAG CGCAAGCTTTCAGTCTAGTCCTAGCAAAGGGTTAG	

TABLA 8

Amplificación del gen	Cebador sentido 5'	Cebador sentido 3'
Tp3	Nº ID SEC:51: CGCGGATCCGCCACCATGAAATT AAATACTATC	
Tp6	Nº ID SEC:53: CGCGCTAGCGCCGCCACCATGGC TCAGATTCCT	
pDiana		Nº ID SEC:52: CGCAAGCTTTCAGTCTAGTCCTAGCAAAGG GTTAG

Los plásmidos se transformaron en la cepa DH5α de *E. coli* (Life Technologies, Carlsbad, CA 92008, USA). Todos los plásmidos se secuenciaron para asegurarse de que no presentaban sustituciones en comparación con los genes originales. Los plásmidos purificados se utilizaron a continuación para transformar las células bacterianas BL21 DE3.

Se aislaron colonias únicas de bacterias BL21 DE3 que contenían los plásmidos recombinantes y se cultivaron en 2XYT(fórmula) a 37ºC hasta alcanzar una DO600 de 0,6, y a continuación se indujo la expresión de la proteína mediante adición de IPTG a una concentración final de 1 mM, y se cultivó durante 4 horas más. Se recogieron las células mediante centrifugación a 4000 g durante 20 minutos. Se aislaron las proteínas recombinantes mediante agarosa con nitrilotriacético (Ni-NTA) nativa o desnaturalizante según las instrucciones del fabricante (Qiagen, 28159 Avenue Stanford, Valencia, CA91355), se dializaron con PBS y se guardaron a -20ºC. Las proteínas purificadas se analizaron en geles de SDS-PAGE al 12% (Laemmli, 1970) y mediante transferencia de western. La concentración de proteína se determinó mediante el ensayo con el reactivo BCA (PIERCE, Rockford, IL 61105, USA). Las células bacterianas o las proteínas purificadas se aplicaron en un gel de SDS-PAGE al 12% en condiciones desnaturalizantes (Laemmli, 1970). Las proteínas se electrotransfirieron sobre membranas de nitrocelulosa (Schleicher and Schull, Dassel, Alemania). Se utilizó el anticuerpo etiqueta-His de ratón (SIGMA) como anticuerpo primario, mientras que como secundario se utilizó el anti-ratón conjugado con peroxidasa de rábano (SIGMA) seguido de la detección con 3,3'-Diaminobenzidina y peróxido de hidrógeno. La pauta abierta de lectura de los segmentos de Tp2 amplificados y clonados en el vector de expresión bacteriano no presentó ninguna sustitución comparada con las secuencias del gen original (resultados no mostrados). La proteína recombinante Tp2 con una etiqueta de Histidina se generó a partir de la construcción, y de este modo puede identificarse mediante inmunotransferencia con un anticuerpo etiqueta-His. La Figura 15A muestra la proteína total de una alícuota del lisado y la Figura 15 B muestra la presencia del producto Tp2-His-etiqueta tal como se tiñó por el anticuerpo marcado con etiqueta His. La expresión de Tp3 (16) y Tp6 (Figr 17) se ha demostrado mediante electroforesis de la proteína a partir de cultivos de *E. coli* transfectadas.

Estrategia de vacunación

Se realizaron ensayos con reses para valorar el potencial de la vacuna de los antígenos diana de CTL identificados utilizando un virus de la viruela del canario recombinante (patentado por Merial Ltd) y el virus Vaccina Anakara Modificado (MVA) como un procedimiento de liberación del antígeno. La Fig. 18 muestra el nivel de respuestas CTL frente a diversos antígenos Tp, según los protocolos de inmunización CP (mediado por viruela del canario)/MVA (virus Vaccina Anakara Modificado). Los resultados muestran la producción del CD8 (CTLs) específico para el antígeno de *T. parva* en animales según los protocolos de inmunización con los vectores virales de la viruela del canario, que expresan el antígeno de *T. parva*. Se ha de remarcar que en el día 7, la respuesta a Tp2 muestra un aumento en el número de células que forman manchas (SFC)/pocillo, respecto a lo que se muestra en la Fig. 20 (que representa el control de tampón fosfato salino, PBS), para el día 7.

En la Fig. 19, se muestra el nivel de las respuestas de CTL frente al antígeno Tp2, según los protocolos de inmunización ADN/MVA. Los resultados indican que la producción del antígeno-específico de CD8 (CTLs) en animales según los protocolos de inmunización con vectores virales de Vaccinia (Ankara), que expresan el antígeno de *T. parva*. Remarcar que en el día 7 y en el día 28, después de una segunda estimulación, la respuesta a Tp2 muestra un aumento en el número de células formadoras de mancha (SFC/pocillo), respecto a lo que se muestra en el Fig. 20 (que representa el control de tampón fosfato salino, PBS), para el día 7 y el día 28.

Los resultados en la Fig. 20 representan los resultados del control para CP/MVA (Fig. 18) y los protocolos de inmunización de ADN/MVA (Fig. 19), en donde a las reses se les administraron inyecciones de tampón fosfato salino en lugar de antígenos Tp. Los resultados experimentales del control para la cuantificación del desarrollo de los CTLs según la inmunización indican una falta de células CD8+ específicas para el antígeno de *T. parva* en los animales inmunizados con PBS. Estos ensayos analizaron el antígeno Tp2 y su utilización en 16 reses con el fin evaluar las respuestas de CTL específicas para el antígeno y relacionar dichas respuestas con el estímulo. Los animales se inocularon intramuscularmente con 1 ml de vacuna (1x108 ucf de virus) y se estimularon con el refuerzo de forma similar al cabo de 4 semanas.

Se realizaron ensayos de inmunización adicionales con las reses después de las 4 semanas, las reses se sometieron a un estímulo LD100 con esporozoitos de *T. parva* mediante administración subcutánea de 1 ml de material infeccioso estabilizado y diluido cuatro semanas después de la inmunización con los antígenos de *T. parva*, utilizando los vectores del virus de la viruela del canario y MVA, y el sistema ADN/MVA. Los animales se monitorizaron parasitológica y clínicamente durante un período de 2-3 semanas para determinar si la vacuna los había protegido. Se esperaba que las vacunas hubieran proporcionado protección. Los ensayos inmunológicos adicionales se realizaron según el protocolo de inmunización y estímulo.

Modificaciones diversas y variaciones del procedimiento descrito y del sistema de la invención serán evidentes para los expertos en la materia sin alejarse del ámbito y espíritu de la invención. Aunque la invención se ha descrito en conexión con realizaciones preferidas específicas, debería entenderse que la invención tal como se reivindica no debería limitarse a dichas realizaciones específicas. Incluso, diversas modificaciones de las maneras descritas más arriba para llevar a cabo la invención, las cuales son obvias a los expertos en el campo de la biología molecular o campos relacionados se hallan dentro del ámbito de las reivindicaciones siguientes.

Referencias citadas en la descripción

Esta lista de referencias citadas por el solicitante es sólo para la conveniencia del lector. Ésta no forma parte del documento de la patente Europea. Aunque se ha tenido mucho cuidado al compilar las referencias, no se pueden excluir errores u omisiones, por lo que la EPO declina cualquier responsabilidad a este respecto.

Documentos de patente citados en esta descripción

- US 5273744 A [0007]
- WO 9316094 A [0071]
- US 4683195 A [0079]
- US 4683202 A [0079]
- US 4800159 A [0079]
- US 5837832 A, **Chee** [0219]
- WO 9511995 A, **Chee** [0219]
- US 5807522 A, **Brown** [0219]
- WO 95251116 A, **Baldeschweiler** [0222]
- US 60504428 B [0285]

Literatura no procedente de patentes citada en la descripción

- **SHARMA** *et al*. *Vet. Parasito/*., vol. 79, 135041 [0003]
- **HOLDER** *et al*. *Nature*, 1981, vol. 294, 361 [0006]
- **MAJARIAN** *et al*. *J. Immunol*., 1984, vol. 132, 3131 [0006]
- **LEW** *et al*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989, vol. 86, 3768 [0006]
- **MCKEEVER**; **MORRISION**. *International Journal for Parasitology*, 1998, vol. 28, 693-706 [0008]
- **GRIBSKOV**; **DEVEREUS**. Sequence Analysis Primer. *Stockton Press*, 1991 [0037]
- **SAMBROOK** J. *et al*. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. *Cold Spring Harbor Laboratory*, 1989 [0053]
- **AUSUBEL** F. M. *et al*. Current Protocols in Molecular Biology. *John Wiley & Sons*, 1989 [0053]
- **GOEDDEL**. Gene Expression Technology, Methods and Enzymology. *Academic Press*, 1990, vol. 185 [0059]
- **DUNACHIE** *et al*. *J Exp Biol*, 2003, vol. 206, 3771-9 [0059]
- **KELLER**, G. H.; M. M. **MANAK**. DNA Probes. *Stockton Press*, 1987, 169-170 [0072]
- **SAMBROOK** *et al*. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, 1989, vol. 1, 2, 3 [0073]
- **BELTZ** *et al*. *Methods Enzymol*, 1983, vol. 100, 266-85 [0073]
- **SAIKI** *et al*. *Science*, 1985, vol. 230, 1350-4 [0079]
- **GOBINDA** *et al*. *PCR Methods Applic*, 1993, vol. 2, 318-22 [0081]
- **TRIGLIA** T. *et al*. *Nucleic Acids Res*, 1988, vol. 16, 8186 [0081]
- **SAMBROOK** *et al*. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, 1989 [0132] [0145]
- **SAMBROOK** *et al*. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, 1989 [0133]

• **SMITH** *et al*. *Gene*, 1988, vol. 67, 31-40 [0137]

• **AMANN** *et al*. *Gene*, 1988, vol. 69, 301-315 [0137]

• **STUDIER** *et al*. *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology*, 1990, vol. 185, 60-89 [0137]

• **GOTTESMAN**, S. *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology*. *Academic Press*, 1990, vol. 185, 119-128 [0138]

• **WADA** *et al*. *Nucleic Acids Res*., 1992, vol. 20, 2111-2118 [0138]

• **BALDARI** *et al*. *EMBO J*., 1987, vol. 6, 229-234 [0139]

• **KUJAN** *et al*. *Cell*, 1982, vol. 30, 933-943 [0139]

• **SCHULTZ** *et al*. *Gene*, 1987, vol. 54, 113-123 [0139]

• **SMITH** *et al*. *Mol. Cell Biol*., 1983, vol. 3, 2156-2165 [0140]

• **LUCKLOW** *et al*. *Virology*, 1989, vol. 170, 31-39 [0140]

• **SEED**, B. *Nature*, 1987, vol. 329, 840 [0141]

• **KAUFMAN** *et al*. *EMBO J*., 1987, vol. 6, 187-195 [0141]

• **SAMBROOK**, J.; **FRITSH**, E. F.; **MANIATIS**, T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, 1989 [0142]

• **CARTER** *et al*. *Nucl. Acids Res*., 1986, vol. 13, 4331 [0156]

• **ZOLLER**. *Nucl. Acids Res*., 1987, vol. 10, 6487 [0156]

• **WELLS** *et al*. *Gene*, 1985, vol. 34, 315 [0156]

• **WELLS** *et al*. *Philos. Trans. R. Soc. London SerA*, 1986, vol. 317, 415 [0156]

• **CUNNINGHAM**; **WELLS**. *Science*, 1989, vol. 244, 1081-1085 [0156]

• **CREIGHTON**. The Proteins. *W.H. Freeman & Co*, [0156]

• **CHOTHIA**. *J. Mol. Biol*, 1976, vol. 150, 1 [0156]

• **SALZBURG** *et al*. *NAR*, 1998, vol. 26, 544 [0159]

• **DELCHER** *et al*. *NAR*, 1999, vol. 27, 4636 [0159]

• **PERTEA**, M.; **SALZBERG**, S. L. *Current Protocols in Bioinformatics*, 2002 [0159]

• S. L. **SALZBERG**; M. **PERTEA**; A. L. **DELCHER**; M. J. **GARDNER**; H. **TETTELIN**. Interpolated Markov models for eukaryotic gene finding. *Genomics*, 1999, vol. 59, 24-31 [0159]

• J. E. **ALLEN**; M. **PERTEA**; S. L. **SALZBERG**. *Genome Research*, 2004, vol. 14 (1 [0160]

• T. E. **CREIGHTON**. Proteins-Structure and Molecular Properties. *W. H. Freeman and Company*, 1993 [0163]

• **WOLD**, F. Posttranslational Covalent Modification of Proteins. *Academic Press*, 1983, 1-12 [0163]

• **SEIFTER** *et al*. *Meth. Enzymol*., 1990, vol. 182, 626-646 [0163]

• **RATTAN** *et al*. *Ann. N.Y Acad. Sci*., 1992, vol. 663, 48-62 [0163]

• **ORLANDI** R. *et al*. *PNAS*, 1989, vol. 86, 3833-3837 [0166]

• **HUSE** W. D. *et al*. *Science*, 1989, vol. 256, 1275-1281 [0166]

• **WINTER** G.; **MILSTEIN** C. *Nature*, 1991, vol. 349, 293-299 [0166]

• **HARLOW**. Antibodies. *Cold Spring Harbor Press*, 1989 [0169]

- Molecular Cloning: A Laboratory Manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, 1989 [0180]
- Methods in Enzymology. Guide to Molecular Cloning Techniques. *Academic Press*, 1997 [0180]
- **LOCKHART**, D. J. *et al*. *Nat. Biotech*., 1996, vol. 14, 1675-1680 [0219]
- **SCHENA**, M. *et al*. *Proc. Natl. Acad. Sci*., 1996, vol. 93, 10614-10619 [0219]
- **CHARD**, T. An Introduction to Radioimmunoassay and Related Techniques. *Elsevier Science Publishers*, 1986 [0225]
- **BULLOCK**, G. R. *et al*. Techniques in Immunocytochemistry. *Academic Press*, 1982, vol. 1 [0225]
- *TECHNIQUES IN IMMUNOCYTOCHEMISTRY*. 1983, vol. 2 [0225]
- *TECHNIQUES IN IMMUNOCYTOCHEMISTRY*. 1985, vol. 3 [0225]
- **TIJSSEN**, P. Practice and Theory of Enzyme Immunoassays: Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology. *Elsevier Science Publishers*, 1985 [0225]
- **RADLEY** *et al*. *Vet Rec*, 1975, vol. 96, 525-7 [0243]
- **BYROM**; **YUNKER**. *Cytotechnology*, 1990, vol. 4, 285-90 [0254]
- **MWANGI** *et al*. *Vet Parasitol*., 1998, vol. 79, 1-17 [0254]
- **NIELSEN** *et al*. *Int J Neural Syst*., 1997, vol. 8, 581-99 [0277]

REIVINDICACIONES

1. Polipéptido aislado que comprende una secuencia representada por el Nº ID SEC:1, o una variante de la misma con más del 90% de identidad de secuencia y con la misma o similar actividad que la secuencia de Nº ID SEC:1, o cualquiera de las secuencias de Nº ID SEC 4 a 7.

2. Composición farmacéutica, que comprende un polipéptido según la reivindicación 1 y un vehículo aceptable farmacéuticamente.

3. Composición inmunogénica, que comprende un polipéptido según la reivindicación 1 y, opcionalmente, un adyuvante, siendo la composición inmunogénica.

4. Composición inmunogéncia según la reivindicación 3, la cual estimula las células T citotóxicas específicas para el polipéptido.

5. Composición inmunogéncia según la reivindicación 3, la cual comprende un epítopo que estimula las células T citotóxicas específicas de *Theileria parva* (*T. parva*-).

6. Vacuna que comprende uno o más polipéptidos según la reivindicación 1 y, opcionalmente, un adyuvante; en donde dicho polipéptido es inmunogénico.

7. Vacuna según la reivindicación 6, la cual protege una animal contra la infección por *T. parva*.

8. Polipéptido según la reivindicación 1, la cual está presente en cantidades detectables en aislados de *T. parva*.

9. Polipéptido según la reivindicación 1, que comprende un antígeno de *T. parva*.

10. Procedimiento para la producción de un polipéptido que estimula linfocitos citotóxicos (CTL) específicos de un antígeno de *T. Parva*, que comprende el cultivo de una célula huésped, y en donde dicha célula huésped contiene un vector que incluye un polinucleótido que codifica un polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1, unido operativamente a una secuencia control, en donde dicha célula huésped se cultiva en condiciones efectivas para la producción de un polipéptido codificado por el polinucleótido, y en donde además se comprende la recolecta de dicho polipéptido.

11. Anticuerpo específico para el polipéptido de la reivindicación 1.

12. Anticuerpo de la reivindicación 11, el cual es un anticuerpo policlonal.

13. Anticuerpo según la reivindicación 11, el cual se acopla con un vehículo y/o un marcador.

14. Equipo para la detección de la presencia de *T. Parva* en una muestra sospechosa de contener *T. Parva*, o para la purificación de *T. Parva* a partir de una muestra que contiene *T. Parva*, que comprende un anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13.

15. Equipo de la reivindicación 14, el cual comprende además los medios para la realización de un ensayo ligado a enzima, o una transferencia de western para detectar la presencia de *T. parva*.

16. Equipo de la reivindicación 14 o 15, que además comprende los medios para la unión del anticuerpo contra *T. parva* en la muestra, y para liberar el organismo del anticuerpo.

17. Utilización de un polipéptido según la reivindicación 1, o un vector que comprende una construcción recombinante que comprende un polinucleótido según la reivindicación 1, unido operativamente a una secuencia control de expresión, o a una célula huésped que comprende un vector que comprende una construcción recombinante que contiene un polinucleótido que codifica un polipéptido según la reivindicación 1, unido operativamente a una secuencia control de la expresión, en la preparación de un medicamento para la prevención y/o tratamiento de la infección por *T. parva*.

18. Procedimiento para preparar un anticuerpo policlonal, que comprende la inmunización de un animal no humano con uno o más de un polipéptido de la reivindicación 1.

19. Procedimiento para la preparación de un anticuerpo policlonal, que comprende la inmunización de un animal no humano con una célula huésped; en donde dicha célula huésped comprende un vector que contiene una construcción recombinante que comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido según la reivindicación 1, unido operativamente a una secuencia control de expresión.

20. Procedimiento para preparar un anticuerpo monoclonal, que comprende:

(a) la inmunización de un animal no humano con un polipéptido de la reivindicación 1,

(b) la recuperación de células del animal no humano, las cuales producen el anticuerpo que se une al polipéptido,

(c) la preparación de un hibridoma con las células aisladas en (b), y

(d) la recuperación de un anticuerpo monoclonal a partir del hibridoma que se une al polipéptido en (a).

21. Procedimiento para la preparación de un anticuerpo monoclonal, que comprende:

(a) la inmunización de un animal no humano con una célula huésped; en donde dicha célula huésped comprende de un vector que comprende una construcción recombinante que contiene un polinucleótido que codifica un polipéptido según la reivindicación 1, unido operativamente a una secuencia control de la expresión,

(b) La recuperación de células de un animal no humano que producen el anticuerpo que se une a un polipéptido producido por la célula huésped,

(c) La preparación de hibridomas con las células aisladas en (b), y

(d) La recuperación de un anticuerpo monoclonal a partir del hibridoma que se une al polipéptido en (b).

22. Utilización de un anticuerpo según la reivindicación 11 a 13 en la preparación de una composición para el diagnóstico de la infección por *T. parva* en una muestra.

23. Vacuna que comprende un vector, el cual contiene una construcción recombinante que incluye un polinucleótido que codifica un polipéptido según la reivindicación 1, unido operativamente a una secuencia control de la expresión.

24. Vector que comprende una construcción recombinante que comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido según la reivindicación 1, unido operativamente a una secuencia control de la expresión.

25. Vector según la reivindicación 24, en donde dicho vector es un plásmido bacteriano, un bacteriófago, un episoma de levadura, un elemento cromosómico de levadura, un cromosoma de levadura artificial, un vector viral, un baculovirus, un papovavirus, SV40, un virus vaccinia, la cepa Ankara del virus vaccinia modificado (MVA), un adenovirus, un poxvirus, un virus de la viruela aviar (FP9), un virus de la viruela del canario, un virus pseudorabia, o un retrovirus.

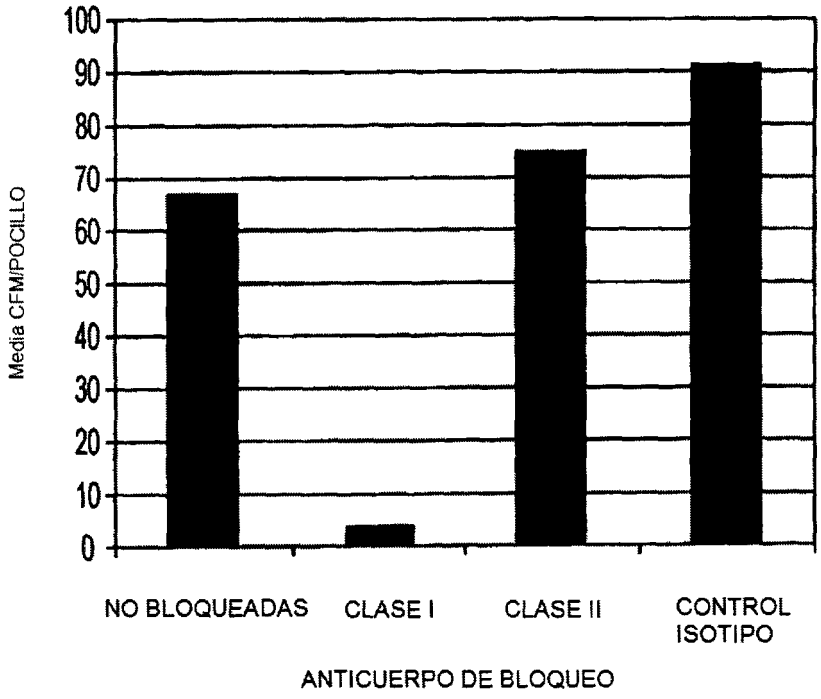
Media CFM/POCILLO
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
NO BLOQUEADAS
CLASE I
CLASE II
CONTROL ISOTIPO
ANTICUERPO DE BLOQUEO

FIG. 1

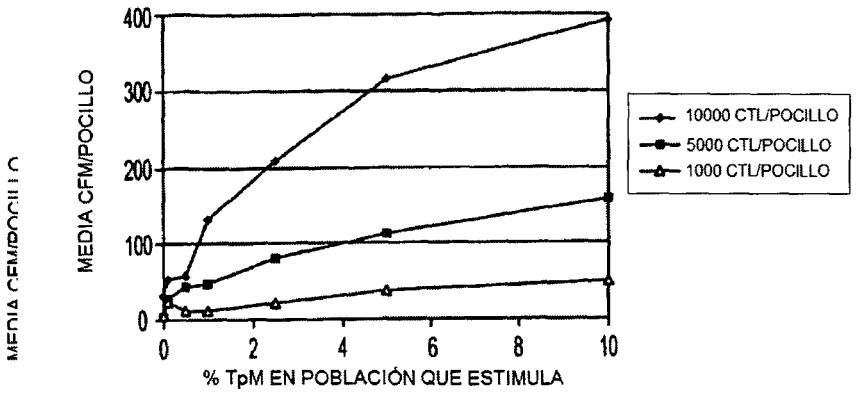

FIG. 2A

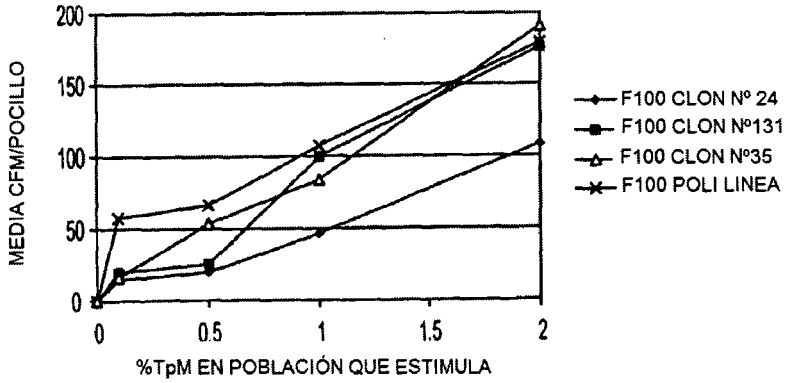

FIG. 2B

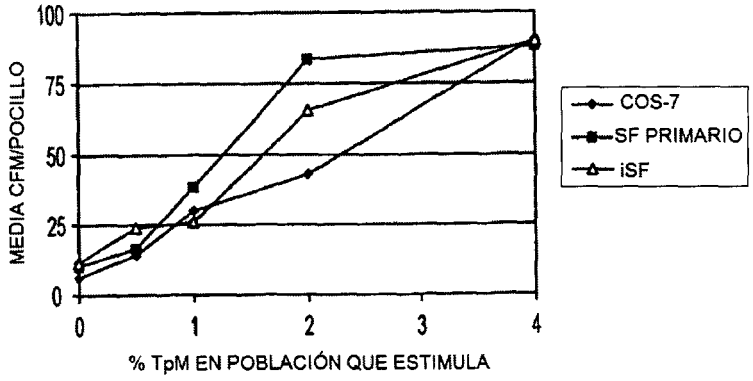

FIG. 2C

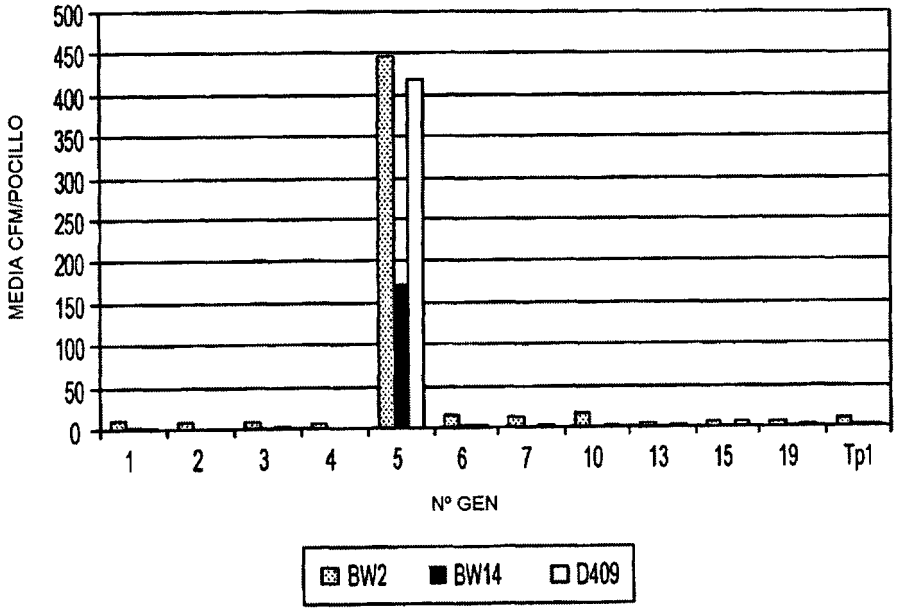
MEDIA CFM/POCILLO
500
450
400
350
300
250
200
150
100
50
0
1
2
3
4
5
6
7
10
13
15
19
Tp1
Nº GEN
BW2
BW14
D409

FIG. 3

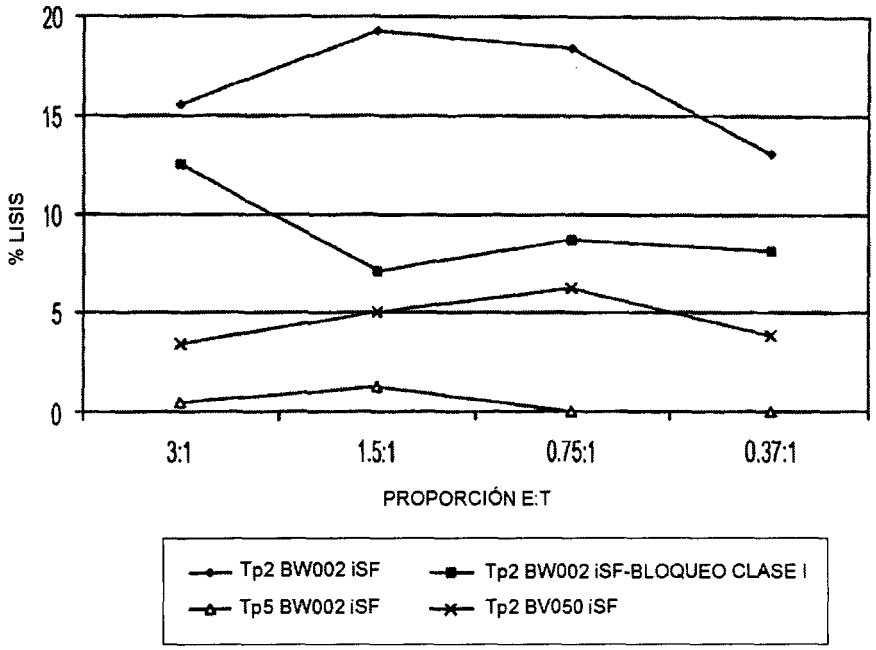
20
15
10
5
0
% LISIS
3:1
1.5:1
0.75:1
0.37:1
PROPORCIÓN E:T
Tp2 BW002 iSF
Tp2 BW002 iSF-BLOQUEO CLASE I
Tp5 BW002 iSF
Tp2 BV050 iSF

FIG. 4

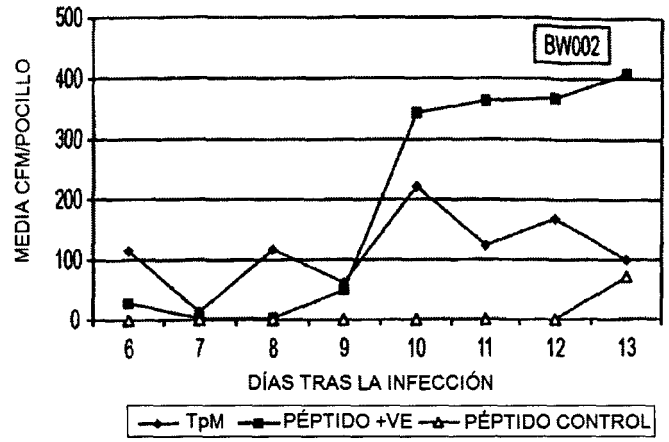

FIG. 5A

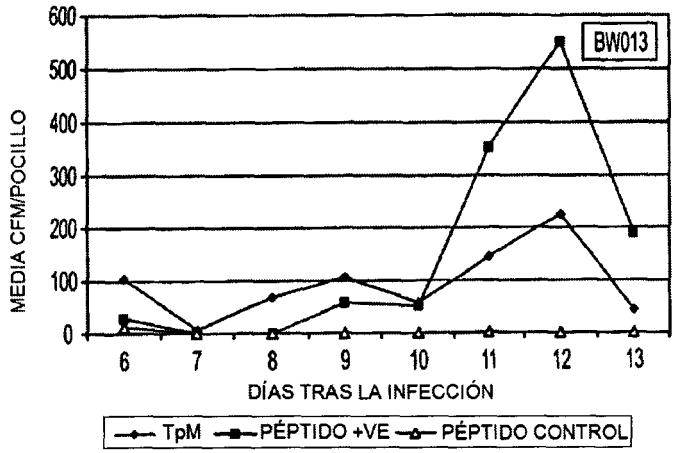

FIG. 5B

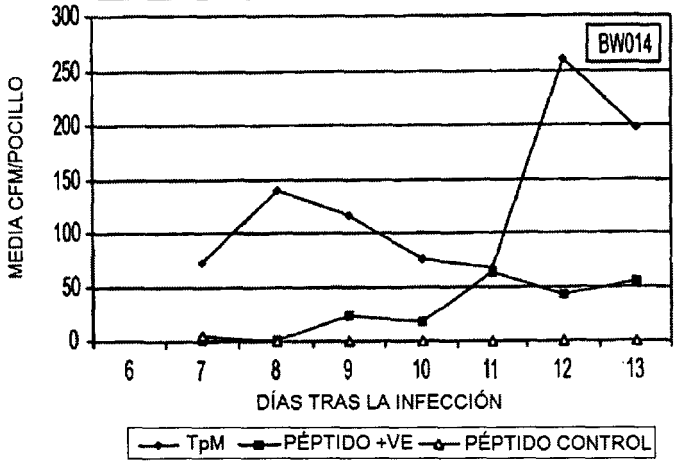

FIG. 5C

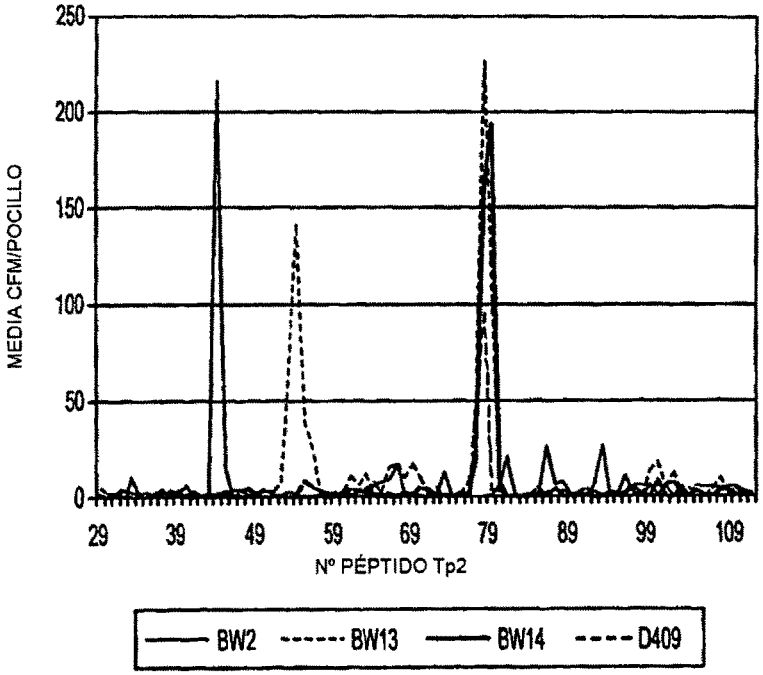
250
200
150
100
50
0
MEDIA CFM/POCILLO
29
39
49
59
69
79
89
99
109
Nº PÉPTIDO Tp2
BW2
BW13
BW14
D409

FIG. 6

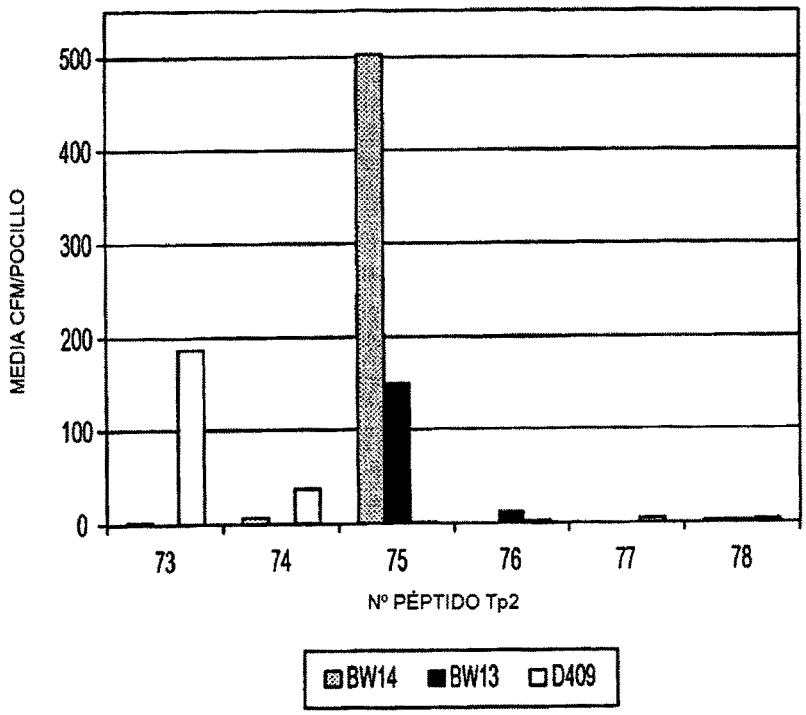
MEDIA CFM/POCILLO
500
400
300
200
100
0
73
74
75
76
77
78
Nº PÉPTIDO Tp2
BW14
BW13
D409

FIG. 7

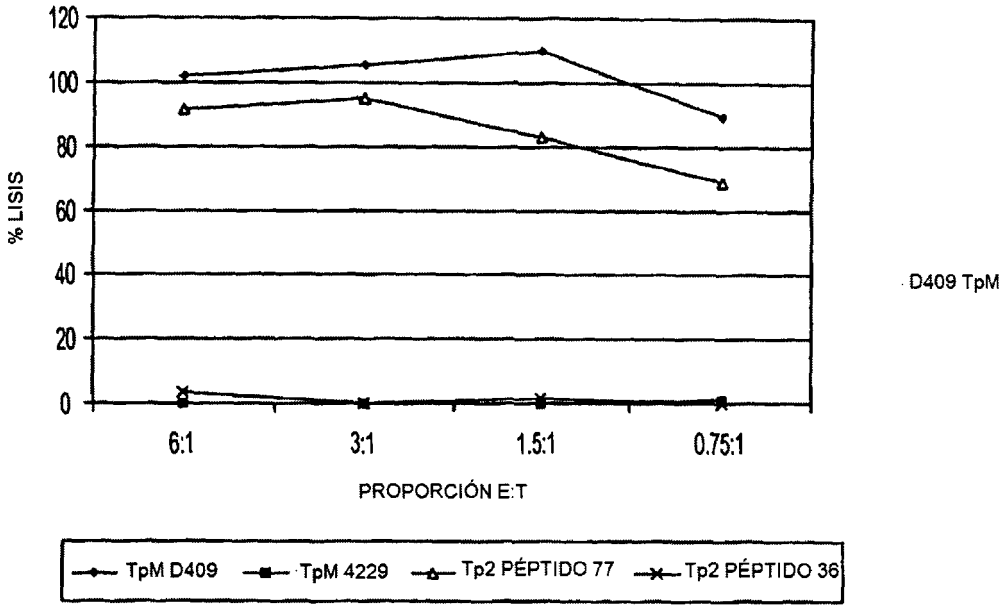
120
100
80
60
40
20
0
% LISIS
6:1
3:1
1.5:1
0.75:1
PROPORCIÓN E:T
TpM D409
TpM 4229
Tp2 PÉPTIDO 77
Tp2 PÉPTIDO 36
D409 TpM

FIG. 8

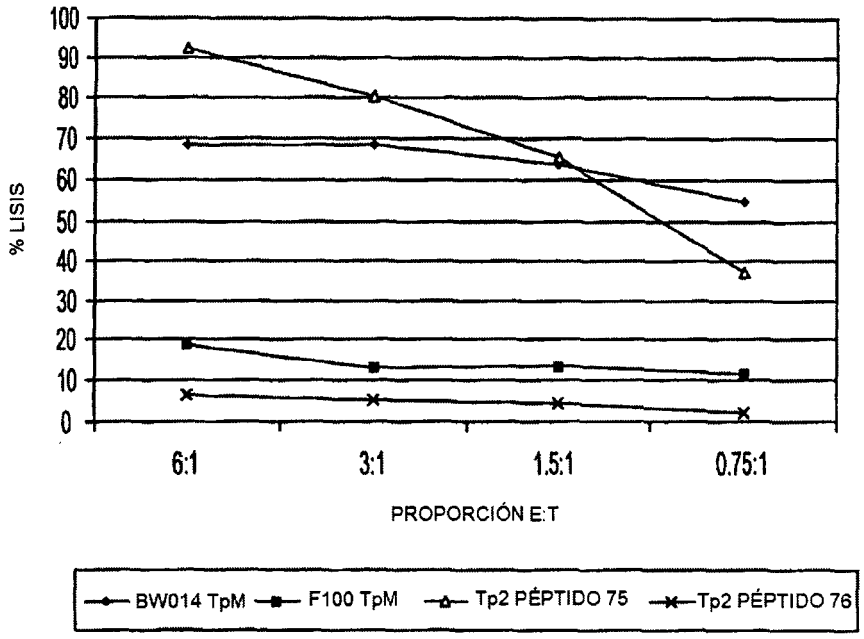
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
% LISIS
6:1
3:1
1.5:1
0.75:1
PROPORCIÓN E:T
BW014 TpM
F100 TpM
Tp2 PÉPTIDO 75
Tp2 PÉPTIDO 76

FIG. 9

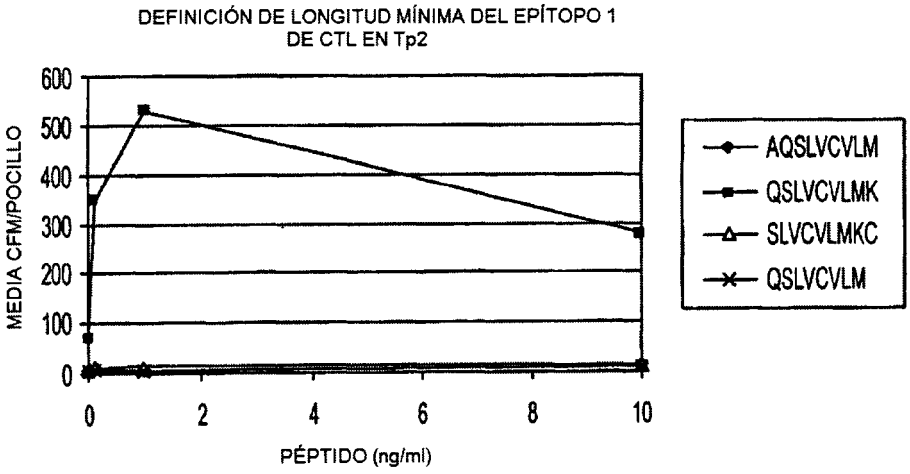
DEFINICIÓN DE LONGITUD MÍNIMA DEL EPÍTOPO 1
DE CTL EN Tp2
MEDIA CFM/POCILLO
600
500
400
300
200
100
0
0
2
4
6
8
10
PÉPTIDO (ng/ml)
AQSLVCVLM
QSLVCVLMK
SLVCVLMKC
QSLVCVLM

FIG. 10

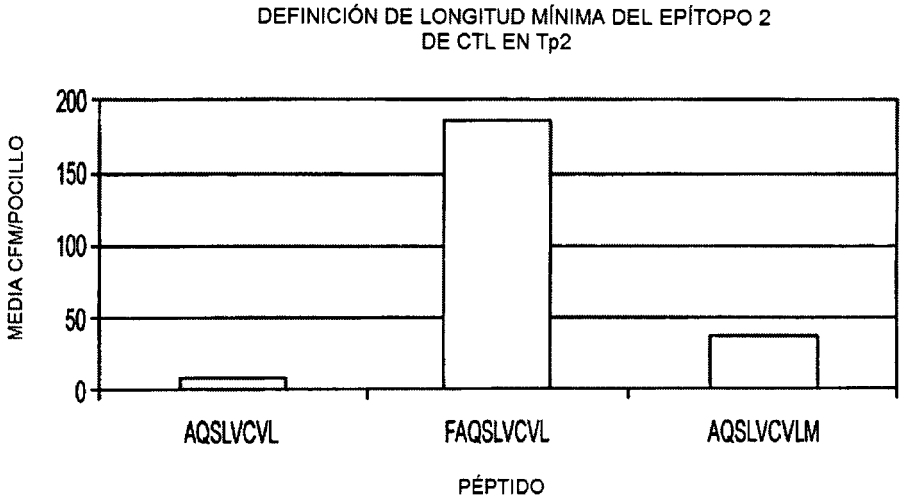
DEFINICIÓN DE LONGITUD MÍNIMA DEL EPÍTOPO 2
DE CTL EN Tp2
MEDIA CFM/POCILLO
200
150
100
50
0
AQSLVCVL
FAQSLVCVL
AQSLVCVLM
PÉPTIDO

FIG. 11

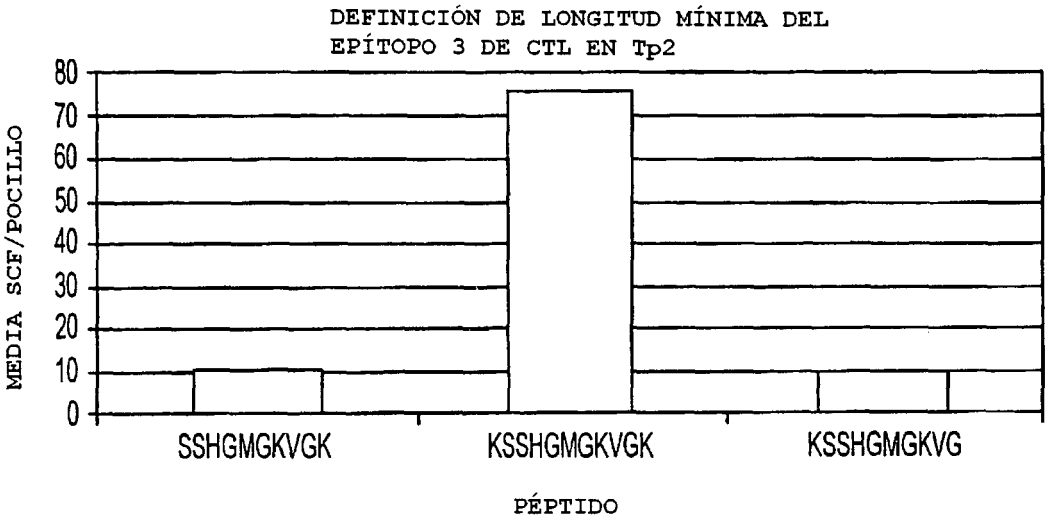
DEFINICIÓN DE LONGITUD MÍNIMA DEL EPÍTOPO 3 DE CTL EN Tp2
MEDIA SCF/POCILLO
80
70
60
50
40
30
20
10
0
SSHGMGKVGK
KSSHGMGKVGK
KSSHGMGKVG
PÉPTIDO

FIG. 12

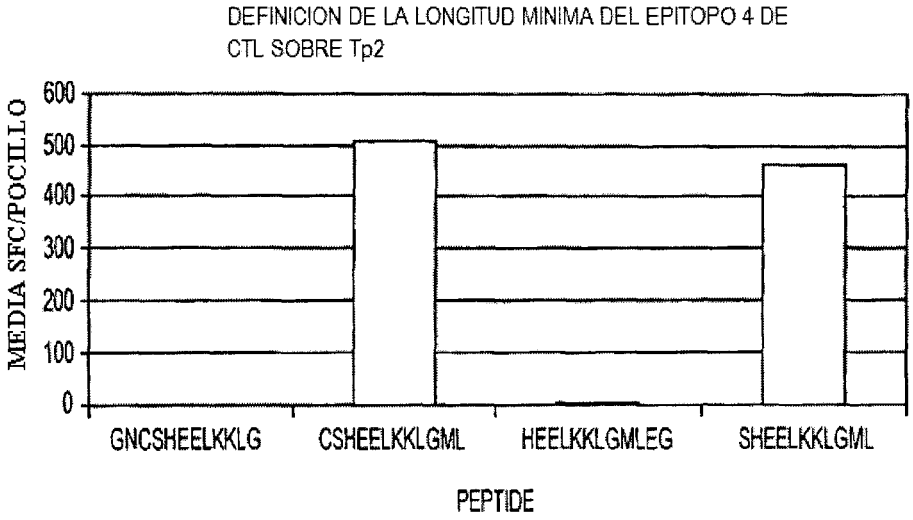
DEFINICION DE LA LONGITUD MINIMA DEL EPITOPO 4 DE CTL SOBRE Tp2
MEDIA SFC/POCILLO
600
500
400
300
200
100
0
GNCSHEELKKLG
CSHEELKKLGML
HEELKKLGMLEG
SHEELKKLGML
PEPTIDE

FIG. 13

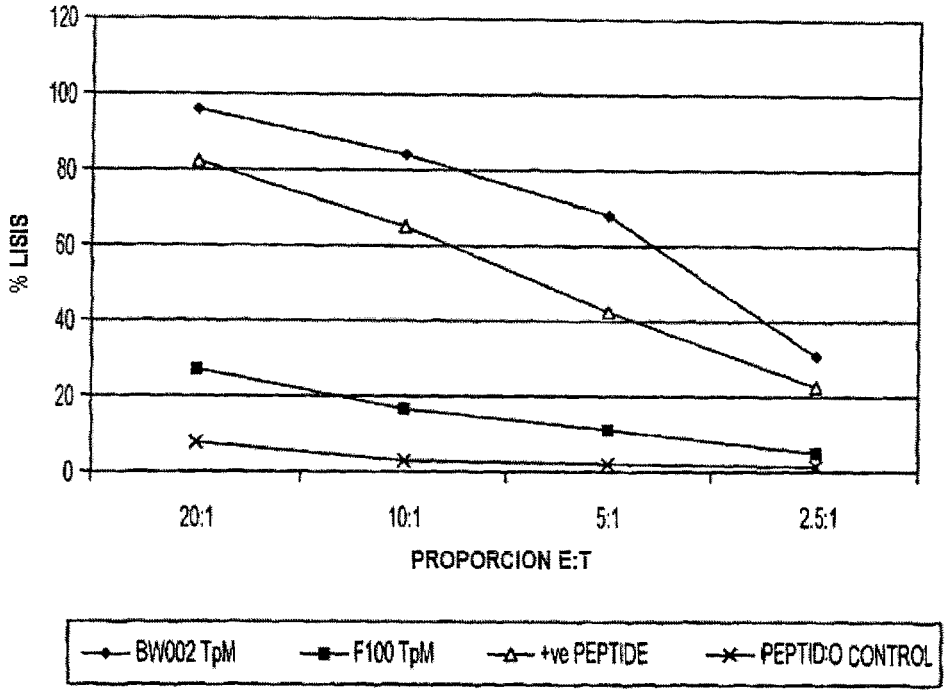
120
100
80
60
40
20
0
% LISIS
20:1
10:1
5:1
2.5:1
PROPORCION E:T
BW002 TpM
F100 TpM
+ve PEPTIDE
PEPTIDO CONTROL

FIG. 14

COOMASSIE

FIG. 15A

ANTI-HIS-TAG

FIG. 15B

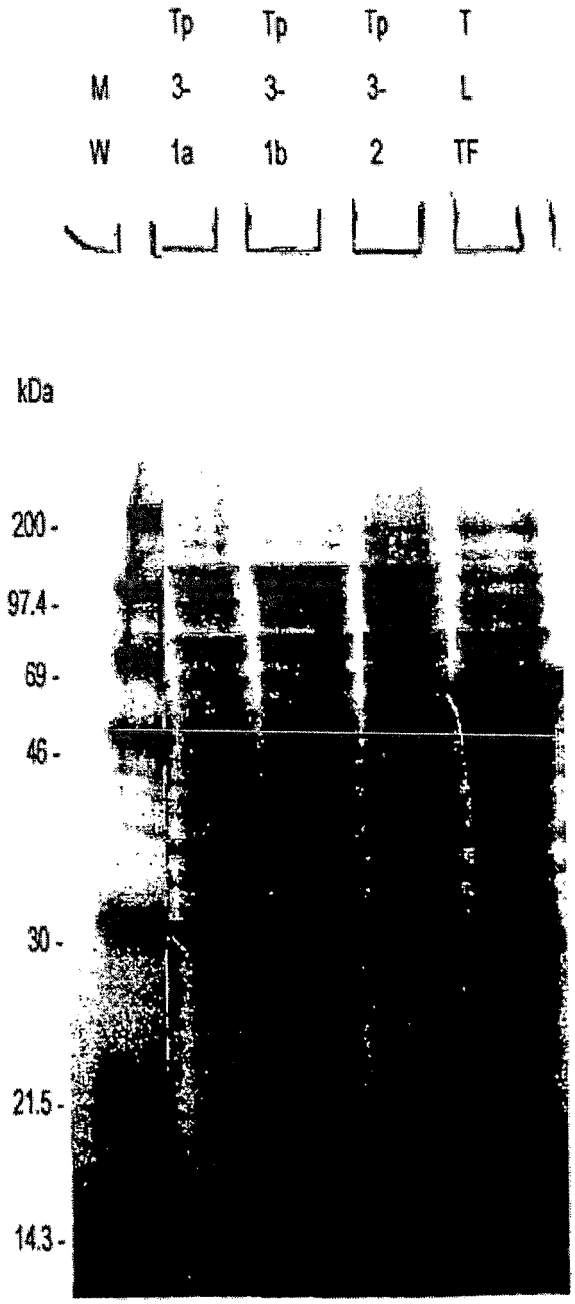

FIG. 16

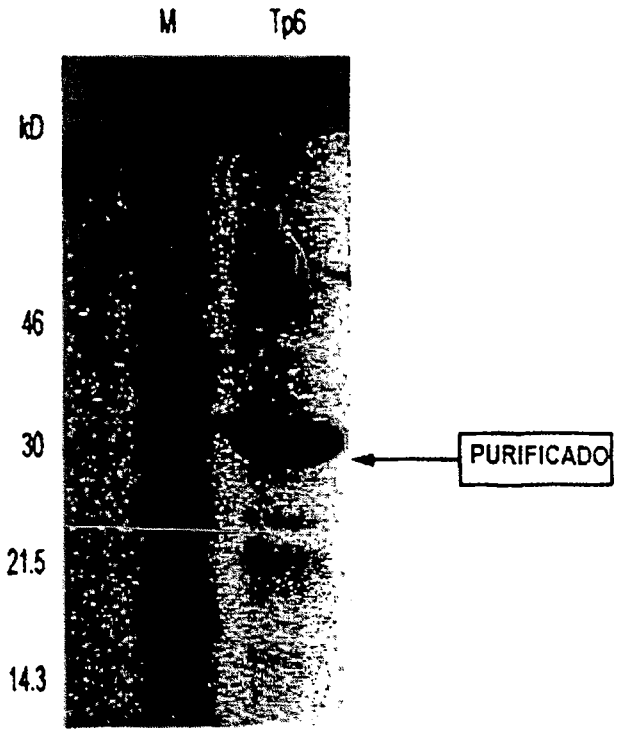

FIG. 17

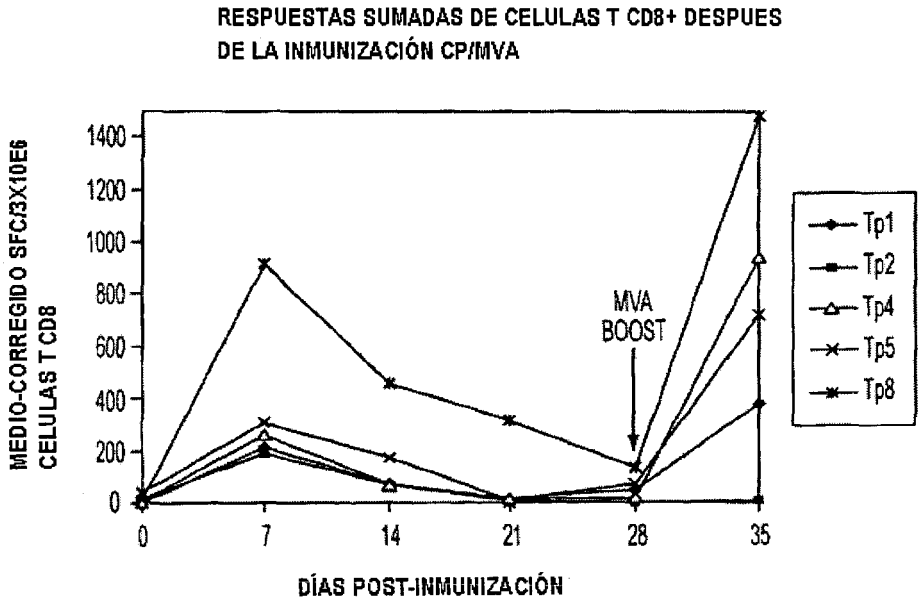
RESPUESTAS SUMADAS DE CELULAS T CD8+ DESPUES DE LA INMUNIZACIÓN CP/MVA
MEDIO-CORREGIDO SFC/3X10E6 CELULAS T CD8
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
0
7
14
21
28
35
DÍAS POST-INMUNIZACIÓN
MVA BOOST
Tp1
Tp2
Tp4
Tp5
Tp8

FIG. 18

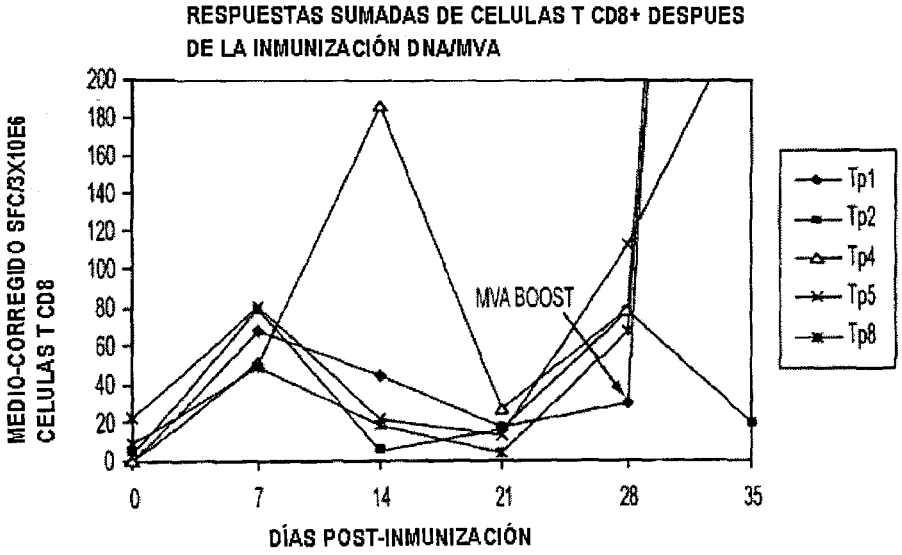
RESPUESTAS SUMADAS DE CELULAS T CD8+ DESPUES DE LA INMUNIZACIÓN DNA/MVA
MEDIO-CORREGIDO SFC/3X10E6 CELULAS T CD8
200
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
0
7
14
21
28
35
DÍAS POST-INMUNIZACIÓN
MVA BOOST
Tp1
Tp2
Tp4
Tp5
Tp8

FIG. 19

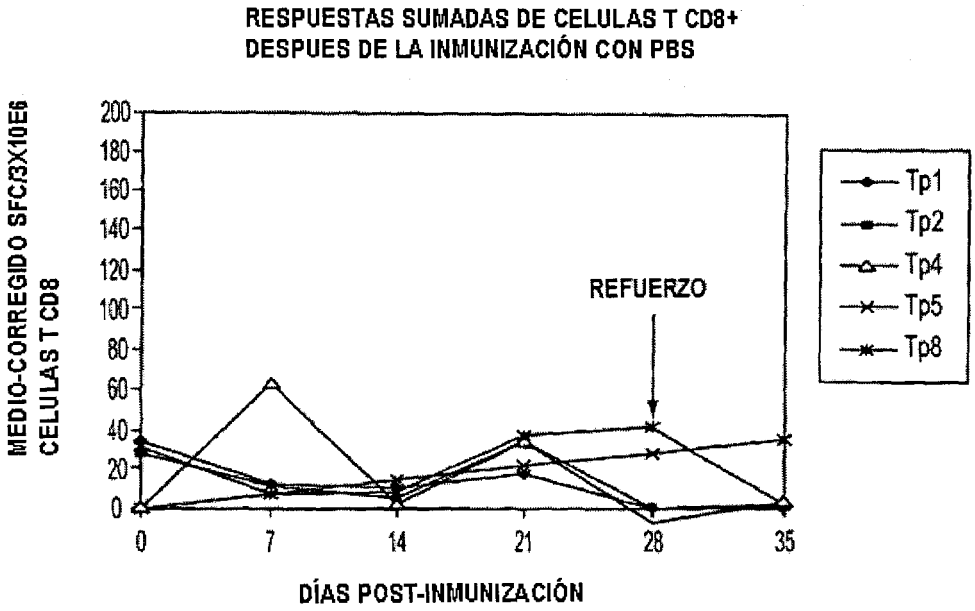
RESPUESTAS SUMADAS DE CELULAS T CD8+
DESPUES DE LA INMUNIZACIÓN CON PBS
MEDIO-CORREGIDO SFC/3X10E6 CELULAS T CD8
200
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
0
7
14
21
28
35
REFUERZO
Tp1
Tp2
Tp4
Tp5
Tp8
DÍAS POST-INMUNIZACIÓN

FIG. 20

LISTA DE SECUENCIAS

<110> INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN INTERNACIONAL LIVESTOCK - INSTITUTO PARA LA INVESTIGACIÓN DEL GENOMA

<120> VACUNA CONTRA LA FIEBRE DE LA COSTA ESTE DERIVADA DE ANTÍGENOS ESPECÍFICOS DE ESQUIZONTES DE CTL

<130> 41860-205199

<140>

<141>

<150> 60/504.428

<151> 2003-09-22

<160> 53

<170> PatentIn Ver. 3.2

<210> 1

<211> 174

<212> PRT

<213> *Theileria parva*

<220>

<223> Secuencia aminoacídica de Tp2:

<400> 1

```
Met Lys Leu Ala Ala Arg Leu Ile Ser Leu Tyr Phe Ile Ile Tyr Ile
 1               5                  10                  15
Leu His Ser Pro Val Leu Gly Gly Asn Cys Ser His Glu Glu Leu Lys
            20                  25                  30
Lys Leu Gly Met Leu Glu Gly Asp Gly Phe Asp Arg Asp Ala Leu Phe
        35                  40                  45
Lys Ser Ser His Gly Met Gly Lys Val Gly Lys Arg Tyr Gly Leu Lys
    50                  55                  60
Thr Thr Pro Lys Val Asp Lys Val Leu Ala Asp Leu Glu Thr Leu Phe
65                  70                  75                  80
Gly Lys His Gly Leu Gly Gly Ile Ser Lys Asp Cys Leu Lys Cys Phe
                85                  90                  95
Ala Gln Ser Leu Val Cys Val Leu Met Lys Cys Arg Gly Ala Cys Leu
            100                 105                 110
Lys Gly Pro Cys Thr Asp Asp Cys Gln Asn Cys Phe Asp Arg Asn Cys
        115                 120                 125
Lys Ser Ala Leu Leu Glu Cys Ile Gly Lys Thr Ser Ile Pro Asn Pro
    130                 135                 140
Cys Lys Trp Lys Glu Asp Tyr Leu Lys Tyr Lys Phe Pro Glu Thr Asp
145                 150                 155                 160
Glu Asp Glu Ser Thr Lys Lys Gly Glu Ala Ser Gly Thr Ser
                165                 170
```

<210> 2
<211> 265
<212> PRT
<213> *Theileria parva*

<220>
<223> Secuencia aminoacídica de Tp3

<400> 2

```
Met Lys Leu Asn Thr Ile Ala Ile Ala Phe Leu Tyr Ser Cys Phe Ser
 1               5                  10                  15

Gln Phe Leu Lys Asn Val Ser Ala Leu Arg Arg Ser Ser Pro Asp Leu
            20                  25                  30

Ser Pro Asp Gly Ser Phe Leu Gln Val Lys Ser Ala Ser Pro Gln Asp
        35                  40                  45

Lys Gln Asp Val Ile Gln Ser Ser Ser Pro Lys Val Thr Val Pro Thr
    50                  55                  60

Val Asp Pro Glu Gly Leu Lys Lys Ala Val Thr Ala Ala Val Leu Ser
65                  70                  75                  80

Asn Gln Asn Gln Ala Leu Gln Asn Gly Ala Leu Asn Pro Ala Asp Phe
                85                  90                  95

Thr Gln Ala Ala Ser Val Asn Ser Met Ser Asn Ala Val Ser Ala Met
            100                 105                 110

Asn Asn Thr Val Gly Pro Val Lys Asn Pro Met Ala Thr Val Gly Thr
        115                 120                 125

Met Asn Ser Phe Thr Gly Met Pro Gly Val Gln Asp Asn Phe Pro Gln
    130                 135                 140

Thr Pro Pro Val Asn Val Gln Asp Thr Ser Thr Gln Glu Asn Ser Leu
145                 150                 155                 160

Asp Asn Leu Asn Leu Leu Leu Asp Pro Ser Leu Val Lys Ile Ser Gln
                165                 170                 175

Ala Asp Ser His Ile Lys Glu Ser Met Glu Lys Ala Val His Ser Leu
            180                 185                 190

Lys Lys Val Leu Glu Gly Leu Thr Asn Leu Ala Thr Leu Ser Lys Ser
        195                 200                 205

Arg Asp Thr Glu Pro Phe Asn Val Leu Gly Asp Asp Tyr Thr Met Arg
    210                 215                 220

Asn Val Leu Asp Leu Met Asn Lys Glu Leu Arg Gln Val Glu Ser Leu
225                 230                 235                 240
```

```
Gln Lys Val Val Phe Gln Phe Asn Ala Phe Ala Leu Ser Thr Phe Thr
                245                 250                 255

Lys Ser Pro Asp Asp Asn Lys Lys Ser
            260                 265
```

<210> 3

<211> 277

<212> PRT

<213> *Theileria parva*

<220>

<223> Secuencia aminoacídica de Tp6

<400> 3

```
Met Ala Gln Ile Pro Val Asp Lys Phe Ala Lys Leu Val Thr Gly Ala
  1               5                  10                  15

Gly Ser Ala Leu Leu Leu Phe Gly Ser Gly Ala Trp Leu Val Asn Ser
            20                  25                  30

Ser Leu Tyr Asp Val Gly Ala Gly His Arg Ala Val Val Tyr Asn Arg
        35                  40                  45

Ile Thr Gly Ile Ser Glu Thr Thr His Gly Glu Gly Thr His Phe Ile
    50                  55                  60

Ile Pro Trp Leu Glu Arg Pro Ile Ile Tyr Asp Val Arg Thr Arg Pro
65                  70                  75                  80

Arg Thr Leu Met Ser Leu Thr Gly Ser Arg Asp Leu Gln Met Val Asn
                85                  90                  95

Ile Thr Cys Arg Val Leu Ser Arg Pro Asp Glu Arg Arg Leu Arg Asp
            100                 105                 110

Ile Tyr Arg His Leu Gly Lys Asp Tyr Asp Glu Arg Val Leu Pro Ser
        115                 120                 125

Ile Ile Asn Glu Val Leu Lys Ser Ile Val Ala Gln Tyr Asn Ala Ser
    130                 135                 140

Gln Leu Ile Thr Gln Arg Glu Arg Val Ser Lys Ala Val Arg Asp Gln
145                 150                 155                 160

Leu Val Asn Arg Ala Arg Asp Phe Asn Ile Leu Leu Asp Asp Val Ser
                165                 170                 175

Leu Thr His Leu Ser Phe Ser Pro Glu Tyr Glu Lys Ala Val Glu Ala
            180                 185                 190

Lys Gln Val Ala Gln Gln Gln Ala Glu Arg Ser Lys Tyr Ile Val Leu
        195                 200                 205

Lys Ala Gln Glu Glu Lys Lys Ser Thr Ile Ile Lys Ala Gln Gly Glu
    210                 215                 220
```

```
Ser Glu Ala Ala Arg Leu Ile Gly Ser Ala Ile Lys Asp Asn Pro Ala
225                 230                 235                 240

Phe Ile Thr Leu Arg Arg Ile Glu Thr Ala Lys Glu Val Ala Asn Ile
                245                 250                 255

Leu Ser Lys Ser Gln Asn Lys Ile Met Leu Asn Ser Asn Thr Leu Leu
            260                 265                 270

Leu Ser Thr Asp Lys
        275
```

<210> 4
<211> 9
<212> PRT
<213> *Theileria parva*

<220>
<223> Secuencia aminoacídica del Epítopo 1 de Tp2 (Tp2.1)

<400> 4

```
Gln Ser Leu Val Cys Val Leu Met Lys
  1               5
```

<210> 5
<211> 9
<212> PRT
<213> *Theileria parva*

<220>
<223> Secuencia aminoacídica del Epítopo 2 de Tp2 (Tp2.2)

<400> 5

```
Phe Ala Gln Ser Leu Val Cys Val Leu
  1               5
```

<210> 6
<211> 11
<212> PRT
<213> *Theileria parva*

<220>
<223> Secuencia aminoacídica del Epítopo 3 de Tp2 (Tp2.3)

<400> 6

```
Lys Ser Ser His Gly Met Gly Lys Val Gly Lys
  1                 5                  10
```

<210> 7
<211> 11
<212> PRT
<213> *Theileria parva*

<220>
<223> Secuencia aminoacídica del Epítopo 4 de Tp2 (Tp2.4)

<400> 7

Ser His Glu Glu Leu Lys Lys Leu Gly Met Leu
1 5 10

<210> 8
<211> 12
<212> PRT
<213> *Theileria parva*

<220>
<223> Secuencia aminoacídica del péptido de Tp2

<400> 8

Cys Ser His Glu Glu Leu Lys Lys Leu Gly Met Leu
1 5 10

<210> 9
<211> 14
<212> PRT
<213> *Theileria parva*

<220>
<223> Secuencia aminoacídica del péptido #43 de Tp2

<400> 9

Phe Lys Ser Ser His Gly Met Gly Lys Val Gly Lys Arg Tyr
1 5 10

<210> 10
<211> 14
<212> PRT
<213> *Theileria parva*

<220>
<223> Secuencia aminoacídica del péptido #53/54 de Tp2

<400> 10

Phe Lys Ser Ser His Gly Met Gly Lys Val Gly Lys Arg Tyr
1 5 10

<210> 11
<211> 14
<212> PRT
<213> *Theileria parva*

<220>
<223> Secuencia aminoacídica del péptido #78/79 de Tp2

<400> 11

Phe Ala Gln Ser Leu Val Cys Val Leu Met Lys Cys Arg Gly
1 5 10

<210> 12
<211> 14
<212> PRT
<213> *Theileria parva*

<220>
<223> Secuencia aminoacídica del péptido #77/78 de Tp2

<400> 12

Lys Cys Phe Ala Gln Ser Leu Val Cys Val Leu Met Lys Cys
1 5 10

<210> 13
<211> 10
<212> PRT
<213> *Theileria parva*

<220>
<223> Secuencia aminoacídica del péptido de Tp2

<400> 13

Ser Ser His Gly Met Gly Lys Val Gly Lys
1 5 10

<210> 14
<211> 12
<212> PRT
<213> *Theileria parva*

<220>
<223> Secuencia aminoacídica del péptido #77 de Tp2

<400> 14

Lys Cys Phe Ala Gln Ser Leu Val Cys Val Leu Met
1 5 10

<210> 15
<211> 12
<212> PRT
<213> *Theileria parva*

<220>
<223> Secuencia aminoacídica del péptido #36 utilizado como un control del experimento

<400> 15

Phe Ile Ile Tyr Ile Leu His Ser Pro Val Leu Gly
1 5 10

<210> 16
<211> 9
<212> PRT
<213> *Theileria parva*

<220>
<223> Secuencia aminoacídica del péptido sintetizado denominado #75, que representa los residuos aminoacídicos 97 a 105 de Tp2

<400> 16

Ala Gln Ser Leu Val Cys Val Leu Met
1 5

<210> 17
<211> 9
<212> PRT
<213> *Theileria parva*

<220>
<223> Secuencia aminoacídica del péptido #76 de Tp2

<400> 17

Ser Leu Val Cys Val Leu Met Lys Cys
1 5

<210> 18
<211> 8
<212> PRT
<213> *Theileria parva*

<220>
<223> Secuencia aminoacídica que representa los residuos aminoacídicos del 98 al 105 de Tp2

<400> 18

Gln Ser Leu Val Cys Val Leu Met
1 5

<210> 19
<211> 9
<212> PRT
<213> *Theileria parva*

<220>
<223> Secuencia aminoacídica que representa los residuos aminoacídicos del 99 al 107 de Tp2

<400> 19

Phe Gly Lys His Gly Leu Gly Gly Ile
1 5

<210> 20
<211> 10
<212> PRT
<213> *Theileria parva*

<220>
<223> Secuencia aminoacídica para el fragmento peptídico de A.A.#49-A.A.#58 de Tp2

<400> 20

Lys Ser Ser His Gly Met Gly Lys Val Gly
1 5 10

<210> 21
<211> 8
<212> PRT
<213> *Theileria parva*

<220>
<223> Secuencia aminoacídica para el fragmento peptídico de A.A.#97-A.A.#164 de Tp2

<400> 21

Ala Gln Ser Leu Val Cys Val Leu
1 5

<210> 22
<211> 12
<212> PRT
<213> *Theileria parva*

<220>
<223> Secuencia aminoacídica para el fragmento peptídico de A.A.#97-A.A.#104 de Tp2

<400> 22

Gly Asn Cys Ser His Glu Glu Leu Lys Lys Leu Gly
1 5 10

<210> 23
<211> 12
<212> PRT
<213> *Theileria parva*

<220>
<223> Secuencia aminoacídica para el fragmento peptídico de A.A.#28-A.A.#39 de Tp2

<400> 23

His Glu Glu Leu Lys Lys Leu Gly Met Leu Glu Gly
1 5 10

<210> 24
<211> 8
<212> PRT
<213> *Theileria parva*

<220>
<223> Secuencia aminoacídica para el fragmento peptídico de Tp1 que representa los residuos aminoacídicos del #96 al #103

<400> 24

Phe Ala Gln Ser Leu Val Cys Val
1 5

<210> 25
<211> 525
<212> ADN
<213> *Theileria parva*

<220>
<223> Secuencia nucleotídica de Tp2

<400> 25

```
atgaaattgg ccgccagatt aattagcctt tactttatta tttacatttt acattcccca 60
gtgctgggag gtaattgtag tcatgaagaa ctaaaaaaat tgggaatgct agagggcgat 120
ggtttcgaca gggatgcatt gttcaaatca tcacatggta tgggaaaggt aggaaaaagg 180
tatggtctta aaactactcc aaaagtagat aaagtcttag cagatcttga aacactgttt 240
ggaaaacacg gtcttggtgg tattagtaaa gattgtctta aatgttttgc acaaagccta 300
gtgtgcgtat taatgaaatg tagaggagca tgtctcaaag gaccatgtac tgacgactgc 360
caaaattgct ttgatagaaa ctgtaaatct gcattgctgg aatgcattgg gaaaacaagt 420
attccaaatc catgtaaatg gaaagaagat tatctaaaat acaaatttcc tgaaacagat 480
gaggacgaat ctacgaaaaa aggagaagcc tccggcactt catag                  525
```

<210> 26
<211> 798
<212> ADN
<213> *Theileria parva*

<220>
<223> Secuencia nucleotídica de Tp3

<400> 26

```
atgaaattaa atactatcgc aatagccttt ttgtattcct gtttctcaca gtttttaaaa 60
aatgtgtctg ctctgaggcg tagttctcca gatttgtcac cagatggttc ttttcttcaa 120
gtaaaatcag cttctcctca ggataaacaa gatgtaatcc aaagttcctc tcctaaggta 180
acagtgccta cggttgaccc tgaaggcctc aagaaggcgg ttactgcagc agttctatca 240
aaccaaaatc aagctctaca aaacggtgct cttaatccag cagatttcac tcaagctgcc 300
tctgttaatt ccatgagtaa tgctgttagt gccatgaaca atactgttgg tccagtaaaa 360
aatcccatgg ctactgttgg tactatgaac tcctttactg gaatgcctgg tgtacaggat 420
aattttcctc agacaccgcc tgttaatgtt caagacacct ctacccagga gaacagtctt 480
gacaacctaa atctcctctt agatccctcg ttagtaaaga tatctcaagc tgatagtcac 540
ataaaagaaa gcatggaaaa agctgtacac agccttaaaa aggtcttgga ggggctaacc 600
aaccttgcga ctctgtctaa aagtagggat actgaaccgt ttaatgttct gggggatgac 660
tatacgatgc gtaacgtttt ggacctcatg aataaggaac tcaggcaggt tgaatctctt 720
cagaaagttg tgttccaatt caacgccttt gcactttcca ccttcactaa gagtccagac 780
gataataaaa aatcctaa                                              798
```

<210> 27
<211> 834
<212> ADN
<213> *Theileria parva*

<220>
<223> Secuencia nucleotídica de Tp6

<400> 27

```
atggctcaga ttcctgttga taaattcgct aaattagtta ctggagccgg ctctgctctc 60
ttattattcg gttcaggtgc ctggcttgtc aattccagtt tatacgatgt tggagctggg 120
catagagctg ttgtatataa ccgtatcact ggaataagtg agactacaca tggagaagga 180
acgcacttca taattccctg gctagaacgt ccaataattt acgatgtgag gactcgtcct 240
aggactctga tgtctctcac cggaagccgt gacttgcaga tggttaacat cacctgccgt 300
gtgttgtctc gtcccgatga gcgcagactc agggatattt acaggcactt gggcaaagat 360
tacgacgagc gagtcctgcc ttcaataata aacgaggttc tgaagagtat tgtggcccag 420
tacaacgcct ctcagctcat tactcagaga gaaagagtta gcaaagcagt cagggaccag 480
ctggtgaaca gggccaggga ctttaatatt cttctcgatg atgtctcctt aacccactta 540
agcttcagtc ctgaatatga aaaggctgta gaggctaaac aagtagctca acagcaagct 600
gaacgcagta aatatatagt gttgaaggct caggaggaga agaaatcgac gataattaag 660
gctcagggag agtctgaggc tgcaaggctt attggaagtg caattaagga taaccctgcc 720
tttattacgc ttcggagaat tgaaaccgct aaggaagtgg ctaacattct ctccaaatcg 780
cagaataaaa tcatgctcaa tagtaatact ctcttactct caactgataa ataa       834
```

<210> 28
<211> 27
<212> ADN
<213> *Theileria parva*

<220>
<223> Secuencia nucleotídica del Epítopo 1 de Tp2 (Tp2.1)

<400> 28

caaagcctag tgtgcgtatt aatgaaa 27

<210> 29
<211> 27
<212> ADN
<213> *Theileria parva*

<220>
<223> Secuencia nucleotídica del Epítopo 2 de Tp2 (Tp2.2)

<400> 29

tttgcacaaa gcctagtgtg cgtatta 27

<210> 30
<211> 33
<212> ADN
<213> *Theileria parva*

<220>
<223> Secuencia nucleotídica del Epítopo 3 de Tp2 (Tp2.3) (Tp2.3)

<400> 30

aaatcatcac atggtatggg aaaggtagga aaa 33

<210> 31
<211> 33
<212> ADN
<213> *Theileria parva*

<220>
<223> Secuencia nucleotídica del Epítopo 4 de Tp2 (Tp2.4)

<400> 31

agtcatgaag aactaaaaaa attgggaatg cta 33

<210> 32
<211> 22
<212> ADN
<213> *Theileria parva*

<220>
<223> Secuencia nucleotídica del cebador de sentido 5' para el clonaje de expresión de Tp2

<400> 32

ggtaattgta gtcatgaaga ac 22

<210> 33
<211> 24
<212> ADN
<213> *Theileria parva*

<220>
<223> Secuencia nucleotídica del cebador sentido 3' para el clonaje de expresión de Tp2.

<400> 33

tttactaata ccaccaagac cgtg 24

<210> 34
<211> 37
<212> ADN
<213> *Theileria parva*

<220>
<223> Secuencia nucleotídica del cebador de sentido 5' para el clonaje del gen Tp2

<400> 34

gccgccacca tgaaattggc cgccagatta attagcc 37

<210> 35
<211> 39
<212> ADN
<213> *Theileria parva*

<220>
<223> Secuencia nucleotídica del cebador de sentido 5’ para el clonaje del gen Tp3

<400> 35

gccgccacca tgaaattaaa tactatcgca atagccttt 39

<210> 36
<211> 37
<212> ADN
<213> *Theileria parva*

<220>
<223> Secuencia nucleotídica del cebador de sentido 5’ para el clonaje del gen Tp6

<400> 36

gccgccacca tggctcagat tcctgttgat aaattcg 37

<210> 37
<211> 24
<212> ADN
<213> *Theileria parva*

<220>
<223> Secuencia nucleotídica del cebador de sentido 3’ para el clonaje del gen Tp2

<400> 37

ctatgaagtg ccggaggctt ctcc 24

<210> 38
<211> 28
<212> ADN
<213> *Theileria parva*

<220>
<223> Secuencia nucleotídica del cebador de sentido 3’ para el clonaje del gen Tp3

<400> 38

ttaggatttt ttattatcgt ctggactc 28

<210> 39
<211> 31
<212> ADN
<213> *Theileria parva*

<220>
<223> Secuencia nucleotídica del cebador de sentido 3’ para el clonaje del gen Tp6

<400> 39

ttatttatca gttgagagta agagagtatt a 31

<210> 40
<211> 26
<212> ADN
<213> *Theileria parva*

<220>
<223> Secuencia nucleotídica del cebador de sentido 5' interno para el clonaje del gen

<400> 40

tccatgtaaa tggaaagaag attatc 26

<210> 41
<211> 26
<212> ADN
<213> *Theileria parva*

<220>
<223> Secuencia nucleotídica del cebador de sentido 5' para el clonaje del gen Tp2

<400> 41

ggaactcagg caggttgaat ctcttc 26

<210> 42
<211> 24
<212> ADN
<213> *Theileria parva*

<220>
<223> Secuencia nucleotídica del cebador de sentido 5' para el clonaje del gen Tp2

<400> 42

ccgctaagga agtggctaac attc 24

<210> 43
<211> 23
<212> ADN
<213> *Theileria parva*

<220>
<223> Secuencia nucleotídia del cebador de sentido 5' específico del vector

<400> 43

acgccaggat tttcccagtc acg 23

<210> 44
<211> 21
<212> ADN
<213> *Theileria parva*

<220>
<223> Secuencia nucleotídia del cebador de sentido 3' específico del vector

<400> 44

gagcggataa catcacacag g 21

<210> 45
<211> 33
<212> ADN
<213> *Theileria parva*

<220>
<223> Secuencia nucleotídica del cebador de sentido 5' específico de Tp3

<400> 45

cgcggatccg ccaccatgaa attaaatact atc 33

<210> 46
<211> 32
<212> ADN
<213> *Theileria parva*

<220>
<223> Secuencia nucleotídica del cebador de sentido 3' específico de Tp3

<400> 46

cgcctcgagg gatttttat tatcgtctgg ac 32

<210> 47
<211> 33
<212> ADN
<213> *Theileria parva*

<220>
<223> Secuencia nucleotídica del cebador de sentido 5' específico de Tp6

<400> 47

cgcgctagcg ccgccaccat ggctcagatt cct 33

<210> 48
<211> 32
<212> ADN
<213> *Theileria parva*

<220>
<223> Secuencia nucleotídica del cebador de sentido 3' específico de Tp6

<400> 48

gcgctcgagt ttatcagttg agagtaagag ag 32

<210> 49
<211> 33
<212> ADN
<213> *Theileria parva*

<220>
<223> Secuencia nucleotídia de cebador de sentido 5' para la adición de una etiqueta (HIS) para las secuencias génicas

<400> 49

cgcctcgagt cctacatacc atctgccgaa aag 33

<210> 50
<211> 35
<212> ADN
<213> *Theileria parva*

<220>
<223> Secuencia nucleotídica del cebador específico de sentido 3' para la adición de una etiqueta (HIS) en las secuencias génicas

<400> 50

cgcaagcttt cagtctagtc ctagcaaagg gttag 35

<210> 51
<211> 33
<212> ADN
<213> *Theileria parva*

<220>
<223> Secuencia nucleotídica de un cebador de sentido 5' específico para la amplificación de secuencias de Tp3

<400> 51

cgcggatccg ccaccatgaa attaaatact atc 33

<210> 52
<211> 35
<212> ADN
<213> *Theileria parva*

<220>
<223> Secuencia nucleotídica de un cebador de sentido 3' específico para la amplificación por PCR de secuencias Tp3-pDiana.

<400> 52

cgcaagcttt cagtctagtc ctagcaaagg gttag 35

<210> 53
<211> 33
<212> ADN
<213> *Theileria parva*

<220>

<223> Secuencia nucleotídica de un cebador de sentido 5' específico para la amplificación por PCR de secuencias de Tp6

<400> 53

cgcgctagcg ccgccaccat ggctcagatt cct 33