



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 288 223**

51 Int. Cl.:
C12N 15/82 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Número de solicitud europea: **03786456 .8**
86 Fecha de presentación : **04.12.2003**
87 Número de publicación de la solicitud: **1613752**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **11.01.2006**

54

Título: **Proteína quimérica que contiene proteinasa cisteínica de *Fasciola hepática* fusionada con la proteína del núcleo del virus de la hepatitis B o de la ubiquitina; plantas expresando dicha proteína; y su utilización como vacuna.**

30

Prioridad: **04.12.2002 PL 357517**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.01.2008

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.01.2008

73

Titular/es: **Institute of Bioorganic Chemistry
Polish Academy of Science
ul. Noskowskiego 12/14
PL-61-704 Poznan, PL
Institute of Biotechnology Antibiotics**

72

Inventor/es: **Legocki, Andrzej, B.;**
Miedzinska, Katarzyna;
Czaplinska, Magdalena;
Modelska, Anna;
Pniewski, Tomasz;
Plucienniczak, Andrzej;
Kezik, Malgorzata;
Porebska, Anna;
Wedrychowicz, Halina;
Mieszczanek, Juliusz;
Jedlina-Panasiuk, Luiza y
Wojciechowicz, Jacek

74

Agente: **Ungría López, Javier**

ES 2 288 223 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

Proteína quimérica que contiene proteinasa cisteínica de *Fasciola hepática* fusionada con la proteína del núcleo del virus de la hepatitis B o de la ubiquitina; plantas expresando dicha proteína; y su utilización como vacuna.

Partícula de ácido nucleínico, célula vegetal, modo de obtención de una proteína quimérica, modo de obtención de una planta transgénica, planta transgénica, aplicación de la planta transgénica, composición farmacéutica, vacuna contra la fascioliasis hepática.

Los objetos del invento son: partícula de ácido nucleínico, célula vegetal, modo de obtención de una proteína quimérica, modo de obtención de una planta transgénica, planta transgénica, aplicación de la planta transgénica, composición farmacéutica, la vacuna contra la fascioliasis hepática. De manera general, el invento se refiere a la manera de provocar una respuesta inmunológica que incluye la administración de la vacuna por vía digestiva. Los objetos del invento sirven a obtener vacunas orales contra la fascioliasis hepática.

La fasciola hepática (*Fasciola hepatica*) es un parásito interno del ganado bovino. Es un esquistosoma Digenea lo cual significa que en su ciclo de vida se distinguen varias etapas de desarrollo con la participación de un huésped intermediario - caracol *Galba truncatula* (*Gastropoda, Lymnaeidae*). El animal es atacado después de haber ingerido plantas en donde había formas invasivas encapsuladas de Fasciola - las metacercarias. En el tubo digestivo de los vertebrados, la membrana de la metacercaria se disuelve, la forma juvenil se desplaza a través de la cavidad peritoneal al hígado y atravesando la pulpa de este órgano llega a los canales biliares donde poco a poco alcanza la pubertad. La enfermedad causada por la fascioliasis hepática, llamada fasciolosis, hace que los animales adelgazan, baja el rendimiento en la producción de leche, baja la fertilidad, e inclusive puede llevar hasta la muerte del animal (Kadlubowski *et al.* 1999). Es entonces una enfermedad de gran peso económico que causa enormes pérdidas. Además, se observa cada vez más casos de esta enfermedad entre la gente, en particular en los países en vía de desarrollo donde, según se supone, cada tercer habitante puede estar infectado y donde los casos más graves de infección por fascioliasis hepática, pueden terminar por la muerte.

La fascioliasis hepática es considerada uno de los problemas parasitarios más graves del mundo. Simultáneamente, son las vacunaciones profilácticas las que llegan a ser una intervención médica más eficaz y más rentable. De su eficiencia decide no sólo su capacidad inmunizadora, sino también la accesibilidad donde el precio es el factor que más influencia tenga. Las investigaciones actuales se concentran, entre otros, en bajar el costo de obtención de las vacunas.

El tratamiento consiste en utilizar los medicamentos anti-fasciolosis, mientras que la prevención consiste en combatir el caracol, que es el huésped intermediario del parásito, como también drenar praderas y pastos. Hasta la fecha, no existe una vacuna eficaz, aunque se ha emprendido varios ensayos cuyo objetivo era encontrar un antígeno adecuado de fasciola que provocara una alta respuesta inmunológica. Hasta ahora, como vacuna, se ha utilizado los antígenos provenientes de Fasciola (Wedrychowicz y Klockiewicz, *Acta Parasitologica* 1994, 39:173).

La migración del esquistosoma en el interior de los tejidos del huésped definitivo es posible gracias a las secretadas enzimas proteolíticas, donde las proteinasas cisteínicas (Piacenza L. *et al.* *Parasitol Int.*, 1998, 47S:266) que disuelven las proteínas de la sustancia intercelular - primero las paredes del tubo digestivo, luego las de los conductos biliares y del hígado. Es entonces un factor clave que permite al parásito desarrollarse, y a la vez el elemento del contacto parásito - huésped. Las enzimas proteolíticas desempeñan un papel muy importante en el ciclo vital de todos los parásitos, porque permiten invadir las células y los tejidos del huésped - hacen degradar los elementos del sistema inmunológico, hidrolizan las proteínas del huésped para sus propias necesidades alimenticias. Como resultado de la evolución, las enzimas se hicieron más específicas lo cual influyó en el éxito adaptador de los parásitos.

La proteinasa cisteínica pertenece al grupo de proteínas llamadas catepsinas L (*cathepsin like protein*). Son conocidas dos formas no homogéneas de estas enzimas - L1 y L2 (27 kDa y 29,5 kDa). El cDNA de la proteinasa cisteínica ha sido utilizado como vacuna anti-fasciolosis con una exitosamente terminada inmunización de ratas (Kofta *et al.*, *Vaccine* 2000, 18:2985).

Hace algo más de diez años se creía que la única función de las enzimas proteolíticas secretadas por las células gastrodérmicas de fascioliasis hepática era únicamente la de facilitar la penetración en los tejidos del huésped y asimilar los elementos alimenticios. Actualmente, se sabe que las catepsinas L pueden cortar los anticuerpos en la región de la bisagra gínglimal y proteger el parásito ante el ataque inmunológico. Disponen además de una capacidad de fragmentar el fibrinógeno de manera que éste forma coágulos que rodean el esquistosoma que se está desplazando en el organismo del huésped y por eso debilitan la eficacia de la respuesta inmunológica, frenando el acceso de los macrófagos. Un de las catepsinas es también presente en los esquistosomas adultos, en las glándulas Melis, donde participa en la formación de huevos. Esto significa entonces que esta enzima es secretada en cada etapa de vida del parásito.

La transgenesis ha facilitado utilizar los organismos animales y vegetales como un tipo de bioreactores. Los organismos transgénicos recibidos por esta vía producen las proteínas antigénicas que introducen el sistema inmunológico en el estado de alerta ante la invasión de los patógenos (Charon *et al.*, *Genetyka zwierzat*, PWN, Warszawa, 2000). En las vacunas de este tipo, el material de vacunación son los antígenos aislados - proteínas virulentas, bacterianas o

parasitarias. La estimulación del sistema inmunológico es posible cuando la proteína mantiene su estructura no alterada, nativa, lo que significa que los factores patógenos de los organismos superiores necesitan usualmente el sistema de expresión eucariótico. Por tanto también, la producción de estas proteínas en la levadura o en las bacterias, a pesar de ser más barata y más eficaz, debido a la falta de posibilidad de una modificación adecuada de proteínas, a menudo resulta ineficaz.

La descripción del patente US6084156 (publicado 04.07.2000) presenta una solución que se refiere a las plantas que producen péptidos líticos. Fuera de la descripción US6084156, la solución concerniente a la unión estabilizadora entre los polipéptidos y el péptido lítico de ubiquitina, y al modo de formación por medio de subclonación del ácido nucleínico que codifica las secuencias de los péptidos líticos al vector de la plasmida que contenga el promotor y la secuencia que codifica el polipéptido ubiquitina, en donde la secuencia del polipéptido de ubiquitina está fusionada en el 5' extremo de la secuencia del ácido nucleínico del péptido lítico que experimenta una translación como polipéptido de fusión, ha sido presentada también en las descripciones de los patentes US 6448391 (publicado 10.09.2002), US6018102 (publicado 25.01.2000) y US5955573 (publicado 21.09.1999). Cabe notar que aparte de ello, las descripciones US6018102 y US5955573 presentan además soluciones que conciernen a los constructos genéticos de la unión del péptido lítico de ubiquitina, los productos proteínicos obtenidos de éstos, como también su producción y aplicación.

La descripción de patente US6306663 (publicado 23.10.2001) presenta la solución que se relaciona con los nuevos compuestos que contengan un elemento de reconocimiento de la ubiquitina y el factor proteínico de ligamiento. El invento concierne también a la aplicación de los compuestos teniendo por finalidad modular el nivel y/o la actividad de la proteína final. Estos compuestos son útiles en la aplicación contra las infecciones, estados inflamatorios, tumores y enfermedades genéticas, como también como herbicidas e insecticidas.

La descripción del patente US6068994 (publicado 30.05.2000) presenta el invento que se relaciona con la expresión de la ubiquitina. La solución muestra el sistema de juntarse la ubiquitina, el cual facilita un alto nivel, ajustable, de formación de proteínas heterológicas con residuos aminoacídicos desestabilizadores en posición terminal. Las proteínas de fusión de ubiquitina, expresándose en la levadura, son con precisión cortadas *in vivo* por las hidrolasas endogénicas, específicas para la ubiquitina, para la proteínas heterológicas de levadura, como lo son alfa-1-antitrypsina humana, gamma-interferon humano y la proteína humana del virus HIV, es decir todas que inician con los residuos desestabilizadores. El vector de expresión que contenga un gen sintético de la ubiquitina monomérica de levadura fue construido y estuvo experimentando la expresión bajo control del promotor de levadura para la glucosa. Este sistema puede ser utilizado para aumentar el nivel de expresión en el caso de proteínas que demuestran un bajo nivel de expresión y para formar proteínas que tengan residuos aminoacídicos desestabilizadores en posición terminal.

En las descripciones del patente US 5847097 (publicado 08.12.1998) y US5646017 (publicado 08.07.1997), ha sido presentado el modo de formar o modificar la estructura de la proteína a nivel de proteína o de gen, con el objetivo de formar los específicos amino-terminaciones *in vivo* o *in vitro*. Estos modos están basados sobre una introducción no natural de la unión proteína-ubiquitina, y sobre la constatación de que el tiempo de la semi-desintegración de la proteína *in vivo* es función del N-terminal aminoácido de proteína.

La descripción del patente US5620923 (publicado 15.04.1997) presenta el modo de crear productos proteínicos sintéticos que contengan hasta cuarenta residuos aminoacídicos aproximadamente, aumentados de ubiquitina en la terminación de carboxilo y que se expresan en las células procarióticas, como *E. coli*. Se puede aplicar este proceso a la producción de los péptidos que contengan entre 2 hasta 40 residuos aminoacídicos aproximadamente y en particular está adaptado a la producción de los péptidos que contengan entre 5 hasta 40 residuos aminoacídicos.

La descripción del patente US 5494818 (publicado 27.02.1996) se refiere a la clase genérica de las proteasas ubiquitino-específicas que de una manera específica cortan/separan los grupos al lado del grupo del residuo C-terminal de ubiquitina en la proteína de fusión de ubiquitina, independientemente de su tamaño.

Más exactamente, el invento atañe a las proteasas ubiquitino-específicas de la clase aislada de la célula y de las secuencias DNA aisladas que codifican las proteínas de esta clase.

Los ensayos de fabricar los antígenos cuya meta eran las vacunaciones, efectuados en cultivos de las células de mamíferos o insectos, estaban relacionados con muy elevados costes, con la necesidad de un control continuo del proceso de síntesis y con una fina purificación de los preparados de vacunación, para que los mismos no constituyeran una potencial fuente de los factores que provoquen la aparición de las reacciones alérgicas o de auto-inmunológicas.

Los bioreactores vegetales son mucho más baratos y más seguros. Las proteínas formadas en una célula vegetal sobre la base del DNA exógeno tienen la idéntica composición de aminoácidos, experimentan modificaciones similares y adquieren propiedades análogas a las que aparecen en el proceso de patogenesis en el organismo del huésped. Las plantas transgénicas poseen un fragmento del DNA ajeno en todas sus células y es aquel que codifica el antígeno apropiado, y producen una determinada proteína antigénica. El introducido gen ajeno es transmitido a la progenie.

Las plantas modificadas pueden ser ingeridas estando crudas, gracias a lo cual se evitan gastos relacionados con la purificación del antígeno. La vía oral de inmunización parece ser la más cómoda visto el modo de administración no invasivo e indolor, una alta eficiencia de la respuesta sistémica (McGhee J.R., Lamm M.E., Strober W. 1999, en:

ES 2 288 223 T3

Mucosal Immunology (Ogra P.L., Lamm M.E., Bienenstock J., Mestecky J., Strober W., McGhee J.R., dir.), pp. 485-505, Academic Press).

5 Las descripciones del patente: US6281345 (publicado 28.08.2001), US6265198 (publicado 24.07.2001) presentan las composiciones farmacéuticas que contienen ácidos nucleínicos, proteínas, anticuerpos e inhibidores, y su aplicación para proteger los animales de las enfermedades causadas por los parásitos del sistema digestivo.

10 La descripción del patente US6066503 (publicado 23.05.2000) presenta una solución concerniente a las secuencias nucleotídicas que codifican las enzimas de la aminopeptidiasis de los parásitos del sistema digestivo, sus antígenos y equivalentes funcionales, y su aplicación como vacuna contra esos parásitos.

En la descripción del patente US5885814 (publicado 23.03.1999) ha sido presentada una vacuna contra los parásitos del sistema digestivo, que contiene la proteasa de serina obtenida de la fascioliasis hepática.

15 Las descripciones de los patentes US6419923 (publicado 22.07.2002), US6365392 (publicado 02.04.2002), US5795768 (publicado 18.08.1998), US5792624 (publicado 11.08.1998), US5750391 (publicado 12.05.1998) y US5691186 (publicado 25.11.1997), presentan los modos de obtención de proteínas de la proteinasa cisteínica, de los anticuerpos, de los compuestos que inhiben la actividad de la proteinasa cisteínica de las filarias, como también su aplicación en la composiciones farmacéuticas para proteger los animales contra las enfermedades causadas por los parásitos del sistema digestivo, y de las aisladas células recombinadas que las expresan. En la descripción US6365392 la composición que contiene diferentes partículas aisladas del ácido nucleírico es una vacuna del virus recombinado.

20 La descripción del patente US5863775 (publicado 26.01.1999) presenta el modo de combatir los parásitos del sistema digestivo en los animales que son huéspedes definitivos, que consiste en administrarle al animal, por vía oral, una proteína antiparasitológica en forma de medicina o de alimento, para que esta proteína llegue al parásito. La proteína antiparasitológica puede ser un inhibidor de la enzima del parásito, por ejemplo un inhibidor de una enzima digestiva como lo es el inhibidor de la proteinasa cisteínica. Conforme a esta solución, la proteína antiparasitológica es una proteína que se expresa en el maíz y arroz transgénicos, que son alimento para animales.

30 A pesar de las investigaciones preliminares descritas más arriba, dedicadas a obtener una vacuna contra la fascioliasis hepática, siempre sigue existiendo una necesidad de adquirir instrumentos eficaces que permitieran obtener de una manera fácil las eficaces vacunas inmunizadoras frente a este parásito.

35 El objetivo del presente invento es suministrar los medios que pudieran ser utilizados para obtener una vacuna frente a la fascioliasis hepática. Un objetivo particular del invento es suministrar las proteínas quiméricas que contuvieran antígenos seleccionados provenientes de la proteinasa cisteínica aislada de la *Fasciola hepatica* y que pudieran ser utilizadas en las vacunaciones contra la fascioliasis hepática, como también instrumentos que permitieran su expresión, sobre todo en los sistemas vegetales. Un objetivo particular del invento es suministrar los medios que permitieran obtener una planta transgénica que podría ser utilizada en la producción de las vacunas comestibles contra fascioliasis hepática.

40 De manera inesperada, la realización del objetivo definido de esta manera, y la solución de los problemas relacionados con las proteínas que se forman en las células sobre la base del DNA exógeno, han sido alcanzados en el presente invento.

45 El objeto del invento es la partícula del ácido nucleírico que codifica la proteína quimérica bajo el control del promotor constitutivo 35S CaMV y cuya característica es que la secuencia que codifica a la proteína quimérica está compuesta por una de las siguientes secuencias:

- 50
- una secuencia nucleotídica que codifica la secuencia aminoacídica del dominio catalítico de la proteinasa cisteínica de fascioliasis hepática, fusionada con una secuencia que codifica la proteína Core *HBC*,
 - una secuencia nucleotídica que codifica la secuencia aminoacídica del dominio de líder de la proteinasa cisteínica de fascioliasis hepática, fusionada con una secuencia que codifica la proteína Core *HBC*,
 - 55 - una secuencia nucleotídica que codifica la secuencia aminoacídica del dominio catalítico de la proteinasa cisteínica de fascioliasis hepática, fusionada con una secuencia que codifica la proteína Core *HBC* y residuos de glicina, o
 - 60 - una secuencia nucleotídica que codifica la secuencia aminoacídica del dominio catalítico de la proteinasa cisteínica de fascioliasis hepática, fusionada con una secuencia nucleotídica que codifica la ubiquitina.

65 Es preferible que la secuencia que codifica la proteína quimérica haya sido seleccionada entre las secuencias presentadas en las Fig. 1 - Fig. 14.

Es preferible que la célula vegetal contenga secuencias aminoácidas reservadas más arriba.

ES 2 288 223 T3

Otro objeto del invento es el modo de obtener una proteína quimérica que incluye la introducción del vector en las células *Agrobacterium tumefaciens* mediante la electroporación, luego la transformación de plantas mediante una cepa bacteriana que comprende ese vector, y la expresión de la proteína quimérica, conteniendo el vector el constructo que contiene una de las siguientes secuencias:

- 5
- una secuencia nucleotídica que codifica la secuencia aminoacídica del dominio catalítico de la proteinasa cisteínica de fascioliasis hepática, fusionada con una secuencia que codifica la proteína Core *HBC*,
 - 10 - una secuencia nucleotídica que codifica la secuencia aminoacídica del dominio de líder de la proteinasa cisteínica de fascioliasis hepática, fusionada con una secuencia que codifica la proteína Core *HBC*,
 - una secuencia nucleotídica que codifica la secuencia aminoacídica del dominio catalítico de la proteinasa cisteínica de fascioliasis hepática, fusionada con una secuencia que codifica la proteína Core *HBC* y residuos de glicina, o
 - 15 - una secuencia nucleotídica que codifica la secuencia aminoacídica del dominio catalítico de la proteinasa cisteínica de fascioliasis hepática, fusionada con una secuencia nucleotídica que codifica ubiquitina.

20 Otro objeto del invento es el modo de obtener una planta transgénica, que incluye la introducción del vector en las células *Agrobacterium tumefaciens* mediante la electroporación, la transformación de las plantas mediante una cepa bacteriana que comprende ese vector, y la regeneración de plantas, conteniendo el vector el constructo compuesto por una de las siguientes secuencias:

- 25
- una secuencia nucleotídica que codifica la secuencia aminoacídica del dominio catalítico de la proteinasa cisteínica de fascioliasis hepática, fusionada con una secuencia que codifica la proteína Core *HBC*,
 - una secuencia nucleotídica que codifica la secuencia aminoacídica del dominio de líder de la proteinasa cisteínica de fascioliasis hepática, fusionada con una secuencia que codifica la proteína Core *HBC*,
 - 30 - una secuencia nucleotídica que codifica la secuencia aminoacídica del dominio catalítico de la proteinasa cisteínica de fascioliasis hepática, fusionada con una secuencia que codifica la proteína Core *HBC* y residuos de glicina, o
 - una secuencia nucleotídica que codifica la secuencia aminoacídica del dominio catalítico de la proteinasa cisteínica de fascioliasis hepática, fusionada con una secuencia nucleotídica que codifica ubiquitina.
 - 35

Otro objeto del invento es una planta transgénica que posee células transformadas por un constructo que contenga una secuencia nucleotídica que se caracteriza por poseer células transformadas por el constructo compuesto por una de las siguientes secuencias:

- 40
- una secuencia nucleotídica que codifica la secuencia aminoacídica del dominio catalítico de la proteinasa cisteínica de fascioliasis hepática, fusionada con una secuencia que codifica la proteína Core *HBC*,
 - una secuencia nucleotídica que codifica la secuencia aminoacídica del dominio de líder de la proteinasa cisteínica de fascioliasis hepática, fusionada con una secuencia que codifica la proteína Core *HBC*,
 - 45 - una secuencia nucleotídica que codifica la secuencia aminoacídica del dominio catalítico de la proteinasa cisteínica de fascioliasis hepática, fusionada con una secuencia que codifica la proteína Core *HBC* y residuos de glicina, o
 - una secuencia nucleotídica que codifica la secuencia aminoacídica del dominio catalítico de la proteinasa cisteínica de fascioliasis hepática, fusionada con una secuencia nucleotídica que codifica ubiquitina.
 - 50

55 Otro objeto del invento es la aplicación de la planta transgénica transformada por un constructo que contenga una secuencia nucleotídica que codifica la secuencia aminoacídica de la proteína quimérica, que se caracteriza por lo que la proteína quimérica está compuesta por una de las siguientes secuencias:

- 60
- una secuencia del dominio catalítico de la proteinasa cisteínica de fascioliasis hepática, fusionada con una secuencia de la proteína Core *HBC*,
 - una secuencia del dominio de líder de la proteinasa cisteínica de fascioliasis hepática, fusionada con una secuencia de la proteína Core *HBC*,
 - 65 - una secuencia del dominio catalítico de la proteinasa cisteínica de fascioliasis hepática, fusionada con una secuencia de la proteína Core *HBC* y residuos de glicina, que forman una estructura del puente de glicina, o
 - una secuencia del dominio catalítico de la proteinasa cisteínica de fascioliasis hepática, fusionada con una secuencia de ubiquitina.

ES 2 288 223 T3

Otro objeto del invento es la composición farmacéutica que comprende una célula vegetal que contenga una secuencia nucleotídica que codifica la secuencia aminoacídica de la proteína quimérica, o una planta transgénica que posee las células transformadas con una secuencia nucleotídica que codifica la secuencia aminoacídica de la proteína quimérica, o sus tejidos, o productos de su transformación y, eventualmente, un soporte farmacéuticamente admisible, que se caracteriza por lo que una secuencia aminoacídica de la proteína quimérica está compuesta por una de las siguientes secuencias:

- una secuencia del dominio catalítico de la proteinasa cisteínica de fascioliasis hepática, fusionada con una secuencia de la proteína Core *HBc*,
- una secuencia del dominio de líder de la proteinasa cisteínica de fascioliasis hepática, fusionada con una secuencia de la proteína Core *HBc*,
- una secuencia del dominio catalítico de la proteinasa cisteínica de fascioliasis hepática, fusionada con una secuencia de la proteína Core *HBc* y residuos de glicina, que forman la estructura del puente de glicina, o
- una secuencia del dominio catalítico de la proteinasa cisteínica de fascioliasis hepática, fusionada con una secuencia de ubiquitina.

Es preferible que la composición farmacéutica sea un liofilizado.

Otro objeto del invento es una vacuna contra la fascioliasis hepática que comprende una célula vegetal que contenga una secuencia nucleotídica que codifica la secuencia aminoacídica de la proteína quimérica, o una planta transgénica que posea células transformadas con una secuencia nucleotídica que codifica la secuencia aminoacídica de la proteína quimérica, o sus tejidos, o los productos de su transformación y, eventualmente, un soporte farmacéuticamente admisible, que se caracteriza por lo que la secuencia aminoacídica de la proteína quimérica está compuesta por una de las siguientes secuencias:

- una secuencia del dominio catalítico de la proteinasa cisteínica de fascioliasis hepática, fusionada con una secuencia de la proteína Core *HBc*,
- una secuencia del dominio de líder de la proteinasa cisteínica de fascioliasis hepática, fusionada con una secuencia de la proteína Core *HBc*,
- una secuencia del dominio catalítico de la proteinasa cisteínica de fascioliasis hepática, fusionada con una secuencia de la proteína Core *HBc* y residuos de glicina, que forman una estructura del puente de glicina,
- una secuencia del dominio catalítico de la proteinasa cisteínica de fascioliasis hepática, fusionada con una secuencia de ubiquitina.

Es preferible que la vacuna tenga la forma de un liofilizado.

Es preferible que la vacuna sea una vacuna oral.

Otro objeto del invento es la célula vegetal reservada más arriba, o la planta transgénica reservada más arriba, para ser aplicadas en la inducción de la resistencia a infecciones por fascioliasis hepática en un mamífero.

Es preferible que el tratamiento sea suministrado por vía oral.

Conforme al invento, la secuencia codificadora de proteinasa ha sido dividida en tramos que codifican el dominio catalítico y el de líder de la enzima, porque la utilización de la secuencia total que codifica la proteinasa cisteínica podría hacer que se formara una enzima plenamente activa que mantendría su actividad hidrolítica que podría a su vez provocar trastornos en el desarrollo de las plantas transgénicas. En la realización particular del invento, estos fragmentos fueron fusionados con la secuencia que codifica la proteína Core *HBc* (núcleo "core" de la hepatitis B) del *HBV*. Esos genes quiméricos fueron colocadas bajo el control del promotor constitutivo 35S CaMV en el vector binario ROK2, obteniendo pMKCROK2 y pMLCROK2. Aparte de eso, fueron realizados los vectores utilizando la secuencia del dominio catalítico fusionado con la proteína Core *HBc* y varios residuos de glicina y además, la secuencia catalítica fue conectada a la ubiquitina. Estas plasmidas fueron introducidas en las plantas mediante procedimientos que permitían su integración al genoma de la planta.

Las figuras que siguen permiten explicar mejor la esencia del invento.

Figura 1 presenta una secuencia que codifica la proteína híbrida "fragmento Core *HBV*::parte de líder de la proteasa cisteínica de fascioliasis hepática". El fragmento ha sido introducido al vector ROK2 en los espacios creados después de la digestión con nucleasa restrictiva BamHI y SacI.

ES 2 288 223 T3

Figura 2 presenta una secuencia que codifica la proteína híbrida “fragmento Core HBV::parte catalítica de la proteasa cisteínica de fascioliasis hepática”. El fragmento ha sido introducido al vector pIGCmT7 en los espacios creados después de la digestión con nucleasa restrictiva NdeI y HindIII.

5 Figura 3 presenta una secuencia que codifica la parte catalítica de la proteasa cisteínica de fascioliasis hepática. El fragmento ha sido introducido al vector pIGCmT7 en los espacios creados después de la digestión con nucleasa restrictiva NdeI y HindIII.

10 Figura 4 presenta una secuencia que codifica la parte catalítica de la proteasa cisteínica de fascioliasis hepática. El fragmento ha sido introducido al vector Bluescript SK(-) en los espacios creados después de la digestión con nucleasa restrictiva BamHI y HindIII.

15 Figura 5 presenta una secuencia que codifica la parte catalítica de la proteasa cisteínica de fascioliasis hepática. El fragmento ha sido introducido al vector Bluescript SK(-) en los espacios creados después de la digestión con nucleasa restrictiva BamHI y HindIII.

20 Figura 6 presenta una secuencia que codifica la proteína híbrida “fragmento Core HBV::dominio catalítico de la proteasa cisteínica de fascioliasis hepática”. El fragmento ha sido introducido al vector ROK2 en los espacios creados después de la digestión con nucleasa restrictiva BamHI y SacI.

Figura 7 presenta una secuencia que codifica la proteína híbrida ubiquitina::parte catalítica de la proteasa cisteínica de fascioliasis hepática”. El fragmento ha sido introducido al vector ROK2 en los espacios creados después de la digestión con nucleasa restrictiva XbaI y BamHI.

25 Figura 8 presenta una secuencia que codifica la proteína híbrida “fragmento Core HBV::parte de líder de la proteasa cisteínica de fascioliasis hepática. El fragmento ha sido introducido al vector pIGCmT7 en los espacios creados después de la digestión con nucleasa restrictiva NdeI y HindIII.

30 Figura 9 presenta una secuencia que codifica la parte catalítica de la proteasa cisteínica de fascioliasis hepática. El fragmento ha sido introducido al vector pIGCmT7 en los espacios creados después de la digestión con nucleasa restrictiva NdeI y HindIII.

35 Figura 10 presenta una secuencia que codifica la proteína híbrida “fragmento Core HBV::parte catalítica de la proteasa cisteínica de fascioliasis hepática”. El fragmento ha sido introducido al vector pIGCmT7 en los espacios creados después de la digestión con nucleasa restrictiva NdeI y HindIII.

40 Figura 11 presenta una secuencia que codifica la proteína híbrida “fragmento Core HBV::parte catalítica de la proteasa cisteínica de fascioliasis hepática”. El fragmento ha sido introducido al vector Bluescript SK (-) en los espacios creados después de la digestión con nucleasa restrictiva EcoRI y HindIII.

Figura 12 presenta una secuencia que codifica la proteína híbrida “ubiquitina::parte catalítica de la proteasa cisteínica de fascioliasis hepática”. El fragmento ha sido introducido al vector Bluescript SK(-) en los espacios creados después de la digestión con nucleasa restrictiva EcoRI y XhoI.

45 Figura 13 presenta una secuencia que codifica la proteína híbrida “fragmento Core HBV::parte de líder de la proteasa cisteínica de fascioliasis hepática”. El fragmento ha sido introducido al vector ROK2 en los espacios creados después de la digestión con nucleasa restrictiva BamHI y SacI.

50 Figura 14 presenta una secuencia que codifica la proteína híbrida “fragmento Core HBV::parte catalítica de la proteasa cisteínica de fascioliasis hepática”. El fragmento ha sido introducido al vector ROK2 en los espacios creados después de la digestión con nucleasa restrictiva BamHI y Asp718. Al comienzo (hasta el lugar de corte con nucleasa restrictiva EcoRI) y al final (desde el lugar de corte con nucleasa restrictiva HindIII), el fragmento clonado contiene una secuencia proveniente del vector Bluescript SK (-).

55 Figura 15 presenta el análisis de transformantes con el método PCR, utilizando los iniciadores oligonucleotídicos específicos. Ha sido confirmada la presencia de los transgenos en el vector: a - pMKCROK2, *A. tumefaciens* LBA4404pMKCROK2, b - pMLCROK2, *A. tumefaciens* LBA4404pMLCROK2, c - *A. tumefaciens* EHA105MOTUBIKatROK, d - *A. tumefaciens* EHA105MOTGlyKatROK;

60 Figura 15a: 1-8. *A.t* LBA4404 pMKCROK2, 9. control negativo, 10. marcador DNA 1 kbp (Sigma), *E. coli* pMKCROK2, 18. control positivo, pMKCROK2;

Figura 15b: 1-5. *A.t*LBA4404 pMLCROK2, 6-8. *E. coli* pMLCROK2, 9. marcador DNA 1kbp (Sigma), 10 control positivo pMLCROK2;

65 Figura 15c: 1-10. *A. tumefaciens*, EHA105MOTUBIKatROK, 11. control positivo pMOTUBIKatROK, 12. marcador DNA 1 kbp (Sigma);

ES 2 288 223 T3

Figura 15d: 1-10 *A. tumefaciens* EHA105MOTGlyKatROK, 11 control positivo MOTGlyKatROK, 12. marcador DNA 1 kbp (Sigma).

Figura 16 presenta el análisis PCR bajo el ángulo de la presencia de una secuencia híbrida MotKat - C, MotLid - C, MotKatGly - C, MotKatUbi. Fueron utilizados los iniciadores MotL5 y MotL3, específicos para el dominio de líder utilizado; Mot5 y MotK3 para la secuencia del dominio catalítico; MOTGly5 y MOTGly3 para el dominio que contenga el puente de glicina, y UBIROCK y MOTKATRO para el constructo que contenga la secuencia de ubiquitina.

Figura 16a: lechuga no transformada 1 - control negativo, 2 control positivo pMKCROK, 3. agua - control negativo, 5. marcador DNA 1kbp (Sigma), 6-14. muestras DNA de las plantas transgénicas;

Figura 16b: 1- marcador DNA 1kbp (Sigma), 2-12 muestras DNA de las plantas transgénicas; control positivo pMLCROK; agua - control negativo

Figura 16c: 1- marcador DNA 1kbp (Sigma), 2-6 muestras DNA de las plantas transgénicas; control positivo p35SMOTGlyKatRok;

Figura 16d: 1-4 muestras DNA de las plantas transgénicas, 5 control positivo p35SMOTUBIROK, 6 marcador DNA 1kbp (Sigma)

Figura 17 presenta el análisis PCR de la generación T1 de las plantas transformadas de lechuga para la presencia de los transgenos: a- MotKat -C, b - MotLid - C, c - MotKatGly - C, d - MotKatUbi;

Figura 17a: 1-14. genotipo A1, 15. control positivo, 16. control negativo, 12. marcador DNA 1 kbp;

Figura 17b: 1-12. genotipo A1, 14-20. genotipo A2, 22. control positivo, 23. control negativo, 13,24. marcador DNA 1 kbp.;

Figura 17c: 1-2. control positivo, 3. control negativo, 4. marcador DNA 1 kbp., 5-13. genotipo A1;

Figura 17d: 1. marcador DNA 1 kbp., 2-12. genotipo A1, 13. control negativo, 14. control positivo

Figura 18 presenta la hibridización tipo Western de un extracto proteínico del liofilizado de lechuga transformada mediante el vector pMLCROK2 donde las pistas representan:

1. marcador proteínico (Promega)
2. preparado proteínico del liofilizado de control, no transformado
3. preparado proteínico del liofilizado de control, no transformado con el antígeno (100 ng) como aditivo
4. control positivo, la proteína híbrida purificada que contiene el dominio de líder de la proteinasa cisteínica fusionado con la proteína c del virus *HBV* (100 ng)
- 5,6. preparado proteínico del liofilizado transgénico, ha sido marcado producto - la proteína antigénica de tamaño 28,8 kDa.

Figura 19 presenta la hibridización tipo Western de extracto proteínico del liofilizado de lechuga transformada mediante el vector pMKCROK2 donde las pistas representan:

1. marcador proteínico (Promega)
2. preparado proteínico del liofilizado de control, no transformado
3. preparado proteínico de la planta de control, no transformada con el antígeno (100 ng) como aditivo
4. control positivo, proteína híbrida purificada que contiene el dominio catalítico de la proteinasa cisteínica fusionado con la proteína c del virus *HBV* (100 ng)
- 5,6. preparado proteínico del liofilizado transgénico, producto marcado: proteína antigénica de tamaño 43,2 kDa

Figura 20 presenta la hibridización tipo Western de extracto proteínico del liofilizado de lechuga transformada mediante el vector p35SMOTUBIROK donde las pistas representan:

1. marcador proteínico (Invitrogen)
2. preparado proteínico del liofilizado de control, no transformado

ES 2 288 223 T3

3. preparado proteínico del liofilizado de control, no transformado con el antígeno (100 ng) como aditivo
4. control positivo, proteína híbrida purificada que contiene el dominio catalítico de la proteinasa cisteínica (100 ng)
- 5,6. preparado proteínico del liofilizado transgénico, producto marcado: proteína antigénica de tamaño 26,8 kDa.

Figura 21 presenta la hibridización tipo Western de extracto proteínico del liofilizado de lechuga transformada mediante el vector p35SMOTGlyKatRok donde las pistas representan:

1. marcador proteínico (Invitrogen)
2. preparado proteínico del liofilizado de control, no transformado
3. preparado proteínico del liofilizado de control, no transformado con el antígeno (100 ng) como aditivo
4. control positivo, proteína híbrida purificada que contiene el dominio catalítico de la proteinasa cisteínica (100 ng)
- 5,6. preparado proteínico del liofilizado transgénico, producto marcado: proteína antigénica de tamaño 48 kDa.

Figura 22 presenta el análisis con el método inmunoenzimático ELISA para confirmar la expresión del antígeno en las plantas de lechuga:

- a) control de plantas en las que fue introducida un fragmento de líder de la proteinasa cisteínica fusionada con la proteína c del virus *HBV* donde:
 - c- - extracto proteínico de lechuga no transgénica o
 - extracto proteínico de lechuga no transgénica con el antígeno 0,5 ng, 1 ng, 2 ng, 3 ng, 8 ng como aditivo
 - 1-12: extracto proteínico de lechuga transgénica que contenía una secuencia de líder de la proteinasa cisteínica fusionado con la proteína c del virus *HBV*
- b) control de plantas en las que fue introducida una secuencia catalítica de la proteinasa cisteínica fusionada con la proteína c del virus *HBV* donde:
 - 1-22: extracto proteínico de lechuga transgénica que contenía una secuencia catalítica de la proteinasa cisteínica fusionado con la proteína c del virus *HBV*, extracto proteínico de lechuga no transgénica
- c) control de plantas en las que fue introducida una secuencia catalítica de la proteinasa cisteínica fusionada con la proteína c del virus *HBV* y puente de glicina donde:
 - 1-9 - extracto proteínico de lechuga transgénica que contenía una secuencia catalítica de la proteinasa cisteínica fusionado con la proteína c del virus *HBV* y puente de glicina
 - c- - extracto proteínico de lechuga no transgénica
 - extracto proteínico de lechuga no transgénica con el antígeno 5 ng, 10 ng, 20 ng como aditivo
- d) control de plantas en las que fue introducida una secuencia catalítica de la proteinasa cisteínica fusionada con la ubiquitina donde:
 - 1-10 - extracto proteínico de lechuga transgénica que contenía una secuencia catalítica de la proteinasa cisteínica fusionado con la proteína c del virus *HBV* y puente de glicina
 - c- - extracto proteínico de lechuga no transgénica
 - extracto proteínico de lechuga no transgénica con el antígeno 5 ng, 10 ng como aditivo

Figura 23 presenta el análisis con el método inmunoenzimático ELISA para confirmar la expresión del antígeno en el liofilizado de lechuga:

- a) análisis del liofilizado que contenía una secuencia del dominio de líder de la proteinasa cisteínica fusionada con la proteína c del virus *HBV* donde:
 - liofilizado de lechuga transgénica

ES 2 288 223 T3

- liofilizado de lechuga no transgénica
- liofilizado de lechuga no transgénica con el antígeno 1,5 ng, 6 ng, 12 ng como aditivo
- 5 - II anticuerpo - control negativo, sistema sin aditivo II del anticuerpo policlonal anti L5

b) análisis de liofilizado que contenga una secuencia del dominio catalítico de la proteinasa cisteínica fusionada con la proteína c del virus *HBV* donde:

- 10 - liofilizado de lechuga transgénica
- liofilizado de lechuga no transgénica
- 15 - liofilizado de lechuga no transgénica con el antígeno 1,5 ng, 6 ng, 12 ng como aditivo
- II anticuerpo - control negativo, sistema sin aditivo II del anticuerpo policlonal anti K4

20 Figura 24 presenta una prueba efectuada mediante el método inmunoenzimático ELISA: a - del suero de animales de experimentación (ratones) para la presencia de los anticuerpos IgG específicos para el antígeno de la fascioliasis hepática administrado, la proteína híbrida compuesta de una secuencia de líder de la proteinasa cisteínica fusionada con la proteína capsídica del virus *HBV* donde:

- 25 - m A ratones alimentados con lechuga transgénica
- m E ratones alimentados con lechuga no transgénica
- 30 - m F ratones a los que fue administrado tampón fosfórico

35 Figura 25 presenta una prueba efectuada mediante el método inmunoenzimático ELISA: a - de suero y b - de las heces de animales de experimentación (ratones) para la presencia de los anticuerpos IgG (suero) y IgA (heces) específicos para el antígeno de la fascioliasis hepática administrado, la proteína híbrida compuesta del dominio catalítico de la proteinasa cisteínica de fascioliasis hepática y de la proteína capsídica del virus *HBV* donde:

- m B ratones alimentados con lechuga transgénica
- 40 - m E ratones alimentados con lechuga no transgénica
- m F ratones a los que fue administrado tampón fosfórico

45 Figura 26 presenta una prueba efectuada mediante el método inmunoenzimático ELISA: a - de suero y b - de las heces de animales de experimentación (ratones) para la presencia de los anticuerpos IgG (suero) y IgA (heces) específicos para el antígeno de la fascioliasis hepática administrado, la proteína híbrida compuesta del dominio catalítico de la proteinasa cisteínica de fascioliasis hepática y de la proteína de ubiquitina donde:

- 50 - m C ratones alimentados con lechuga transgénica
- m E ratones alimentados con lechuga no transgénica
- 55 - m F ratones a los que fue administrado tampón fosfórico

60 Figura 27 presenta una prueba efectuada mediante el método inmunoenzimático ELISA: a - de suero y b - de las heces de animales de experimentación (ratones) para la presencia de los anticuerpos IgG (suero) y IgA (heces) específicos para el antígeno de la fascioliasis hepática administrado, la proteína híbrida compuesta del dominio catalítico de la proteinasa cisteínica de fascioliasis hepática y de la proteína capsídica del virus *HBV* y residuos de glicina donde:

- m D ratones alimentados con lechuga transgénica
- 65 - m E ratones alimentados con lechuga no transgénica
- m F ratones a los que fue administrado tampón fosfórico

ES 2 288 223 T3

Figura 28 presenta la plasmida bacteriana de expresión pIGCmT7 (4056 bp) diseñada sobre la base de la plasmida pIGDM1ⁱ que es una plasmida perteneciente al grupo ColE1 Enterobacter agglomerans. La plasmida pIGCmT7 fue creada introduciendo el gen de resistencia a cloramfenicol, el polilinker junto al promotor RNA de la polimerasa del fago T7 y una secuencia que codifica el codón stop de transcripción proveniente del fago T7, donde:

5 ARG t-RNA - gen de arginina tRNA para los codones AGA y AGG

ORI - origen de replicación de la plasmida pIGDM1

10 Cm-R - gen de resistencia a cloramfenicol

T7 - promotor

stop - terminación de transcripción

15 Figura 29 presenta una plasmida vegetal de expresión ROK2 donde:

20 RB - secuencia por el flanco derecho

LB - secuencia por el flanco izquierdo

pNOS - promotor Nos

25 NPT II (Canamicina R) - gen de resistencia a canamicina

tNOS - terminador Nos

30 pCaMV 35S - promotor del virus del mosaico de coliflor

Más abajo están presentadas las realizaciones ejemplares del invento definido más arriba.

Ejemplo 1

35 *Construcción de vectores para la transformación de plantas*

La primera variante se refería a la construcción del vector pMKC35SROK que contenía una secuencia del dominio catalítico de la proteinasa cisteínica fusionada con una secuencia que codificaba la proteína Core *HBc* (*hepatitis B core*) del virus *HBV*.

La segunda variante de experiencia se refería a la construcción del vector pMLC35SROK que contenía una secuencia del dominio de líder de la proteinasa cisteínica fusionada con una secuencia que codificaba la proteína Core *HBc* (*hepatitis B core*) del virus *HBV*.

La tercera variante se refería a la construcción del vector p35SMOTKatUBIROK que contenía una secuencia del dominio catalítico de la proteinasa cisteínica fusionada con una secuencia que codificaba la ubiquitina.

La cuarta variante se refería a la construcción del vector p35SMOTGlyKatROK que contenía una secuencia del dominio catalítico de la proteinasa cisteínica fusionada con una secuencia que codificaba la ubiquitina y residuos de glicina.

Las bacterias suspendidas en glicerol y almacenadas en un ultraconglador (temperatura -70°C) fueron descongeladas en el baño de hielo. A las bacterias descongeladas se les añadió 1-20 ng del DNA plasmídico, revolviendo la mezcla suavemente e incubándola en hielo durante 2 a 6 minutos. Las bacterias fueron trasladadas a una cubeta enfriada para la electroporación. La cubeta era colocada en un electroporador y se aplicaba la corriente. La electroporación se efectuaba con 25 μ F y 2500 V. Después de la electroporación, las bacterias eran suspendidas en 1 ml de sustancia nutritiva SOC y trasladadas al matraz. Las bacterias eran sacudidas durante 1 a 2 horas en la temp. 28°C, 50-60 rpm. Después de la incubación, la suspensión era sembrada en el medio de cultivo YEB con antibióticos: rifampicina 100 mg/l y canamicina 50 mg/l, y cultivada durante 2 días en la temp. 28°C.

Una selección preliminar de células transformadas fue efectuada en la sustancia nutritiva con factores selectivos de rifampicina 100 mg/l y canamicina 50 mg/l como aditivos. El segundo método era la visualización del tramo introducido de DNA mediante su amplificación con el método PCR (en células *A. tumefaciens* cocinadas durante 10 min. en 150 μ l de agua) utilizando los iniciadores oligonucleotídicos específicos.

Las agrobacterias crecidas fueron sembradas en 10 ml de sustancia nutritiva líquida YEB con antibióticos en concentración de rifampicina 100 mg/l y canamicina 50 mg/l en los matraces Erlenmayer de 100 ml y cultivadas en la

ES 2 288 223 T3

temp. 28°C. Después de 16 a 20 horas de cultivo con la suspensión, las agrobacterias fueron inoculadas en un fresco medio de cultivo YEB con antibióticos: rifampicina 100 mg/l y canamicina 50 mg/l en relación 1:100 y se seguía el cultivo en la temp. 28°C hasta que las bacterias alcanzaran la fase logarítmica de crecimiento. La fase de crecimiento de las bacterias fue evaluada sobre la base de medición OD de la suspensión, con 600 nm de longitud de onda.

5

Ejemplo 2

Transformación y obtención de plantas transgénicas

10

CUADRO 1

Variantes de experiencia realizadas

15

Variante de experiencia	Cepa <i>Agrobacterium</i>	Variante de lechuga
LT-12	<i>A. tumefaciens</i> LBA4404 pMKC35SROK	Syrena
LT-13	<i>A. tumefaciens</i> LBA4404 pMLC35SROK	Bipp Burple
LT-14	<i>A. tumefaciens</i> EHA105MOTUBIROK	Aramir
LT-15	<i>A. tumefaciens</i> EHA105MOTGlyKatROK	Aramir

35

Las semillas fueron recogidas en el matraz y durante 2 min, enjuagadas en etanol 70%. Luego el etanol fue eliminado y las semillas enjuagadas con agua aséptica. Más tarde, durante 20 minutos estuvieron incubadas en una solución 25% del blanqueador comercial Clorox, con el detergente Tween 20 (concentración 0,01%) como aditivo. Después, el material fue lavado 4-5 veces, cada vez 2-3 minutos con agua destilada aséptica, hasta que el Clorox estuviera totalmente eliminado. Las semillas esterilizadas de lechuga fueron colocadas en platillos con agar 0,8%. Las semillas germinaban en la temp. 22-24°C, en las condiciones de un alumbramiento débil. Después de transcurridos 2-3 días, fueron cortados los cotiledones que, a su turno, eran colocados en la suspensión *A. tumefaciens* e incubados durante 10 min., siendo suavemente removidos. Después de la inoculación, los cotiledones eran colocados, con su lado inferior para abajo, encima del medio de cultivo LR3A. La cocultura fue llevada durante 2-4 días, en la oscuridad, en la temp. 28°C. Después de terminada la cocultura, los cotiledones fueron trasladados en un medio de cultivo selectivo LR3A con antibióticos concentrados: canamicina 200 mg/l y aumentina 300 mg/l.

40

45

Cada 5 días, los cotiledones en los que se había formado el callus, estaban reinoculados en un medio de cultivo LR3A fresco con antibióticos concentrados: canamicina 200 mg/l y aumentina 300 mg/l. Las plantas que se regeneraban estaban cortadas del callus y reinoculadas en el medio de cultivo LR2A con antibióticos concentrados: canamicina 200 mg/l y aumentina 300 mg/l. Cuando las plantas alcanzaban 2-3 cm, fueron trasladadas a los frascos con el medio de cultivo 1/2SH, con antibióticos concentrados: canamicina 200 mg/l y aumentina 300 mg/l. Las plantas arraigadas fueron plantadas en macetas con arena mezclada con perlita en relación 1:1 y adaptadas a las condiciones *in vivo*.

50

55

Las semillas recogidas de los transformantes iniciales fueron esterilizadas y colocadas en las placas Petri con agar 0,8% y antibióticos como aditivo: canamicina 200 mg/l y aumentina 300 mg/l. Las semillas germinaban durante 1-2 días en la temperatura de 28°C en la oscuridad. Las plantas de semillero que se desarrollaban, fueron trasladadas a las macetas y adaptadas a las condiciones *in vivo*.

60

65

ES 2 288 223 T3

Regeneración de las plantas

CUADRO 2

Condiciones de regeneración de las plantas

Cultivo de plantas en las condiciones in vitro, en sala de cultivos	Cultivo de plantas en las condiciones in vivo, en invernadero
- temperatura 22 - 24°C	- temperatura 18 - 22 °C de día, 14-18 °C de noche
- fotoperíodo 16/8 (16 horas de luz y 8 de oscuridad)	- fotoperíodo 14/10 (14 horas de luz y 10 de oscuridad)
- intensidad de la luz fluorescente ca. 3000 lux	en la temporada otoño-invierno; alumbramiento natural en primavera y verano.
	- fertilización: azofosca

Ejemplo 3

Expresión y análisis

Análisis de las bacterias transformadas

La selección inicial de transformantes se realizó en una sustancia nutritiva con un factor selectivo como aditivo, en donde había sido introducido el factor de resistencia DNA (rifampicina 100 mg/ml, canamicina 50 mg/ml).

La etapa siguiente era el análisis de los transformantes con el método PCR, utilizando los iniciadores oligonucleotídicos específicos.

(Tabla pasa a página siguiente)

ES 2 288 223 T3

CUADRO 3

Iniciadores oligonucleotídicos utilizados en las reacciones PCR y en el secuenciado

gen	iniciador	secuencia de iniciador	t° conexión, °C	tamaño del producto, pz
MotLidC	MOTL5	GGA TCC ATA TGT CGA ATG ATG ATT TG	65	240
	MOTL3	ATA CGA TTG TTC GTC TCA TAC GGG A	65	
MotKatC	MOT5	TGA CTG GCG TGA ATC TGG TTA TG	65	546
	MOTK3	TTC CAC ACA TGT TAC CTC GAT TCC	65	
MotKatG ly	MOTGly5	GAA TTT GGA GCT ACT GTG GAG	58	1170
	MOTGly3	AGC TTA AAC AAC AGT AGT CTC CG	58	
MotKatU bi	UBIROCK	GGG GTC TAG ACC ATG CAG ATT TTC GTC AAA ACT TTG	100	912
	MOTKATRO	GGG GAT CCT TAA TGG ATG CCG GAA ATC GTG CC	100	

La confirmación de la presencia de los transgenos en el vector: a - pMKCROK2, *A. tumefaciens* LBA4404pMKCROK2, b - pMLCROK2, *A. tumefaciens* LBA4404pMLCROK2, c - *A. tumefaciens* EHA105MOTUBIKatROK, d - *A. tumefaciens* EHA105MOTGlyKatROK ha sido presentada en la fig. 15.

Análisis de los híbridos de la generación T0 utilizando el método PCR

Las plantas transgénicas obtenidas fueron verificadas en cuanto a la presencia de la secuencia híbrida MotKat - C, MotLid - C, MotKatGly - C y MotKatUbi, utilizando el método PCR. Fueron utilizados los iniciadores MotL5 y MotL3 específicos para la secuencia del dominio de líder, Mot5 y MotK3 para la secuencia del dominio catalítico, MOTGly5 y MOTGly3 para el dominio que contenga el puente de glicina, y UBIROCK y MOTKATRO para el constructo que contenga una secuencia de ubiquitina.

La verificación de las transformadas plantas de lechuga para la presencia de los transgenos: a- MotKat - C, b- MotLid - C, c- MotKatGly - C y d- MotKatUbi ha sido presentada en la fig. 16.

La etapa siguiente consistía en producir una generación de transformantes T1, genéticamente homogénea. Fueron seleccionados diez semillas de 5 líneas de transformantes F0, y luego, con el método PCR, se analizaba las plantas para la presencia de secuencias de los genes introducidos.

La verificación de la generación T1 de las plantas transformadas de lechuga para la presencia de los transgenos: a- MotKat -C, b - MotLid - C, c- MotKatGly - C y d- MotKatUbi ha sido presentado en la fig. 17.

ES 2 288 223 T3

Análisis de los transformantes obtenidos T1 obtenidos con métodos inmunológicos

La utilización de los métodos inmunológicos nos permite descubrir el nivel de expresión en la proteína.

5 Hasta el momento, no disponemos de los anticuerpos monoclonales anti- MotKat y anti- MotLid. En cambio, disponemos de los anticuerpos policlonales. Las proteínas híbridas pueden ser detectadas utilizando los anticuerpos monoclonales anti-C que poseemos en el laboratorio y los anticuerpos policlonales anti-MotKat y anti-MotLid, en el análisis Western blot o en el test de sandwich ELISA.

10 De los liofilizados fue aislada la proteína para la hibridación tipo Western Blot. Se obtuvo un resultado positivo que indica la presencia de proteína en las plantas [fig. 18, 19, 20, 21].

15 Análisis tipo Western no es un método que permita estimar con exactitud la cantidad de proteína. Además, tal como se nota en los geles, la proteína puede sufrir fragmentación o agregación, entonces en el control positivo no obtenemos una sola banda distinguible. No hay que olvidar que la proteína introducida en la planta es una proteína quimérica que aparte del dominio de fascioliasis contiene una proteína virulenta. Esta proteína tiene la capacidad de formar estructuras parecidas a las cápsidas virulentas. De allí, a pesar de que el análisis Western es realizado en las condiciones desnaturizantes, una parte del dominio queda ligada, emitiendo señales adicionales sobre el gel en forma de una mayor cantidad de bandas.

20 Para estimar con más exactitud el contenido de antígeno en el material vegetal, se aplicó el test elaborado ELISA.

25 La placa Maxisorp (Nunc) fue revestida con anticuerpos monoclonales anti- c (*Mab to HBc Ag*) suspendidos en el tampón carbónico pH=9,6 en dilución 1:5000, y estuvo incubada en la temp. 37°C, durante 3 horas. Luego, fue enjuagada tres veces con el tampón fosfórico PBS pH=7,4 con 0,05% Tween 20 como aditivo. En la etapa siguiente se realizó un bloqueo de la placa con 5% leche desengrasada disuelta en el tampón PBS, en el volumen 390 μ l por pozo. Después de 30 min. la placa fue enjuagada según lo escrito arriba y revestida con el antígeno (antígeno puro, las plantas transformadas, liofilizado de hojas de las plantas transformadas). Esta etapa del experimento estuvo llevada a cabo en la noche, en la temp. 4°C. Luego, la placa fue enjuagada de nuevo y revestida con anticuerpos policlonales de conejo dirigidos contra el dominio de líder o dominio catalítico de la proteinasa cisteínica de fascioliasis hepática respectivamente, suspendidos en el tampón PBS, de 100 μ l/pozo de volumen y en dilución 1:1000 o 1:2000. La placa estuvo incubada en la temp. 37°C, con 100 rpm, durante 1 hora, luego enjuagada y revestida con anticuerpos monoclonales anti-ratón IgG (partícula entera) conjugados con fosfatasa alcalina (Sigma) suspendida en el tampón PBS, de 100 μ l/pozo de volumen, en dilución 1:20000. La etapa estuvo llevada a cabo en la temp. 37°C, durante 35 1 hora. Luego, fue provocada una reacción de colores después de añadido el substrato (de marca INC): 2-amino-2-metil-1,3 propanodiol (concentrado 10 veces) y la solución acuosa de p-nitrofenilfosfato (concentrada 50 veces) y completada hasta el volumen deseado con agua MQ. El volumen del substrato por pozo era de 100 μ l. Estuvo incubado en la oscuridad durante 30 min. La lectura de reacción fue efectuada con la longitud de onda $\lambda=405$ nm en el lector de placas BioRad Modelo 550.

40 Fueron analizadas las plantas de la generación T1 (transformantes T1) con el test ELISA para la presencia de proteínas híbridas, con el objetivo de seleccionar las plantas que demuestran la más alta expresión. Sólo las plantas con la expresión más alta de antígeno estuvieron cultivadas para la masa verde [fig. 22a, 22b, 22c, 22d].

45 El resultado del test ELISA muestra que no en todas las plantas se produce la expresión de proteína, a pesar de que a nivel del DNA son transgénicas. Parece entonces justificable someter las plantas a un test inmunológico, antes de proceder a almacenar el material por la liofilización. Gracias a ello, podemos eliminar las plantas que dan una baja señal y por esto mismo “diluyen” la concentración del antígeno en el liofilizado.

50 La hojas de las plantas que durante el test ELISA dieron la señal más fuerte, fueron recogidas y liofilizadas para concentrar el material. El material obtenido que provenía de dos variantes experimentales y que contenía el dominio de líder o dominio catalítico de la proteinasa cisteínica, fusionada con la proteína c del virus HBV como antígeno, fue verificado mediante el test ELISA, para determinar la cantidad del antígeno para los futuros experimentos [fig. 23a, 23b].

55 Los tests efectuados muestran que gracias a la selección de plantas hemos logrado obtener un alto nivel del antígeno en el liofilizado. Gracias al específico test inmunológico, fue posible determinar el nivel del antígeno en los liofilizados y planificar una inmunización experimental de animales. El test ELISA muestra que el nivel del antígeno es de 10 μ g aproximadamente en 1 g de liofilizado que contiene el dominio de líder del gen de proteinasa cisteínica fusionada con la proteína c del virus HBV y 12 μ g de antígeno por 1 g de liofilizado que contiene el dominio catalítico del gen de proteinasa cisteínica fusionada con la proteína c del virus HBV.

65

ES 2 288 223 T3

Ejemplo 4

Inmunización de los ratones con un material transgénico: liofilizado de lechuga

5 1. Grupos de ratones

En la experiencia fueron utilizadas hembras de ratones de raza Balb/C, de 10 semanas de edad. Los animales eran criados en las condiciones asépticas, en jaulas aisladas, y recibían agua y alimentos de autoclave. Estaban divididos en 8 grupos de experimentación de a 6 ratones cada uno:

- 10 A - grupo al que fue administrado un liofilizado que contenía un antígeno - la proteína híbrida compuesta del dominio de líder del gen de proteinasa cisteínica fusionada con la proteína c del virus HBV
- 15 B - grupo al que fue administrado un liofilizado que contenía un antígeno - la proteína híbrida compuesta del dominio catalítico del gen de proteinasa cisteínica fusionada con la proteína c del virus HBV
- 20 C - grupo al que fue administrado un liofilizado que contenía un antígeno - la proteína híbrida compuesta del dominio catalítico del gen de proteinasa cisteínica fusionada con la proteína c del virus HBV y puente de glicina
- D - grupo al que fue administrado un liofilizado que contenía un antígeno - la proteína híbrida compuesta del dominio catalítico del gen de proteinasa cisteínica fusionada con la ubiquitina
- 25 E - grupo al que fue administrado un liofilizado de lechuga no transgénica- variante Bipp Burple
- F - grupo al que fue administrado un liofilizado de lechuga no transgénica- variante Syrena
- G - grupo al que fue administrado un liofilizado de lechuga no transgénica- variante Aramir
- 30 H - grupo al que fue administrado el tampón PBS

2. Material vegetal utilizado para el análisis

35 Un liofilizado de hojas de lechuga, variante Bipp Burple, Aramir y Syrena, que contenga la proteína quimérica, secuencia de líder de la proteinasa cisteínica fusionado con la proteína c del virus HBV (variante Bipp Burple), un liofilizado de hojas de lechuga que contenga la secuencia del dominio catalítico fusionado con la proteína c del virus HBV (variante Syrena), un liofilizado de hojas de lechuga que contenga la secuencia del dominio catalítico fusionado con la proteína c del virus HBV y el puente de glicina (variante Aramir), y un liofilizado de hojas de lechuga que contenga la secuencia del dominio catalítico fusionado con la ubiquitina (variante Aramir). Como material de control fue utilizado el liofilizado de lechuga no transgénica de la misma variante que la lechuga transgénica. El material vegetal fue suspendido en el tampón PBS, obteniendo una papilla semilíquida (250 μ l) cuya consistencia facilitaba la administración. El material vegetal era bien tolerado por los animales.

45 3. Administración de antígeno

El liofilizado fue administrado por vía alimentaria mediante un tubo gástrico. Se apartaba el alimento 12 horas antes de la inmunización.

50 4. Esquema de inmunización

- a) Grupos inmunizados A, B, C y D recibieron un liofilizado de lechuga transgénica.
Grupos de control E, F y G recibieron un liofilizado de lechuga no transgénica.
55 Grupo H recibió el tampón PBS.
- b) Inmunización doble con un intervalo de 30 días.
- c) La dosis de cada una de las inmunizaciones para el respectivo grupo de ratones era la siguiente:
- 60 Dosis de antígeno:
1 g de liofilizado contiene:
MLC - 10 μ g de antígeno
65 MKC - 12 μ g de antígeno

ES 2 288 223 T3

MKCGly- sin definición

MKCubi- sin definición

5 La los ratones se les administra el antígeno en dosis de a 100 ng (de a 10 mg de liofilizado MLC y 8,3 g de liofilizado MKC y 10 mg MKCGly y MKUbi respectivamente) suspendido en 250 μ l de tampón PBS. Durante 12 horas después de administrado el antígeno a los ratones, estaba eliminado el alimento.

5. Toma del material de animales

10 La toma de sangre se efectúa a partir del plexo retrobulbar, con un tubo capilar, en cantidad de 150 μ l, antes de comenzar el experimento, los días 14, 30 y 45 de la duración del experimento. La toma de las heces: antes de la inmunización y los días 1, 14 30 y 45 de la duración del experimento.

15 6. Preparación del material para el análisis

Sangre

20 a) inmediatamente después de tomar el material, éste fue sometido a la separación en las centrifugas Eppendorf, 4°C, 3 rpm, 20 min.

b) el suero separado estuvo guardado en la temp. -20°C hasta efectuarse las análisis.

Heces

25 a) el material tomado fue triturado en el tampón PBS, en relación 1:5, con un majadero de polipropileno;

b) centrifugación 10 min, 4°C, 12 rpm;

30 c) el supernatante fue separado y almacenado en la temp. de -20°C para los análisis siguientes.

7. Análisis inmunológica

35 Las muestras tomadas, después de ser descongeladas, son utilizadas para las pruebas efectuadas mediante el método ELISA de alta sensibilidad.

a) La placa PoliSorp (Nunc) fue revestida con el antígeno E2 0,5 μ g/ml en PBS, con 50 μ g/pozo

b) la placa estuvo incubada en la temp. 4°C durante toda la noche;

40 c) enjuagada tres veces con el tampón fosfórico (PBS) y Tween (0,05%), pH 7,4 - como aditivo;

d) 5% leche desengrasada disuelta en el tampón PBS, estuvo bloqueada durante 30 min. en la temperatura ambiente, 380 μ l/pozo;

45 e) enjuagada como en el punto c;

f) fueron colocadas las muestras de suero o de heces en diluciones apropiadas, en gradientes, de a 50 μ l/pozo (dilución 20x, 40x y 80x);

50 g) estuvo incubada durante 2 horas en la temperatura ambiente;

h) enjuagada como en el punto c;

55 i) estuvo incubada con los anticuerpos anti-ratones IgG e IgA conjugados con la peroxidasa de rábano picante [inglés: *alkaline phosphatase or peroxidase*] en cantidad de 100 μ l/pozo. Dilución de anticuerpos 1:2000, tiempo de incubación 1 hora y media, temp. 37°C; rotación 60 rpm.

j) enjuagada como en el punto c;

60 k) estuvo incubada con el substrato TMB, 100 μ l/pozo, 30 min. en la oscuridad;

m) fue leída la reacción en el lector BioRad, modelo 550. Longitud de onda λ 405 nm.

65 El análisis del contenido de los anticuerpos de fascioliasis hepática IgG en el suero y de IgA en las heces de animales inmunizados con el liofilizado de hojas de lechuga transgénica, demuestra la presencia de los anticuerpos específicos para el antígeno administrado: la proteína que contiene el dominio catalítico o el dominio de líder de la proteinasa cisteínica de fascioliasis hepática. Esto permite suponer que la administración del material vegetal que

ES 2 288 223 T3

contiene proteínas híbridas inmunogénicas, provoca una reacción inmunológica. La vía de administración -con el alimento- no lleva a inactivar ni destruir las partículas inmunogénicas lo cual puede facilitar una vacunación ulterior de los animales.

5 Debido a que la liofilización “concentra” el antígeno unas 3 veces, está permitido que la cantidad del antígeno en 1 g de liofilizado que contenga el dominio catalítico del gen de proteinasa cisteínica fusionada con la proteína c del virus HBV y el puente de glicina, pudiera alcanzar 50 μg aproximadamente, mientras que la cantidad del antígeno en 1 g de liofilizado que contenga el dominio catalítico del gen de proteinasa cisteínica fusionada con la ubiquitina sería de 20 μg aproximadamente.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Partícula del ácido nucleínico que codifica la proteína quimérica bajo el control del promotor constitutivo 35S CaMV y cuya característica es que la secuencia que codifica a la proteína quimérica está compuesta por una de las siguientes secuencias:

- una secuencia nucleotídica que codifica la secuencia aminoacídica del dominio catalítico de la proteinasa cisteínica de fascioliasis hepática, fusionada con una secuencia que codifica la proteína Core *HBc*,
- una secuencia nucleotídica que codifica la secuencia aminoacídica del dominio de líder de la proteinasa cisteínica de fascioliasis hepática, fusionada con una secuencia que codifica la proteína Core *HBc*,
- una secuencia nucleotídica que codifica la secuencia aminoacídica del dominio catalítico de la proteinasa cisteínica de fascioliasis hepática, fusionada con una secuencia que codifica la proteína Core *HBc* y residuos de glicina, o
- una secuencia nucleotídica que codifica la secuencia aminoacídica del dominio catalítico de la proteinasa cisteínica de fascioliasis hepática, fusionada con una secuencia nucleotídica que codifica la ubiquitina.

2. La secuencia del ácido nucleínico, conforme a la reivind. 1, característica por lo que la secuencia que codifica la proteína quimérica ha sido seleccionada entre las secuencias representadas en las Fig. 1 - Fig. 14.

3. La célula vegetal que contenga una secuencia del ácido nucleínico con la reivind. 1 o 2.

4. El modo de obtener la proteína quimérica que incluye la introducción del vector en las células *Agrobacterium tumefaciens* mediante la electroporación, luego la transformación de plantas mediante una cepa bacteriana que comprende ese vector, y la expresión de la proteína quimérica, conteniendo el vector el constructo que contiene una de las siguientes secuencias:

- una secuencia nucleotídica que codifica la secuencia aminoacídica del dominio catalítico de la proteinasa cisteínica de fascioliasis hepática, fusionada con una secuencia que codifica la proteína Core *HBc*,
- una secuencia nucleotídica que codifica la secuencia aminoacídica del dominio de líder de la proteinasa cisteínica de fascioliasis hepática, fusionada con una secuencia que codifica la proteína Core *HBc*,
- una secuencia nucleotídica que codifica la secuencia aminoacídica del dominio catalítico de la proteinasa cisteínica de fascioliasis hepática, fusionada con una secuencia que codifica la proteína Core *HBc* y residuos de glicina, o
- una secuencia nucleotídica que codifica la secuencia aminoacídica del dominio catalítico de la proteinasa cisteínica de fascioliasis hepática, fusionada con una secuencia nucleotídica que codifica ubiquitina.

5. El modo de obtener una planta transgénica, que incluye la introducción del vector en las células *Agrobacterium tumefaciens* mediante la electroporación, la transformación de las plantas mediante una cepa bacteriana que comprende ese vector, y la regeneración de plantas, conteniendo el vector el constructo compuesto por una de las siguientes secuencias:

- una secuencia nucleotídica que codifica la secuencia aminoacídica del dominio catalítico de la proteinasa cisteínica de fascioliasis hepática, fusionada con una secuencia que codifica la proteína Core *HBc*,
- una secuencia nucleotídica que codifica la secuencia aminoacídica del dominio de líder de la proteinasa cisteínica de fascioliasis hepática, fusionada con una secuencia que codifica la proteína Core *HBc*,
- una secuencia nucleotídica que codifica la secuencia aminoacídica del dominio catalítico de la proteinasa cisteínica de fascioliasis hepática, fusionada con una secuencia que codifica la proteína Core *HBc* y residuos de glicina, o
- una secuencia nucleotídica que codifica la secuencia aminoacídica del dominio catalítico de la proteinasa cisteínica de fascioliasis hepática, fusionada con una secuencia nucleotídica que codifica ubiquitina.

6. El uso de la planta transgénica que posea células transformadas por un constructo que contenga una secuencia nucleotídica que se **caracteriza** por poseer células transformadas por el constructo compuesto por una de las siguientes secuencias:

- una secuencia nucleotídica que codifica la secuencia aminoacídica del dominio catalítico de la proteinasa cisteínica de fascioliasis hepática, fusionada con una secuencia que codifica la proteína Core *HBc*,

ES 2 288 223 T3

- una secuencia nucleotídica que codifica la secuencia aminoacídica del dominio de líder de la proteinasa cisteínica de fascioliasis hepática, fusionada con una secuencia que codifica la proteína Core *HBC*,
- 5 - una secuencia nucleotídica que codifica la secuencia aminoacídica del dominio catalítico de la proteinasa cisteínica de fascioliasis hepática, fusionada con una secuencia que codifica la proteína Core *HBC* y residuos de glicina, o
- una secuencia nucleotídica que codifica la secuencia aminoacídica del dominio catalítico de la proteinasa cisteínica de fascioliasis hepática, fusionada con una secuencia nucleotídica que codifica ubiquitina.

10 7. El uso de la planta transgénica transformada por un constructo que contenga una secuencia nucleotídica que codifica la secuencia aminoacídica de la proteína quimérica, que se **caracteriza** por lo que la proteína quimérica está compuesta por una de las siguientes secuencias:

- 15 - una secuencia del dominio catalítico de la proteinasa cisteínica de fascioliasis hepática, fusionada con una secuencia de la proteína Core *HBC*,
- una secuencia del dominio de líder de la proteinasa cisteínica de fascioliasis hepática, fusionada con una secuencia de la proteína Core *HBC*,
- 20 - una secuencia del dominio catalítico de la proteinasa cisteínica de fascioliasis hepática, fusionada con una secuencia de la proteína Core *HBC* y residuos de glicina, que forman una estructura del puente de glicina, o
- 25 - una secuencia del dominio catalítico de la proteinasa cisteínica de fascioliasis hepática, fusionada con una secuencia de ubiquitina.

30 8. La composición farmacéutica que comprende una célula vegetal que contenga una secuencia nucleotídica que codifica la secuencia aminoacídica de la proteína quimérica, o una planta transgénica que posee las células transformadas con una secuencia nucleotídica que codifica la secuencia aminoacídica de la proteína quimérica, o sus tejidos, o productos de su transformación y, eventualmente, un soporte farmacéuticamente admisible, que se **caracteriza** por lo que una secuencia aminoacídica de la proteína quimérica está compuesta por una de las siguientes secuencias:

- 35 - una secuencia del dominio catalítico de la proteinasa cisteínica de fascioliasis hepática, fusionada con una secuencia de la proteína Core *HBC*,
- una secuencia del dominio de líder de la proteinasa cisteínica de fascioliasis hepática, fusionada con una secuencia de la proteína Core *HBC*,
- 40 - una secuencia del dominio catalítico de la proteinasa cisteínica de fascioliasis hepática, fusionada con una secuencia de la proteína Core *HBC* y residuos de glicina, que forman la estructura del puente de glicina, o
- una secuencia del dominio catalítico de la proteinasa cisteínica de fascioliasis hepática, fusionada con una secuencia de ubiquitina.

45 9. La composición farmacéutica conforme a la reivind. 8, característica por lo que tiene la forma de liofilizado.

50 10. Vacuna contra la fascioliasis hepática que comprende una célula vegetal que contenga una secuencia nucleotídica que codifica la secuencia aminoacídica de la proteína quimérica, o una planta transgénica que posea células transformadas con una secuencia nucleotídica que codifica la secuencia aminoacídica de la proteína quimérica, o sus tejidos, o los productos de su transformación y, eventualmente, un soporte farmacéuticamente admisible, que se **caracteriza** por lo que la secuencia aminoacídica de la proteína quimérica está compuesta por una de las siguientes secuencias:

- 55 - una secuencia del dominio catalítico de la proteinasa cisteínica de fascioliasis hepática, fusionada con una secuencia de la proteína Core *HBC*,
- una secuencia del dominio de líder de la proteinasa cisteínica de fascioliasis hepática, fusionada con una secuencia de la proteína Core *HBC*,
- 60 - una secuencia del dominio catalítico de la proteinasa cisteínica de fascioliasis hepática, fusionada con una secuencia de la proteína Core *HBC* y residuos de glicina, que forman una estructura del puente de glicina,
- una secuencia del dominio catalítico de la proteinasa cisteínica de fascioliasis hepática, fusionada con una secuencia de ubiquitina.

65 11. Vacuna conforme a la reivind. 10, característica por lo que tiene la forma de liofilizado.

12. Vacuna conforme a la reivind. 10, característica por lo que es una vacuna oral.

ES 2 288 223 T3

13. Una célula vegetal conforme a la reivind. 3, o una planta transgénica conforme a la reivind. 6, para ser aplicadas en la inducción de la resistencia a una infección por fasciolosis en un mamífero.

5

14. Método conforme a la reivind. 13, característica por lo que la célula vegetal es administrada por la vía oral.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 288 223 T3

*Bam*HI
ggatccat gtcgaatgat gatttgtggc atcagtggaa gccaatgtac aacaatgaat
acaatggggc tgacgatcag cacagacgaa atatttggga agagaatgtg aaacatatcc
aagaacataa cctacgtcac gatctcggcc tcgtcaccta cacattggga ttgaaccaat
tcacggatat gacattcgag gaattcaagg ccaaatatct aacagaaatg tcacgcgcgt
ccgatatact ctcacacggg gtcccgtatg agacgaacaa tcgtatcgat cttataaag
aatttggagc tactgtggag ttactctcgt ttttgccttc tgacttcttt cttcagtac
gagatcttct agataccgcc tcagctctct atcgggaagc cttagagtct cctgagcatt
gttcacctca ccatactgca ctcaggcaag caattctttg ctggggggaa ctaatgactc
tagctacctg ggtgggtggt aatttgaag atccagcatc tagggaccta gttgttagtt
atgtcaacac taatatgggc ttaaagttca ggcaactttt gtggtttcac atttctgtc
tcacttttgg aagagaaacg gtcataagatg atttgggtgc tttcggagtg tggattcgca
ctcctccagc ttatagacca ccaaagccc ctatcttacc aacacttccg gagactactg
ttgtttaaaa gcttgagctc

*Sac*I

Fig. 1

NdeI

catatggctg taccgacaa aattgactgg cgtgaatctg gttatgtgac ggagggtgaaa
gatcagggaa actgtgggtc ctggtgggca ttctcaacaa ccggtactat ggagggacag
tatatgaaaa acgaaagaac tagtatttca ttctctgagc aacaactggt cgattgtagc
ggtccttggg gaaataatgg ttgcagtggg ggattgatgg aaaatgctta ccaatatttg
aaacaatttg gattggaaac cgaatcctct tatccgtaca cggctgtgga aggtcagtgt
cgatacaata agcagttagg agttgccaaa gtgactggct actacactgt gccttctggc
agtgaggtag aattgaaaaa tctagtcggt gccgaaggac ctgccgcggt cgctgtggat
gtggaatctg acttcatgat gtacaggagt ggtatttacc agagccaaac ttgttcaccg
cttcgtgtga atcatgcagt cttggctgtc ggttacggaa cacagggtgg tactgactat
tggattgtga aaaatagttg gggattgtcg tgggtgagc gcggttacat tcgaatggct
aggaatcgag gtaacatgtg tggaaattgct tcgctggcca gtctcccgat tggcacgatt
tccggcatcg atccttataa agaatttgga gctactgtgg agttactctc gtttttgct
tctgacttct ttccttcagt acgagatcct ctagataccg cctcagctct ctatcgggaa
gccttagagt ctctgagca ttgttcacct caccatactg cactcaggca agcaattctt
tgctgggggg aactaatgac tctagctacc tgggtgggtg ttaatttgga agatccagca
tctagggacc tagttgttag ttatgtcaac actaatatgg gcttaaagtt caggcaactt
ttgtggtttc acatttcttg tctcactttt ggaagagaaa cggtcataga gtatttggtg
tcttctggag tgtggattcg cactcctcca gcttatagac caccaaatgc ccctatctta
tcaacacttc cgggactac tgttgtttaa aagctt

HindIII

Fig. 2

NdeI
catatggctg taccgacaa aattgactgg cgtgaatctg gttatgtgac ggaggtgaaa
gatcagggaa actgtgggtc ctgttgggca ttctcaacaa ccggtactat ggagggacag
tatatgaaaa acgaaagaac tagtatttca ttctctgagc aacaactggt cgattgtagt
ggtccttggg gaaataatgg ttgcagtggg ggattgatgg aaaatgctta ccaatatttg
aaacaatttg gattggaaac cgaatcctct tatccgtaca cggctgtgga aggtcagtgt
cgatacaata agcagttagg agttgcaaaa gtgactggct actacactgt gccttctggc
agtgaaggtag aattgaaaaa tctagtcggt gccgaaggac ctgccgcggt cgctgtggat
gtggaatctg acttcatgat gtacaggagt ggtatttadc agagccaaac ttgttcaccg
cttcgtgtga atcatgcagt cttggctgtc ggttacggaa cacaggggtg tactgactat
tggattgtga aaaatagttg gggattgtcg tggggtgagc gcggttacat tcgaatggct
aggaatcgag gtaacatgtg tgaattgct tcgctggcca gtctcccgat ggtggcacga
tttccggcat cgattaagct t

HindIII

Fig. 3

ES 2 288 223 T3

*Bam*HI

ggatccatat ggctgtacc gacaaaattg actggcgtga atctggttat gtgacggagg
tgaaagatca gggaaactgt ggttcctggt gggcattctc aacaaccggt actatggagg
gacagtatat gaaaaacgaa agaactagta tttcattctc tgagcaacaa ctggtcgatt
gtagtgggtcc ttggggaaat aatggttgca gtggtggatt gatggaaaat gcttaccaat
at ttgaaaca at ttggattg gaaaccgaat cctcttatcc gtacacggct gtggaaggct
agtgtcgata caataagcag ttaggagttg ccaaagtgac tggctactac actgtgcctt
ctggcagtga ggtagaattg aaaaatctag tcggtgccga aggacctgcc gcggtcgctg
tggatgtgga atctgacttc atgatgtaca ggagtggat ttatcagagc caaacttgtt
caccgcttcg tgtgaatcat gcagtcttgg ctgtcggta cggaacacag ggtggtactg
actattggat tgtgaaaaat agttggggat tgtcgtggg tgagcgcggt tacattcgaa
tggttaggaa tcgaggtaac atgtgtggaa ttgcttcgct ggccagtctc ccgatggtgg
cacgatttcc ggcacgatt aagctt

*Hind*III

Fig. 4

ES 2 288 223 T3

*Bam*HI

ggatccatat ggctgtaccc gacaaaattg actggcgtga atctggttat gtgacggagg
tgaaagatca gggaaactgt ggttcctggt gggcattctc aacaaccggt actatggagg
gacagtatat gaaaaacgaa agaactagta ttccattctc tgagcaacaa ctggtcgtt
gtagcgggtcc ttggggaaat aatggttgca gtggtggatt gatggaaaat gcttaccaat
at ttgaaaca at ttggattg gaaaccgaat cctcttatcc gtacacggct gtggaaggtc
agtgtcgata caataagcag ttaggagttg ccaaagtgac tggctactac actgtgcctt
ctggcagtga ggtagaattg aaaaatctag tcggtgccga aggacctgcc gcggtcgctg
tggatgtgga atctgacttc atgatgtaca ggagtggat ttatcagagc caaacttgtt
caccgcttcg tgtgaatcat gcagtcttg ctgtcggtta cggaacacag ggtggtagctg
actattggat tgtgaaaaat agttggggat tgcgtgggg tgagcgcggt tacattcgaa
tggctaggaa tcgaggtaac atgtgtggaa ttgcttcgct ggccagctc ccgatggtgg
cacgatttcc gggtagcggg agtgatatcg attaagctt

*Hind*III

Fig. 5

ES 2 288 223 T3

*Bam*HI

ggatccatataat ggctgtaccc gacaaaattg actggcgtga atctggttat gtgacggagg
tgaaagatca gggaaactgt ggttcctggt gggcattctc aacaaccggg actatggagg
gacagtatat gaaaaacgaa agaactagta tttcattctc tgagcaacaa ctggtcgatt
gtagcgggtcc ttggggaaat aatggttgca gtgggtggatt gatggaaaat gcttaccaat
at ttgaaaca at ttggattg gaaaccgaat cctcttatcc gtacacggct gtggaaggct
agtgtcgata caataagcag ttaggagttg ccaaagtgac tggctactac actgtgcctt
ctggcagtgga ggtagaattg aaaaatctag tgggtgccga aggacctgcc gcggtcgctg
tggatgtgga atctgacttc atgatgtaca ggagtgggat ttatcagagc caaacttgtt
caccgcttcg tgtgaatcat gcagtcttgg ctgtcgggta cggaacacag ggtggtactg
actattggat tgtgaaaaat agttggggat tgtcgtgggg tgagcgcggg tacattcgaa
tggctaggaa tcgaggtaac atgtgtggaa ttgcttcgct ggccagtctc ccgattggca
cgatttccgg catcgatcct tataaagaat ttggagctac tgtggagtta ctctcgttt
tgcttctga cttcttctc tcaagtacgag atcttctaga taccgcctca gctctctatc
gggaagcctt agagtctcct gagcattggt cacctcacca tactgcactc aggcaagcaa
ttctttgctg gggggaacta atgactctag ctacctgggt ggtgttaat ttggaagatc
cagcatctag ggacctagtt gttagttatg tcaacactaa tatgggctta aagttcaggc
aacttttgtg gtttcacatt tcttgtctca cttttggaag agaaacgggc atagagtatt
tgggtgtctt cggagtgtgg attcgcactc ctccagctta tagaccacca aatgccctta
tcttatcaac acttccggag actactgttg tttaaaagct tgagctc

*Sac*I

Fig. 6

ES 2 288 223 T3

*Xba*I

tctagaccat gcagattttc gtcaaaactt tgaccggtaa aaccataaca ttggaagttg
aatcttccga taccatcgac aacgttaagt cgaaaattca agacaaggaa ggtatccctc
cagatcaaca aagattgac tttgccggtg agcagctaga agacggtaga acgctgtctg
attacaacat tcagaaggag tccaccttac atcttgtctt aagactccgc ggtgggtgctg
taccgacaa aattgactgg cgtgaatctg gttatgtgac ggaggtgaaa gatcagggaa
actgtggttc ctgttgggca ttctcaacaa ccggtactat ggagggacag tatatgaaaa
acgaaagaac tagtatttca ttctctgagc aacaactggt cgattgtagc ggtccttggg
gaaataatgg ttgcagtggg ggattgatgg aaaatgctta ccaatatttg aaacaatttg
gattggaaac cgaatcctct tatccgtaca cggctgtgga aggtcagtggt cgatacaata
agcagttagg agttgccaaa gtgactggct actacactgt gccttctggc agtgaggtag
aattgaaaaa tctagtccgt gccgaaggac ctgcccggtt cgctgtggat gtggaatctg
acttcatgat gtacaggagt ggtatttacc agagccaaac ttgttcaccg cttcgtgtga
atcatgcagt ctggctgtc ggttacggaa cacaggggtg tactgactat tggattgtga
aaaatagttg gggattgtcg tgggtgagc gcggttacat tcgaatggct aggaatcgag
gtaacatgtg tggaaattgct tcgctggcca gtctcccgat tggcacgatt tccggcatcg
attaaggatc c

*Bam*HI

Fig. 7

NdeI

catatgtcga atgatgattt gtggcatcag tgggaagcga tgtacaacaa tgaatacaat
 ggggctgacg atcagcacag acgaaatatt tgggaagaga atgtgaaaca tatccaagaa
 cataacctac gtcacgatct cggcctcgtc acctacacat tgggattgaa ccaattcacg
 gatatgacat tcgaggaatt caaggccaaa tatctaacag aaatgtcacg cgcgtccgat
 atactctcac acggtgtccc gtatgagacg aacaatcgtc tcgatcctta taaagaattt
 ggagctactg tggagtact ctcgtttttg ccttctgact tctttccttc agtacgagat
 cttctagata ccgcctcagc tctctatcgg gaagccttag agtctcctga gcattgttca
 cctcaccata ctgcactcag gcaagcaatt ctttgctggg gggaaactaat gactctagct
 acctgggtgg gtgttaattt ggaagatcca gcatctaggg acctagtgtg tagttatgtc
 aacactaata tgggcttaaa gttcaggcaa cttttgtggt ttcacatttc ttgtctcact
 tttggaagag aaacggcat agagtatttg gtgtcttcg gagtgtggat tcgcactcct
 ccagcttata gaccaccaa tgcccctatc ttatcaacac ttccggagac tactgtttgtt
 taaaagctt

HindIII

Fig. 8

ES 2 288 223 T3

NdeI

```
catatggctg taccgacaa aattgactgg cgtgaatctg gttatgtgac ggaggtgaaa  
gatcagggaa actgtgggtc ctggtgggca ttctcaacaa ccggtactat ggagggacag  
tatatgaaaa acgaaagaac tagtatttca ttctctgagc aacaactggt cgattgtagc  
ggtccttggg gaaataatgg ttgcagtggg ggattgatgg aaaatgctta ccaatatttg  
aaacaatttg gattggaaac cgaatcctct tatccgtaca cggctgtgga aggtcagtgt  
cgatacaata agcagttagg agttgccaaa gtgactggct actacactgt gccttctggc  
agtgaggtag aattgaaaaa tctagtcggt gccgaaggac ctgccgcggt cgctgtggat  
gtggaatctg acttcatgat gtacaggagt ggtatttacc agagccaaac ttgttcaccg  
cttcgtgtga atcatgcagt cttggctgtc ggttacggaa cacaggggtg tactgactat  
tggattgtga aaaatagttg gggattgtcg tggggtgagc gcggttacat tcgaatggct  
aggaatcgag gtaacatgtg tgggaattgct tcgctggcca gtctcccgat ggtggcacga  
tttccgggta gcggtagtga tatcgattaa gctt
```

HindIII

Fig. 9

ES 2 288 223 T3

NdeI
catatgggaca tcgaccccta taaagaattt ggagctactg tggagttact ctcgtttttg
ccttctgact tctttccttc agtacgagat cttctggata ccgcctcagc tctctatcgg
gaagccttag agtctcctga gcattgttca cctcaccata ctgcactcag gcaagcaatt
ctttgctggg gggaactaat gactctagct acctgggtgg gtgtaatct cgaggatcaa
ggtggtggag gttctggtgg aggaggccaa ggaggcgctg taccggacaa aattgactgg
cgtgaatctg gttatgtgac ggaggtgaaa gatcagggaa actgtggttc ctggtgggca
ttctcaacaa ccggtactat ggagggacag tatatgaaaa acgaaagaac tagtatttca
ttctctgagc aacaactggt cgattgtagc ggtccttggg gaaataatgg ttgcagtggg
ggattgatgg aaaatgctta ccaatatttg aaacaatttg gattggaaac cgaatcctct
tatccgtaca cggctgtgga aggtcagtgf cgatacaata agcagttagg agttgccaaa
gtgactggct actacactgt gccttctggc agtgaggtag aattgaaaaa tctagtcggg
gccgaaggac ctgccgcggg cgctgtggat gtggaatctg acttcatgat gtacaggagt
ggtatattatc agagccaaac ttgttcaccg cttcgtgtga atcatgcagt cttggctgtc
ggttacggaa cacagggtgg tactgactat tggattgtga aaaatagttg gggattgtcg
tggggtgagc gcggttacat tcgaatggct aggaatcgag gtaacatgtg tgggaattgct
tcgctggcca gtctcccgat tggcacgatt tccggcatcg atggccaagg aggccaagga
ggaggtggtt caggcggtgg tggatctagg gacctagttg ttagttatgt caacactaat
atgggcttaa agttcaggca acttttgtgg tttcacattt cttgtctcac ttttgggaaga
gaaacgggtca tagagtattt ggtgtctttc ggagtgtgga ttcgactcc tccagcttat
agaccaccaa atgcccctat cttatcaaca cttccggaga ctactgttgt ttaagctt
HindIII

Fig. 10

NdeI

cata tggacatcga tccttataaa gaatttggag ctactgtgga gttactctcg tttttgcctt
ctgacttctt tccttcagta cgagatcttc tggataccgc ctcaactctc taticgggaag
ccttagagtc tcctgagcat tgttcacctc accatactgc actcaggcaa gcaattcttt
gctgggggga actaatgact ctagctacct ggggtgggtgt taatctcgag gatcaagggtg
gtggagggtc tgggtggagga ggccaaggag gcgctgtacc cgacaaaatt
gactggcgtg aatctgggta tgtgacggag gtgaaagatc agggaaactg tggttcctgt
tgggcattct caacaaccgg tactatggag ggacagtata tgaaaaacga aagaactagt
atttcattct ctgagcaaca actggtcgat tgtagcggtc cttggggaaa taatggttgc
agtgggtgat tgatggaaaa tgcttaccaa tatttgaac aatttggatt ggaaaccgaa
tcctcttacc cgtacacggc tgtggaaggt cagtgtcgat acaataagca gttaggagtt
gccaaagtga ctggctacta cactgtgcct tctggcagtg aggtagaatt gaaaaatcta
gtcgggtgcc aaggacctgc cgcggtcgct gtggatgtgg aatctgactt catgatgtac
aggagtggta tttatcagag ccaaacttgt tcaccgcttc gtgtgaatca tgcagtcttg
gctgtcgggt acggaacaca ggggtgtact gactattgga ttgtgaaaa tagttgggga
ttgtcgtggg gtgagcgcgg ttacattcga atggctagga atcgaggtaa catgtgtgga
attgcttcgc tggccagtc cccgattggc acgatttccg gcacgatgg ccaaggaggc
caaggaggag gtggttcagg cgggtgtgga tctagggacc tagttgtag ttatgtcaac
actaatatgg gcttaaagtt caggcaactt ttgtggtttc acatttcttg tctcactttt
ggaagagaaa cggcataga gtatttgggt tctttcggag tgtggattcg cactcctcca
gcttatagac caccaaatgc ccctatctta tcaacacttc cggagactac tgttgtttaa
gctt
HindIII

Fig. 11

ES 2 288 223 T3

EcoRI

gaattcatata gcagattttc gtcaaaactt tgaccggtaa aaccataaca ttggaagttg
aatcttccga taccatcgac aacgttaagt cgaaaattca agacaaggaa ggtatccctc
cagatcaaca aagattgatc tttgccggtg agcagctaga agacggtaga acgctgtctg
attacaacat tcagaaggag tccaccttac atcttgtctt aagactccgc ggtgggtgctg
taccgcgaca aattgactgg cgtgaatctg gttatgtgac ggaggtgaaa gatcagggaa
actgtgggtc ctggtgggca ttctcaacaa ccggtactat ggagggacag tatatgaaaa
acgaaagaac tagtatttca ttctctgagc aacaactggg cgattgtagc ggtccttggg
gaaataatgg ttgcagtggg ggattgatgg aaaatgctta ccaatatttg aaacaatttg
gattggaaac cgaatcctct tatccgtaca cggctgtgga aggtcagtgt cgatacaata
agcagttagg agttgccaaa gtgactggct actacactgt gccttctggc agtgaggtag
aattgaaaaa tctagtcggt gccgaaggac ctgccgcggt cgctgtggat gtggaatctg
acttcatgat gtacaggagt ggtatttata agagccaaac ttgttcaccg cttcgtgtga
atcatgcagt cttggctgtc ggttacggaa cacagggtgg tactgactat tggattgtga
aaaatagttg gggattgtcg tggggtgagc gcggttacat tcgaatggct aggaaatcgag
gtaacatgtg tgggaattgct tcgctggcca gtctcccgat tggcacgatt tccggcatcg
attaagctta tcgataccgt cgacctcgag

XhoI

Fig. 12

ES 2 288 223 T3

*Bam*HI

ggatccatata gtcgaatgat gatttgtggc atcagtggaa gcgaaatgtac aacaatgaat
acaatggggc tgacgatcag cacagacgaa atatttggga agagaatgtg aaacatatcc
aagaacataa cctacgtcac gatctcggcc tcgtcaccta cacattggga ttgaaccaat
tcacggatat gacattcgag gaattcaagg ccaaataatct aacagaaatg tcacgcgcgt
ccgatatact ctcacacggt gtcccgtatg agacgaacaa tcgtatcgat ccttataaag
aatttggagc tactgtggag ttactctcgt tttgccttc tgacttcttt ccttcagtac
gagatcttct agataaccgcc tcagctctct atcgggaagc cttagagtct cctgagcatt
gttcacctca ccatactgca ctcaggcaag caattctttg ctggggggaa ctaatgactc
tagctacctg ggtgggtggt aatttgggaag atccagcatc tagggaccta gttgttagtt
atgtcaacac taatatgggc ttaaagttca ggcaactttt gtggtttcac atttcttgtc
tcacttttgg aagagaaacg gtcataagagt atttgggtgc tttcggagtg tggattcgca
ctcctccagc ttatagacca ccaaagtccc ctatcttate aacacttccg gagactactg
ttgtttaaaa gcttgagctc

*Sac*I

Fig. 13

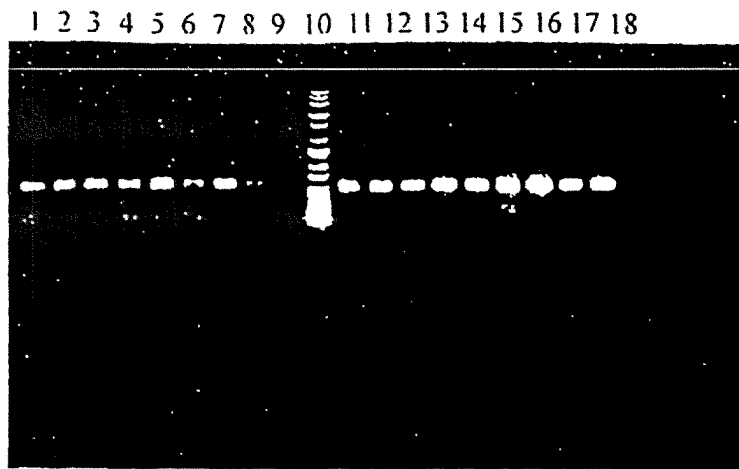


Fig. 15 a



Fig. 15 b

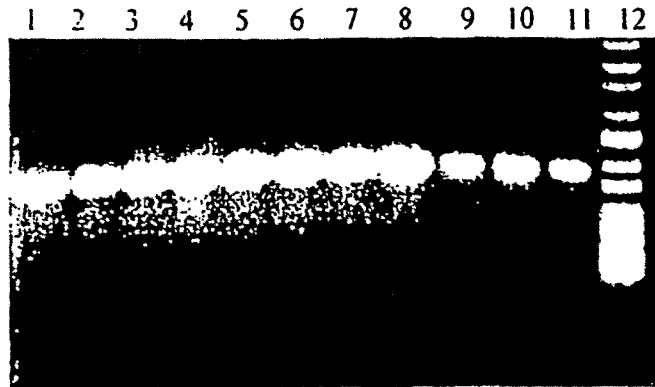


Fig. 15 c

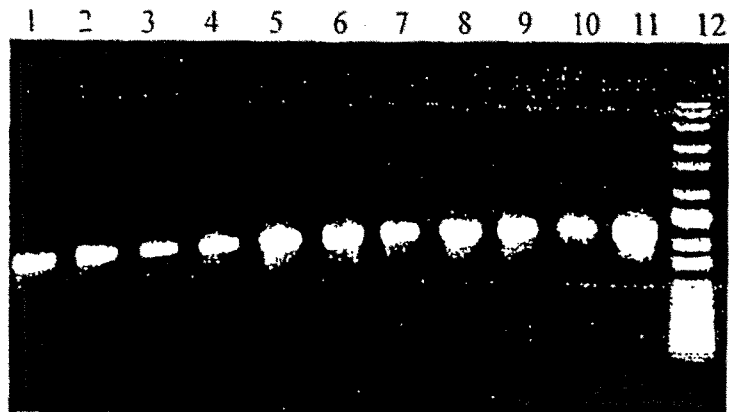


Fig. 15 d

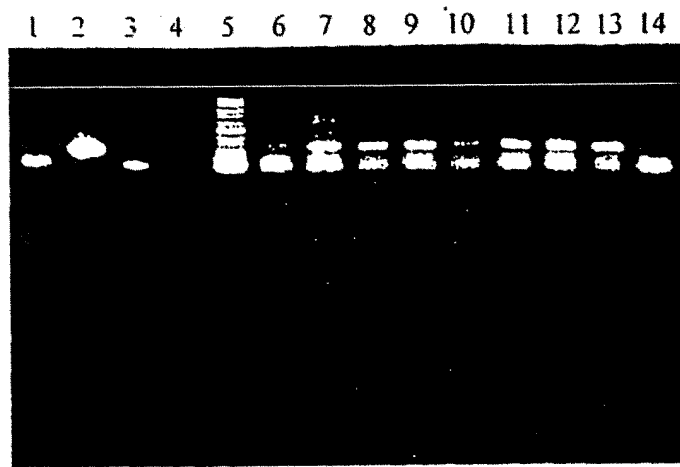


Fig. 16 a

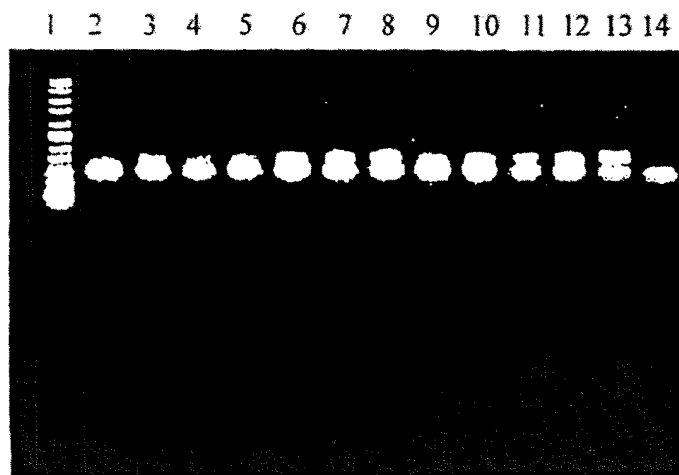


Fig. 16 b

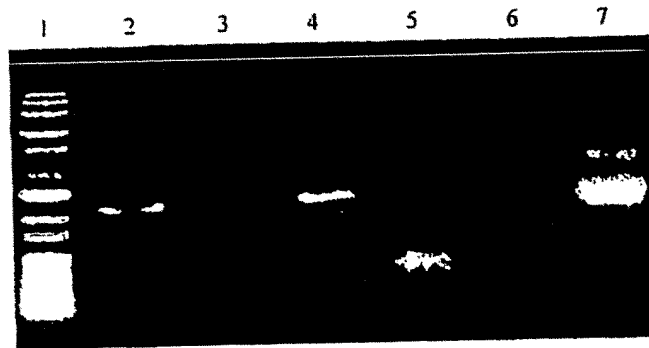


Fig. 16 c

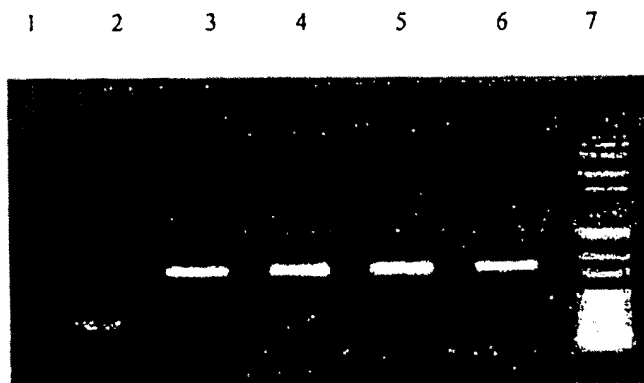


Fig. 16 d

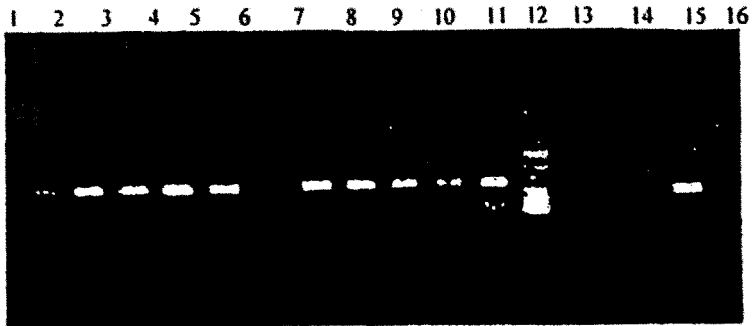


Fig. 17 a

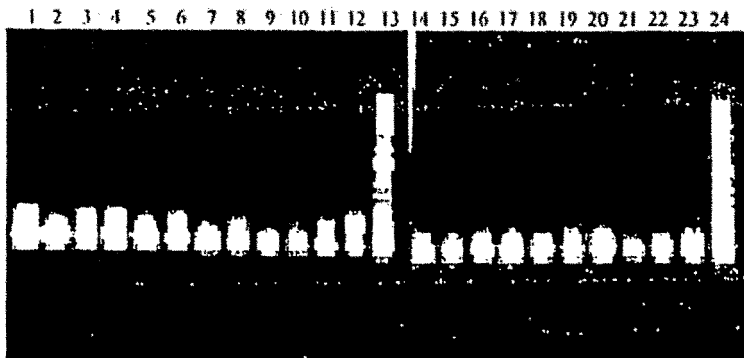


Fig. 17 b

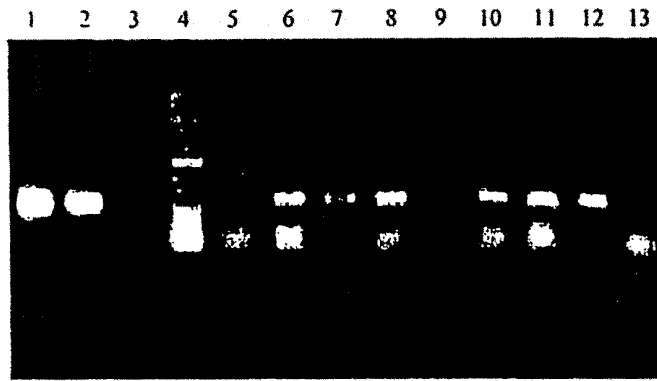


Fig. 17 c

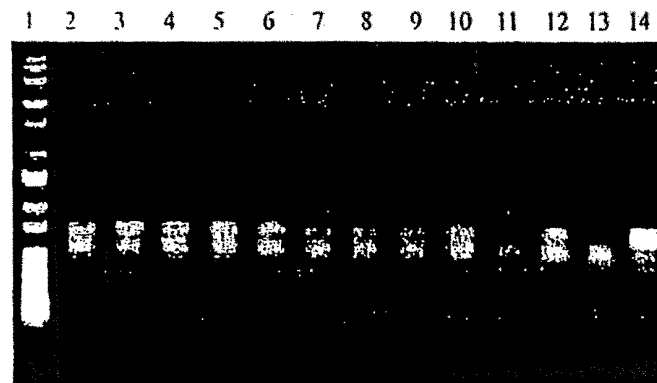


Fig. 17d

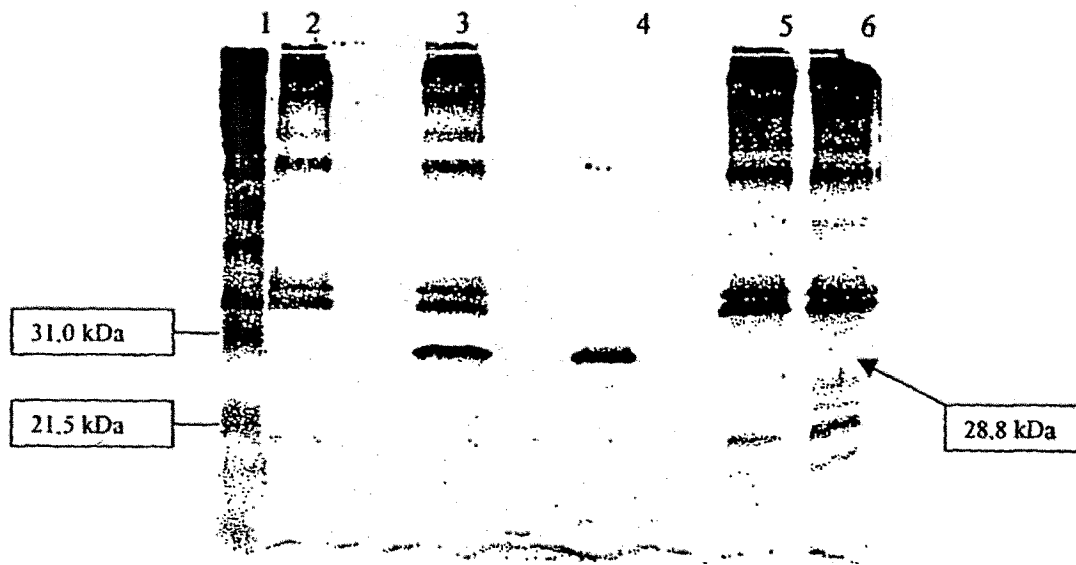


Fig. 18

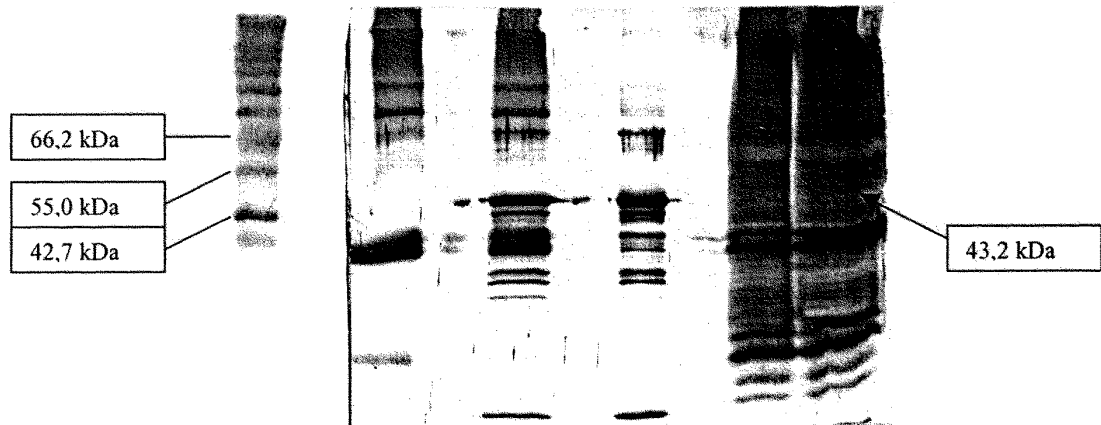


Fig. 19

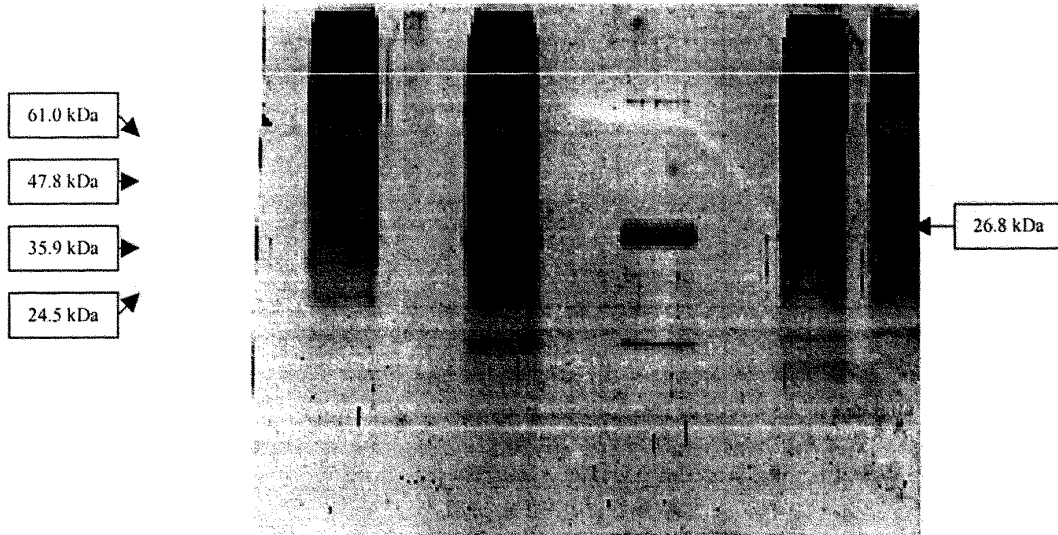


Fig. 20



Fig. 21

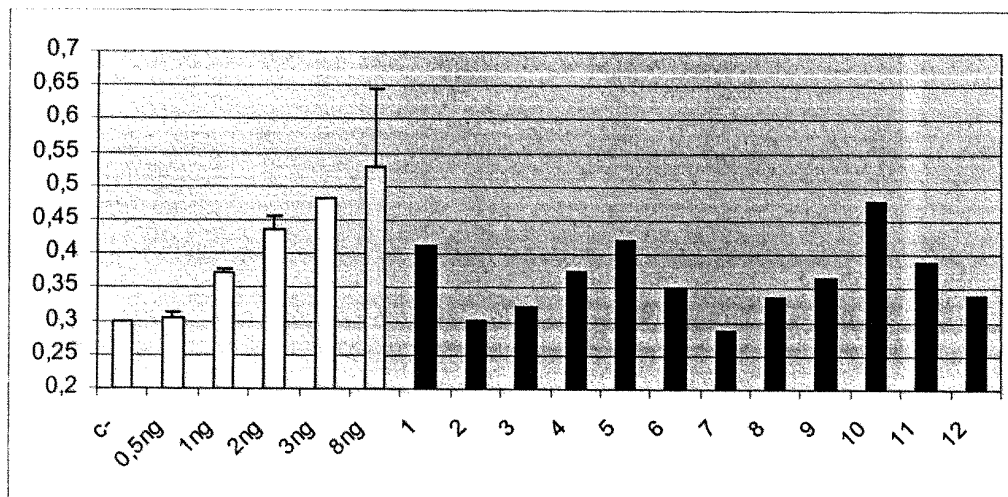


Fig. 22 a

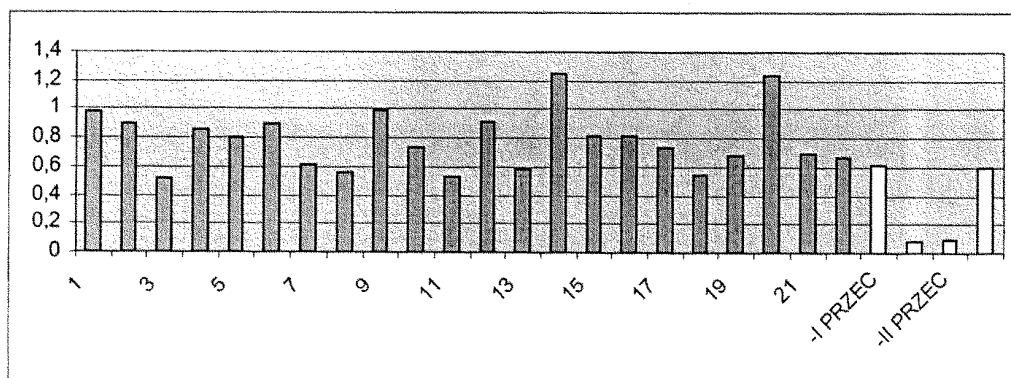


Fig. 22 b

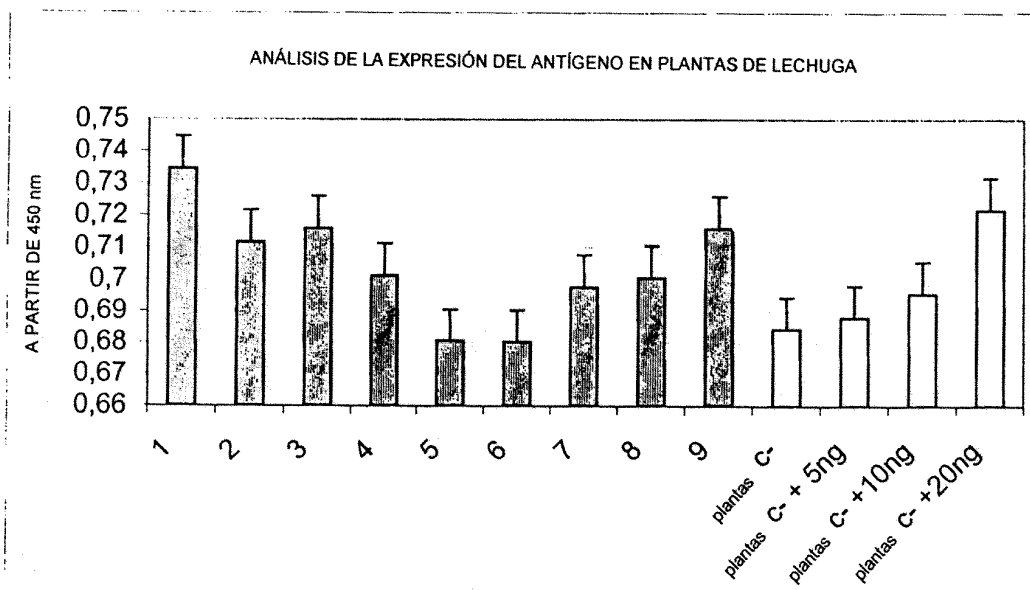


Fig. 22 c

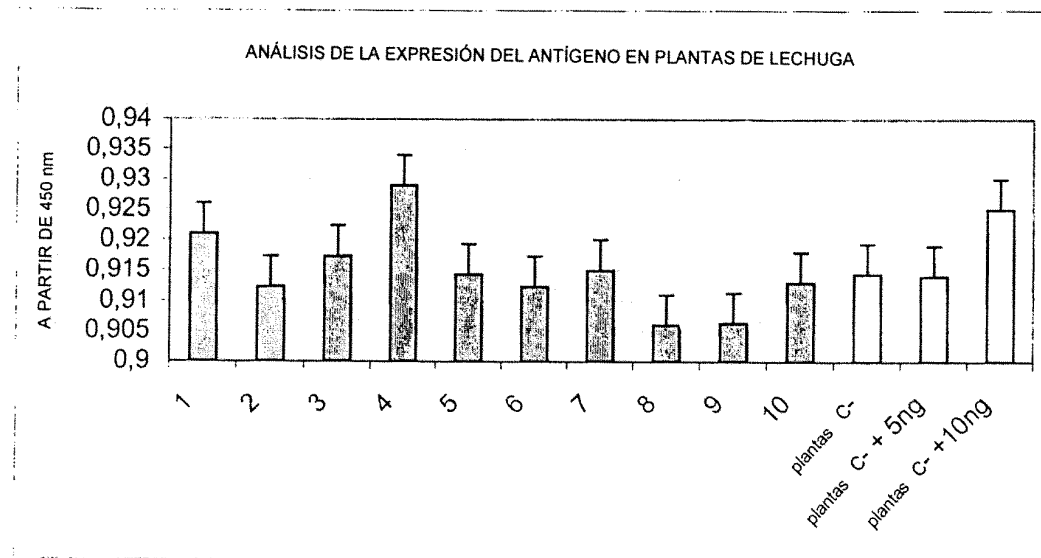


Fig. 22 d

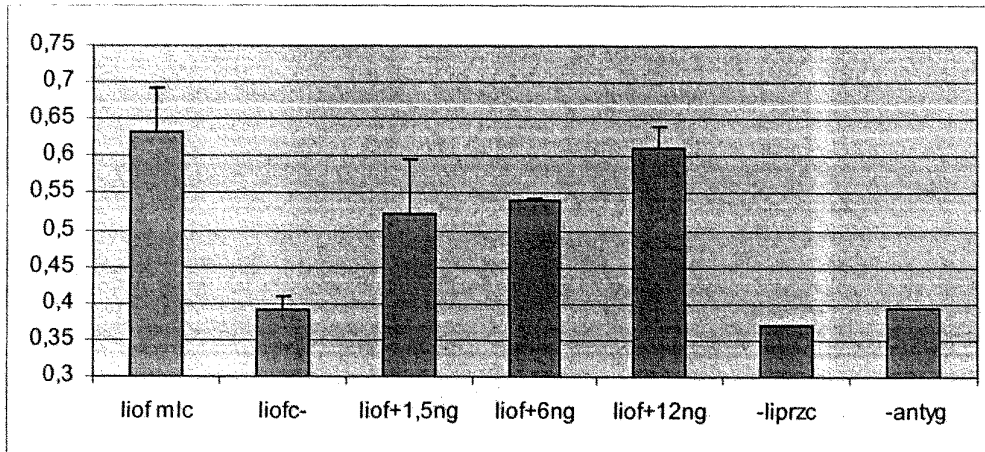


Fig. 23 a

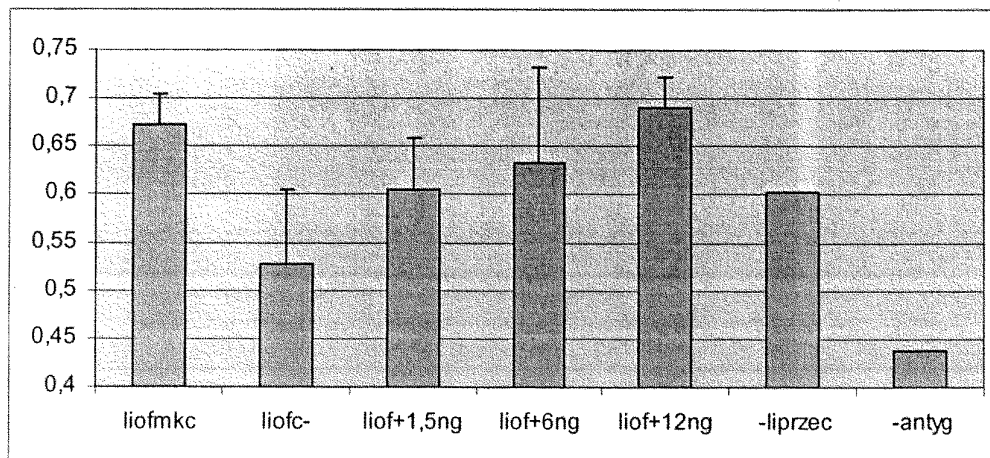


Fig. 23 b

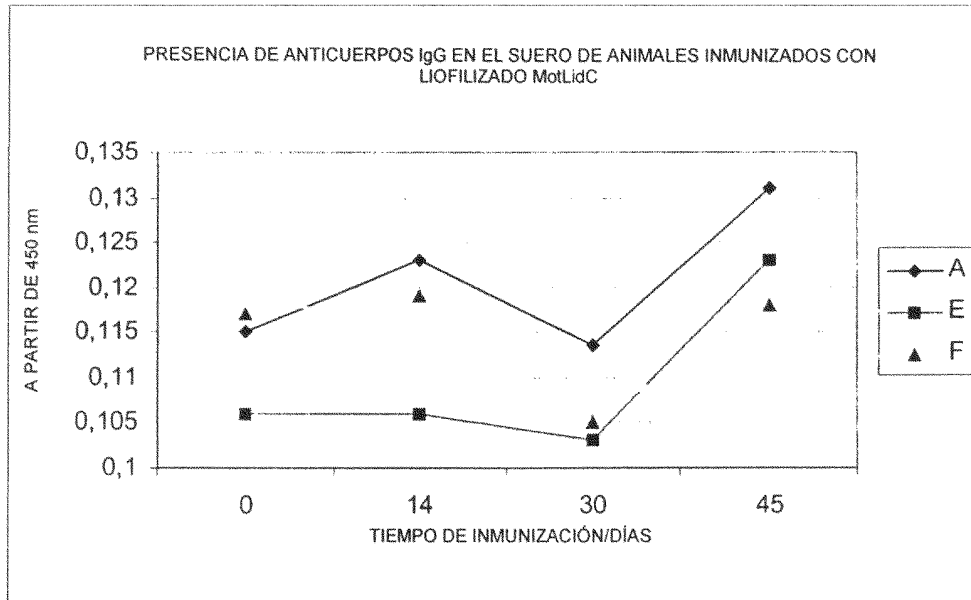


Fig. 24

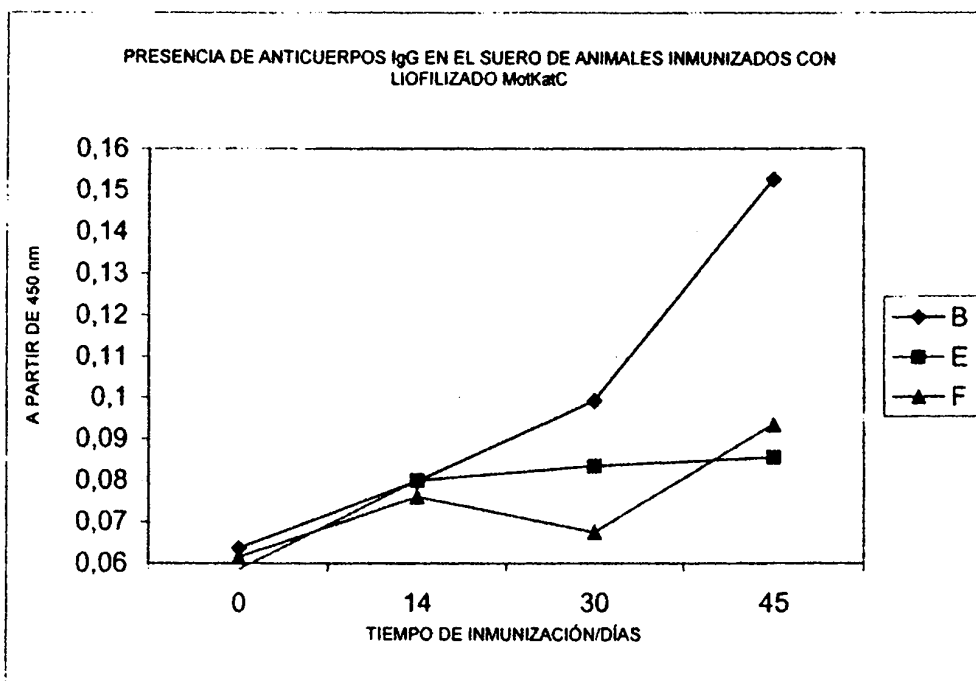


Fig. 25 a

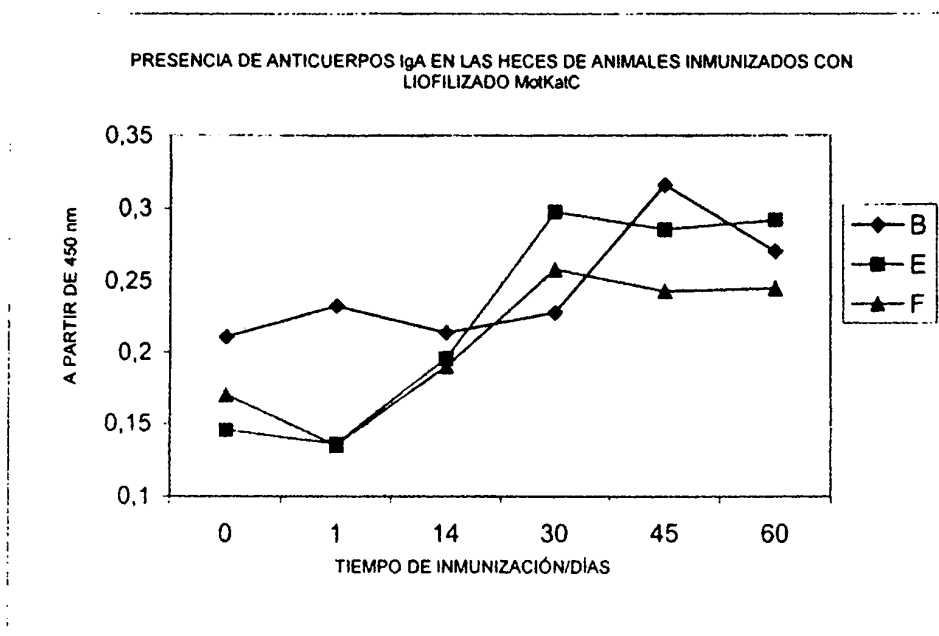


Fig. 25 b

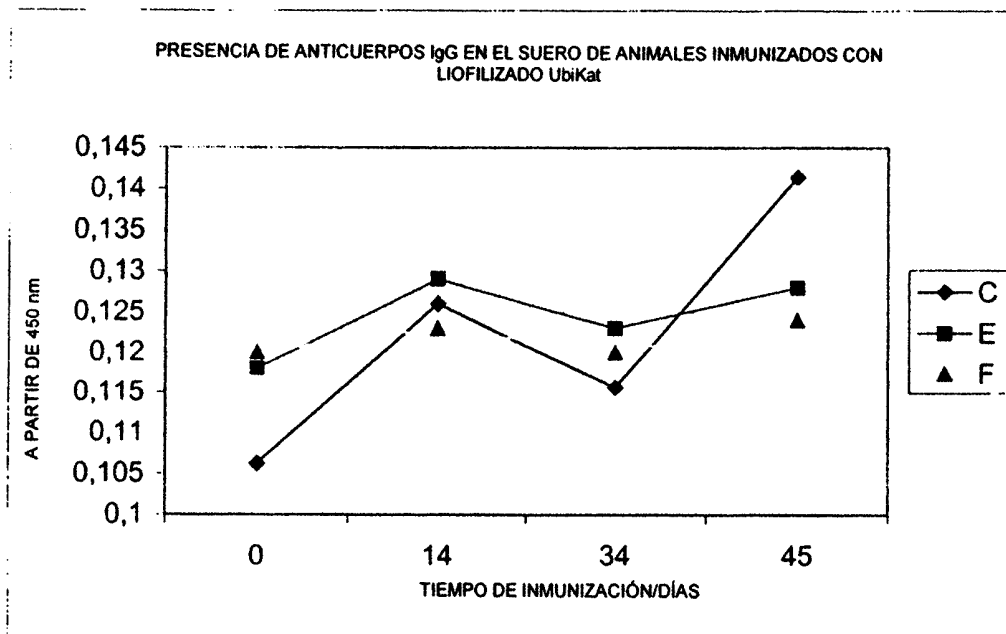


Fig. 26 a

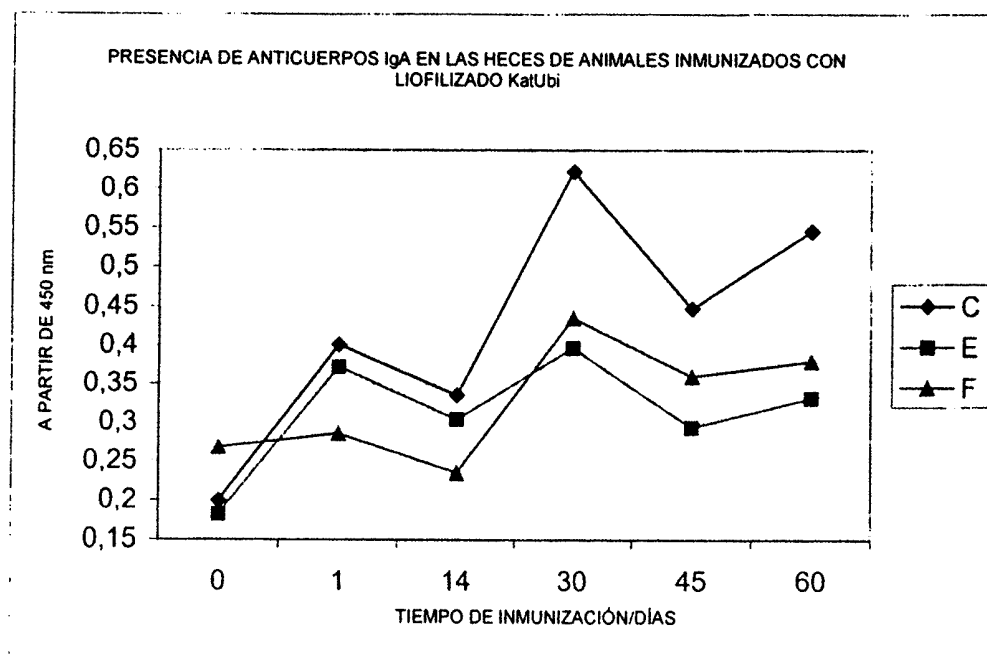


Fig. 26 b

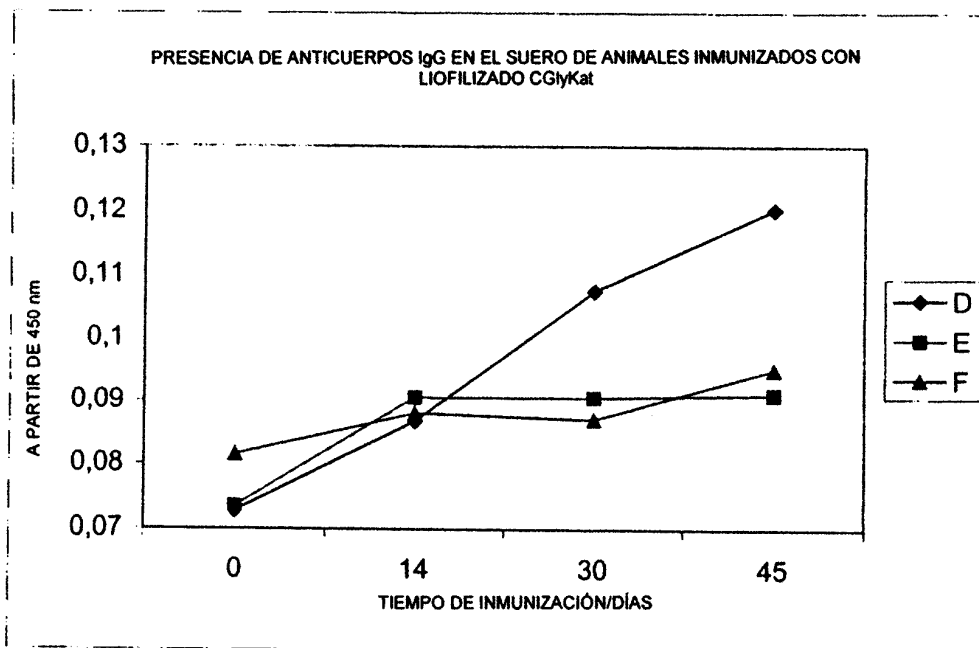


Fig. 27 a

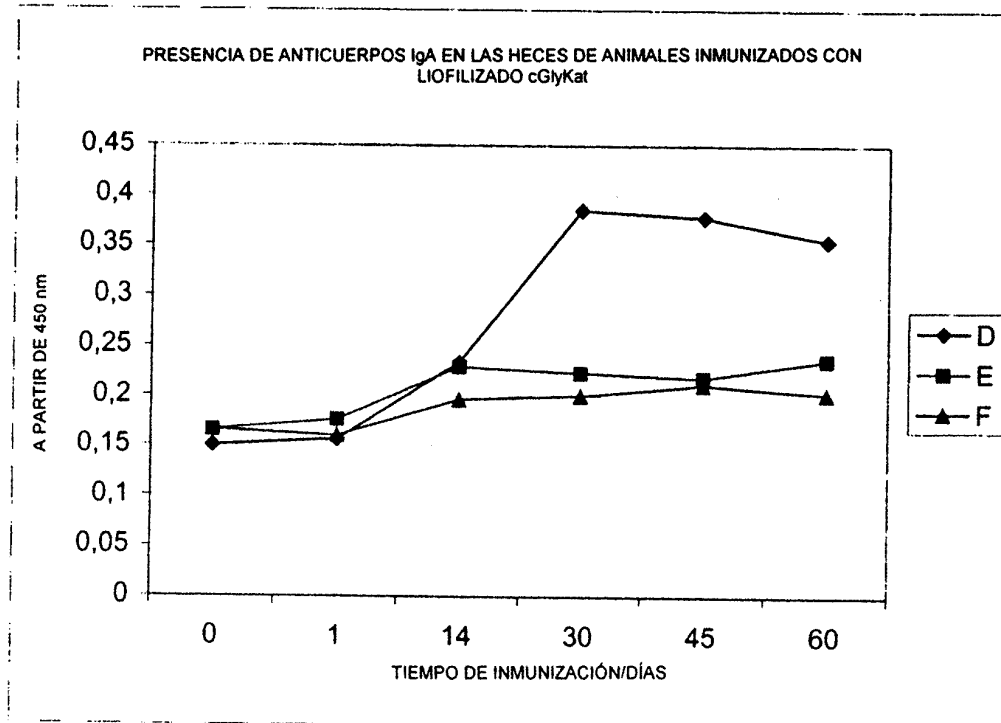


Fig. 27 b

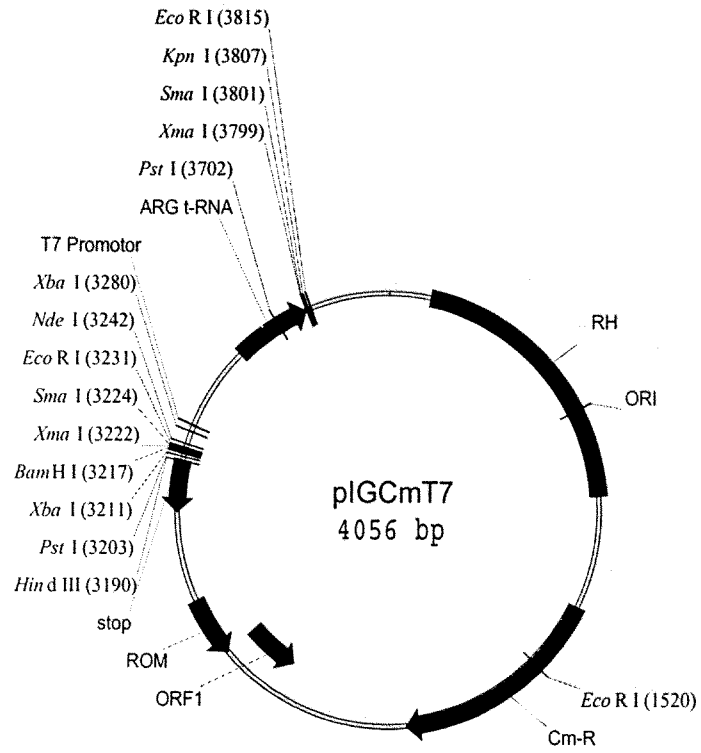


Fig. 28

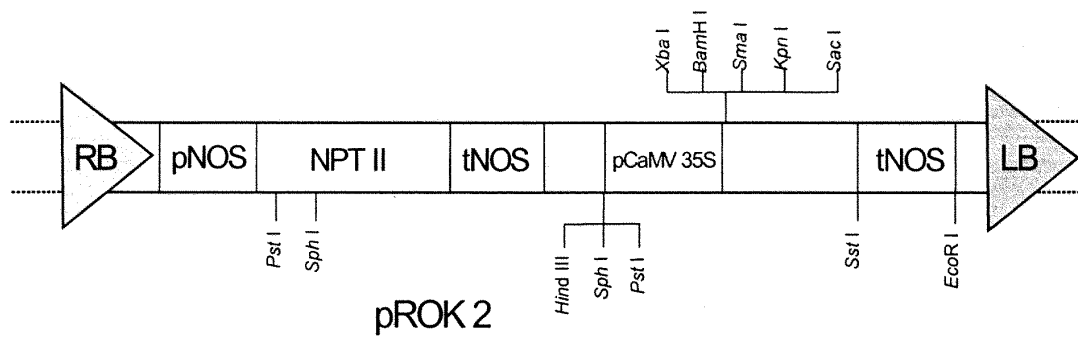


Fig. 29