



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 283 419**

51 Int. Cl.:
A61K 39/09 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **01944804 .2**
86 Fecha de presentación : **11.06.2001**
87 Número de publicación de la solicitud: **1292327**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **19.03.2003**

54 Título: **Immunización de ganado lechero con proteína Mig.**

30 Prioridad: **12.06.2000 US 211016 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.11.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.11.2007

73 Titular/es: **University of Saskatchewan**
124 Veterinary Road
Saskatoon, Saskatchewan S7N 0W0, CA

72 Inventor/es: **Potter, Andrew, A.;**
Bolton, Alexandra, J. y
Song, Xin, Ming

74 Agente: **Arizti Acha, Mónica**

ES 2 283 419 T3

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

DESCRIPCIÓN

Inmunización de ganado lechero con proteína Mig.

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere generalmente a antígenos bacterianos y genes que codifican para los mismos. Más particularmente, la presente invención se refiere a la clonación, expresión y caracterización de la proteína Mig receptora de Fc de varias especies bacterianas de *Streptococcus*, y al uso de la misma en composiciones de vacuna.

10 **Antecedentes**

La mastitis es una infección de la glándula mamaria normalmente provocada por bacterias u hongos. La respuesta inflamatoria tras la infección da como resultado la disminución en la producción de leche así como de su calidad, y provoca pérdidas económicas anuales principales a la industria lechera.

Entre las especies bacterianas más comúnmente asociadas con la mastitis hay diversas especies del género *Streptococcus*, incluyendo *Streptococcus aureus*, *Streptococcus uberis* (inclasificable), *Streptococcus agalactiae* (grupo B de Lancefield), *Streptococcus dysgalactiae* (grupo C de Lancefield), *Streptococcus zooepidemicus*, y los estreptococos de grupos D, G, L y N de Lancefield. Algunas de estas especies son contagiosas (por ejemplo *S. agalactiae*), mientras que otras se consideran patógenos medioambientales (por ejemplo *S. dysgalactiae* y *S. uberis*).

El patógeno medioambiental *S. uberis* es responsable de aproximadamente el 20% de todos los casos clínicos de mastitis (Bramley, A. J. y Dodd, F. H. (1984) J. Dairy Res. 51:481-512; Bramley, A. J. (1987) Animal Health Nutrition 42:12-16; Watts, J. L. (1988) J. Dairy Sci. 71:1616-1624); es el microorganismo predominante aislado de las glándulas mamarias durante el periodo de no lactancia (Bramley, A. J. (1984) Br. Vet. J. 140:328-335; Bramley y Dodd (1984) J. Dairy Res. 51:481-512; Oliver, S. P. (1988) Am. J. Vet. Res. 49:1789-1793).

La mastitis resultante de la infección con *S. uberis* es comúnmente subclínica, caracterizada por una leche aparentemente normal con un aumento de los recuentos de células somáticas debido al influjo de leucocitos. La composición química de la leche cambia debido a la supresión de la secreción con la transferencia de cloruro de sodio y bicarbonato de la sangre a la leche, provocando un desplazamiento del pH hasta un nivel más alcalino. La mastitis por *S. uberis* también puede tomar forma de un estado clínico agudo, con signos obvios de enfermedad tales como coágulos o decoloración de la leche e hinchazón o endurecimiento de la glándula mamaria. Algunos casos de la enfermedad clínica pueden ser graves y puede estar presente la pirexia. Para una revisión de las manifestaciones clínicas de la mastitis por *S. uberis*, véase, Bramley (1991) Mastitis: physiology or pathology. págs. 3-9. En C. Burvenich, G. Vandeputte-van Messom, y A. W. Hill (ed.), New insights into the pathogenesis of mastitis. Rijksuniversiteit Gent, Bélgica; y Schalm *et al.* (1971) The mastitis complex-A brief summary. págs. 1-3. En Bovine Mastitis. Lea & Febiger, Filadelfia.

Los métodos de control antibacteriano convencionales tales como el baño antiséptico para pezones y tratamiento con antibióticos son eficaces para el control de muchos tipos de mastitis contagiosas, pero los microorganismos medioambientales normalmente encontrados en todos los establos para ganado lechero a menudo son resistentes a tales medidas. Por tanto la vacunación es una estrategia atractiva para evitar infecciones de las glándulas mamarias, y se ha mostrado que es beneficiosa en el caso de algunos patógenos de mastitis contagiosos.

Sin embargo, la bibliografía es limitada en lo referente a estudios de vacunación con patógenos medioambientales tales como *S. dysgalactiae* y *S. uberis*, y se han observado resultados variables. En algunos casos, la inmunización ha dado como resultado un aumento de la sensibilidad al microorganismo específico y en otros casos se ha obtenido una protección específica para la cepa.

Por ejemplo, estudios previos han mostrado que la infección primaria con *S. uberis* puede reducir considerablemente la tasa de infección tras una segunda exposición con la misma cepa (Hill, A. W. (1988) Res. Vet. Sci. 44:386-387). La vacunación local con *S. uberis* inactivado protege la glándula mamaria bovina frente a la exposición intramamaria con la cepa homóloga (Finch *et al.* (1994) Infect. Immun. 62:3599-3603). De manera similar, se ha mostrado que la vacunación subcutánea con *S. uberis* activo provoca una modificación drástica de la patogénesis de la mastitis con la misma cepa (Hill *et al.* (1994) FEMS Immunol. Med. Microbiol. 8:109-118). Los animales vacunados de esta manera producen menos bacterias en su leche y muchos cuartos permanecen libres de infección.

No obstante, la vacunación con bacterias activas o atenuadas puede presentar riesgos para el receptor. Además, está claro que las vacunas inactivadas convencionales son en general muy ineficaces frente a *S. uberis* y *S. agalactiae*, ya sea debido a la falta de antígenos protectores sobre células que crecen *in vitro* o al enmascaramiento de estos antígenos mediante mimetismo molecular.

La actual falta de vacunas existentes de mastitis frente a *S. agalactiae* o las cepas de estreptococos contagiosos se debe al menos en parte a la falta de conocimiento sobre los determinantes de virulencia y antígenos protectores producidos por esos microorganismos que están implicados en la invasión y protección de la glándula mamaria (Collins *et al.* (1988) J. Dairy Res. 55:25-32; Leigh *et al.* (1990) Res. Vet. Sci. 49: 85-87; Marshall *et al.* (1986) J. Dairy Res. 53: 507-514).

Se sabe que *S. dysgalactiae* se une a varias proteínas extracelulares y derivadas del plasma tales como fibronectina, fibrinógeno, colágeno, alfa-II-macroglobulina, IgG, albúmina y otros compuestos. El microorganismo también produce hialuronidasa y fibrinolisisina y puede adherirse a, e invadir, células epiteliales mamarias bovinas. Sin embargo, no se conocen los papeles exactos de los componentes bacterianos responsables de estos fenotipos en la patogénesis.

5

De manera similar, se entiende poco la patogénesis de la infección por *S. uberis*. Además, la influencia de factores de virulencia de *S. uberis* sobre los mecanismos de defensa del huésped y la fisiología de la glándula mamaria no está bien definida. Factores de virulencia conocidos asociados con *S. uberis* incluyen una cápsula de ácido hialurónico (Hill, A. W. (1988) Res. Vet. Sci. 45:400-404), hialuronidasa (Schaufuss *et al.* (1989) Zentralbl. Bakteriologie. Ser. A 271:46-53), proteína de tipo R (Groschup, M. H. y Timoney, J. F. (1993) Res. Vet. Sci. 54:124-126), y una co-hemolisina, el factor CAMP, también conocido como factor UBERIS (Skalka, B. y Smola, J. (1981) Zentralbl. Bakteriologie. Ser. A 249:190-194), proteína de tipo R, activador de plasminógeno y factor CAMP. Sin embargo, se sabe muy poco sobre sus papeles en la patogenicidad.

Se ha propuesto el uso de determinantes de virulencia de *Streptococcus* como agentes inmunogénicos. Por ejemplo, se ha mostrado que el factor CAMP de *S. uberis* protege los sujetos vertebrados frente a la infección por ese microorganismo (Jiang, *et al.*, patente estadounidense número 5.863.543).

El antígeno γ de la cepa de estreptococos de grupo B A909 (número de ATCC 27591) es un componente del complejo marcador de proteína c, que comprende adicionalmente una subunidad α y β (Boyle, patente estadounidense número 5.721.339). Se ha notificado que los subconjuntos de serotipo Ia, II, y casi todas las células de serotipo Ib de estreptococos del grupo B, expresan componentes de la proteína c. Se ha propuesto el uso de la subunidad γ como agente inmunogénico frente a infecciones por *Streptococcus* del grupo B de Lancefield. Sin embargo, no se ha estudiado su uso para evitar o tratar infecciones bacterianas en animales, incluyendo la mastitis en el ganado.

25

Se considera que la proteína M de estreptococos del grupo A es uno de los factores de virulencia principales de este microorganismo debido a su capacidad para impedir el ataque por fagocitos humanos (Lancefield, R. C. (1962) J. Immunol. 89:307-313). Las bacterias persisten en el tejido infectado hasta que se producen anticuerpos frente a la molécula M. Los anticuerpos específicos del tipo frente a la proteína M pueden invertir el efecto anti-fagocítico de la molécula y permitir un aclaramiento eficaz del microorganismo invasor.

30

Las proteínas M son uno de los factores de virulencia clave de *Streptococcus pyogenes*, debido a su implicación en la mediación de la resistencia frente a la fagocitosis (Kehoe, M. A. (1991) Vaccine 9:797-806) y a su capacidad para inducir respuestas inmunitarias en el huésped potencialmente dañinas mediante su superantigenicidad y su capacidad para inducir respuestas de anticuerpos de reacción cruzada en el huésped (Bisno, A. L. (1991) New Engl. J. Med. 325:783-793; Froude *et al.* (1989) Curr. Top. Microbiol. Immunol. 145:5-26; Stollerman, G. H. (1991) Clin. Immunol. Immunopathol. 61:131-142).

Sin embargo, existen obstáculos para usar proteínas M intactas como vacunas. Los epítomos opsónicos de la proteína son extremadamente específicos del tipo, dando como resultado una protección específica del tipo, estrecha. Además, algunas proteínas M parecen contener epítomos que reaccionan de manera cruzada con tejidos del sujeto inmunizado, provocando respuesta autoinmunitaria dañina (véase por ejemplo Dale, J. G. y Beachey, E. H. (1982) J. Exp. Med. 156:1165-1176; Dale, J. B. y Beachey, E. H. (1985) J. Exp. Med. 161:113-122; Baird, R. W., Bronze, M. S., Draus, W., Hill, H. R., Veasey, L. G. y Dale, J. B. (1991) J. Immunol. 146:3132-3137; Bronze, M. S. y Dale, J. B. (1993) J. Immunol. 151:2820-2828; Cunningham, M. W. y Russell, S. M. (1983) Infect. Immun. 42:531-538).

45

Se han expresado proteínas quiméricas que contienen tres dominios de unión a fibronectina (FNBD) diferentes derivados de proteínas de unión a fibronectina de *S. dysgalactiae* y *Staphylococcus aureus* sobre la superficie de células de *Staph. carnosus*. En el caso de una de esas proteínas, las inmunizaciones intranasales con células de *Staph. carnosus* recombinantes activas que expresan la proteína quimérica sobre su superficie dio como resultado una mejora en la respuesta de anticuerpos frente al inmunógeno de modelo presente en la proteína de superficie quimérica (Liljeqvist, S. *et al.* (1999) FEBS Letters 446:299-304).

50

Los receptores de Fc bacterianos (restos de superficie que se unen a moléculas de inmunoglobulina mediante un mecanismo no inmunitario, es decir, a la parte de Fc del anticuerpo) son una clase de proteínas de unión categorizadas adicionalmente por su reactividad con diferentes clases y subclases de inmunoglobulinas de mamíferos. El receptor de tipo I (también conocido como proteína A), el más extensamente estudiado y caracterizado, se ha aislado de *Staphylococcus aureus*, y se une a tipos 1, 2 y 4 de IgG; este tipo de receptor muestra además reactividad cruzada con IgA e IgM. Se ha notificado que el receptor de Fc de tipo II, encontrado en unos pocos estreptococos del grupo A de Lancefield, y el receptor de tipo III (también conocido como proteína G), encontrado en la mayoría de las cepas de *Streptococcus* de grupo G y grupo C humanas, reaccionan con los cuatro tipos de IgG. En el caso del receptor de tipo III, la unión a IgG es sumamente específica; la proteína no reacciona de manera cruzada con IgA ni IgM. El receptor de tipo IV se encuentra en ciertos estreptococos del grupo G bovinos, y el receptor de tipo V se encuentra en ciertas cepas de *Streptococcus zooepidemicus*. El receptor de Fc de tipo VI se ha aislado de las cepas S212 y RSS-212 de *S. zooepidemicus*, y se une a IgG de rata con alta afinidad, es decir, 100 veces la de la unión de proteína A, y de 30 a 40 veces la de la unión de proteína G (Boyle, *et al.*, patente estadounidense número 4.977.082). Para una evaluación de receptores de Fc, véase Langone (1982) Adv. Immunol. 32:167 y Myhre *et al.* (1984) Basic Concepts of Streptococci and Streptococcal Diseases (Holm & Christensen, eds.) Redbook Ltd., Chertsey, Surrey, Inglaterra.

65

ES 2 283 419 T3

El documento U.S. 5.328.987 describe una secuencia de ADN que codifica para una proteína receptora de Fc de IgA humana. Jonsson *et al* (Euro: J. Biochem. (1994) 220: 819-826) describe una proteína Mig.

La utilidad de las proteínas de unión a FC se ha limitado hasta la fecha a la detección y purificación de anticuerpos. Con respecto a las aplicaciones clínicas, se ha propuesto un método de tratamiento de sangre extracorpóreo de enfermedades autoinmunitarias que emplea proteínas de unión a Fc para eliminar complejos antígeno-anticuerpo (véase por ejemplo Fahnestock, patente estadounidense número 4.954.618). Sin embargo, no se ha descrito ni sugerido previamente su uso en composiciones de vacuna.

Hasta ahora, no se ha estudiado la capacidad protectora de la proteína Mig de *S. dysgalactiae* frente a la mastitis, ni se ha aislado o caracterizado la proteína Mig de *S. dysgalactiae*.

Sumario de la invención

En consecuencia, la presente invención proporciona proteínas receptoras de Fc y usos de las mismas. En una realización, la invención se refiere a una composición de vacuna que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable y una proteína receptora de Fc. La proteína receptora de Fc se selecciona del grupo que consiste en:

(a) una proteína Mig de *Streptococcus dysgalactiae* que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en las posiciones de aminoácidos 1 a 669, incluidos, de las figuras 1A-1D (SEQ ID NO: 4);

(b) una proteína receptora de Fc que tiene al menos aproximadamente el 70% de identidad de secuencia con (a).

En algunas realizaciones, la composición de vacuna comprende un adyuvante.

Aún en realizaciones adicionales, la invención se refiere a un método de producción de una composición de vacuna. El método comprende las etapas de

(a) proporcionar una proteína receptora de Fc en la que dicha proteína receptora se selecciona del grupo que consiste en: (i) una proteína Mig de *Streptococcus dysgalactiae* que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en las posiciones de aminoácidos 1 a 669, incluidos, de las figuras 1A-1D (SEQ ID NO: 4); y (ii) una proteína receptora de Fc que tiene al menos aproximadamente el 70% de identidad de secuencia con (i), y

(b) combinar dicha proteína con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En otra realización, la invención se refiere al uso de una proteína receptora de Fc en la que dicha proteína receptora de Fc se selecciona del grupo que consiste en (a) una proteína Mig de *Streptococcus dysgalactiae* que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en las posiciones de aminoácidos 1 a 669, incluidos, de las figuras 1A-1D (SEQ ID NO: 4); y (b) una proteína receptora de Fc que tiene al menos aproximadamente el 70% de identidad de secuencia con (a) en la fabricación de un medicamento para evitar una infección bacteriana en un sujeto vertebrado.

En ciertas realizaciones la infección bacteriana es una infección por estreptococos. Adicionalmente, la infección bacteriana puede provocar mastitis.

Aún en otra realización, la invención se refiere al uso de un polinucleótido que comprende una secuencia codificante para una proteína receptora de Fc en el que dicha proteína receptora de Fc se selecciona del grupo que consiste en (a) una proteína Mig de *Streptococcus dysgalactiae* que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en las posiciones de aminoácidos 1 a 669, incluidos, de las figuras 1A-1D (SEQ ID NO: 4); y (b) una proteína receptora de Fc que tiene al menos aproximadamente el 70% de identidad de secuencia con (a) en la fabricación de un medicamento útil para tratar o evitar una infección bacteriana en un sujeto vertebrado.

En ciertas realizaciones, la infección bacteriana es una infección por estreptococos y puede provocar mastitis.

Éstas y otras realizaciones de la presente invención se les ocurrirán fácilmente a los expertos en la técnica en vista de las descripciones en el presente documento.

Breve descripción de las figuras

Las figuras 1A-1D representan la secuencia de polinucleótido que codifica para la proteína Mig de *Streptococcus dysgalactiae*, y la secuencia de aminoácidos deducida de la misma (SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4, respectivamente).

La figura 2 presenta los siguientes resultados para el análisis de estructura de péptidos de la proteína Mig de *S. dysgalactiae*: un diagrama de hidropatía de Kyle-Doolittle ("Hidrofiliidad KD"), ponderada a lo largo de un intervalo de 7; un diagrama de probabilidad de superficie de Emini ("Probabilidad de superficie"); un diagrama de flexibilidad de cadena de Karplus-Schulz ("Flexibilidad"); un diagrama de índice antigénico de Jameson-Wolf, y diagramas de estructura secundaria tanto de Chou-Fasman como de Garnier-Osguthorpe-Robson ("Hélices alfa CF" y "Láminas beta CF", y "Vueltas GOR", "Hélices alfa GOR", "Láminas beta GOR", y "Sitios de glicosilación", respectivamente).

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

La figura 4 compara el cambio en el porcentaje de cuartos de la ubre infectados con *S. dysgalactiae* durante un periodo de 7 días entre tres grupos experimentales: (1) animales control no vacunados; (2) animales vacunados con la proteína Mig; y (3) animales vacunados con GapC, una proteína de unión a plasmina aislada de *S. dysgalactiae* que se evaluó de manera simultánea. La infección se definió como la recuperación de >500 ufc de *S. dysgalactiae* por ml de secreciones de leche.

La figura 5 representa la respuesta inflamatoria observada frente a la infección con *S. dysgalactiae* trazada como recuentos de células somáticas (RCS) medios para cada grupo experimental frente al tiempo en días tras la exposición. En la figura, los diamantes (-◆-) representan cuartos no expuestos, no vacunados, los cuadrados (-■-) representan animales expuestos, no vacunados, los triángulos (-△-) representan animales expuestos, vacunados con Mig, y las x (-X-) representan animales expuestos, vacunados con GapC.

La figura 6 ilustra los recuentos de células somáticas por cuarto mamario el día 1 tras la exposición. En la figura, la barra representa la media para cada grupo. Los cuadrados (-■-) representan animales no vacunados; los triángulos (-△-) representan animales vacunados con GapC, y los triángulos invertidos (-▼-) representan animales vacunados con Mig.

20 Descripción detallada de la invención

A menos que se indique lo contrario, la práctica de la presente invención empleará técnicas convencionales de biología molecular, microbiología, tecnología de ADN recombinante, e inmunología, que están dentro del conocimiento del experto en la técnica. Tales técnicas se explican por completo en la bibliografía. Véase, por ejemplo, Sambrook, Fritsch & Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Vols. I, II y III, Segunda Edición (1989); Perbal, B., *A Practical Guide to Molecular Cloning* (1984); la serie, *Methods In Enzymology* (S. Colowick y N. Kaplan eds., Academic Press, Inc.); y *Handbook of Experimental Immunology*, Vols. I-IV (D. M. Weir y C. C. Blackwell eds., 1986, Blackwell Scientific Publications).

Las siguientes abreviaturas de aminoácidos se usan a lo largo del texto:

Alanina: Ala (A)	Arginina: Arg (R)
Asparagina: Asn (N)	Ácido aspártico: Asp (D)
Cisteína: Cys (C)	Glutamina: Gln (Q)
Ácido glutámico: Glu (E)	Glicina: Gly (G)
Histidina: His (H)	Isoleucina: Ile (I)
Leucina: Leu (L)	Lisina: Lys (K)
Metionina: Met (M)	Fenilalanina: Phe (F)
Prolina: Pro (P)	Serina: Ser (S)
Treonina: Thr (T)	Triptofano: Trp (W)
Tirosina: Tyr (Y)	Valina: Val (V)

1. Definiciones

Al describir la presente invención, se emplearán los siguientes términos, y se pretende que se definan tal como se indica a continuación.

Debe observarse que, tal como se usa en esta memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares “un”, “uno(a)” y “el (la)” incluyen los referentes en plural a menos que el contenido indique claramente lo contrario. Por tanto, por ejemplo, la referencia a “una proteína de unión a Fc de *Streptococcus dysgalactiae*” incluye una mezcla de dos o más de tales proteínas, y similares.

Los términos “proteína receptora de Fc” y “proteína de unión a Fc”, usados de manera intercambiable en el presente documento, representan una proteína bacteriana que puede unirse a moléculas de inmunoglobulina en un sitio distinto al sitio de reconocimiento de antígenos, incluyendo sin limitación la región de Fc de una molécula de inmunoglobulina.

Los términos “proteína Mig” y “proteína Mig receptora de Fc” y “proteína Mig de unión a Fc” (usados de manera intercambiable en el presente documento) o una secuencia de nucleótidos que codifica para la misma, se refiere a una

ES 2 283 419 T3

proteína o una secuencia de nucleótidos, respectivamente, que se deriva de un gen Mig encontrado en una variedad de especies bacterianas, incluyendo, sin limitación, ciertas cepas de estreptococos de grupo A. La secuencia de nucleótidos de un gen Mig de *Streptococcus* representativo de *S. dysgalactiae* (SEQ ID NO: 3), y la correspondiente secuencia de aminoácidos codificada por ese gen (SEQ ID NO: 4), se representan en las figuras 1A-1D. Sin embargo, una proteína Mig tal como se define en el presente documento no se limita a las secuencias representadas ya que se sabe que los subtipos de cada una de estas especies de *Streptococcus* y se producirán variaciones en las proteínas Mig entre ellos.

Un gen Mig representativo derivado de *S. dysgalactiae* se encuentra en el plásmido pAA505Mig.

Además, la proteína derivada o secuencias de nucleótidos no necesitan derivarse físicamente del gen descrito anteriormente, sino que pueden generarse de cualquier otra manera, incluyendo por ejemplo, síntesis química, aislamiento (por ejemplo, de *S. dysgalactiae*) o mediante producción recombinante, basándose en la información proporcionada en el presente documento. Adicionalmente, el término se refiere a proteínas que tienen secuencias de aminoácidos sustancialmente homólogas (tal como se define a continuación) a las secuencias de aminoácidos contiguas codificadas por los genes, que presentan actividad inmunológica y/o de unión a plasmina.

Por tanto, los términos se refieren a secuencias de longitud completa, así como inmunogénicas, truncadas y parciales, y análogos activos y formas precursoras de las proteínas. También se incluyen en el término fragmentos de nucleótido del gen que incluyen al menos aproximadamente 8 pares de bases contiguos, más preferiblemente al menos aproximadamente 10-20 pares de bases contiguos, y lo más preferiblemente al menos aproximadamente de 25 a 50, o más, pares de bases contiguos del gen, o cualquier número entero entre esos valores. Tales fragmentos son útiles como sondas y en métodos de diagnóstico, tratados de manera más completa a continuación.

Los términos también incluyen las formas que tiene, así como que carecen de, una secuencia señal, si la misma está presente, así como las secuencias de ácido nucleico que codifican para la misma. Adicionalmente, el término se refiere a formas de las proteínas Mig que carecen de una región de anclaje a membrana, y secuencias de ácido nucleico que codifican para proteínas con tales delecciones. Tales delecciones pueden ser deseables en sistemas que no proporcionan la secreción de la proteína. Además, pueden o no estar presentes dominios de unión a receptor de Fc de las proteínas. Por tanto, por ejemplo, si la proteína Mig de unión a Fc se usa para purificar inmunoglobulina, generalmente se conservará el dominio de unión a Fc. Si la proteína va a usarse en composiciones de vacuna, estarán presentes epítomos inmunogénicos que pueden o no incluir el dominio de unión a receptor de Fc.

Los términos también incluyen proteínas en forma neutra o en forma de sales de adición de bases o ácidos dependiendo del modo de preparación. Tales sales de adición de ácidos pueden implicar grupos amino libres y las sales básicas pueden formarse con carboxilos libres. Las sales de adición de bases y ácidos farmacéuticamente aceptables se tratan a continuación. Además, las proteínas pueden modificarse mediante combinación con otros materiales biológicos tales como lípidos (tanto los que se producen de manera natural con la molécula como otros lípidos que no destruyen la actividad inmunológica) y sacáridos, o mediante modificación de la cadena lateral, tal como acetilación de grupos amino, fosforilación de cadenas laterales hidroxiladas, oxidación de grupos sulfhidrilo, glicosilación de residuos de aminoácido, así como otras modificaciones de la secuencia primaria codificada.

Por tanto, el término se refiere a delecciones, adiciones y sustituciones en la secuencia, siempre que se conserven las funciones polipeptídicas para producir una respuesta inmunológica tal como se define en el presente documento. Con respecto a esto, las sustituciones particularmente preferidas serán generalmente de naturaleza conservativa, es decir, las sustituciones que tienen lugar dentro de una familia de aminoácidos. Por ejemplo, los aminoácidos se dividen generalmente en cuatro familias: (1) ácidos -- aspartato y glutamato; (2) básicos -- lisina, arginina, histidina; (3) no polares -- alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptofano; y (4) polares no cargados -- glicina, asparagina, glutamina, cisteína, serina, treonina, tirosina. La fenilalanina, triptofano y tirosina se clasifican a veces como aminoácidos aromáticos. Por ejemplo, es razonablemente predecible que una sustitución aislada de leucina con isoleucina o valina, o viceversa; un aspartato con un glutamato o viceversa; una treonina con una serina o viceversa; o una sustitución conservativa similar de un aminoácido con un aminoácido estructuralmente relacionado, no tendrá un efecto principal sobre la actividad biológica. Por tanto, las proteínas que tienen sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos que la molécula de referencia, pero tienen sustituciones menores de aminoácidos que no afectan sustancialmente a la inmunogenicidad y/o afinidad de unión a plasmina de la proteína, están dentro de la definición del polipéptido de referencia.

Por ejemplo, el polipéptido de interés puede incluir hasta aproximadamente 5-10 sustituciones de aminoácidos conservativas o no conservativas, o incluso hasta aproximadamente 15-25 ó 20-50 sustituciones de aminoácidos conservativas o no conservativas, o cualquier número entero entre estos valores, siempre que la función deseada de la molécula permanezca intacta.

De manera similar, las sustituciones que se producen en el dominio de unión transmembrana, si están presentes, y la secuencia señal, si está presente, no afectarán normalmente a la inmunogenicidad. Un experto en la técnica puede determinar fácilmente otras regiones de la molécula de interés que pueden tolerar cambios mediante referencia a los diagramas de estructura de péptido mostrados en la figura 2 y la figura 3 en el presente documento.

El término “proteína Mig de estreptococos” se refiere a una proteína Mig de unión a Fc, tal como se definió anteriormente, derivada de una especie de estreptococos que produce la misma, incluyendo, pero sin limitarse a, *S. dysgalactiae*. Por ejemplo, una “proteína Mig de *S. dysgalactiae*” es una proteína de unión a Fc tal como se definió anteriormente, derivada de *S. dysgalactiae*.

5 Proteínas o polipéptidos “de tipo natural” o “nativos” se refieren a proteínas o polipéptidos aislados de la fuente en la que se producen las proteínas de manera natural. Polipéptidos “recombinantes” se refieren a polipéptidos producidos mediante técnicas de ADN recombinante; es decir, producidos a partir de células transformadas mediante un constructo de ADN exógeno que codifica para el polipéptido deseado. Polipéptidos “sintéticos” son aquellos preparados mediante
10 síntesis química.

Una proteína o polipéptido “aislado” es una molécula de proteína o polipéptido separada y diferenciada del microorganismo completo con el que se encuentra la molécula en la naturaleza; o una proteína o polipéptido desprovisto, total o parcialmente, de una secuencia normalmente asociada con el mismo en la naturaleza; o una secuencia, tal como
15 existe en la naturaleza, pero que tiene secuencias heterólogas (tal como se definen a continuación) en asociación con la misma.

El término “funcionalmente equivalente” se refiere a que la secuencia de aminoácidos de una proteína Mig de unión a Fc es una que provocará una respuesta inmunológica potenciada o sustancialmente equivalente, tal como se definió anteriormente, comparado con la respuesta provocada por una proteína de unión a Fc que tiene identidad con la proteína de unión a Fc de referencia, o una parte inmunogénica de la misma.

El término “epítipo” se refiere al sitio sobre un antígeno o hapteno frente al que responden células B y/o células T específicas. El término también se usa de manera intercambiable con “determinante antigénico” o “sitio de determinante antigénico”. Los anticuerpos que reconocen el mismo epítipo pueden identificarse en un inmunoensayo sencillo que muestra la capacidad de un anticuerpo para bloquear la unión de otro anticuerpo a un antígeno diana.

Los términos proteína o polipéptido “inmunogénico” se refieren a una secuencia de aminoácidos que provoca una respuesta inmunológica tal como se describe a continuación. Una proteína o polipéptido “inmunogénico”, tal como se usa en el presente documento, incluye la secuencia de longitud completa de la proteína receptora de Fc en cuestión, con o sin la secuencia señal, dominio de anclaje a membrana y/o dominio de unión a Fc, análogos de la misma, o fragmentos inmunogénicos de la misma.

Por “fragmento inmunogénico” se hace referencia a un fragmento de una proteína receptora de Fc que incluye uno o más epítopos y por tanto provoca la respuesta inmunológica descrita a continuación. Tales fragmentos pueden identificarse usando varias técnicas de mapeo de epítopos, bien conocidas en la técnica. Véase, por ejemplo, Epitope Mapping Protocols en Methods in Molecular Biology, Vol. 66 (Glenn E. Morris, Ed., 1996) Humana Press, Totowa, Nueva Jersey. Por ejemplo, los epítopos lineales pueden determinarse mediante por ejemplo, síntesis concurrente de grandes números de péptidos sobre soportes sólidos, correspondiendo los péptidos a las partes de la molécula de proteína, y haciendo reaccionar los péptidos con anticuerpos mientras los péptidos todavía están unidos a los soportes. Tales técnicas se conocen en la técnica y se describen en, por ejemplo, la patente estadounidense número 4.708.871; Geysen *et al.* (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:3998-4002; Geysen *et al.* (1986) Molec. Immunol. 23:709-715.

De manera similar, los epítopos conformacionales se identifican fácilmente determinando la conformación espacial de aminoácidos tal como, por ejemplo, mediante cristalografía de rayos x y resonancia magnética nuclear de 2 dimensiones. Véase, por ejemplo, Epitope Mapping Protocols, mencionado anteriormente. Las regiones antigénicas de las proteínas también pueden identificarse usando diagramas de hidropatía y antigenicidad habituales, tales como los calculados usando, por ejemplo, el programa de software Omega versión 1.0 disponible del Oxford Molecular Group. Este programa informático emplea el método de Hopp/Woods, Hopp *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci USA (1981) 78:3824-3828 para determinar perfiles de antigenicidad, y la técnica de Kyte-Doolittle, Kyte *et al.*, J. Mol. Biol. (1982) 157:105-132 para los diagramas de hidropatía. Las figuras 2 y 3 en el presente documento representan perfiles de Kyte-Doolittle para proteínas representativas abarcadas por la invención.

Los fragmentos inmunogénicos, para fines de la presente invención, incluirán normalmente al menos aproximadamente 3 aminoácidos, preferiblemente al menos aproximadamente 5 aminoácidos, más preferiblemente al menos aproximadamente 10-15 aminoácidos, y lo más preferiblemente 25 o más aminoácidos, de la molécula de proteína Mig receptora de Fc original. No hay límite superior crítico para la longitud del fragmento, que puede comprender casi la longitud completa de la secuencia de proteína, o incluso una proteína de fusión que comprende dos o más epítopos de Mig.

Una “composición inmunogénica” es una composición que comprende una molécula antigénica en la que la administración de la composición a un sujeto da como resultado el desarrollo en el sujeto de una respuesta inmunitaria humoral y/o celular frente a la molécula antigénica de interés.

Por “composición de vacuna de subunidad” se hace referencia a una composición que contiene al menos un polipéptido inmunogénico, pero no todos los antígenos, derivado de, u homólogo a, un antígeno de un patógeno de interés. Una composición de este tipo está sustancialmente libre de partículas o células de patógeno intactas, o el lisado de

ES 2 283 419 T3

tales células o partículas. Por tanto, una “composición de vacuna de subunidad” se prepara a partir de polipéptidos inmunogénicos al menos parcialmente purificados (preferiblemente purificados de manera sustancial) a partir del patógeno, o análogos recombinantes de los mismos. Una composición de vacuna de subunidad puede comprender el antígeno de subunidad o antígenos de interés sustancialmente libres de otros antígenos o polipéptidos del patógeno.

Por “farmacéuticamente aceptable” o “farmacológicamente aceptable” se hace referencia a un material que no es biológicamente o de otro modo indeseable, es decir, el material puede administrarse a un individuo en una formulación o composición sin provocar ningún efecto biológico indeseable o interactuar de manera perjudicial con ningún componente de la composición en la que está contenido.

Una “respuesta inmunológica” frente a una composición o vacuna es el desarrollo en el huésped de una respuesta inmunitaria celular y/o mediada por anticuerpos frente a la composición o vacuna de interés. Normalmente, una “respuesta inmunológica” incluye, pero no se limita a, uno o más de los siguientes efectos: la producción de anticuerpos, células B, células T cooperadoras, células T supresoras, y/o células T citotóxicas y/o células T $\gamma\delta$, dirigidas específicamente frente a un antígeno o antígenos incluidos en la composición o vacuna de interés. Preferiblemente, el huésped presentará una respuesta inmunológica o bien terapéutica o bien protectora tal que se potenciará la resistencia de la glándula mamaria frente a una nueva infección y/o se reducirá la gravedad clínica de la enfermedad. Tal protección se demostrará mediante o bien una reducción o bien una falta de síntomas normalmente presentados por un huésped infectado y/o un tiempo de recuperación más rápido.

Por “inmunización con ácido nucleico” se hace referencia a la introducción de una molécula de ácido nucleico que codifica para uno o más antígenos seleccionados en una célula huésped, para la expresión *in vivo* de un antígeno, antígenos, un epítipo, o epítipos. La molécula de ácido nucleico puede introducirse directamente en un sujeto receptor, tal como mediante inyección, inhalación, administración oral, intranasal y mucosa, o similar, o puede introducirse *ex vivo*, en células que se han extraído del huésped. En este último caso, las células transformadas vuelven a introducirse en el sujeto en el que puede montarse una respuesta inmunitaria frente al antígeno codificado por la molécula de ácido nucleico.

El término “tratamiento” tal como se usa en el presente documento se refiere o bien a (1) la prevención de una infección o nueva infección (profilaxis), o bien a (2) la reducción o eliminación de síntomas de la enfermedad de interés (terapia).

Por “mastitis” se hace referencia a una inflamación de la glándula mamaria en mamíferos, incluyendo en vacas, ovejas, cabras, cerdas, yeguas, y similares, provocada por la presencia de *S. uberis*. La infección se manifiesta mediante la infiltración de células fagocíticas en la glándula. Generalmente, se reconocen 4 tipos clínicos de mastitis: (1) muy aguda, asociada con hinchazón, calor, dolor, y secreción anómala en la glándula y acompañada por fiebre y otros signos de alteración sistémica, tales como depresión marcada, pulso rápido y débil, ojos hundidos, debilidad y anorexia completa; (2) aguda, con cambios en la glándula similares a los anteriores pero en la que la fiebre, anorexia y depresión son de leves a moderadas; (3) subaguda, en la que no se presentan cambios sistémicos y los cambios en la glándula y su secreción son menos marcados; y (4) subclínica, en la que la reacción inflamatoria sólo puede detectarse mediante pruebas habituales para detectar mastitis.

Las pruebas habituales para la detección de mastitis incluyen, pero no se limitan a, la prueba de mastitis de California, la prueba de mastitis de Wisconsin, la prueba de Nagase, el recuento de células electrónico y recuentos de células somáticas usados para detectar un contenido de glóbulos blancos persistentemente alto en la leche. En general, un recuento de células somáticas de aproximadamente 300.000 a aproximadamente 500.000 células por ml o superior, en la leche indicará la presencia de la infección. Por tanto, se considera que una vacuna es eficaz en el tratamiento y/o prevención de la mastitis cuando, por ejemplo, el recuento de células somáticas en la leche se mantiene por debajo de aproximadamente 500.000 células por ml. Para una evaluación de la mastitis y los diagnósticos de la misma, véase, por ejemplo, *The Merck Veterinary Manual: A Handbook of Diagnosis, Therapy, and Disease Prevention and Control for the Veterinarian*, Merck y Co., Rahway, Nueva Jersey, 1991.

Por los términos “vertebrado”, “sujeto”, y “sujeto vertebrado” se hace referencia a cualquier miembro del subfilo *Chordata*, incluyendo, sin limitación, mamíferos tales como ganado vacuno, ovejas, cerdos, cabras, caballos y seres humanos; y animales domésticos tales como perros y gatos; y aves, incluyendo aves domésticas, salvajes y de caza tales como gallos y gallinas incluyendo pollos, pavos y otras aves gallináceas; y peces. El término no se refiere a una edad en particular. Por tanto, se pretende que se cubran tanto animales adultos como neonatos, así como fetos.

Una molécula de “ácido nucleico” puede incluir, pero no se limita a, secuencias procariotas, ARNm eucariota, ADNc a partir de ARNm eucariota, secuencias de ADN genómico a partir de ADN eucariota (por ejemplo, de mamífero), e incluso secuencias de ADN sintético. El término también engloba secuencias que incluyen cualquiera de los análogos de bases de ADN y ARN.

Una molécula de ácido nucleico “aislada” es una molécula de ácido nucleico separada y diferenciada del organismo completo con el que se encuentra la molécula en la naturaleza; o una molécula de ácido nucleico desprovista, total o parcialmente, de secuencias normalmente asociadas con la misma en la naturaleza; o una secuencia, tal como existe en la naturaleza, pero que tiene secuencias heterólogas (tal como se definen a continuación) en asociación con la misma. El término “aislado” en el contexto de un polinucleótido se refiere a que el polinucleótido está aislado del

ES 2 283 419 T3

cromosoma con el que está normalmente asociado, y está aislado de la secuencia genómica completa en la que se produce normalmente.

5 “Polinucleótido purificado” se refiere a un polinucleótido de interés o fragmento del mismo que está esencialmente libre, por ejemplo, contiene menos de aproximadamente el 50%, preferiblemente menos de aproximadamente el 70%, y más preferiblemente menos de aproximadamente el 90%, de la proteína con la que el polinucleótido se asocia de manera natural. Las técnicas para purificar polinucleótidos de interés se conocen bien en la técnica e incluyen, por ejemplo, rotura de la célula que contiene el polinucleótido con un agente caotrópico y separación del/de los polinucleótido(s) y proteínas mediante cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de afinidad y sedimentación
10 según la densidad.

Una “secuencia codificante” o una “secuencia de nucleótidos que codifica para” una proteína particular, es una secuencia de nucleótidos que se transcribe y traduce en un polipéptido *in vitro* o *in vivo* cuando se coloca bajo el control de elementos reguladores apropiados. Los límites de la secuencia codificante se determinan por un codón de inicio en el extremo terminal en 5' (amino) y un codón de detención de la traducción en el extremo terminal en 3' (carboxilo). Una secuencia codificante puede incluir, pero no se limita a, secuencias procariotas, ADNc de ARNm eucariota, secuencias de ADN genómico de ADN eucariota (por ejemplo, de mamíferos), e incluso secuencias de ADN sintético. Una secuencia de terminación de la traducción estará normalmente ubicada en sentido 3' con respecto a la secuencia codificante. Una secuencia “complementaria” es una en la que la base de nitrógeno en una posición de nucleótido dada, es el complemento de la base de nitrógeno que aparece en la misma posición en la secuencia de referencia. Para ilustrarlo, el complemento de adenosina es tirosina, y viceversa; de manera similar, la citosina es complementaria a la guanina, y viceversa; por tanto, el complemento de la secuencia de referencia 5'-ATGCTGA-3' será 5'-TACGACT-3'.

25 Una secuencia “de tipo natural” o “nativa”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a secuencias codificantes de polipéptido que son esencialmente tal como se encuentran en la naturaleza, por ejemplo, las secuencias codificantes de proteína Mig de *S. dysgalactiae* representadas en las figuras 1A-1D (SEQ ID NO: 4).

“Recombinante” tal como se usa en el presente documento para describir una molécula de ácido nucleico se refiere a un polinucleótido de origen genómico, de ADNc, semisintético o sintético que, debido a su origen o manipulación: (1) no está asociado con todo o una parte del polinucleótido con el que está asociado en la naturaleza; y/o (2) está unido a un polinucleótido distinto del que está unido en la naturaleza. El término “recombinante” tal como se usa con respecto a una proteína o polipéptido se refiere a un polipéptido producido mediante expresión de un polinucleótido recombinante. “Células huésped recombinantes”, “células huésped”, “células”, “líneas celulares”, “cultivos celulares” y otros términos de este tipo que representan microorganismos procariotas o líneas celulares eucariotas cultivadas como entidades unicelulares, se usan de manera intercambiable, y se refieren a células que pueden usarse, o se han usado, como receptores para vectores recombinantes u otro ADN de transferencia, e incluyen la progenie de la célula original que se infectó. Se entiende que la progenie de una única célula madre puede no ser necesariamente idéntica de manera completa en morfología o en complemento de ADN total o genómico a la madre original, debido a la mutación accidental o deliberada. La progenie de la célula madre que es lo suficientemente similar a la madre como para caracterizarse mediante la propiedad relevante, tal como la presencia de una secuencia de nucleótidos que codifica para un péptido deseado, se incluye en la progenie a la que hace referencia esta definición, y está cubierta por los términos anteriores.

45 “Homología” se refiere a la identidad porcentual entre dos restos de polinucleótido o dos de polipéptido. Dos secuencias de ADN, o dos de polipéptido son “sustancialmente homólogas” entre sí cuando las secuencias muestran al menos aproximadamente el 80%-85%, preferiblemente al menos aproximadamente el 90%, y lo más preferiblemente al menos aproximadamente el 95%-98% de identidad de secuencia a lo largo de una longitud definida de las moléculas. Tal como se usa en el presente documento, sustancialmente homólogo también se refiere a secuencias que muestran identidad completa con respecto a la secuencia de ADN o polipéptido especificada.

En general, “identidad” se refiere a una correspondencia idéntica nucleótido a nucleótido o aminoácido a aminoácido de dos polinucleótidos o secuencias de polipéptido, respectivamente. La identidad porcentual puede determinarse mediante comparación directa de la información de secuencia entre dos moléculas alineando las secuencias, contando el número exacto de correspondencias entre las dos secuencias alineadas, dividiendo entre la longitud de la secuencia más corta, y multiplicando el resultado por 100. Pueden usarse programas informáticos fácilmente disponibles para ayudar en el análisis, tales como ALIGN, Dayhoff, M. O. en Atlas of Protein Sequence and Structure M. O. Dayhoff ed., 5 Suppl. 3:353-358, National biomedical Research Foundation, Washington, DC, que adapta el algoritmo de homología local de Smith y Waterman (1981) *Advances in Appl. Math.* 2:482-489 para el análisis de péptidos. Hay programas para determinar la identidad de secuencia de nucleótidos disponibles en el paquete de análisis de secuencias de Wisconsin, Versión 8 (disponible de Genetics Computer Group, Madison, WI) por ejemplo, los programas BESTFIT, FASTA y GAP, que también se basan en el algoritmo de Smith y Waterman. Estos programas se utilizan fácilmente con los parámetros por defecto recomendados por el fabricante y descritos en el paquete de análisis de secuencias de Wisconsin al que se hizo referencia anteriormente. Por ejemplo, la identidad porcentual de una secuencia de nucleótidos particular con respecto a una secuencia de referencia puede determinarse usando el algoritmo de homología de Smith y Waterman con una tabla de puntuación por defecto y penalización de hueco de seis posiciones de nucleótidos.

Otro método de establecer la identidad porcentual en el contexto de la presente invención es el uso del paquete de programas MPSRCH con derechos de autor de la Universidad de Edimburgo, desarrollado por John F. Collins y Shane S. Sturrok, y distribuido por IntelliGenetics, Inc. (Mountain View, CA). A partir de esta serie de paquetes puede emplearse el algoritmo de Smith-Waterman en el que los parámetros por defecto se usan para la tabla de puntuación (por ejemplo, penalizaciones por apertura de hueco de 12, penalización por extensión de hueco de uno, y un hueco de seis). A partir de los datos generados el valor “Match” (“correspondencia”) refleja la “identidad de secuencia”. Otros programas adecuados para calcular la identidad porcentual o similitud entre secuencias se conocen generalmente en la técnica, por ejemplo, otro programa de alineación es BLAST, usado con los parámetros por defecto. Por ejemplo, pueden usarse BLASTN y BLASTP usando los siguientes parámetros por defecto: código genético = normal; filtro = ninguno; cadena = ambas; punto de corte = 60; esperado = 10; matriz = BLOSUM62; descripciones = 50 secuencias; ordenar por = alta puntuación; bases de datos = no redundantes, GenBank + EMBL + DDBJ + PDB + traducciones de CDS de GenBank + Swiss Protein + Spupdate + PIR. Pueden encontrarse detalles de estos programas en la siguiente dirección de internet: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>.

Alternativamente, puede determinarse la homología mediante hibridación de polinucleótidos en condiciones que forman dúplex estables entre regiones homólogas, seguido por digestión con nucleasa(s) específica(s) de cadenas sencillas, y determinación de tamaño de los fragmentos digeridos. Las secuencias de ADN que son sustancialmente homólogas pueden identificarse en un experimento de hibridación tipo Southern, por ejemplo, en condiciones rigurosas, tal como se define para ese sistema particular. La definición de condiciones de hibridación apropiadas está dentro del conocimiento del experto en la técnica. Véase, por ejemplo, Sambrook *et al.*, mencionado anteriormente; DNA Cloning, mencionado anteriormente; Nucleic Acid Hybridization, mencionado anteriormente.

Por el término “variante degenerada” se hace referencia a un polinucleótido que contiene cambios en la secuencia de ácido nucleico del mismo, que codifica para un polipéptido que tiene la misma secuencia de aminoácidos que el polipéptido codificado por el polinucleótido a partir del cual se deriva la variante degenerada.

En la técnica se conocen bien las técnicas para determinar la “similitud” de secuencias de aminoácidos. En general, “similitud” se refiere a la comparación exacta de aminoácido a aminoácido de dos o más polipéptidos en el lugar apropiado, en el que los aminoácidos son idénticos o presentan propiedades químicas y/o físicas similares tales como carga e hidrofobicidad. Entonces puede determinarse la denominada “similitud porcentual” entre las secuencias de polipéptido comparadas. También se conocen en la técnica las técnicas para determinar la identidad de secuencia de ácido nucleico y de aminoácidos e incluyen determinar la secuencia de nucleótidos del ARNm para ese gen (normalmente mediante un producto intermedio de ADNc) y determinar la secuencia de aminoácidos codificada por la misma, y compararla con una segunda secuencia de aminoácidos. En general, la “identidad” se refiere a una correspondencia exacta de nucleótido a nucleótido o aminoácido a aminoácido de dos polinucleótidos o secuencias de polipéptido, respectivamente.

Una región “heteróloga” de un constructo de ADN es un segmento identificable de ADN dentro de, o unido a, otra molécula de ADN que no se encuentra en asociación con la otra molécula en la naturaleza. Por tanto, cuando la región heteróloga codifica para un gen bacteriano, el gen estará normalmente flanqueado por ADN que no flanquea al gen bacteriano en el genoma de la bacteria fuente. Otro ejemplo de la secuencia codificante heteróloga es un constructo en el que la propia secuencia codificante no se encuentra en la naturaleza (por ejemplo, secuencias sintéticas que tienen codones diferentes del gen nativo). Los acontecimientos de variación alélica o mutaciones que se producen de manera natural no dan lugar a una región heteróloga de ADN, tal como se usa en el presente documento.

Un “vector” es un replicón, tal como un plásmido, fago, o cósmido, al que puede unirse otro segmento de ADN de manera que se provoca la replicación del segmento unido. Un vector puede transferir secuencias de genes a células diana (por ejemplo, vectores de plásmido bacteriano, vectores virales, vectores no virales, vehículos particulados y liposomas).

Normalmente, los términos “constructo vector”, “vector de expresión”, “vector de expresión de genes”, “vector de administración de genes”, “vector de transferencia de genes” y “casete de expresión” se refieren todos a un montaje que puede dirigir la expresión de una secuencia o gen de interés. Por tanto, los términos incluyen vehículos de expresión y clonación, así como vectores virales.

Estos montajes incluyen un promotor que está operativamente unido a las secuencias o gen(es) de interés. También pueden estar presentes otros elementos de control. Los casetes de expresión descritos en el presente documento pueden contenerse dentro de un constructo de plásmido. Además de los componentes del casete de expresión, el constructo de plásmido también puede incluir un origen de replicación bacteriano, uno o más marcadores seleccionables, una señal que permite que el constructo de plásmido exista como ADN de cadenas sencillas (por ejemplo, un origen de replicación M13), un sitio de clonación múltiple, y un origen de replicación “de mamíferos” (por ejemplo, un origen de replicación de SV40 o adenovirus).

“Elementos de control” de ADN se refieren colectivamente a promotores de la transcripción, elementos potenciadores de la transcripción, secuencias de terminación de la transcripción; secuencias de poliadenilación (ubicadas en 3’ con respecto al codón de detención de la traducción), secuencias para la optimización de la iniciación de la traducción (ubicadas en 5’ con respecto a la secuencia codificante), secuencias de terminación de la traducción, dominios reguladores en sentido 5’, sitios de unión a ribosoma y similares, que proporcionan colectivamente la transcripción y

traducción de una secuencia codificante en una célula huésped. Véase por ejemplo, McCaughan *et al.* (1995) PNAS USA 92:5431-5435; Kochetov *et al.* (1998) FEBS Letts. 440:351-355. No todas estas secuencias de control necesitan estar siempre presentes en un vector recombinante siempre que el gen deseado pueda transcribirse y traducirse.

5 “Operativamente unido” se refiere a una disposición de elementos en la que los componentes así descritos están configurados de manera que realizan su función habitual. Por tanto, los elementos de control operativamente unidos a una secuencia codificante pueden realizar la expresión de la secuencia codificante. Los elementos de control no necesitan ser contiguos a la secuencia codificante, siempre que funcionen para dirigir la expresión de la misma. Por tanto, por ejemplo, pueden estar presentes secuencias de intervención no traducidas, pero transcritas, entre un promotor
10 y la secuencia codificante y el promotor todavía puede considerarse “operativamente unido” a la secuencia codificante. De manera similar, los “elementos de control compatibles con la expresión en un sujeto” son aquellos que pueden realizar la expresión de la secuencia codificante en ese sujeto.

15 Un elemento de control, tal como un promotor, “dirige la transcripción” de una secuencia codificante en una célula cuando la ARN polimerasa se unirá al promotor y transcribirá la secuencia codificante dentro de ARNm, que entonces se traduce en el polipéptido codificado por la secuencia codificante.

20 Una “célula huésped” es una célula que se ha transformado, o puede transformarse, mediante una molécula de ácido nucleico exógena.

Una célula se ha “transformado” mediante ADN exógeno cuando tal ADN exógeno se ha introducido dentro de la membrana celular. El ADN exógeno puede o no integrarse (unirse covalentemente) en el ADN cromosómico que constituye el genoma de la célula. En procariotas y levaduras, por ejemplo, el ADN exógeno puede conservarse en un elemento episomal, tal como un plásmido. Con respecto a células eucariotas, una célula transformada de manera
25 estable es una en la que el ADN exógeno se ha integrado en el cromosoma de manera que lo heredan las células hijas mediante replicación del cromosoma. Esta estabilidad se demuestra mediante la capacidad de la célula eucariota para establecer líneas celulares o clones comprendidos por una población de células hijas que contienen el ADN exógeno.

30 Tal como se usa en el presente documento, una “muestra biológica” se refiere a una muestra de tejido o líquido aislada de un sujeto, incluyendo, pero sin limitarse a, por ejemplo, sangre, plasma, suero, materia fecal, orina, médula ósea, bilis, líquido cefalorraquídeo, líquido linfático, muestras de piel, secreciones externas de la piel, vías respiratorias, tracto intestinal y genitourinario, lágrimas, saliva, leche, células sanguíneas, órganos, biopsias y también muestras de constituyentes de cultivo celular *in vitro* incluyendo pero sin limitarse a medio condicionado resultante del crecimiento de células y tejidos en medio de cultivo, por ejemplo, células recombinantes y componentes celulares.

35 Tal como se usa en el presente documento, los términos “etiqueta” y “etiqueta detectable” se refieren a una molécula que puede detectarse, incluyendo, pero sin limitarse a, isótopos radiactivos, componentes fluorescentes, componentes quimioluminiscentes, enzimas, sustratos de enzimas, cofactores de enzimas, inhibidores de enzimas, cromóforos, tintes, iones metálicos, soles metálicos, ligandos (por ejemplo, biotina o haptenos) y similares. El término “componente fluorescente” se refiere a una sustancia o parte de la misma que puede mostrar fluorescencia en el intervalo detectable. Ejemplos particulares de etiquetas que pueden usarse en la invención incluyen fluoresceína, rodamina, dansilo, umbeliferona, Texas red, luminol, NADPH y α - β -galactosidasa.

45 2. Modos de llevar a cabo la invención

Antes de describir la presente invención en detalle, debe entenderse que esta invención no se limita a formulaciones o parámetros de procedimiento particulares ya que, por supuesto, los mismos pueden variar. También debe entenderse que la terminología usada en el presente documento es únicamente para el fin de describir realizaciones particulares de la invención, y no se pretende que sea limitativa.

50 Aunque pueden usarse varios métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento en la práctica de la presente invención, los materiales y métodos preferidos se describen en el presente documento.

55 Resulta central para la presente invención el descubrimiento de que la proteína Mig de unión a Fc aislada de *S. dysgalactiae* puede provocar una respuesta inmunitaria en un sujeto vertebrado. En particular, el gen para la proteína Mig en *S. dysgalactiae* se ha aislado, secuenciado y caracterizado, y se ha deducido la secuencia de aminoácidos codificada por el gen a partir del mismo. La secuencia de ADN completa para el gen *mig* de *S. dysgalactiae* (SEQ ID NO: 3) y la correspondiente secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 4) se muestran en las figuras 1A-1D.

60 Tal como se describe en los ejemplos, el gen *mig* de *S. dysgalactiae* de longitud completa, representado en las posiciones de nucleótido 1-2.010 incluidos, de las figuras 1A-1D, codifica para la proteína Mig de *S. dysgalactiae* de longitud completa de 669 aminoácidos, que incluye una primera región transmembrana de 24 aminoácidos (residuos 15 y 39) y una segunda región transmembrana de 18 aminoácidos de 18 aminoácidos (residuos 646-664). Las regiones transmembrana se determinaron usando el programa TMpred, que predice regiones de expansión de membrana y su orientación. El programa usa un algoritmo basado en el análisis estadístico de TMbase, una base de datos de proteínas transmembrana que se producen en la naturaleza, usando una combinación de varias matrices de peso para la puntuación. Véase Hofmann, K., & Stoffel, W. (1993) Biol. Chem. 347:166.

La Mig de *S. dysgalactiae* tiene un peso molecular previsto de aproximadamente 73 kDa (calculado usando el programa Peptide Sort del paquete GCG Wisconsin, versión 10, proporcionado por el paquete de análisis de secuencia SeqWeb, versión 1.1 del Canadian Bioinformatics Resource). La secuencia de longitud completa incluye un péptido señal.

La figura 2 representa en diagrama los siguientes resultados de análisis estructurales para la proteína Mig de la presente invención: hidropatía de Kyte-Doolittle, ponderada a lo largo de un intervalo de 7; probabilidad de superficie según Emini; flexibilidad de cadena según Karplus-Schulz; índice de antigenicidad según Jameson-Wolf; estructura secundaria según Garnier-Osguthorpe-Robson; estructura secundaria según Chou-Fasman; y sitios de glicosilación previstos. La figura 3 representa en diagrama la estructura secundaria según Chou-Fasman para la proteína Mig de la presente invención. Un experto en la técnica puede usar fácilmente la información presentada en las figuras 2 y 3 para determinar regiones inmunogénicas en la proteína para su uso en composiciones de vacuna.

Pueden proporcionarse proteínas Mig receptoras de Fc, incluyendo sin limitación la proteína Mig de *S. dysgalactiae*, fragmentos inmunogénicos de la misma o proteínas quiméricas que incluye la misma, en composiciones de vacuna de subunidades. Además del uso en composiciones de vacuna, las proteínas o anticuerpos frente a las mismas pueden usarse como reactivos de diagnóstico para detectar la presencia de infección en un sujeto vertebrado. De manera similar, los genes que codifican para las proteínas pueden clonarse y usarse para diseñar sondas para detectar y aislar genes homólogos en otras cepas bacterianas. Por ejemplo, fragmentos que comprenden al menos aproximadamente 15-20 nucleótidos, más preferiblemente al menos aproximadamente 20-50 nucleótidos, y lo más preferiblemente aproximadamente 60-100 nucleótidos, o cualquier número entero entre estos valores, encontrarán uso en estas realizaciones.

Las composiciones de vacuna de la presente invención pueden usarse para tratar o evitar una amplia variedad de infecciones bacterianas en sujetos vertebrados. Por ejemplo, las composiciones de vacuna que incluyen, sin limitación, la proteína Mig receptora de Fc de *S. dysgalactiae*, pueden usarse para tratar infecciones por estreptococos en sujetos vertebrados que se provocan por esta u otras especies. En particular, *S. uberis*, *S. agalactiae*, y *S. dysgalactiae* son patógenos bacterianos comunes asociados con la mastitis en especies bovinas, equinas, ovinas y cabrías. Adicionalmente, se sabe que estreptococos del grupo B, tales como *S. agalactiae*, provocan muchas otras infecciones en vertebrados, incluyendo septicemia, meningitis, bacteriemia, impétigo, artritis, infecciones del tracto urinario, abscesos, abortos espontáneos etc. Por tanto, las composiciones de vacuna que contienen la proteína Mig receptora de Fc encontrarán uso para tratar y/o evitar una amplia variedad de infecciones por estreptococos.

De manera similar, las proteínas de unión a Fc derivadas de otros géneros bacterianos tales como estafilococos encontrarán uso para tratar infecciones bacterianas provocadas por especies que pertenecen a esos géneros. Por tanto, resulta fácilmente evidente que las proteínas de unión a Fc de una variedad de especies bacterianas pueden usarse para tratar y/o evitar una amplia variedad de infecciones bacterianas en numerosas especies animales.

Las proteínas de unión a Fc de estreptococos de la presente invención, incluyendo sin limitación la proteína Mig de unión a Fc, pueden usarse en composiciones de vacuna ya sea solas o en combinación con otros antígenos bacterianos, fúngicos, virales o de protozoos. Estos antígenos pueden proporcionarse por separado o incluso como proteínas de fusión que comprenden uno o más epítomos de una proteína de unión a Fc fusionada a uno o más de estos antígenos. Por ejemplo, otras proteínas inmunogénicas de *S. uberis*, tales como el factor CAMP, cápsula de ácido hialurónico, hialuronidasa, proteína de tipo R y activador de plasminógeno, pueden administrarse con la proteína Mig. Adicionalmente, las proteínas inmunogénicas de otros organismos implicados en la mastitis, tales como de los géneros *Staphylococcus*, *Corynebacterium*, *Pseudomonas*, *Nocardia*, *Clostridium*, *Mycobacterium*, *Mycoplasma*, *Pasteurella*, *Prototheca*, otros estreptococos, bacterias coliformes, así como levaduras, pueden administrarse junto con las proteínas de unión a Fc descritas en el presente documento para proporcionar un amplio espectro de protección. Por tanto, por ejemplo, proteínas inmunogénicas de *Staphylococcus aureus*, *Str. agalactiae*, *Str. dysgalactiae*, *Str. zooepidemicus*, *Corynebacterium pyogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Nocardia asteroides*, *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes* y *Klebsiella spp.* pueden proporcionarse junto con las proteínas de unión a Fc de la presente invención.

Adicionalmente, pueden usarse juntas las proteínas de Fc de diferentes especies de estreptococos en las composiciones de vacuna de la presente invención. En esta realización, las proteínas de Fc múltiples pueden proporcionarse ya sea como proteínas de fusión o como antígenos diferenciados en la misma o diferentes composiciones de vacuna.

Producción de proteínas de unión a Fc

Las proteínas de unión a Fc anteriormente descritas y fragmentos activos, análogos y proteínas quiméricas derivadas de las mismas, pueden producirse mediante una variedad de métodos. Específicamente, las proteínas de unión a Fc pueden aislarse directamente de bacterias que expresan las mismas. Esto se logra generalmente preparando en primer lugar un extracto en bruto que carece de componentes celulares y varias proteínas extrañas. Las proteínas deseadas pueden purificarse entonces adicionalmente a partir de la fracción de lisado celular, por ejemplo, mediante cromatografía en columna, HPLC, técnicas inmunoabsorbentes u otros métodos convencionales bien conocidos en la técnica.

Más particularmente, se han descrito técnicas para aislar proteínas de unión a Fc. Por ejemplo, los métodos de Reis, *et al.* se han usado para aislar un receptor de Fc funcionalmente homogéneo que tiene las propiedades de un receptor de tipo III (Reis *et al.*, (1984) *J. Immunol.* 132:3091).

5 Alternativamente, las proteínas pueden producirse de manera recombinante tal como se describe en el presente documento. Tal como se explicó anteriormente, estos productos recombinantes pueden tomar forma de secuencias de proteínas parciales, secuencias de longitud completa, formas precursoras que incluyen secuencias señal, formas maduras sin señales, o incluso proteínas de fusión (por ejemplo, con una secuencia líder apropiada para el huésped recombinante, o con otra secuencia de antígeno de subunidad para *Streptococcus* u otro patógeno).

10 En una realización de la presente invención, la proteína Mig de *S. dysgalactiae* se purifica a partir de una fracción de lisado celular usando cromatografía de afinidad tras producir de manera recombinante la proteína. Véase el ejemplo 1A-D, a continuación.

15 Pueden construirse bibliotecas de genes y usarse los clones resultantes para transformar una célula huésped apropiada. Pueden combinarse colonias y examinarse para seleccionar clones que tienen actividad de unión a receptor de Fc, es decir, seleccionar clones que pueden unirse a IgG.

20 Alternativamente, una vez que se determinan las secuencias de aminoácidos, pueden prepararse sondas de oligonucleótidos que contienen los codones para una parte de las secuencias de aminoácidos determinadas y usarse para examinar bibliotecas de ADNc o genómico para seleccionar genes que codifican para las proteínas objeto. Las estrategias básicas para preparar sondas de oligonucleótidos y bibliotecas de ADN, así como su examinación mediante hibridación de ácido nucleico, se conocen bien por los expertos en la técnica. Véase, por ejemplo, *DNA Cloning: Vol. II*, mencionado anteriormente; *Nucleic Acid Hybridization*, mencionado anteriormente; *Oligonucleotide Synthesis*, mencionado anteriormente; Sambrook *et al.*, mencionado anteriormente. Una vez que se ha identificado un clon de la biblioteca examinada mediante hibridación positiva, puede confirmarse mediante análisis con enzima de restricción y secuenciación de ADN que el inserto de biblioteca particular contiene un gen de proteína de unión a Fc o un homólogo del mismo. Entonces pueden aislarse adicionalmente los genes usando técnicas habituales y, si se desea, emplearse enfoques de PCR o enzimas de restricción para eliminar partes de la secuencia de longitud completa.

30 De manera similar, pueden aislarse genes directamente de bacterias usando técnicas conocidas, tales como extracción con fenol y manipularse adicionalmente la secuencia para producir cualquier alteración deseada. Véase, por ejemplo, Sambrook *et al.*, mencionado anteriormente, para una descripción de las técnicas usadas para obtener y aislar el ADN.

35 Alternativamente, pueden prepararse sintéticamente secuencias de ADN que codifican para las proteínas de interés en vez de clonarse. Las secuencias de ADN pueden diseñarse con los codones apropiados para la secuencia de aminoácidos particular. En general, se seleccionarán codones preferidos para el huésped previsto si la secuencia se usará para su expresión. La secuencia completa se monta a partir de oligonucleótidos de solapamiento preparados mediante métodos habituales y montados en una secuencia codificante completa. Véase, por ejemplo, Edge (1981) *Nature* 292:756; Nambair *et al.* (1984) *Science* 223:1299; Jay *et al.* (1984) *J. Biol. Chem.* 259:6311.

40 Una vez que se han preparado o aislado las secuencias codificantes para las proteínas deseadas, pueden clonarse en cualquier vector o replicón adecuado. Se conocen varios vectores de clonación por los expertos en la técnica, y la selección de un vector de clonación apropiado es cuestión de elección. Los ejemplos de vectores de ADN recombinante para la clonación y células huésped que pueden transformar incluyen el bacteriófago λ (*E. coli*), pBR322 (*E. coli*), pACYC177 (*E. coli*), pKT230 (bacteria gram-negativa), pGV1106 (bacteria gram-negativa), pLAFR1 (bacteria gram-negativa), pME290 (bacteria gram-negativa distinta de *E. coli*), pHV14 (*E. coli* y *Bacillus subtilis*), pBD9 (*Bacillus*), pIJ61 (*Streptomyces*), pUC6 (*Streptomyces*), YIp5 (*Saccharomyces*), YCp19 (*Saccharomyces*) y virus del papiloma bovino (células de mamíferos). Véase, Sambrook *et al.*, mencionado anteriormente; *DNA Cloning*, mencionado anteriormente; B. Perbal, mencionado anteriormente.

45 El gen puede colocarse bajo el control de un promotor, sitio de unión a ribosoma (para la expresión bacteriana) y, opcionalmente, un operador (denominados colectivamente en el presente documento elementos de "control"), de manera que la secuencia de ADN que codifica para la proteína deseada se transcribe en ARN en la célula huésped transformada por un vector que contiene esta construcción de expresión. La secuencia codificante puede o no contener un péptido señal o secuencia líder. Si se incluye una secuencia señal, puede ser o bien la secuencia nativa, homóloga o bien una secuencia heteróloga. Por ejemplo, la secuencia señal para la proteína Mig de *S. dysgalactiae* (residuo de aminoácidos 1 a 39, incluidos) puede usarse para la secreción de la misma, al igual que varias otras secuencias señal, bien conocidas en la técnica. Pueden eliminarse secuencias líder por el huésped en un tratamiento tras la traducción. Véase, por ejemplo, las patentes estadounidenses números 4.431.739; 4.425.437; 4.338.397.

50 También pueden ser deseables otras secuencias reguladoras que permiten la regulación de la expresión de las secuencias de proteínas relacionadas con el crecimiento de la célula huésped. Las secuencias reguladoras se conocen por los expertos en la técnica, y ejemplos incluyen aquellas que provocan que se active o inactive la expresión de un gen en respuesta a un estímulo químico o físico, incluyendo la presencia de un compuesto regulador. También pueden estar presentes otros tipos de elementos reguladores en el vector, por ejemplo, secuencias potenciadoras.

Las secuencias de control y otras secuencias reguladoras pueden unirse a la secuencia codificante antes de la inserción en un vector, tal como los vectores de clonación descritos anteriormente. Alternativamente, la secuencia codificante puede clonarse directamente en un vector de expresión que ya contiene las secuencias de control y un sitio de restricción apropiado.

En algunos casos puede ser necesario modificar la secuencia codificante de manera que pueda unirse a las secuencias de control con la orientación apropiada; es decir, para mantener el marco de lectura apropiado. También puede ser deseable producir mutantes o análogos de la proteína de unión a Fc. Pueden prepararse mutantes o análogos mediante la delección de una parte de la secuencia que codifica para la proteína, mediante inserción de una secuencia, y/o mediante sustitución de uno o más nucleótidos dentro de la secuencia. Se describen técnicas para modificar secuencias de nucleótidos, tales como mutagénesis dirigidas al sitio, en, por ejemplo, Sambrook *et al.*, mencionado anteriormente; DNA Cloning, mencionado anteriormente; Nucleic Acid Hybridization, mencionado anteriormente.

Entonces se usa el vector de expresión para transformar una célula huésped apropiada. Se conocen varias líneas celulares de mamíferos en la técnica e incluyen líneas celulares inmortalizadas disponibles de la Colección Americana de Cultivos Tipo (American Type Culture Collection - ATCC), tales como, pero sin limitarse a, células de ovario de hámster chino (CHO), células HeLa, células de riñón de cría de hámster (BHK), células de riñón de mono (COS), células de carcinoma hepatocelular humano (por ejemplo, Hep G2), células de riñón bovino Madin-Darby ("MDBK"), así como otras. De manera similar, huéspedes bacterianos tales como *E. coli*, *Bacillus subtilis*, y *Streptococcus spp.*, encontrarán uso en los presentes constructos de expresión. Huéspedes de levaduras útiles en la presente invención incluyen entre otros, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans*, *Candida maltosa*, *Hansenula polymorpha*, *Kluyveromyces fragilis*, *Kluyveromyces lactis*, *Pichia guilliermondii*, *Pichia pastoris*, *Schizosaccharomyces pombe* y *Yarrowia lipolytica*. Células de insectos para su uso con vectores de expresión de baculovirus incluyen, entre otros, *Aedes aegypti*, *Autographa californica*, *Bombyx mori*, *Drosophila melanogaster*, *Spodoptera frugiperda*, y *Trichoplusia ni*.

Dependiendo del sistema de expresión y el huésped seleccionados, las proteínas de la presente invención se producen cultivando células huésped transformadas por un vector de expresión descrito anteriormente en condiciones en las que se expresa la proteína de interés. Entonces se aísla la proteína de las células huésped y se purifica. Si el sistema de expresión segrega la proteína en el medio de cultivo, la proteína puede purificarse directamente del medio. Si la proteína no se segrega, se aísla de lisados celulares. La selección de las condiciones de crecimiento apropiadas y métodos de recuperación está dentro del conocimiento del experto en la técnica.

Las proteínas de la presente invención también pueden producirse mediante síntesis química tal como síntesis de péptidos en fase sólida, usando secuencias de aminoácidos conocidas o secuencias de aminoácidos derivadas de la secuencia de ADN de los genes de interés. Tales métodos se conocen por los expertos en la técnica. Véase, por ejemplo, J. M. Stewart y J. D. Young, Solid Phase Peptide Synthesis, 2ª Ed., Pierce Chemical Co., Rockford, IL (1984) y G. Barany y R. B. Merrifield, The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology, editors E. Gross y J. Meienhofer, Vol. 2, Academic Press, Nueva York, (1980), págs. 3-254, para técnicas de síntesis de péptidos en fase sólida; y M. Bodansky, Principles of Peptide Synthesis, Springer-Verlag, Berlin(1984) y E. Gross y J. Meienhofer, Eds., The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology, mencionado anteriormente, Vol. 1, para la síntesis clásica en disolución. La síntesis química de péptidos puede ser preferible si un pequeño fragmento del antígeno en cuestión puede hacer surgir una respuesta inmunológica en el sujeto de interés.

Las proteínas de unión a Fc de la presente invención, o sus fragmentos, pueden usarse para producir anticuerpos, tanto policlonales como monoclonales. Si se desean anticuerpos policlonales, se inmuniza un mamífero seleccionado (por ejemplo, ratón, conejo, cabra, caballo, etc.) con un antígeno de la presente invención, o su fragmento, o un antígeno mutado. Se recoge suero del animal inmunizado y se trata según procedimientos conocidos. Véase, por ejemplo, Jurgens *et al.* (1985) J. Chrom. 348:363-370. Si se usa suero que contiene anticuerpos policlonales, pueden purificarse los anticuerpos policlonales mediante cromatografía de inmunoafinidad, usando procedimientos conocidos.

Anticuerpos monoclonales frente a la proteína Mig y frente a los fragmentos de la misma, también pueden producirse fácilmente por un experto en la técnica. La metodología general para preparar anticuerpos monoclonales usando tecnología del hibridoma se conoce bien. Pueden crearse líneas celulares que producen anticuerpos inmortales mediante fusión celular, y también mediante otras técnicas tales como la transformación directa de linfocitos B con ADN oncogénico, o transfección con virus Epstein-Barr. Véase, por ejemplo, M. Schreier *et al.*, Hybridoma Techniques (1980); Hammerling *et al.*, Monoclonal Antibodies and T-cell Hybridomas (1981); Kennett *et al.*, Anticuerpos monoclonales (1980); véanse también las patentes estadounidenses números 4.341.761; 4.399.121; 4.427.783; 4.444.887; 4.452.570; 4.466.917; 4.472.500. 4.491.632; y 4.493.890. Pueden examinarse paneles de anticuerpos monoclonales producidos frente a la proteína Mig, o fragmentos de la misma, para detectar diversas propiedades; es decir, para detectar isótopos, epítomos, afinidad, etc. Los anticuerpos monoclonales son útiles en la purificación, usando técnicas de inmunoafinidad, de los antígenos individuales frente a los que se dirigen. También pueden usarse anticuerpos tanto policlonales como monoclonales para la inmunización pasiva o pueden combinarse con preparaciones de vacuna de subunidad para potenciar la respuesta inmunitaria. Los anticuerpos policlonales y monoclonales también son útiles para fines de diagnóstico.

ES 2 283 419 T3

Formulaciones de vacuna y administración

Las proteínas de unión a Fc de la presente invención pueden formularse en composiciones de vacuna, ya sea solas o en combinación con otros antígenos, para su uso para inmunizar sujetos tal como se describe a continuación. Métodos de preparación de tales formulaciones se describen, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania, 18ª Edición, 1990. Normalmente, las vacunas de la presente invención se preparan como preparaciones inyectables, ya sea como suspensiones o como disoluciones líquidas. También pueden prepararse formas sólidas adecuadas para su disolución o suspensión en vehículos líquidos antes de la inyección. La preparación también puede emulsionarse o puede encapsularse el principio activo en vehículos de liposomas. El principio inmunogénico activo se mezcla generalmente con un vehículo farmacéutico compatible, tal como, por ejemplo, agua, solución salina, dextrosa, glicerol, etanol, o similares, y combinaciones de los mismos. Además, si se desea, el vehículo puede contener cantidades menores de sustancias auxiliares tales como agentes de humectación o emulsificación y agentes tamponantes del pH.

También pueden añadirse adyuvantes que potencian la eficacia de la vacuna a la formulación. Los adyuvantes pueden incluir, por ejemplo, dipéptidos de muramilo, avridina, hidróxido de aluminio, bromuro de dimetildioctadecilamonio (DDA), aceites, emulsiones de aceite en agua, saponinas, citocinas, y otras sustancias conocidas en la técnica.

La proteína Mig puede unirse a un vehículo con el fin de aumentar la inmunogenicidad de la misma. Vehículos adecuados incluyen macromoléculas grandes, lentamente metabolizadas, tales como proteínas, incluyendo albúminas séricas, hemocianina de lapa californiana, moléculas de inmunoglobulina, tiroglobulina, ovalbúmina, y otras bien conocidas por los expertos en la técnica; polisacáridos, tales como sepharose, agarosa, celulosa, perlas de celulosa y similares; aminoácidos poliméricos tales como ácido poliglútamico, polilisina, y similares; copolímeros de aminoácidos; y partículas de virus inactivas.

Las proteínas de unión a Fc de la presente invención pueden usarse o bien en su forma nativa o bien su contenido en grupos funcionales puede modificarse, por ejemplo, mediante succinilación de residuos de lisina o reacción con cis-tiolactona. También puede incorporarse un grupo sulfhidrilo en el vehículo (o antígeno), por ejemplo, mediante reacción de funciones amino con 2-iminotiolano o el éster de N-hidroxisuccinimida de 3-(4-ditiopiridil-propionato). También pueden modificarse vehículos adecuados para incorporar un brazo espaciador (tal como hexametildiamina u otras moléculas bifuncionales de tamaño similar) para la unión de péptidos.

Otros vehículos adecuados para las proteínas de unión a Fc de la presente invención incluyen polipéptidos VP6 de rotavirus, o fragmentos funcionales de los mismos, tal como se describe en la patente estadounidense número 5.071.651. También es útil un producto de fusión de una proteína viral y los inmunógenos objeto preparados por métodos descritos en la patente estadounidense número 4.722.840. Todavía otros vehículos adecuados incluyen células, tales como linfocitos, ya que la presentación en esta forma imita el modo natural de presentación en el sujeto, que da lugar al estado inmunizado. Alternativamente, las proteínas de la presente invención pueden acoplarse con eritrocitos, preferiblemente los propios eritrocitos del sujeto. Métodos para acoplar péptidos a proteínas o células se conocen por los expertos en la técnica.

Además, las proteínas de unión a Fc (o complejos de las mismas) pueden formularse en composiciones de vacuna o bien en forma neutra o bien de sal. Sales farmacéuticamente aceptables incluyen las sales de adición de ácido (formadas con los grupos amino libres de los polipéptidos activos) y que se forman con ácidos inorgánicos tales como, por ejemplo, ácidos clorhídrico o fosfórico, o ácidos orgánicos tales como acético, oxálico, tartárico, mandélico y similares. También pueden derivarse sales formadas a partir de grupos carboxilo libres a partir de bases inorgánicas tales como, por ejemplo, hidróxidos de sodio, de potasio, de amonio, de calcio o férrico, y bases orgánicas tales como isopropilamina, trimetilamina, 2-etilamino-etanol, histidina, procaína, y similares.

Las formulaciones de vacuna contendrán una "cantidad terapéuticamente eficaz" del principio activo, es decir, una cantidad que puede provocar una respuesta inmunitaria en un sujeto al que se administra la composición. En el tratamiento y prevención de la mastitis, por ejemplo, una "cantidad terapéuticamente eficaz" sería preferiblemente una cantidad que potencia la resistencia de la glándula mamaria frente a una nueva infección y/o reduce la gravedad clínica de la enfermedad. Tal protección se demostrará o bien mediante reducción o bien mediante falta de síntomas normalmente presentados por un huésped infectado, un tiempo de recuperación más rápido y/o una disminución de recuento de células somáticas en la leche del cuarto infectado. Por ejemplo, la capacidad de la composición para mantener o reducir el recuento de células somáticas (RCS) en la leche por debajo de aproximadamente 500.000 células por ml, valor umbral fijado por la International Dairy Federation (Federación lechera internacional), por encima del cual se considera que los animales tienen mastitis clínica, será indicativa del efecto terapéutico.

La cantidad exacta se determina fácilmente por un experto en la técnica usando pruebas habituales. La concentración de proteína de unión a Fc oscilará normalmente desde aproximadamente el 1% hasta aproximadamente el 95% (p/p) de la composición, o incluso superior o inferior si es apropiado. Con las presentes formulaciones de vacuna, de 5 a 500 µg de principio activo por ml de disolución inyectada deben ser adecuados para provocar una respuesta inmunitaria cuando se administra una dosis de 1 a 3 ml por animal.

Para inmunizar a un sujeto, generalmente se administra la vacuna por vía parenteral, normalmente mediante inyección intramuscular. Sin embargo, también son aceptables otros modos de administración tales como inyección

subcutánea, intraperitoneal e intravenosa. La cantidad que debe administrarse depende del animal que esté tratándose, la capacidad del sistema inmunitario del animal para sintetizar anticuerpos, y el grado de protección deseado. Pueden establecerse fácilmente dosificaciones eficaces por un experto en la técnica mediante ensayos rutinarios que establezcan curvas de dosis-respuesta. Se inmuniza al sujeto mediante administración de la vacuna en al menos una dosis, y preferiblemente dos dosis. Además, se pueden administrar al animal tantas dosis como se requieran para mantener un estado de inmunidad frente a la infección.

Formulaciones de vacuna adicionales que son adecuadas para otros modos de administración incluyen supositorios y, en algunos casos, formulaciones de aerosol, intranasales, orales, y formulaciones de liberación sostenida. Para los supositorios, la composición de vehículo incluirá vehículos y aglutinantes tradicionales, tales como, glicoles polialcalinos, o triglicéridos. Tales supositorios pueden formarse a partir de mezclas que contienen el principio activo en el intervalo de aproximadamente el 0,5% a aproximadamente el 10% (p/p), de manera preferible aproximadamente del 1% a aproximadamente el 2%. Los vehículos orales incluyen excipientes normalmente empleados tales como, por ejemplo, calidades farmacéuticas de manitol, lactosa, almidón, magnesio, estearato, sacarínacelulosa de sodio, carbonato de magnesio, y similares. Estas composiciones de vacuna orales pueden tomarse en forma de disoluciones, suspensiones, comprimidos, pastillas, cápsulas, formulaciones de liberación sostenida, o polvo, y contienen desde aproximadamente el 10% hasta aproximadamente el 95% del principio activo, de manera preferible aproximadamente del 25% a aproximadamente el 70%.

Las formulaciones intranasales incluirán normalmente vehículos que ni provocan irritación a la mucosa nasal ni alteran significativamente la función de cilios. Pueden emplearse diluyentes tales como agua, solución salina acuosa u otras sustancias conocidas con la invención objeto. Las formulaciones nasales también pueden contener conservantes tales como, pero sin limitarse a, clorobutanol y cloruro de benzalconio. Un tensioactivo puede estar presente para potenciar la absorción de las proteínas objeto por la mucosa nasal.

Las formulaciones de liberación controlada o sostenida se preparan incorporando la proteína en excipientes o vehículos tales como liposomas, polímeros impermeables no reabsorbibles tales como copolímeros de acetato de etilvinilo y copolímeros de Hytrel®, polímeros hinchables tales como hidrogeles, o polímeros reabsorbibles tales como colágeno y ciertos poliácidos o poliésteres tales como los usados para preparar suturas reabsorbibles. Las proteínas de unión a Fc también pueden administrarse usando mini-bombas implantadas, bien conocidas en la técnica.

Las proteínas de unión a Fc de la presente invención también pueden administrarse mediante un virus vehículo que expresa las mismas. Los virus vehículo que encontrarán uso con la presente invención incluyen, pero no se limitan a, los virus vaccinia y otros virus de la viruela, adenovirus, y virus del herpes. A modo de ejemplo, pueden construirse recombinantes del virus vaccinia que expresan proteínas novedosas tal como sigue. El ADN que codifica para la proteína particular se inserta en primer lugar en un vector apropiado de manera que esté adyacente a un promotor de vaccinia y a secuencias de ADN de vaccinia flanqueantes, tales como la secuencia que codifica para timidina cinasa (TK). Entonces se usa este vector para transfectar células que se infectan simultáneamente con virus vaccinia. La recombinación homóloga sirve para insertar el promotor de vaccinia más el gen que codifica para la presente proteína en el genoma viral. El recombinante de TK resultante puede seleccionarse cultivando las células en presencia de 5-bromodesoxiuridina y seleccionando placas virales resistentes a la misma.

Una vía de administración alternativa implica la terapia génica o inmunización con ácido nucleico. Por tanto, pueden administrarse directamente secuencias de nucleótido (y elementos reguladores adjuntos) que codifican para las proteínas de unión a Fc objeto a un sujeto para la traducción *in vivo* de las mismas. Alternativamente, puede lograrse la transferencia de genes transfectando las células o tejidos del sujeto *ex vivo* y reintroduciendo el material transformado en el huésped. El ADN puede introducirse directamente en el organismo huésped, es decir, mediante inyección (véase la publicación internacional número WO/90/11092; y Wolff *et al.* (1990) *Science* 247:1465-1468). También puede lograrse la transferencia de genes mediada por liposomas usando métodos conocidos. Véase, por ejemplo, Hazinski *et al.* (1991) *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 4:206-209; Brigham *et al.* (1989) *Am. J. Med. Sci.* 298:278-281; Canonico *et al.* (1991) *Clin. Res.* 39:219A; y Nabel *et al.* (1990) *Science* 249:1285-1288. Los agentes de selección como diana, tales como anticuerpos dirigidos frente a antígenos de superficie expresados sobre tipos celulares específicos, pueden conjugarse covalentemente con la superficie liposomal de manera que el ácido nucleico puede administrarse a tejidos y células específicos sensibles a la infección.

Depósitos de cepas útiles para poner en práctica la invención

Se realizó un depósito de cultivos biológicamente puros de las siguientes cepas en la Colección Americana de Cultivos Tipo, 10801 University Boulevard, Manassas. El número de registro indicado se asignó tras pruebas de viabilidad satisfactorias, y las tasas requeridas se pagaron según las condiciones del Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos a los Fines del Procedimiento en Materia de Patentes y los Reglamentos en el mismo (Tratado de Budapest). Esto garantiza el mantenimiento de cultivos viables durante un periodo de treinta (30) años desde la fecha de depósito. Los microorganismos estarán disponibles por la ATCC según los términos del tratado de Budapest, que garantiza la disponibilidad permanente y sin restricciones de la prole a quien a quien el U.S. Commissioner of Patents and Trademarks (Comisario de patentes y marcas de los EE.UU.) determine autorizado a lo mismo según la norma 35 U.S.C. (United States Code - Código de los Estados Unidos) párrafo 122 y las normas del comisario siguientes (incluyendo 37 C.F.R. (Code of Federal Regulations - Código de

ES 2 283 419 T3

Reglamento Federal) párrafo 1.12 con referencia particular a 886 OG 638). Al conceder una patente, se eliminarán irrevocablemente todas las limitaciones sobre la disponibilidad al público de los cultivos depositados.

Estos depósitos se proporcionan simplemente como conveniencia para los expertos en la técnica, y no son un reconocimiento de que se requiera un depósito según 35 U.S.C. § 112.

Cepa bacteriana	Plásmido	Gen	Fecha de depósito	Nº ATCC
DH5 α	pAA505Mig	gen <i>mig</i> de <i>S. dysgalactiae</i>	31 de mayo del 2000	PTA-1977

Experimentos

A continuación hay ejemplos de realizaciones específicas para llevar a cabo la presente invención. Los ejemplos se ofrecen únicamente para fines ilustrativos, y no se pretende que limiten el alcance de la presente invención de ninguna manera.

Se han realizado esfuerzos para garantizar la precisión con respecto a los números usados (por ejemplo, cantidades, temperaturas, etc.), pero por supuesto, debe permitirse alguna desviación y error experimental.

A menos que se indique lo contrario, las partes son partes en peso, el peso molecular es el peso molecular promedio en peso, la temperatura está en grados centígrados, y la presión es, o está próxima a, la atmosférica.

Materiales y métodos

Se compraron enzimas de fuentes comerciales, y se usaron según las instrucciones del fabricante.

En el aislamiento de fragmentos de ADN, excepto cuando se indique, todas las manipulaciones del ADN se realizaron según procedimientos habituales. Véase, Sambrook *et al.*, mencionado anteriormente. Pueden comprarse enzimas de restricción, ADN ligasa de T4, *E. coli*, ADN polimerasa I, fragmento Klenow, y otros reactivos biológicos de proveedores comerciales y usarse según las instrucciones del fabricante. Se separaron fragmentos de ADN de cadena doble sobre geles de agarosa.

Ejemplo 1

Preparación, amplificación, secuenciación, expresión, purificación y caracterización de la proteína Mig receptora de Fc de S. dysgalactiae

A. Preparación de ADN cromosómico de *S. dysgalactiae*

Se obtuvo un aislado de *S. dysgalactiae* clínico de un caso de mastitis bovina (número de registro de ATCC 43078) de la Colección Americana de Cultivos Tipo (10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209), y se usó como fuente de ADN. Se hizo crecer de manera rutinaria el microorganismo sobre placas de agar sangre de oveja de TSA (PML Microbiologicals, Mississauga, Ontario) a 37°C durante 18 horas, o en caldo Todd-Hewitt (Oxoid Ltd., Hampshire, Inglaterra) complementado con extracto de levadura al 0,3% (Sigma, St. Louis, Missouri) (THB-YE) a 37°C, CO₂ al 5%.

Se preparó ADN cromosómico a partir de *S. dysgalactiae* que creció en 100 ml de THB-YE complementado con glicina 20 mM durante aproximadamente 6 horas, hasta que se alcanzó una A₆₀₀ de 0,8 a 1,0. Se recogieron las células y volvieron a suspenderse en EDTA 50 mM, Tris-HCl 50 mM, TWEEN 20 al 0,5% (Sigma, St. Louis, MO) y se complementaron con ARNasa A (200 mg/ml), proteinasa K (20 mg/ml), lisozima (100 mg/ml) y mutanolisina (100 mg/ml). (Sigma, St. Louis, Missouri). Tras la lisis bacteriana durante 30 minutos a 37°C con agitación vigorosa, se mezclaron clorhidrato de guanidina y TWEEN-20, pH 5,5, con el lisado para dar una concentración final de 0,8 M y un 5%, respectivamente. Se incubó esta mezcla a 50°C durante 30 minutos. Entonces se purificó el ADN cromosómico usando un kit Genomic-tip 100g de Qiagen (Qiagen, Alemania) y se precipitó usando 0,7 volúmenes de isopropanol. Se lavó el sedimento resultante en etanol al 70% y volvió a suspenderse en 0,5 ml de Tris-HCl 10 mM, pH 8,8.

B. Amplificación y clonación del gen *Mig* de *S. dysgalactiae*

Se amplificó el gen *Mig* mediante PCR (véase Mullis *et al.*, patente estadounidense número 4.683.195; Mullis, patente estadounidense número 4.683.202); usando el cebador directo *mig1* (SEQ ID NO: 1, mostrado en la tabla 1) y el cebador inverso *mig1r* (SEQ ID NO: 2, mostrado en la tabla 1). En las secuencias representadas en la tabla 1, el subrayado representa nucleótidos añadidos a la secuencia original, y la negrita indica la ubicación de sitios de reconocimiento de endonucleasa de restricción.

ES 2 283 419 T3

TABLA 1

Tabulación de secuencias		
SEQ ID NO:	NOMBRE DE SECUENCIA	SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS/AMINOÁCIDOS
1	Cebador <i>mig1</i>	5' - G CGG CCA TGG TAG AAA ATA CTATAA CTG-3'
2	Cebador <i>mig1R</i>	5' - ACG CCC GGG TTA GTC TTC TTT ACGTTT-3'
3	gen <i>mig</i> de la cepa SDG8 de <i>Streptococcus dysgalactiae</i>	(véase la figura 1)
4	gen <i>mig</i> de la cepa SDG8 de <i>Streptococcus dysgalactiae</i>	
5	Cebador <i>mig-3</i>	5' - GTT GGC CTA GAT ATC ACA GAA TTACAA -3'
6	Cebador <i>mig-4</i>	5' - AAA GCA CCC GGG CCA GCC ATT ACTG -3'
7	Cebador <i>mig-6</i>	5' - AGG TGC TTC CCA TGG AAC TGC CTGAAC T -3'
8	Cebador <i>mig-7</i>	5' - GGC GAG AGT CTA GAA ACT AAA GCGAAA AAC -3'
9	Cebador <i>mig-8</i>	5' - GCA ATC ACC AGG ATC CTC AGT AACCAT TTC -3'
10	Cebador <i>mig-9</i>	5' - CAG GCA GTT CAT ATG GAA GCA CCTACA GT -3'
11	Cebador <i>mig-10</i>	5' - TCC CGG AGT AGC ATT GTC AGT C -3'
12	Cebador <i>mig-11</i>	5' - GCA GCG GTC CAT ATG CCT GTT GGCCTA GAT -3'
13	Cebador <i>mig-12</i>	5' - GCC TGA ACT GGA TCC CTC AAC TGATCT G -3'
14	Cebador <i>mig-13</i>	5' - TTC CGT TGG ATC CTG CAA CTC CAATTG -3'
15	Cebador <i>mig-14</i>	5' - TAA GTC AAA AGC TTT GAC AAT TAGTCT T -3'

ES 2 283 419 T3

Se llevó a cabo la PCR usando ADN polimerasa de Vent (New England Biolabs, Mississauga, Ontario, Canadá). Se combinaron 0,7 μg de ADN genómico de *S. dysgalactiae*, 1 μM de cada uno de los cebadores *mig1* (SEQ ID NO: 1) *mig1r* (SEQ ID NO: 2) (véase anteriormente), 200 μM de cada uno de dATP, dCTP, dGTP y dTTP, MgSO_4 3 mM, 1 X tampón de PCR ThermoPol (New England Biolabs), y 2 unidades de ADN polimerasa de Vent. Entonces se incubó la mezcla de reacción durante 3 ciclos de 1 minuto a 94°C, 3 minutos a 50°C, y 1 minuto, 10 segundos a 72°C, seguido por 27 ciclos de 15 segundos a 95°C, 30 segundos a 55°C, 1 minuto a 72°C, seguido por un único ciclo de 5 minutos a 72°C.

El producto de PCR de *mig* obtenido anteriormente y el vector de expresión pAA505 (VIDO, Saskatoon, Saskatchewan, Canadá) se digirieron con las enzimas de restricción NcoI y SmaI (Amersham Pharmacia, Quebec, Canadá) según las instrucciones del fabricante, y se ligó la secuencia de *mig* en los mismos sitios del vector.

Se usó este constructo para transformar *E. coli* DH5 α (Life Technologies, Gaithersburg, MD). Las células de *E. coli* DH5 α transformadas que llevaban el constructo de vector pAA505-*mig* se denominaron *E. coli* DH5 α pAA505Mig.

C. Secuencia de nucleótidos del gen *mig* de *S. dysgalactiae* y secuencia de aminoácidos deducida correspondiente

Se determinó la secuencia de nucleótidos en ambas orientaciones del gen *mig* en un secuenciador automático de ADN ABI 373 (Applied Biosystems) en el Plant Biotechnology Institute (PBI, Saskatoon, Saskatchewan, Canadá) usando los múltiples cebadores mostrados en la tabla 1 (cebadores *mig-2* a *mig-14*).

Las figuras 1A-1D representan la secuencia de nucleótidos codificante y la secuencia de aminoácidos, respectivamente para la proteína Mig de *S. dysgalactiae* (SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4, respectivamente).

Entonces se compararon estas secuencias con secuencias conocidas mediante análisis con BLAST. Los parámetros de búsqueda usados para analizar la secuencia de ácido nucleico fueron los siguientes: base de datos: nt; número de letras en la base de datos: 1.961.177.913; número de secuencias en la base de datos: 614.801; matriz: blastn matrix: 1-3; penalización de hueco: Existencia: 5, Extensión: 2. Los resultados obtenidos mostraron que el gen *mig* de *S. dysgalactiae* SD8 representado en las figuras 1A-1D es homólogo a varias secuencias de nucleótidos conocidas, por ejemplo, hay una homología del 98% con el gen *mig* de *S. dysgalactiae* SC1 (número de registro de Emb Z29666.1 SDMIGSUP).

Los parámetros de búsqueda usados para analizar la secuencia de aminoácidos fueron los siguientes: base de datos: nr; número de letras en la base de datos: 157.988.256; número de secuencias en la base de datos: 503.479; matriz: BLOSUM62; penalizaciones de huecos: existencia: 11, extensión: 1. Los resultados obtenidos mostraron que la secuencia de aminoácidos de *mig* de *S. dysgalactiae* SD8 representada en las figuras 1A-1D es homóloga en hasta el 89% con varias secuencias de aminoácidos conocidas.

D. Expresión y purificación de la proteína Mig de *S. dysgalactiae* recombinante

Se hizo crecer *E. coli* que contenía el constructo preparado en el ejemplo 1B, mencionado anteriormente, en caldo LB que contenía ampicilina 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ hasta una A_{600} de aproximadamente 0,5. Entonces se indujo la expresión de la proteína Mig mediante adición de isopropil- β ,D-tiogalactósido 1 mM (IPTG) (Sigma, St. Louis, MO). Tras tres horas de incubación a 37°C, se recogieron las células, se lavaron en tampón de columna (fosfato de sodio 50 mM pH 8,0, NaCl 0,2 M) y se lisaron mediante sonicación.

Aproximadamente el 40% de la proteína recombinante estaba en la fracción soluble del sonificado celular con un rendimiento de aproximadamente 50 mg de la proteína recombinante por litro de volumen de cultivo, según se determinó usando un kit de ensayo de proteínas DC (BioRad Laboratories, Mississauga, Ontario, Canadá) con albúmina de sérica bovina (Pierce, Rockford, Illinois) como patrón.

La proteína Mig recombinante se purificó mediante cromatografía de afinidad usando una matriz de agarosa-IgG, basándose en la capacidad de la proteína para unirse a la parte de Fc de la molécula de IgG. El lisado celular se clarificó mediante centrifugación y se aplicó la fracción soluble a una columna de agarosa de BLIgG (Sigma, St. Louis, Missouri). Se lavó la columna con 10 volúmenes de columna de tampón de columna (fosfato de sodio 50 mM pH 8,0, NaCl 0,3 M), y se eluyó la proteína con tampón de columna más glicina 0,1 M, pH 2,5, dando una fracción de proteína homogénea con una concentración de Mig de aproximadamente 10-15 mg/ml. Se dializó el eluato frente a 2.000 volúmenes de PBSA y se almacenó a -20°C.

E. Caracterización de la proteína recombinante

El análisis de la proteína purificada mediante SDS-PAGE demostró una pureza del 60%.

ES 2 283 419 T3

Ejemplo 2

Inmunización con Mig e infección experimental de ganado

- 5 Se formularon vacunas para que contuviesen 50 mg/ml GapC o Mig recombinante purificada por afinidad en el adyuvante basado en aceite VSA3 (VIDO, Saskatoon, Saskatchewan, Canadá). VSA3 es una combinación de Emulsigen Plus™ (MVP Laboratories, Ralston, Nebraska) y bromuro de dimetildioctadecil-amonio (Kodak, Rochester, Nueva York).
- 10 Se obtuvieron 24 vacas holandesas no lactantes sin historial de infección por *S. dysgalactiae* de diversas granjas en Saskatchewan, Canadá. Una semana antes de la vacunación, se trataron todos los animales con Cepha-dry™ (300 mg por cuarto; Ayerst Laboratories, Montreal, Canadá), con el fin de aclarar cualquier infección de las ubres antes de la etapa de vacunación.
- 15 Se inmunizaron tres grupos de ocho animales por vía subcutánea con dos dosis de vacunas que contenían Mig, GapC (una proteína de unión a plasmina aislada de bacterias de estreptococos que se evaluó de manera simultánea), o un placebo con un intervalo de tres semanas entre inmunizaciones. Dos semanas tras la segunda inmunización, se expusieron los animales a 650 unidades formadoras de colonias de *S. dysgalactiae* administradas en tres cuartos con una cánula de infusión en ubre. El cuarto cuarto de cada animal sirvió como control sin infección.
- 20 Se examinaron todos los animales diariamente para detectar signos clínicos de enfermedad y se recogieron muestras de todos los cuartos de ubre todos los días. Se observaron las muestras para determinar la consistencia y se determinaron recuentos de células somáticas así como números bacterianos.

25 Ejemplo 3

Colonización bacteriana

- 30 Se enumeraron bacterias extendiendo diluciones en serie (10^0 a 10^{-3}) directamente sobre placas de agar sangre de oveja de TSA seguido por incubación durante la noche a 37°C, CO₂ al 5%. La colonización se define como >500 ufc/ml del microorganismo de exposición recuperado.
- 35 Para confirmar que las bacterias recuperadas de secreciones lácteas eran *S. dysgalactiae*, se sometieron a prueba colonias seleccionadas recuperadas de cada animal usando una prueba de estreptococos API 20 (bioMerieux SA, Hazelwood, Missouri) según las instrucciones del fabricante. Esta prueba es un método normalizado que combina 20 ensayos bioquímicos para detectar actividad enzimática y fermentación de azúcar, cuyos resultados dan un perfil analítico. El perfil permite la identificación de la especie de estreptococos particular presente o bien refiriéndose a un índice de perfil analítico o bien usando un software de identificación.
- 40 Tras la exposición con *S. dysgalactiae*, se mostró que los animales de todos los grupos estaban colonizados por *S. dysgalactiae* (figura 4). Los animales inmunizados con Mig mostraron una reducción en el número de cuartos infectados en los días tres y cuatro tras la exposición.

Ejemplo 4

- 45 *Medición de la respuesta inflamatoria*

- 50 Se midió la respuesta inflamatoria como función del recuento de células somáticas (es decir, linfocitos, neutrófilos, y monocitos). Se midieron los recuentos de células somáticas en un contador Coulter usando técnicas habituales, según recomendación del Agriculture and Agri-Food Canada Pamphlet IDF50B (1985) Milk and Milk products-Methods of Sampling. Siempre se leyeron las muestras en un plazo de 48 horas desde la recogida y fijación.
- 55 Se determinó el número de células somáticas presente en la glándula en los días 1 a 7 tras la exposición. Los números del cuarto sin exponer permanecieron constantes durante todo el ensayo, mientras que el día 1, el grupo inmunizado con Mig era inferior al grupo inmunizado con placebo (figura 5). Los datos individuales del día 1 se muestran en la figura 6.

- 60 Por tanto, se describe la clonación, expresión y caracterización de la proteína Mig de *S. dysgalactiae*, al igual que métodos para usar la misma.

65

REIVINDICACIONES

5 1. Composición de vacuna que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable y una proteína receptora de Fc, en la que dicha proteína receptora de Fc se selecciona del grupo que consiste en:

(a) una proteína Mig de *Streptococcus dysgalactiae* que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en las posiciones de aminoácidos 1 a 669, incluidos, de las figuras 1A-1D (SEQ ID NO: 4); y

10 (b) una proteína receptora de Fc que tiene al menos el 70% de identidad de secuencia con (a).

2. Composición de vacuna según la reivindicación 1, en la que dicha proteína Mig comprende la secuencia de aminoácidos de la proteína Mig de *Streptococcus dysgalactiae* representada en las posiciones de aminoácidos 1 a 669, incluidos, de las figuras 1A-1D (SEQ ID NO: 4).

15 3. Composición de vacuna según la reivindicación 1, que además comprende un adyuvante.

4. Método de producción de una composición de vacuna que comprende las etapas de

20 (a) proporcionar una proteína receptora de Fc en el que dicha proteína receptora de Fc se selecciona del grupo que consiste en: i) una proteína Mig de *Streptococcus dysgalactiae* que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en las posiciones de aminoácidos 1 a 669, incluidos, de las figuras 1A-1D (SEQ ID NO: 4); y (ii) una proteína receptora de Fc que tiene al menos el 70% de identidad de secuencia con (i), y

25 (b) combinar dicha proteína con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

5. Uso de una proteína receptora de Fc en el que dicha proteína receptora de Fc se selecciona del grupo que consiste en:

30 (a) una proteína Mig de *Streptococcus dysgalactiae* que comprende secuencia de aminoácidos mostrada en las posiciones de aminoácidos 1 a 669, incluidos, de las figuras 1A-1D (SEQ ID NO: 4); y

35 (b) una proteína receptora de Fc que tiene al menos el 70% de identidad de secuencia con (a) en la fabricación de una composición de vacuna útil para tratar o evitar una infección por estreptococos en un sujeto vertebrado.

6. Uso según la reivindicación 5, en el que dicha proteína Mig comprende la secuencia de aminoácidos de la proteína Mig de *Streptococcus dysgalactiae* representada en las posiciones de aminoácidos 1 a 669, incluidos, de las figuras 1A-1D (SEQ ID NO: 4).

40 7. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 5 ó 6, en el que dicha infección por estreptococos provoca mastitis.

8. Uso de un polinucleótido que comprende una secuencia codificante para una proteína receptora de Fc en el que dicha proteína receptora de Fc se selecciona del grupo que consiste en:

45 (a) una proteína Mig de *Streptococcus dysgalactiae* que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en las posiciones de aminoácidos 1 a 669, incluidos, de las figuras 1A-1D (SEQ ID NO: 4); y

50 (b) una proteína receptora de Fc que tiene al menos el 70% de identidad de secuencia con (a) en la fabricación de un medicamento útil para tratar o evitar una infección por estreptococos en un sujeto vertebrado.

9. Uso según la reivindicación 8, en el que dicha proteína Mig comprende la secuencia de aminoácidos de la proteína Mig de *Streptococcus dysgalactiae* representada en las posiciones de aminoácidos 1 a 669, incluidos, de las figuras 1A-1D (SEQ ID NO: 4).

10. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 8 ó 9, en el que dicha infección por estreptococos provoca mastitis.

ES 2 283 419 T3

atg gaa aaa gaa aaa aaa gta aaa tac ttt tta cgt aaa tca gct ttt	48
Met Glu Lys Glu Lys Lys Val Lys Tyr Phe Leu Arg Lys Ser Ala Phe	
1 5 10 15	
gga tta gcg tct gta tca gct gcg ttt tta gtt tcg gga gca cta gaa	96
Gly Leu Ala Ser Val Ser Ala Ala Phe Leu Val Ser Gly Ala Leu Glu	
20 25 30	
aat act ata act gtt tct gca gaa act ata cct gca gcg gtc att gta	144
Asn Thr Ile Thr Val Ser Ala Glu Thr Ile Pro Ala Ala Val Ile Val	
35 40 45	
cct gtt ggc cta gat act aca gaa tta caa aaa tgg tat gac att gca	192
Pro Val Gly Leu Asp Thr Thr Glu Leu Gln Lys Trp Tyr Asp Ile Ala	
50 55 60	
aat gat tta gtt gcg act gac aat gct act ccg gga ggc gta ttt aca	240
Asn Asp Leu Val Ala Thr Asp Asn Ala Thr Pro Gly Gly Val Phe Thr	
65 70 75 80	
gca gac tca atg aag gca tta tat cgt tta cta aat gat gca tac gat	288
Ala Asp Ser Met Lys Ala Leu Tyr Arg Leu Leu Asn Asp Ala Tyr Asp	
85 90 95	
gtg ttg gaa tca aaa gac tat aga aaa tat gat tct caa gat agg att	336
Val Leu Glu Ser Lys Asp Tyr Arg Lys Tyr Asp Ser Gln Asp Arg Ile	
100 105 110	
gtt gaa ttg gta aac aat tta aag aat act acg cag tct ctt tta cca	384
Val Glu Leu Val Asn Asn Leu Lys Asn Thr Thr Gln Ser Leu Leu Pro	
115 120 125	
att gga gta gaa cca gta gta ttt gat act act cgc ttg aat acc tgg	432
Ile Gly Val Glu Pro Val Val Phe Asp Thr Thr Arg Leu Asn Thr Trp	
130 135 140	
tat gat gct gct aat gaa att gtt aat aat tca gat gct tat aca gca	480
Tyr Asp Ala Ala Asn Glu Ile Val Asn Asn Ser Asp Ala Tyr Thr Ala	
145 150 155 160	
gaa tca att cag tcg ttg tat aag tta att aat gat gca tac gat gtg	528
Glu Ser Ile Gln Ser Leu Tyr Lys Leu Ile Asn Asp Ala Tyr Asp Val	
165 170 175	
tta gaa tca aaa gat tac agt aag tat gat tct caa gat aaa gtc aac	576
Leu Glu Ser Lys Asp Tyr Ser Lys Tyr Asp Ser Gln Asp Lys Val Asn	
180 185 190	
aat ctt gca gat cag ttg aga gat gca gtt cag gca gtt caa cta gaa	624
Asn Leu Ala Asp Gln Leu Arg Asp Ala Val Gln Ala Val Gln Leu Glu	
195 200 205	

FIG. 1A

ES 2 283 419 T3

gca cct aca gtg att gac gca cct gaa cta act cca gct ttg act act	672
Ala Pro Thr Val Ile Asp Ala Pro Glu Leu Thr Pro Ala Leu Thr Thr	
210 215 220	
tac aaa ctt gtt gtt aaa ggt aac act ttc tca gga gaa aca act act	720
Tyr Lys Leu Val Val Lys Gly Asn Thr Phe Ser Gly Glu Thr Thr Thr	
225 230 235 240	
aaa gcc atc gat act gca act gcg gaa aaa gaa ttc aaa caa tac gca	768
Lys Ala Ile Asp Thr Ala Thr Ala Glu Lys Glu Phe Lys Gln Tyr Ala	
245 250 255	
aca gct aac aat gtt gac ggt gag tgg tct tat gac gat gca act aaa	816
Thr Ala Asn Asn Val Asp Gly Glu Trp Ser Tyr Asp Asp Ala Thr Lys	
260 265 270	
acc ttt aca gtt act gaa aaa cca gca gtg att gac gca ctt gaa cta	864
Thr Phe Thr Val Thr Glu Lys Pro Ala Val Ile Asp Ala Leu Glu Leu	
275 280 285	
act cca gcc ttg act act tac aaa ctt att gtt aaa ggt aac act ttc	912
Thr Pro Ala Leu Thr Thr Tyr Lys Leu Ile Val Lys Gly Asn Thr Phe	
290 295 300	
tca ggc gaa aca act act aaa gct atc gat gct gca act gca gaa aaa	960
Ser Gly Glu Thr Thr Thr Lys Ala Ile Asp Ala Ala Thr Ala Glu Lys	
305 310 315 320	
gaa ttc aaa caa tac gca aca gct aac aat gtt gac ggt gag tgg tct	1008
Glu Phe Lys Gln Tyr Ala Thr Ala Asn Asn Val Asp Gly Glu Trp Ser	
325 330 335	
tat gac tat gca act aaa acc ttt aca gtt act gaa aaa cca gca gtg	1056
Tyr Asp Tyr Ala Thr Lys Thr Phe Thr Val Thr Glu Lys Pro Ala Val	
340 345 350	
att gac gca cct gaa cta act cca gcc ttg act act tac aaa ctt att	1104
Ile Asp Ala Pro Glu Leu Thr Pro Ala Leu Thr Thr Tyr Lys Leu Ile	
355 360 365	
gtt aaa ggt aac act ttc tca ggc gaa aca act act aaa gct atc gat	1152
Val Lys Gly Asn Thr Phe Ser Gly Glu Thr Thr Thr Lys Ala Ile Asp	
370 375 380	
gct gca act gca gaa aaa gaa ttc aaa caa tac gca aca gct aac aat	1200
Ala Ala Thr Ala Glu Lys Glu Phe Lys Gln Tyr Ala Thr Ala Asn Asn	
385 390 395 400	
gtt gac ggt gaa tgg tct tat gac gat gca act aaa acc ttt aca gtt	1248
Val Asp Gly Glu Trp Ser Tyr Asp Asp Ala Thr Lys Thr Phe Thr Val	
405 410 415	

FIG. 1B

ES 2 283 419 T3

act gaa aaa cca gca gtg att gac gca cct gaa cta act cca gcc ttg	1296
Thr Glu Lys Pro Ala Val Ile Asp Ala Pro Glu Leu Thr Pro Ala Leu	
420 425 430	
act act tac aaa ctt att gtt aaa ggt aac act ttc tca ggc gaa aca	1344
Thr Thr Tyr Lys Leu Ile Val Lys Gly Asn Thr Phe Ser Gly Glu Thr	
435 440 445	
act act aaa gca gta gac gca gaa act gca gaa aaa gcc ttc aaa caa	1392
Thr Thr Lys Ala Val Asp Ala Glu Thr Ala Glu Lys Ala Phe Lys Gln	
450 455 460	
tac gca aca gct aac aat gtt gac ggt gaa tgg tct tat gac gat gca	1440
Tyr Ala Thr Ala Asn Asn Val Asp Gly Glu Trp Ser Tyr Asp Asp Ala	
465 470 475 480	
act aaa acc ttt aca gtt act gaa aaa cca gca gtg att gac gca cct	1488
Thr Lys Thr Phe Thr Val Thr Glu Lys Pro Ala Val Ile Asp Ala Pro	
485 490 495	
gaa tta aca cca gca ttg aca acc tac aaa ctt gtt atc aat ggt aaa	1536
Glu Leu Thr Pro Ala Leu Thr Thr Tyr Lys Leu Val Ile Asn Gly Lys	
500 505 510	
aca ttg aaa ggc gaa aca act act aaa gca gta gac gta gaa act gca	1584
Thr Leu Lys Gly Glu Thr Thr Thr Lys Ala Val Asp Val Glu Thr Ala	
515 520 525	
gaa aaa gcc ttc aaa caa tac gct aac gaa aac ggt gtt gat ggt gtt	1632
Glu Lys Ala Phe Lys Gln Tyr Ala Asn Glu Asn Gly Val Asp Gly Val	
530 535 540	
tgg act tac gat gat gcg act aag acc ttt acg gta act gaa atg gtt	1680
Trp Thr Tyr Asp Asp Ala Thr Lys Thr Phe Thr Val Thr Glu Met Val	
545 550 555 560	
act gaa att cct ggt gat gca cca act gaa cca gaa aag cca gaa gca	1728
Thr Glu Ile Pro Gly Asp Ala Pro Thr Glu Pro Glu Lys Pro Glu Ala	
565 570 575	
agt atc cct ctt gtt ccg tta act cct gca act cca att gct aaa gat	1776
Ser Ile Pro Leu Val Pro Leu Thr Pro Ala Thr Pro Ile Ala Lys Asp	
580 585 590	
gac gct aag aaa gac gat act aag aaa gtc gat act aag aaa gaa gac	1824
Asp Ala Lys Lys Asp Asp Thr Lys Lys Val Asp Thr Lys Lys Glu Asp	
595 600 605	
gct aaa aaa cca gaa gct aaa aaa cca gaa gct aag aaa gaa gaa gct	1872
Ala Lys Lys Pro Glu Ala Lys Lys Pro Glu Ala Lys Lys Glu Glu Ala	
610 615 620	

FIG. 1C

```
aag aaa gaa gaa gct aag aaa gct gca act ctt cct aca act ggt gaa 1920
Lys Lys Glu Glu Ala Lys Lys Ala Ala Thr Leu Pro Thr Thr Gly Glu
625                630                635                640

gga agc aac cca ttt ttc aca gct gct gcg ctt gca gta atg gct ggt 1968
Gly Ser Asn Pro Phe Phe Thr Ala Ala Ala Leu Ala Val Met Ala Gly
645                650                655

gcg ggt gct ttg gca gtc gct tca aaa cgt aaa gaa gac taa 2010
Ala Gly Ala Leu Ala Val Ala Ser Lys Arg Lys Glu Asp
660                665                670
```

FIG. 1D

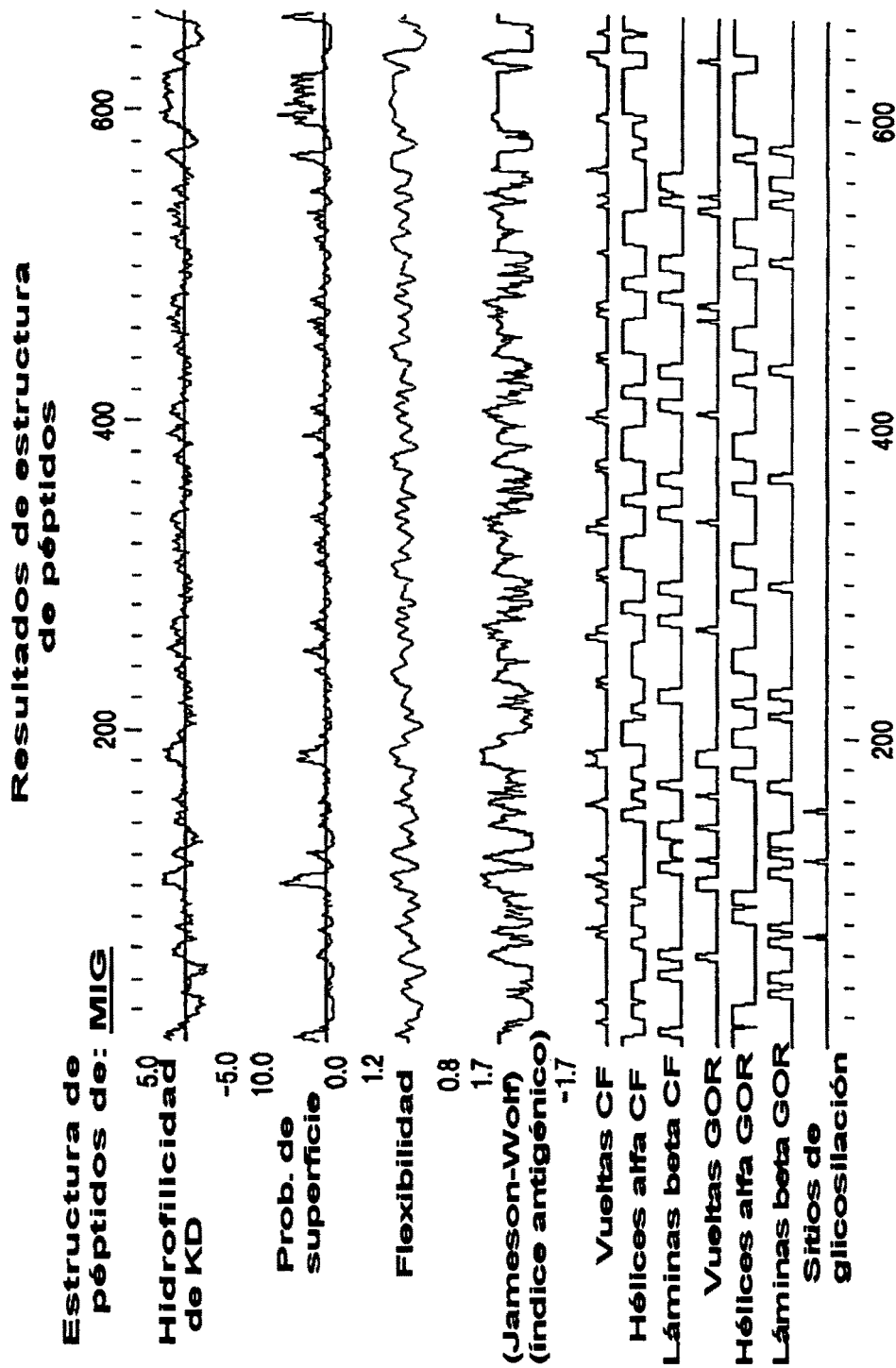
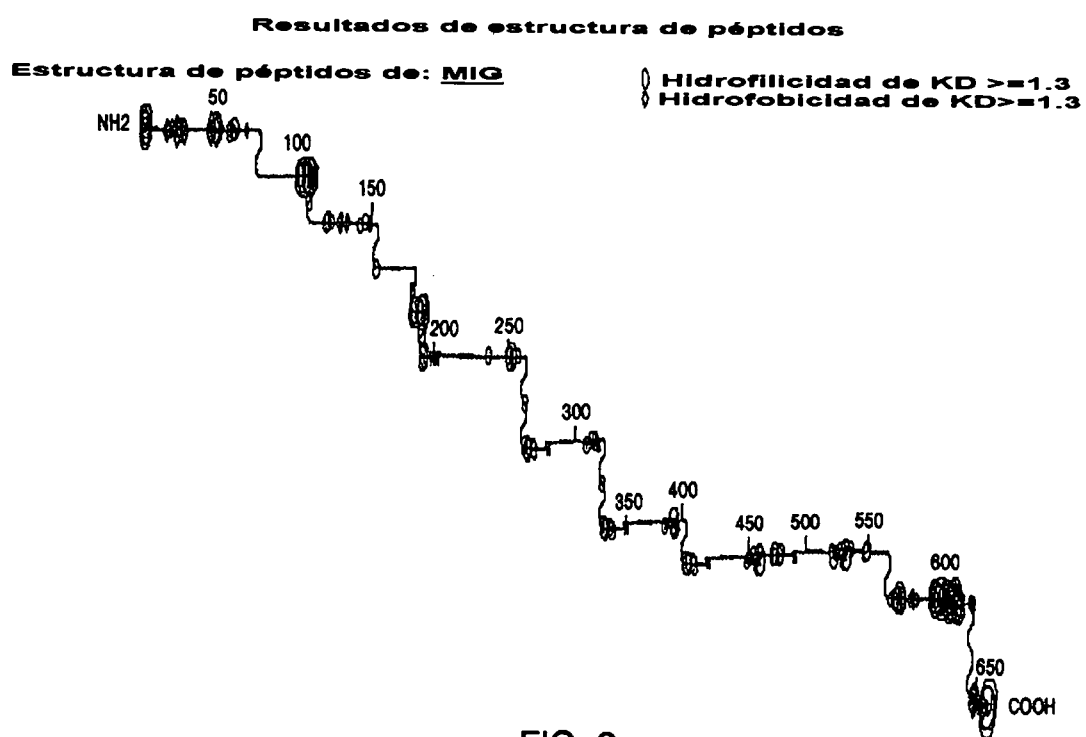


FIG. 2



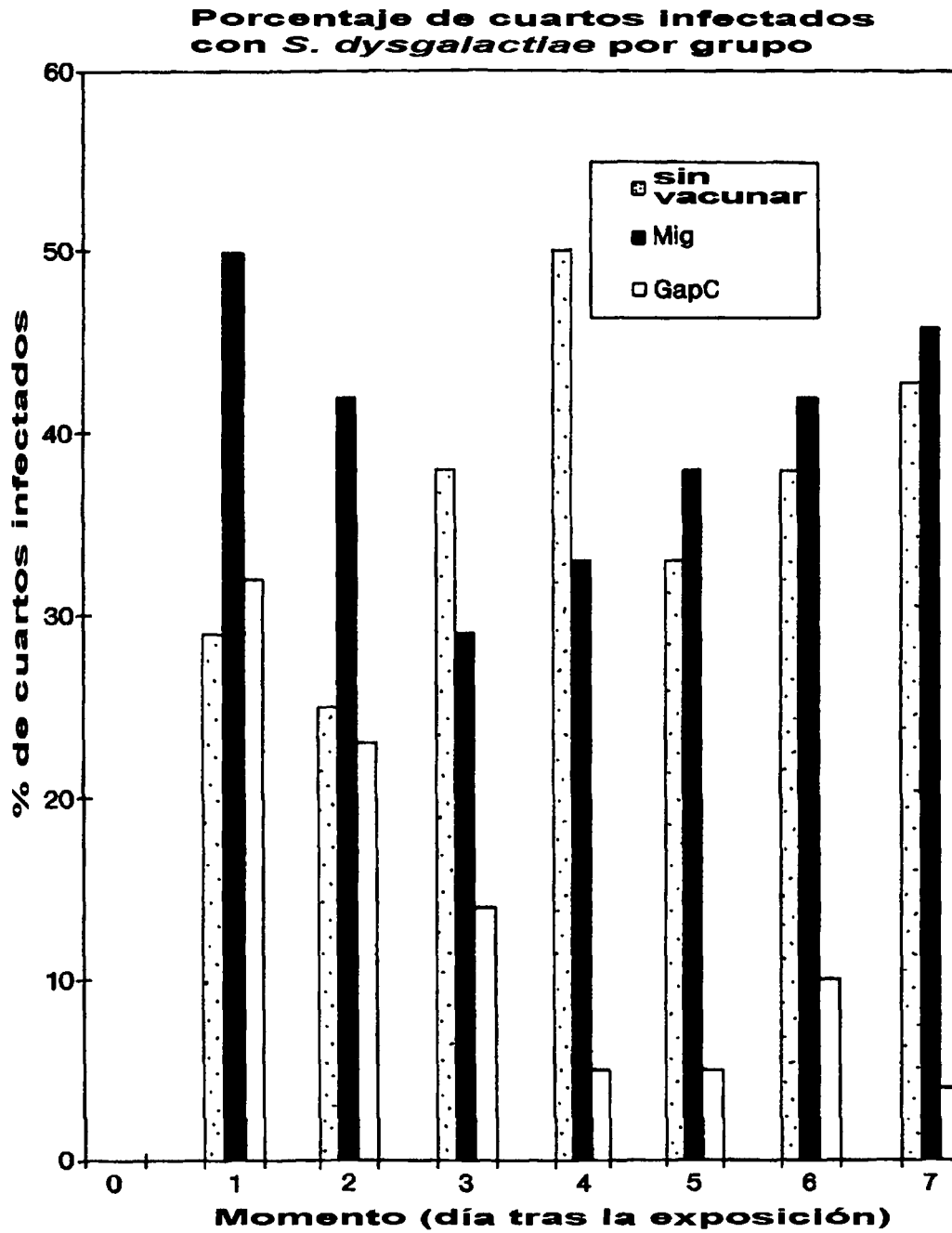


FIG. 4

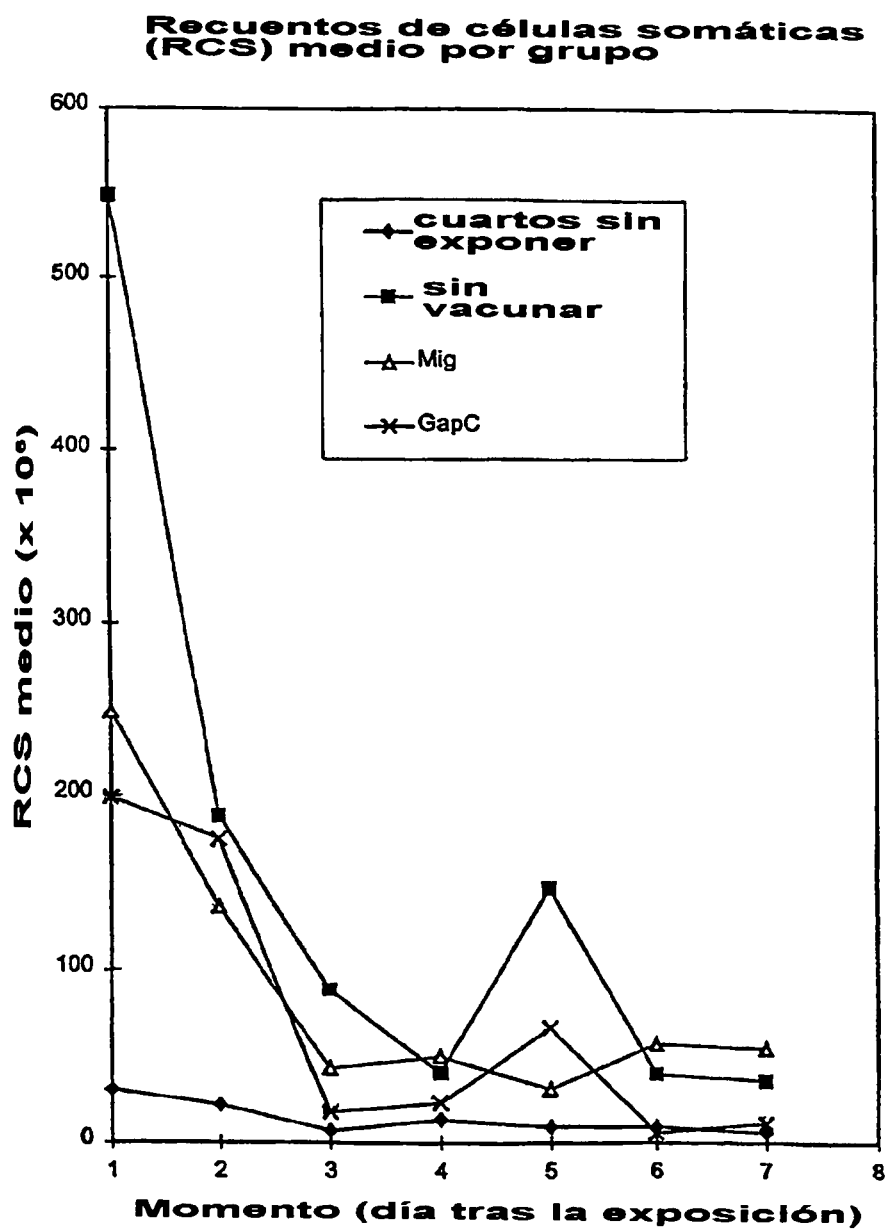


FIG. 5

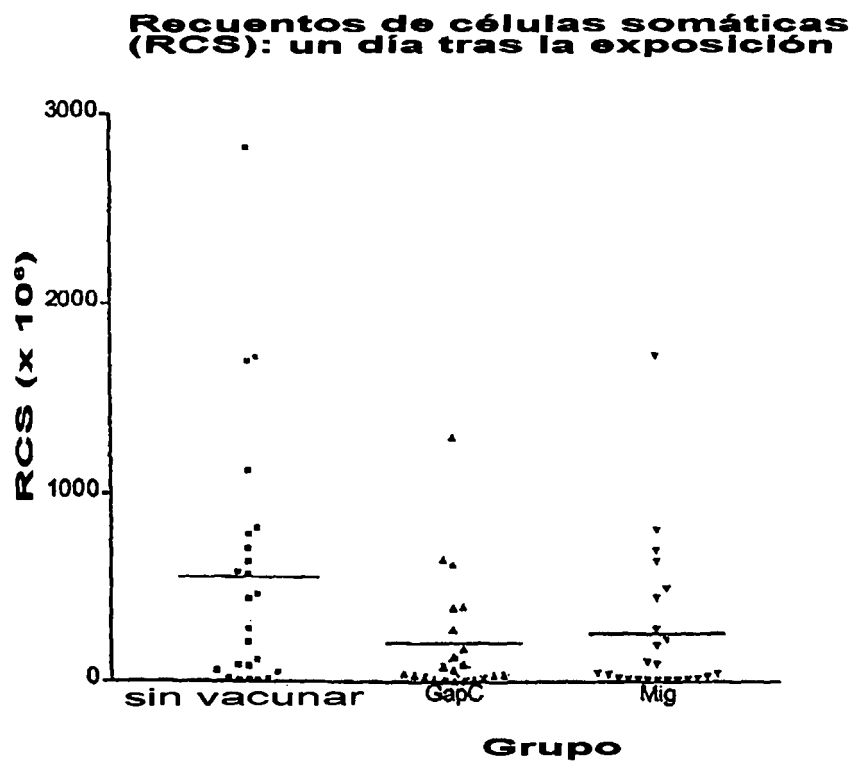


FIG. 6

ES 2 283 419 T3

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> University of Saskatchewan
Potter, Andrew A.
5 Bolton, Alexandra J.
Song, Xin Ming
- <120> INMUNIZACIÓN DE GANADO LECHERO CON PROTEÍNA MIG
<130> 08-891815WO
10 <140>
<141>
<160> 15
15 <170> PatentIn Ver. 2.0
<210> 1
<211> 28
<212> ADN
20 <213> Secuencia artificial
<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador mig1
25 <400> 1

gcggccatgg tagaaaatac tataactg 28
- 30 <210> 2
<211> 27
<212> ADN
35 <213> Secuencia artificial
<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador mig1R
40 <400> 2

acgcccgggt tagtcttctt tacgttt 27
- 45 <210> 3
<211> 2010
<212> ADN
<213> *Streptococcus dysgalactiae*
50 <220>
<221> CDS
<222> (1) .. (2010)
55 <400> 3

atg gaa aaa gaa aaa aaa gta aaa tac ttt tta cgt aaa tca gct ttt 48
Met Glu Lys Glu Lys Lys Val Lys Tyr Phe Leu Arg Lys Ser Ala Phe
60 1 5 10 15
- 65

ES 2 283 419 T3

5 gga tta gcg tct gta tca gct gcg ttt tta gtt tcg gga gca cta gaa 96
 Gly Leu Ala Ser Val Ser Ala Ala Phe Leu Val Ser Gly Ala Leu Glu
 20 25 30

10 aat act ata act gtt tct gca gaa act ata cct gca gcg gtc att gta 144
 Asn Thr Ile Thr Val Ser Ala Glu Thr Ile Pro Ala Ala Val Ile Val
 35 40 45

15 cct gtt ggc cta gat act aca gaa tta caa aaa tgg tat gac att gca 192
 Pro Val Gly Leu Asp Thr Thr Glu Leu Gln Lys Trp Tyr Asp Ile Ala
 50 55 60

20 aat gat tta gtt gcg act gac aat gct act ccg gga ggc gta ttt aca 240
 Asn Asp Leu Val Ala Thr Asp Asn Ala Thr Pro Gly Gly Val Phe Thr
 65 70 75 80

25 gca gac tca atg aag gca tta tat cgt tta cta aat gat gca tac gat 288
 Ala Asp Ser Met Lys Ala Leu Tyr Arg Leu Leu Asn Asp Ala Tyr Asp
 85 90 95

30 gtg ttg gaa tca aaa gac tat aga aaa tat gat tct caa gat agg att 336
 Val Leu Glu Ser Lys Asp Tyr Arg Lys Tyr Asp Ser Gln Asp Arg Ile
 100 105 110

35 gtt gaa ttg gta aac aat tta aag aat act acg cag tct ctt tta cca 384
 Val Glu Leu Val Asn Asn Leu Lys Asn Thr Thr Gln Ser Leu Leu Pro
 115 120 125

40 att gga gta gaa cca gta gta ttt gat act act cgc ttg aat acc tgg 432
 Ile Gly Val Glu Pro Val Val Phe Asp Thr Thr Arg Leu Asn Thr Trp
 130 135 140

45 tat gat gct gct aat gaa att gtt aat aat tca gat gct tat aca gca 480
 Tyr Asp Ala Ala Asn Glu Ile Val Asn Asn Ser Asp Ala Tyr Thr Ala
 145 150 155 160

50 gaa tca att cag tcg ttg tat aag tta att aat gat gca tac gat gtg 528
 Glu Ser Ile Gln Ser Leu Tyr Lys Leu Ile Asn Asp Ala Tyr Asp Val
 165 170 175

55 tta gaa tca aaa gat tac agt aag tat gat tct caa gat aaa gtc aac 576
 Leu Glu Ser Lys Asp Tyr Ser Lys Tyr Asp Ser Gln Asp Lys Val Asn
 180 185 190

60 aat ctt gca gat cag ttg aga gat gca gtt cag gca gtt caa cta gaa 624
 Asn Leu Ala Asp Gln Leu Arg Asp Ala Val Gln Ala Val Gln Leu Glu
 195 200 205

65 gca cct aca gtg att gac gca cct gaa cta act cca gct ttg act act 672
 Ala Pro Thr Val Ile Asp Ala Pro Glu Leu Thr Pro Ala Leu Thr Thr
 210 215 220

70 tac aaa ctt gtt gtt aaa ggt aac act ttc tca gga gaa aca act act 720
 Tyr Lys Leu Val Val Lys Gly Asn Thr Phe Ser Gly Glu Thr Thr Thr
 225 230 235 240

ES 2 283 419 T3

5
 10
 15
 20
 25
 30
 35
 40
 45
 50
 55
 60
 65

aaa gcc atc gat act gca act gcg gaa aaa gaa ttc aaa caa tac gca 768
 Lys Ala Ile Asp Thr Ala Thr Ala Glu Lys Glu Phe Lys Gln Tyr Ala
 245 250 255

 aca gct aac aat gtt gac ggt gag tgg tct tat gac gat gca act aaa 816
 Thr Ala Asn Asn Val Asp Gly Glu Trp Ser Tyr Asp Asp Ala Thr Lys
 260 265 270

 acc ttt aca gtt act gaa aaa cca gca gtg att gac gca ctt gaa cta 864
 Thr Phe Thr Val Thr Glu Lys Pro Ala Val Ile Asp Ala Leu Glu Leu
 275 280 285

 act cca gcc ttg act act tac aaa ctt att gtt aaa ggt aac act ttc 912
 Thr Pro Ala Leu Thr Thr Tyr Lys Leu Ile Val Lys Gly Asn Thr Phe
 290 295 300

 tca ggc gaa aca act act aaa gct atc gat gct gca act gca gaa aaa 960
 Ser Gly Glu Thr Thr Thr Lys Ala Ile Asp Ala Ala Thr Ala Glu Lys
 305 310 315 320

 gaa ttc aaa caa tac gca aca gct aac aat gtt gac ggt gag tgg tct 1008
 Glu Phe Lys Gln Tyr Ala Thr Ala Asn Asn Val Asp Gly Glu Trp Ser
 325 330 335

 tat gac tat gca act aaa acc ttt aca gtt act gaa aaa cca gca gtg 1056
 Tyr Asp Tyr Ala Thr Lys Thr Phe Thr Val Thr Glu Lys Pro Ala Val
 340 345 350

 att gac gca cct gaa cta act cca gcc ttg act act tac aaa ctt att 1104
 Ile Asp Ala Pro Glu Leu Thr Pro Ala Leu Thr Thr Tyr Lys Leu Ile
 355 360 365

 gtt aaa ggt aac act ttc tca ggc gaa aca act act aaa gct atc gat 1152
 Val Lys Gly Asn Thr Phe Ser Gly Glu Thr Thr Thr Lys Ala Ile Asp
 370 375 380

 gct gca act gca gaa aaa gaa ttc aaa caa tac gca aca gct aac aat 1200
 Ala Ala Thr Ala Glu Lys Glu Phe Lys Gln Tyr Ala Thr Ala Asn Asn
 385 390 395 400

 gtt gac ggt gaa tgg tct tat gac gat gca act aaa acc ttt aca gtt 1248
 Val Asp Gly Glu Trp Ser Tyr Asp Asp Ala Thr Lys Thr Phe Thr Val
 405 410 415

 act gaa aaa cca gca gtg att gac gca cct gaa cta act cca gcc ttg 1296
 Thr Glu Lys Pro Ala Val Ile Asp Ala Pro Glu Leu Thr Pro Ala Leu
 420 425 430

 act act tac aaa ctt att gtt aaa ggt aac act ttc tca ggc gaa aca 1344
 Thr Thr Tyr Lys Leu Ile Val Lys Gly Asn Thr Phe Ser Gly Glu Thr
 435 440 445

 act act aaa gca gta gac gca gaa act gca gaa aaa gcc ttc aaa caa 1392
 Thr Thr Lys Ala Val Asp Ala Glu Thr Ala Glu Lys Ala Phe Lys Gln
 450 455 460

ES 2 283 419 T3

<400> 4

5 Met Glu Lys Glu Lys Lys Val Lys Tyr Phe Leu Arg Lys Ser Ala Phe
1 5 10 15

Gly Leu Ala Ser Val Ser Ala Ala Phe Leu Val Ser Gly Ala Leu Glu
20 25 30

10 Asn Thr Ile Thr Val Ser Ala Glu Thr Ile Pro Ala Ala Val Ile Val
35 40 45

15 Pro Val Gly Leu Asp Thr Thr Glu Leu Gln Lys Trp Tyr Asp Ile Ala
50 55 60

Asn Asp Leu Val Ala Thr Asp Asn Ala Thr Pro Gly Gly Val Phe Thr
65 70 75 80

20 Ala Asp Ser Met Lys Ala Leu Tyr Arg Leu Leu Asn Asp Ala Tyr Asp
85 90 95

25 Val Leu Glu Ser Lys Asp Tyr Arg Lys Tyr Asp Ser Gln Asp Arg Ile
100 105 110

Val Glu Leu Val Asn Asn Leu Lys Asn Thr Thr Gln Ser Leu Leu Pro
115 120 125

30 Ile Gly Val Glu Pro Val Val Phe Asp Thr Thr Arg Leu Asn Thr Trp
130 135 140

35 Tyr Asp Ala Ala Asn Glu Ile Val Asn Asn Ser Asp Ala Tyr Thr Ala
145 150 155 160

Glu Ser Ile Gln Ser Leu Tyr Lys Leu Ile Asn Asp Ala Tyr Asp Val
165 170 175

40 Leu Glu Ser Lys Asp Tyr Ser Lys Tyr Asp Ser Gln Asp Lys Val Asn
180 185 190

45 Asn Leu Ala Asp Gln Leu Arg Asp Ala Val Gln Ala Val Gln Leu Glu
195 200 205

Ala Pro Thr Val Ile Asp Ala Pro Glu Leu Thr Pro Ala Leu Thr Thr
210 215 220

50 Tyr Lys Leu Val Val Lys Gly Asn Thr Phe Ser Gly Glu Thr Thr Thr
225 230 235 240

Lys Ala Ile Asp Thr Ala Thr Ala Glu Lys Glu Phe Lys Gln Tyr Ala
245 250 255

55 Thr Ala Asn Asn Val Asp Gly Glu Trp Ser Tyr Asp Asp Ala Thr Lys
260 265 270

60 Thr Phe Thr Val Thr Glu Lys Pro Ala Val Ile Asp Ala Leu Glu Leu
275 280 285

65

ES 2 283 419 T3

Thr Pro Ala Leu Thr Thr Tyr Lys Leu Ile Val Lys Gly Asn Thr Phe
 290 295 300
 5 Ser Gly Glu Thr Thr Thr Lys Ala Ile Asp Ala Ala Thr Ala Glu Lys
 305 310 315 320
 10 Glu Phe Lys Gln Tyr Ala Thr Ala Asn Asn Val Asp Gly Glu Trp Ser
 325 330 335
 Tyr Asp Tyr Ala Thr Lys Thr Phe Thr Val Thr Glu Lys Pro Ala Val
 340 345 350
 15 Ile Asp Ala Pro Glu Leu Thr Pro Ala Leu Thr Thr Tyr Lys Leu Ile
 355 360 365
 20 Val Lys Gly Asn Thr Phe Ser Gly Glu Thr Thr Thr Lys Ala Ile Asp
 370 375 380
 Ala Ala Thr Ala Glu Lys Glu Phe Lys Gln Tyr Ala Thr Ala Asn Asn
 385 390 395 400
 25 Val Asp Gly Glu Trp Ser Tyr Asp Asp Ala Thr Lys Thr Phe Thr Val
 405 410 415
 30 Thr Glu Lys Pro Ala Val Ile Asp Ala Pro Glu Leu Thr Pro Ala Leu
 420 425 430
 Thr Thr Tyr Lys Leu Ile Val Lys Gly Asn Thr Phe Ser Gly Glu Thr
 435 440 445
 35 Thr Thr Lys Ala Val Asp Ala Glu Thr Ala Glu Lys Ala Phe Lys Gln
 450 455 460
 Tyr Ala Thr Ala Asn Asn Val Asp Gly Glu Trp Ser Tyr Asp Asp Ala
 465 470 475 480
 Thr Lys Thr Phe Thr Val Thr Glu Lys Pro Ala Val Ile Asp Ala Pro
 485 490 495
 45 Glu Leu Thr Pro Ala Leu Thr Thr Tyr Lys Leu Val Ile Asn Gly Lys
 500 505 510
 Thr Leu Lys Gly Glu Thr Thr Thr Lys Ala Val Asp Val Glu Thr Ala
 515 520 525
 Glu Lys Ala Phe Lys Gln Tyr Ala Asn Glu Asn Gly Val Asp Gly Val
 530 535 540
 55 Trp Thr Tyr Asp Asp Ala Thr Lys Thr Phe Thr Val Thr Glu Met Val
 545 550 555 560
 60 Thr Glu Ile Pro Gly Asp Ala Pro Thr Glu Pro Glu Lys Pro Glu Ala
 565 570 575
 Ser Ile Pro Leu Val Pro Leu Thr Pro Ala Thr Pro Ile Ala Lys Asp
 580 585 590
 65

ES 2 283 419 T3

		Asp	Ala	Lys	Lys	Asp	Asp	Thr	Lys	Lys	Val	Asp	Thr	Lys	Lys	Glu	Asp
				595					600					605			
5		Ala	Lys	Lys	Pro	Glu	Ala	Lys	Lys	Pro	Glu	Ala	Lys	Lys	Glu	Glu	Ala
								610					615			620	
10		Lys	Lys	Glu	Glu	Ala	Lys	Lys	Ala	Ala	Thr	Leu	Pro	Thr	Thr	Gly	Glu
							625					630			635		640
15		Gly	Ser	Asn	Pro	Phe	Phe	Thr	Ala	Ala	Ala	Leu	Ala	Val	Met	Ala	Gly
						645					650					655	
20		Ala	Gly	Ala	Leu	Ala	Val	Ala	Ser	Lys	Arg	Lys	Glu	Asp			
					660					665							
	<210>	5															
	<211>	27															
	<212>	ADN															
	<213>	Secuencia artificial															
25	<220>																
	<223>	Descripción de la secuencia artificial: cebador mig-3															
30	<400>	5															
		gttggcctag atatcacaga attaca														27	
35	<210>	6															
	<211>	25															
	<212>	ADN															
	<213>	Secuencia artificial															
40	<220>																
	<223>	Descripción de la secuencia artificial: cebador mig-4															
45	<400>	6															
		aaagcacceg ggccagccat tactg														25	
50	<210>	7															
	<211>	28															
	<212>	ADN															
	<213>	Secuencia artificial															
55	<220>																
	<223>	Descripción de la secuencia artificial: cebador mig-6															
60	<400>	7															
		aggtgcttcc catggaactg cctgaact														28	
65	<210>	8															
	<211>	30															
	<212>	ADN															
	<213>	Secuencia artificial															

ES 2 283 419 T3

	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador mig-7	
5	<400> 8	
	ggcgagagtc tagaaactaa agcgaaaaac	30
10	<210> 9	
	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador mig-8	
	<400> 9	
20	gcaatcacca ggatcctcag taaccatttc	30
	<210> 10	
25	<211> 29	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
30	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador mig-9	
	<400> 10	
35	caggcaggtc atatggaagc acctacagt	29
	<210> 11	
40	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
45	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador mig-10	
	<400> 11	
50	tcccggagta gcattgtcag tc	22
	<210> 12	
	<211> 30	
55	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
60	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador mig-11	
	<400> 12	
65	gcagcgggcc atatgcctgt tggcctagat	30
	<210> 13	
	<211> 28	

ES 2 283 419 T3

	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
5	<223> Descripción de Secuencia artificial: cebador mig-12	
	<400> 13	
10	gcctgaactg gatccctcaa ctgatctg	28
	<210> 14	
	<211> 27	
15	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
20	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador mig-13	
	<400> 14	
25	ttccgttga tctgccaact ccaattg	27
	<210> 15	
	<211> 28	
30	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador mig-14	
35	<400> 15	
40	taagtcaaaa gcttgacaa ttagtctt	28
45		
50		
55		
60		
65		