



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 304 526**

(51) Int. Cl.:

**C07K 16/18** (2006.01)

**C07K 14/435** (2006.01)

**A61K 38/00** (2006.01)

**A61K 38/02** (2006.01)

**A61K 39/00** (2006.01)

**A61K 39/395** (2006.01)

**C12N 5/10** (2006.01)

**C12N 15/12** (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Número de solicitud europea: **03750540 .1**

(86) Fecha de presentación : **11.09.2003**

(87) Número de publicación de la solicitud: **1539820**

(87) Fecha de publicación de la solicitud: **15.06.2005**

(54) Título: **Vacuna de *Ostertagia*.**

(30) Prioridad: **13.09.2002 US 243319**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**16.10.2008**

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**16.10.2008**

(73) Titular/es: **Universiteit Gent  
Sint-Pietersnieuwstraat 25  
9000 Gent, BE**

(72) Inventor/es: **Geldhof, Peter;  
Vercauteren, Isabel;  
Claerebout, Edwin;  
Vercruysse, Jozef y  
De Maere, Veerle**

(74) Agente: **Ungría López, Javier**

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

Vacuna de *Ostertagia*.

La presente invención se refiere a secuencias de ácido nucleico que codifican proteínas de *Ostertagia ostertagi* y a fragmentos de ADN, moléculas de ADN recombinante, vectores de microorganismos o virus vivos recombinantes y células hospedadoras que comprenden dichas secuencias de ácidos nucleicos. La invención también se refiere a proteínas de *Ostertagia ostertagi* codificadas por dichas secuencias. Además, la presente invención se refiere a vacunas que comprenden dichas secuencias de ácidos nucleicos, fragmentos de ADN, moléculas de ADN recombinante, vectores de microorganismos o virus vivos recombinantes y células hospedadoras que comprenden dichas secuencias de ácidos nucleicos, proteínas y anticuerpos contra dichas proteínas. Además, la invención se refiere al uso de dichas proteínas en vacunas y para la fabricación de vacunas. Además, la invención se refiere al uso de dichas secuencias de ácidos nucleicos, proteínas o anticuerpos para fines de diagnóstico o vacunación. Por último, la invención se refiere a kits de diagnóstico que comprenden dichos ácidos nucleicos, proteínas o anticuerpos contra dichas proteínas.

Hay aproximadamente 82 millones de cabezas de ganado en la UE y aproximadamente 97 millones en los Estados Unidos y la mayoría de ellas están expuestas a infecciones con nematodos gastrointestinales en el pastoreo, dando como resultado una eficacia de producción reducida y a menudo importante. El más común y el más patógeno de estos nematodos es *Ostertagia ostertagi*, que infecta el abomaso del ganado. El síndrome patológico causado por nematodos gastrointestinales habitualmente denominado gastroenteritis parasitaria (PGE) disminuye drásticamente la viabilidad económica de las unidades de producción de ganado (Kloosterman, A. *et al.*, *Parasitology Today* 8, 330-335 (1992); Vercruysse, J. y Claerebout, E., *Veterinary Parasitology* 98, 195-214 (2001)). Los animales que presentan mayor riesgo de PGE son los terneros durante su primera estación de pastoreo. La PGE clínica en terneros de pastoreo se caracteriza por diarrea (acuosa), pérdida de peso, manto sin brillo, anorexia, una pérdida general de condición y, finalmente, la muerte (Anderson, N. *et al.*, *Veterinary Record* 41, 196-204 (1965); Hilderson, H. *et al.*, *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift* 56, 269-29 (1987)). Sin embargo, las pérdidas de producción se deben principalmente a infecciones subclínicas, sin signos patentes de enfermedad. Se observan reducciones importantes en la ganancia de peso diaria en terneros no tratados en su primera estación de pastoreo, con infecciones subclínicas (Shaw, D. J. *et al.*, *Veterinary Parasitology* 74, 115-131 (1998)). Las vacas adultas todavía pueden albergar grandes cantidades de *O. ostertagi* (por ejemplo, Borgsteede, F. H. M. *et al.*, *Veterinary Parasitology* 89, 287-296 (2000); Agneessens, J. *et al.*, *Veterinary Parasitology* 90, 83-92 (2000)). Aunque habitualmente las infecciones por nematodos gastrointestinales en vacas adultas son subclínicas, están asociadas con niveles de producción de leche reducidos (Gross, S. J. *et al.*, *Veterinary Record* 144, 581-587 (1999)). También se afecta la calidad de la canal por infecciones por nematodos gastrointestinales, con un peso de la canal, un porcentaje al sacrificio y las medidas de la canal relacionadas reducidas (Entrocasso, C. M. *et al.*, *Research in Veterinary Science* 40, 76-85 (1986)). El control de la PGE en Europa se basa casi exclusivamente en el uso de fármacos antihelmínticos (Vercruysse, J. y Dorny, P., *International Journal for Parasitology* 29, 165-175 (1999)). Sin embargo, el uso aumentado de antihelmínticos en el ganado durante las dos últimas décadas (Borgsteede, F. H. M. *et al.*, *Veterinary Parasitology* 78, 23-36 (1998); Schnieder, T. *et al.*, *Veterinary Record* 145, 704-706 (1999); Claerebout, E. *et al.*, *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift* 69, 108-115 (2000)) tiene varios inconvenientes. Los elevados costes de los tratamientos antihelmínticos, el efecto negativo de los tratamientos antihelmínticos preventivos en el desarrollo de una inmunidad natural contra nematodos gastrointestinales (Vercruysse, J. *et al.*, *Parasitology Today* 10, 129-132 (1994); Claerebout, E. y Vercruysse J., *Le Point Vétérinaire (Número especial)* 28, 175-179 (1997)), la preocupación del consumidor con respecto a restos de fármacos en los productos alimenticios y en el entorno (Wall, R. y Strong, L., *Nature* 327, 418-421 (1987); Steel, J. W. En: *NRA Special Review of Macrocyclic Lactones*. National Registration Authority for Agricultural and Veterinary Chemicals, Cambera (1998); Strong, L. *Veterinary Parasitology* 48, 3-17 (1993)) y, por último pero no en menor medida, el aumento de la incidencia de resistencia parasitaria contra los antihelmínticos disponibles (Vermunt, J. J. *et al.*, *Veterinary Record* 137, 43-45 (1995); Vermut, J. J. *et al.*, *New Zealand Veterinary Journal* 44, 188-193 (1996); Coles, G. C. *et al.*, *Veterinary Record* 142, 255-256 (1998); y Gill, J. H. y Lacey, E., *International Journal for Parasitology* 28, 863-877 (1998); y Fiel, C. A. *et al.*, *Revista de Medicina Veterinaria* (Buenos Aires) 81, 310-315 (2000)) son fuertes incentivos para que los productores adopten sistemas de control alternativos (Vercruysse y Dorny (1999), anteriormente). Se está considerando la vacunación como la solución más factible (Knox, D. P., *Parasitology* 120, S43-S61 (2000)).

Sin embargo, a pesar de la evolución de la biotecnología que permite el desarrollo de vacunas de “nueva generación” basadas en la tecnología del ADN recombinante, no están disponibles hasta el momento vacunas contra parásitos nematodos gastrointestinales. Los problemas principales que obstaculizan el desarrollo de vacunas de nematodos en rumiantes son (1) la mayoría de los antígenos parasitarios que se han seleccionado para el desarrollo de vacunas son “antígenos ocultos”, es decir, antígenos que no se reconocen por el hospedador durante una infección natural. Por consiguiente, la respuesta inmune que se genera mediante la vacunación con estos antígenos no se estimula por una reinfección natural; (2) hasta el momento no se han encontrado proteínas de nematodos recombinantes que induzcan una respuesta inmune protectora.

Un objetivo de la presente invención es proporcionar polipéptidos que sean capaces de contribuir a la protección contra los efectos patógenos de la infección por *Ostertagia ostertagi* en ganado.

Sorprendentemente, ahora se ha descubierto que podían identificarse y aislarse específicamente 7 polipéptidos diferentes, siendo cada uno de estos polipéptidos diferentes capaz de inducir una respuesta inmune contra parásitos *Ostertagia*. Los inventores han descubierto que pueden usarse estos polipéptidos como componentes vacunales para

proporcionar una vacuna que, de hecho, contribuya a la protección contra la infección por *Ostertagia ostertagi* en el ganado y ayude a disminuir los daños causados por *Ostertagia ostertagi*.

Se han usado tres enfoques diferentes para la detección de los genes que codifican los componentes vacunales de acuerdo con la invención. Un enfoque, presentado en detalle en el Ejemplo 1, usa antisuero de conejo anti-proteína excretora-secretora preparado específicamente para la detección de genes que codifican proteínas de *Ostertagia ostertagi* inmunorreactivas. Este enfoque ha conducido al descubrimiento de una nueva proteína inmunogénica para la que se representa la secuencia codificante en la SEC ID N°: 9 que se proporciona a continuación.

Se sabe bien en la técnica que muchas secuencias de ácidos nucleicos diferentes pueden codificar la misma proteína. Este fenómeno es comúnmente conocido como una oscilación en la segunda y especialmente en la tercera base de cada triplete que codifica un aminoácido. Este fenómeno puede dar como resultado una heterología para dos secuencias de ácido nucleico que aún codifican la misma proteína. Por lo tanto, en principio, dos secuencias de ácido nucleico que tienen una homología de secuencia tan reducida como del 70%, todavía pueden codificar la misma proteína.

El peso molecular de todas las proteínas de acuerdo con la invención se determina mediante electroforesis en gel en un gel de poliacrilamida. Debido a una ligera variabilidad de las determinaciones de pesos moleculares que se encuentran frecuentemente en la técnica, el peso molecular puede variar. Por lo tanto, el peso molecular de las proteínas de acuerdo con la invención debería interpretarse como que es su peso molecular teórico +/- 5 kD.

El nivel de homología de nucleótidos puede determinarse con el programa informático "BLAST 2 SEQUENCES" mediante la selección del subprograma: "BLASTN" que puede encontrarse en [www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/bl2.html](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/bl2.html). Una referencia para este programa es Tatiana A. Tatusova, Thomas L. Madden, *FEMS Microbiol. Letters* 174, 247-250 (1999). Los parámetros que se usan son los parámetros por defecto: Recompensa por un emparejamiento: +1. Penalización por un emparejamiento erróneo: -2. Apertura de huecos: 5. Extensión de huecos: 2. Disminución x por huecos: 50.

También están dentro del alcance de la invención las secuencias de nucleótidos que son complementarias a la secuencia que se representa en la SEC ID N°: 9 que se describe en este documento, o las secuencias de nucleótidos que comprenden series en tándem de las secuencias de acuerdo con la invención.

Una realización se refiere a una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína de *Ostertagia ostertagi* de 30 kD en la que dicha secuencia de ácido nucleico tiene una homología de al menos el 85% con la secuencia de ácido nucleico del gen de la proteína de *Ostertagia ostertagi* de 30 kD que se representa en la SEC ID N°: 9.

Preferiblemente, una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la invención que codifica esta proteína de *Ostertagia ostertagi* de 30 kD tiene una homología de al menos el 90%, preferiblemente del 93%, más preferiblemente del 95%, con la secuencia de ácido nucleico de *Ostertagia ostertagi* que se representa en la SEC ID N°: 9.

Aun más preferido es un nivel de homología del 98%, del 99% o incluso del 100%.

En la solicitud internacional publicada WO 95/09182, se describen supuestos antígenos protectores y sus ácidos nucleicos codificantes de, entre otros, el parásito *Ostertagia circumcincta*. Esta especie de parásito de *Ostertagia* infecta cabras y ovejas, pero no ganado. Los antígenos que se describen en el documento WO 95/09182 son una galectina (N° de acceso del GenBank AAC47546) y péptidos de una tropomiosina y de una glutatión-S-transferasa. Ni la proteína galectina ni los péptidos tienen una homología significativa con las proteínas de acuerdo con la invención.

Los antígenos publicados anteriormente con los n° de entrada de la base de datos EMBL-EBI: AJ310812 y BM052055, tienen un nivel máximo de identidad de secuencia de nucleótidos con la SEC ID N°: 9 de sólo el 52% y el 79%, respectivamente.

Un segundo enfoque para la detección de componentes vacunales, que se presenta en detalle en el Ejemplo 2, se basaba en el análisis de componentes en una fracción específica del parásito, la fracción ES (fracción excretora-secretora), que desempeña un papel en el establecimiento de la inmunidad contra *Ostertagia ostertagi*. Sorprendentemente, este enfoque condujo al descubrimiento de las proteínas de 31 y 30 kD descritas anteriormente (SEC ID N°: 1 y 9). Esto proporcionaba una confirmación plena de la importancia de las proteínas de 31 y 30 kD descritas anteriormente como componentes vacunales.

Experimentos similares han proporcionado una demostración reiterada de esta eficacia vacunal de las proteínas de 30 kD de acuerdo con la invención. Véanse los documentos publicados después de la fecha de prioridad de la presente solicitud: Vercauteren *et al.*, 2003, *Mol. and Biochem. Parasitol.*, vol. 126, págs. 201-208; y: Geldhof *et al.*, 2003, *Mol. and Biochem. Parasitol.*, vol. 128, págs. 111-114.

Un tercer enfoque para la detección de componentes vacunales, que se presenta en detalle en el Ejemplo 3, usa anticuerpos locales obtenidos a partir del moco y del sobrenadante del cultivo de células secretoras de anticuerpo (ASC). Aunque los anticuerpos del suero pueden usarse en principio para seleccionar antígenos de nematodos candidatos, las respuestas locales de anticuerpos producidas en localizaciones tisulares restringidas no siempre son detectables en suero. Además, la persistencia de anticuerpos en suero hace difícil diferenciar entre exposiciones anteriores y recientes

a un patógeno. Por el contrario, los anticuerpos locales de los ganglios linfáticos que drenan el abomaso y del moco que recubre la mucosa del abomaso son más específicos para antígenos presentes en el tejido infectado en el momento del examen. Se demostró en estudios en ratas y ovejas que cultivos celulares que contenían células secretoras de anticuerpos (ASC), inducidas *in vivo* en ganglios linfáticos que drenaban los tejidos infectados, producían anticuerpos (sondas de ASC) en el sobrenadante de cultivo que reflejaban específicamente la exposición a antígenos del área que drenaban, y que esos antígenos específicos de fase se detectaban más fácilmente mediante sondas de ASC de ganglios linfáticos que mediante anticuerpos del suero. No sólo los ganglios linfáticos de drenaje sino también la capa de moco de recubrimiento del abomaso son una fuente de anticuerpos locales. Después de una infección experimental de terneros con *O. ostertagi*, se observó una correlación negativa entre la fecundidad del helmineto y las IgA específicas de parásito en el moco (Claerebout, E. *et al.*, 17<sup>th</sup> International Conference of the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology, Copenhagen, 1999). Se exploraron genotecas de ADNc de las 3 diferentes fases parasitarias con las mismas sondas de anticuerpos para identificar las secuencias de nucleótidos que codifican estos antígenos. Se presentan en los Ejemplos 4 y 5 detalles sobre el aislamiento de los genes que codifican estos antígenos y la caracterización de los antígenos proteicos.

Se ha usado este enfoque altamente específico para la selección de proteínas y genes que codifican estas proteínas que pueden estar directamente relacionados con el estado inmune en lugar de simplemente con el estado de infección. Sorprendentemente, este enfoque ha revelado dos proteínas más inmunogénicas, para las que se representan las secuencias codificantes a continuación en las SEC ID N°: 11 y 13.

Puesto que la presente invención describe secuencias de ácido nucleico que codifican nuevas proteínas de *Ostertagia ostertagi*, actualmente es posible obtener por primera vez estas proteínas en cantidades suficientes. Esto puede realizarse, por ejemplo, mediante el uso de sistemas de expresión para expresar los genes que codifican las proteínas de acuerdo con la invención. Por lo tanto, en una forma más preferida de esta realización, la invención se refiere a fragmentos de ADN que comprenden una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la invención. Un fragmento de ADN es una extensión de nucleótidos que funciona como un vehículo para una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la invención. Dichos fragmentos de ADN pueden ser, por ejemplo, plásmidos en los que se clona una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la invención. Dichos fragmentos de ADN son útiles, por ejemplo, para aumentar la cantidad de ADN para su uso como cebadores y para la expresión de una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la invención, como se describe a continuación.

Un requerimiento esencial para la expresión de la secuencia de ácido nucleico es un promotor adecuado unido funcionalmente a la secuencia de ácido nucleico, de tal modo que la secuencia de ácido nucleico esté bajo el control del promotor. Es evidente para los especialistas en la técnica que la selección de un promotor incluye a cualquier promotor eucariota, procariota o viral capaz de dirigir la transcripción de genes en células usadas como células hospedadoras para la expresión de proteínas. Por lo tanto, una forma aún más preferida de esta realización se refiere a una molécula de ADN recombinante que comprende un fragmento de ADN y/o una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la invención, en la que la secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la invención se coloca bajo el control de un promotor unido funcionalmente. Esto puede obtenerse por medio de, por ejemplo, técnicas de biología molecular convencionales, por ejemplo, Sambrook y Russell: "Molecular cloning: a laboratory manual" (2001), Cold Spring Harbor Laboratory Press; ISBN: 0879695773. Los promotores unidos funcionalmente son promotores que son capaces de controlar la transcripción de las secuencias de ácido nucleico a las que están unidos. Dicho promotor puede ser el promotor nativo de un nuevo gen de acuerdo con la invención u otro promotor de *Ostertagia ostertagi*, con tal de que ese promotor sea funcional en las células usadas para la expresión. También puede ser un promotor heterólogo. Cuando las células hospedadoras son bacterias, las secuencias de control de la expresión útiles que pueden usarse incluyen el promotor y el operador de Trp (Goeddel *et al.*, *Nucl. Acids. Res.*, 8, 4057 (1980)); el promotor y el operador de lac (Chang *et al.*, *Nature*, 275, 615 (1978)); el promotor de la proteína de membrana externa (Nakamura, K. y Inouge, M., *EMBO J.*, 1, 771-775 (1982)); los promotores y operadores del bacteriófago lambda (Remaut, E. *et al.*, *Nucl. Acids. Res.*, 11, 4677-4688 (1983)); el promotor y el operador de  $\alpha$ -amilasa (*B. subtilis*), secuencias de terminación y otras secuencias de control y potenciación de la expresión compatibles con la célula hospedadora seleccionada. Cuando la célula hospedadora es una levadura, las secuencias de control de la expresión útiles incluyen, por ejemplo, el factor de acoplamiento  $\alpha$ . Para células de insecto, pueden usarse los promotores de polihedrina o p10 de baculovirus (Smith, G. E. *et al.*, *Mol. Cell. Biol.* 3, 2156-2165 (1983)). Cuando la célula hospedadora es de origen de vertebrados las secuencias de control de la expresión útiles ilustrativas incluyen el promotor inmediato temprano de citomegalovirus (humano) (Seed, B. *et al.*, *Nature* 329, 840-842 (1987); Fynan, E. F. *et al.*, *PNAS USA* 90, 11478-11482 (1993); Ulmer, J. B. *et al.*, *Science* 259, 1745-1748 (1993)), el LTR del virus de sarcoma de Rous (RSV), Gorman, C. M. *et al.*, *PNAS USA* 79, 6777-6781 (1982); Fynan *et al.*, anteriormente; Ulmer *et al.*, anteriormente) el LTR de MPSV (Stacey *et al.*, *J. Virology* 50, 725-732 (1984)), el promotor inmediato temprano de SV40 (Sprague J. *et al.*, *J. Virology* 45, 773 (1983)), el promotor de SV-40 (Berman, P. W. *et al.*, *Science* 222, 524-527 (1983)), el promotor de la metalotioneína (Brinster, R. L. *et al.*, *Nature* 296, 39-42 (1982)), el promotor de choque térmico (Voellmy *et al.*, *PNAS USA* 82, 4949-53 (1985)), el promotor tardío principal de Ad2 y el promotor de  $\beta$ -actina (Tang *et al.*, *Nature* 356, 152-154 (1992)). Las secuencias reguladoras también pueden incluir secuencias de terminación y de poliadenilación. Entre las secuencias que pueden usarse están la secuencia de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina, la secuencia de poliadenilación de SV40 y las secuencias de terminación y poliadenilación del citomegalovirus humano, bien conocidas.

Son sistemas que se usan con mucha frecuencia sistemas de expresión de células de bacterias, levaduras, hongos, insectos y vertebrados. Dichos sistemas se conocen bien en la técnica y están disponibles en general, por ejemplo,

en el mercado a través de Clontech Laboratories Inc. (4030 Fabian Way, Palo Alto, California 94303-4607, Estados Unidos). Después de estos sistemas de expresión, son sistemas de expresión atractivos sistemas de expresión basados en parásitos. Dichos sistemas se describen, por ejemplo, en la Solicitud de Patente Francesa con número de Publicación 2 714 074 y en la Publicación NTIS de Estados Unidos N° US 08/043109 (Hoffman, S. y Rogers, W.: fecha de publicación, 1 de diciembre 1993).

Un sistema de expresión muy atractivo para la expresión de genes de nematodos heterólogos es un sistema de expresión de nematodos basado en el helminto *Caenorhabditis elegans*. Se ha descrito un sistema de expresión heterólogo para este nematodo en Redmond, D. L. *et al.*, en *Molecular and Biochemical Parasitology* 112, 125-131 (2001). Véase también Hashmi, S. *et al.*, en *Trends in Parasitology* 17, 387-393 (2001). Los genes de acuerdo con la presente invención pueden fusionarse inmediatamente cadena abajo de un promotor de la cisteína proteasa de *C. elegans*, cpr-5, que se ha demostrado recientemente que dirige la expresión en el intestino de *C. elegans* (Redmond *et al.*, 2001) y se ha clonado en el vector pGEX. La cepa mutante de *C. elegans* de crecimiento lento DR96 unc76 (e911) puede transformarse por microinyección de ADN plasmídico en el brazo distal de la gónada hermafrodita. El ADN plasmídico puede prepararse, por ejemplo, usando el método de Qiagen. Pueden inyectarse genes de *Ostertagia* de acuerdo con la invención junto con el plásmido de reparación p76-16B. El plásmido p76-16B rescata el fenotipo unc76 y permite identificar a los transformantes a través de la reversión de vuelta al fenotipo de tipo silvestre. Se mantendrán líneas transformadas en las que la segunda generación y las posteriores mostrarán el fenotipo de tipo silvestre. La presencia de la construcción inyectada en helmintos transgénicos puede verificarse fácilmente mediante el análisis por PCR de helmintos individuales con cebadores desarrollados específicamente para el ADN de interés (Kwa *et al.*, *Journal of Molecular Biology* 246, 500-510 (1995)). Los helmintos transgénicos, rescatados mediante p76-16B, crecen más rápidamente que los mutantes unc76(e911) y permiten la acumulación rápida de material de helmintos transgénicos. Debido a su ciclo biológico rápido, los transformantes pueden crecer *in vitro* en grandes cantidades. Pueden prepararse extractos somáticos de helmintos transgénicos moliendo los nematodos en un mortero en atmósfera de nitrógeno líquido y resuspendiéndolos en PBS 0,05 M que contiene TritonX-100® al 2%. Se purificarán proteínas de fusión mediante cromatografía de afinidad usando una columna de Glutathione Sepharose.

Una forma aún más preferida de esta realización de la invención se refiere a vectores vivos recombinantes (LRC) que comprenden una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína de *Ostertagia ostertagi* de acuerdo con la invención, un fragmento de ADN de acuerdo con la invención o una molécula de ADN recombinante de acuerdo con la invención. Estos LRC son microorganismos o virus en los que se ha clonado información genética adicional, en este caso una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína de *Ostertagia ostertagi*. El ganado infectado con dichos LRC producirá una respuesta inmunológica no sólo contra los inmunógenos del vector, sino también contra la proteína o proteínas inmunogénicas cuyo código genético se haya clonado adicionalmente en el LRC, tal como, por ejemplo, el nuevo gen de la proteína de *Ostertagia ostertagi* de acuerdo con la invención.

Como un ejemplo de LRC bacterianos, pueden usarse de forma atractiva cepas de *Salmonella* atenuadas conocidas en la técnica. También se han descrito, entre otros, vectores de parásitos vivos recombinantes en Vermeulen, A. N. (*Int. J. Parasitol.* 28, 1121-1130 (1998)). Además, pueden usarse LRC de virus como un modo de transporte de la secuencia de ácido nucleico al interior de una célula diana. Los vectores de virus vivos recombinantes también se denominan virus vectores. Son virus que se usan con frecuencia como vectores virus Vaccinia (Panicali *et al.*, *PNAS USA* 79, 4927 (1982), Herpesvirus (E.P.A. 0473210A2) y Retrovirus (Valerio, D. *et al.*; en Baum, S. J., Dicke, K. A., Lotzova, E. y Pluznick, D. H. (Eds.), *Experimental Haematology today* - 1988. Springer Verlag, New York: págs. 92-99 (1989)).

Puede usarse la técnica de recombinación homóloga *in vivo*, bien conocida en la técnica, para introducir una secuencia de ácido nucleico recombinante dentro del genoma de una bacteria, parásito o virus de elección, capaz de inducir la expresión de la secuencia de ácido nucleico insertada de acuerdo con la invención en el animal hospedador.

Por último, otra forma de esta realización de la invención se refiere a una célula hospedadora que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína de acuerdo con la invención, un fragmento de ADN que comprende dicha secuencia de ácido nucleico o una molécula de ADN recombinante que comprende dicha secuencia de ácido nucleico bajo el control de un promotor unido funcionalmente. Esta forma también se refiere a una célula hospedadora que contiene un vector de un microorganismo o virus vivo recombinante que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica a una proteína de *Ostertagia ostertagi* de acuerdo con la invención. Una célula hospedadora puede ser una célula de origen bacteriano, por ejemplo, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* y especies de *Lactobacillus*, junto con plásmidos basados en bacterias como pBR322 o vectores de expresión bacterianos como los de las series pEX, pET y pGEX o con bacteriófagos. La célula hospedadora también puede ser de origen eucariota, por ejemplo, células de levaduras junto con moléculas de vectores específicos de levaduras o células eucariotas superiores como células de insectos (Luckow *et al.*, *Biotechnology* 6, 47-55 (1988)) junto con vectores o baculovirus recombinantes, células de plantas junto con, por ejemplo, vectores basados en el plásmido Ti o vectores virales de plantas (Barton, K. A. *et al.*, *Cell* 32, 1033 (1983), células de mamíferos como células Hela, células de ovario de hámster chino (CHO) o células renales felinas de Crandell-Rees, también con vectores apropiados o virus recombinantes. Además, el hospedador puede ser un nematodo tal como *C. elegans*, como se ha explicado anteriormente.

Otra realización de la invención se refiere a las nuevas proteínas de *Ostertagia ostertagi* de acuerdo con la invención.

Una forma de esta realización se refiere a una proteína de *Ostertagia ostertagi* de 30 kD en la que la proteína tiene una homología de secuencia de al menos el 90%, preferiblemente, sin embargo, del 92%, más preferiblemente del 94%, del 95% o incluso del 96% de homología, en ese orden de preferencia, con la secuencia de aminoácidos que se representa en la SEC ID N°: 10. Aún más preferido es un nivel de homología del 97%, 98%, 99% o incluso del 100%, en ese orden de preferencia.

Una forma más preferida de esta realización se refiere a una proteína de *Ostertagia ostertagi* de 30 kD codificada por una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención.

El nivel de homología de proteínas puede determinarse con el programa informático "BLAST 2 SEQUENCES" mediante la selección del subprograma: "BLASTP" que puede encontrarse en [www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/bl2.html](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/bl2.html). Una referencia para este programa es Tatiana A. Tatusova, Thomas L. Madden, *FEMS Microbiol. Letters* 174, 247-250 (1999). Matriz usada: "blosum62". Los parámetros usados son los parámetros por defecto: Apertura de huecos: 11. Extensión de huecos: 1. Disminución x por huecos: 50.

Se entenderá que, para las proteínas en particular que se incluyen en este documento, pueden existir variaciones naturales entre cepas de *Ostertagia ostertagi* individuales. Estas variaciones pueden demostrarse por una o varias diferencias de aminoácidos en la secuencia global o por delecciones, sustituciones, inserciones, inversiones o adiciones de uno o varios aminoácidos en dicha secuencia. Se han descrito sustituciones de aminoácidos que no alteran esencialmente las actividades biológicas e inmunológicas, por ejemplo, en Neurath *et al.*, en *The Proteins*, Academic Press Nueva York (1979). Son reemplazos de aminoácidos entre aminoácidos relacionados o reemplazos que se han producido con frecuencia en la evolución, entre otros, Ser/Ala, Ser/Gly, Asp/Gly, Asp/Asn, Ile/Val (véase Dayhof, M. D., *Atlas of protein sequence and structure*, Nat. Biomed. Res. Found. Washington D. C. (1978), vol. 5, supl. 3). Otras sustituciones de aminoácidos incluyen Asp/Glu, Thr/Ser, Ala/Gly, Ala/Thr, Ser/Asn, Ala/Val, Thr/Phe, Ala/Pro, Lys/Arg, Leu/Ile, Leu/Val y Ala/Glu. Basándose en esta información, Lipman y Pearson desarrollaron un método para la comparación rápida y sensible de proteínas (*Science* 227, 1435-1441 (1985)) y la determinación de la similitud funcional entre proteínas homólogas. Dichas sustituciones de aminoácidos de las realizaciones ejemplares de esta invención, así como variaciones que tienen delecciones y/o inserciones, están dentro del alcance de la invención siempre que las proteínas resultantes conserven su reactividad inmune. Esto explica por qué proteínas de *Ostertagia ostertagi* de acuerdo con la invención, cuando se aíslan de diferentes aislados de campo, pueden tener niveles de homología de aproximadamente el 70% y todavía representar la misma proteína con las mismas características inmunológicas. Esas variaciones en la secuencia de aminoácidos de una cierta proteína de acuerdo con la invención que todavía proporcionan una proteína capaz de inducir una respuesta inmune contra una infección con *Ostertagia ostertagi* o, al menos, contra las manifestaciones clínicas de la infección, se considera que "no influyen esencialmente en la inmunogenicidad".

Una forma de otra realización más de la invención se refiere a vacunas para combatir una infección por *Ostertagia ostertagi* que comprenden al menos una proteína de *Ostertagia ostertagi* de acuerdo con la invención, como se ha descrito anteriormente, junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Otra realización más de la presente invención se refiere a las proteínas de *Ostertagia ostertagi* de acuerdo con la invención para su uso en una vacuna.

De nuevo, otra realización de la presente invención se refiere al uso de una secuencia de ácido nucleico, un fragmento de ADN, una molécula de ADN recombinante, un vector de un microorganismo o virus vivo recombinante, una célula hospedadora o una proteína de acuerdo con la invención para la fabricación de una vacuna, más específicamente una vacuna para combatir una infección por *Ostertagia ostertagi*.

Un modo de fabricar una vacuna de acuerdo con la invención es por crecimiento del nematodo, seguido de purificación bioquímica de una proteína de *Ostertagia ostertagi* a partir del nematodo del sobrenadante. Sin embargo, éste es un modo de fabricar la vacuna que requiere mucho tiempo.

Por lo tanto, es mucho más conveniente usar los productos de expresión de un gen que codifica una proteína de *Ostertagia ostertagi* de acuerdo con la invención en vacunas. Esto es posible ahora por primera vez porque se proporcionan en la presente invención las secuencias de ácidos nucleicos de genes, que codifican una nueva proteína de *Ostertagia ostertagi*, adecuados como componentes vacunales.

Pueden prepararse fácilmente vacunas basadas en los productos de expresión de estos genes por mezcla de la proteína de acuerdo con la invención con un vehículo farmacéuticamente aceptable, como se describe a continuación.

Como alternativa, una vacuna de acuerdo con la invención puede comprender vectores de microorganismos o virus vivos recombinantes, como se han descrito anteriormente, capaces de expresar la proteína de acuerdo con la invención. Dichas vacunas basadas, por ejemplo, en un vector de *Salmonella* o en un vector viral, por ejemplo, un vector de Herpesvirus, tienen la ventaja sobre las vacunas de subunidades de que mimetizan mejor el modo natural de infección de *Ostertagia ostertagi*. Además, su autopropagación es una ventaja puesto que sólo son necesarias pequeñas cantidades del vector recombinante para la inmunización.

Las vacunas también pueden basarse en células hospedadoras, como se han descrito anteriormente, que comprendan la proteína de acuerdo con la invención.

Todas las vacunas descritas anteriormente contribuyen a una vacunación activa, es decir, desencadenan el sistema de defensa del hospedador. Como alternativa, pueden generarse anticuerpos, por ejemplo, en conejos, o pueden obtenerse a partir de líneas celulares productoras de anticuerpos, como se describen a continuación. Después, dichos anticuerpos pueden administrarse a la vaca. Este método de vacunación, la vacunación pasiva, es la vacunación de elección cuando un animal ya está infectado y no existe tiempo para permitir que se desencadene una respuesta inmune natural. También es el método preferido para vacunar animales que son propensos a una presión de infección elevada repentina. Los anticuerpos administrados contra la proteína de acuerdo con la invención pueden interferir en estos casos con *Ostertagia ostertagi*. Este enfoque tiene la ventaja de que disminuye o interrumpe el desarrollo de *Ostertagia ostertagi*. Por lo tanto, otra forma de esta realización de la invención se refiere a una vacuna para combatir una infección por *Ostertagia ostertagi* que comprende anticuerpos contra una proteína de *Ostertagia ostertagi* de acuerdo con la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Otra realización más de esta invención se refiere a anticuerpos contra una proteína de *Ostertagia ostertagi* de acuerdo con la invención.

También se conocen en la técnica métodos para la producción a gran escala de anticuerpos de acuerdo con la invención. Dichos métodos se basan en la clonación de (fragmentos de) la información genética que codifica la proteína de acuerdo con la invención en un fago filamentoso para la presentación en fagos. Dichas técnicas se describen, entre otros, en la "Antibody Engineering Page" en "filamentous phage display" en <http://axim11.imt.uni-marburg.de/~rek/aephpage.html> y en artículos de revisión por Cortese, R. *et al.*, (1994) en *Trends in Biotechn.* 12, 262-267., por Clackson, T y Wells, J. A. (1994) en *Trends in Biotechn.* 12, 173-183, por Marks, J. D. *et al.*, (1992) en *J. Biol. Chem.* 267, 16007-16010, por Winter, G. *et al.*, (1994) en *Annu. Rev. Immunol.* 12, 433-455 y por Little, M. *et al.*, (1994) *Biotechn. Adv.* 12, 539-555. Los fagos se usan posteriormente para explorar bibliotecas de expresión de camélidos que expresan anticuerpos de cadena pesada de camélidos (Muyltermans, S. y Lauwereys, M., *Journ. Molec. Recogn.* 12, 131-140 (1999) y Ghahroudi, M. A. *et al.*, *FEBS Letters* 414, 512-526 (1997)). Las células de la biblioteca que expresen los anticuerpos deseados pueden replicarse y posteriormente usarse para la expresión de anticuerpos a gran escala.

Otra realización más se refiere a un método para la preparación de una vacuna de acuerdo con la invención que comprende la mezcla de anticuerpos de acuerdo con la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Una alternativa y modo eficaz de vacunación es la vacunación directa con ADN que codifique el antígeno pertinente. La vacunación directa con ADN que codificaba proteínas ha tenido éxito para muchas proteínas diferentes (como se revisa, por ejemplo, en Donnelly *et al.*, *The Immunologist* 2, 20-26 (1993)). En el campo de las vacunas antiparasitarias, se ha obtenido protección contra, por ejemplo, *Plasmodium yoelii*, con la vacunación con ADN con el gen del circumsporozoito de *Plasmodium yoelii* (*Vaccine* 12, 1529-1533 (1994)). Se ha obtenido protección contra *Leishmania major* con la vacunación con ADN con el gen de la glicoproteína de superficie gp63 de *Leishmania major* (*Vaccine* 12, 1534-1536 (1994)).

Este modo de vacunación también es atractivo para la vacunación de ganado contra la infección por *Ostertagia ostertagi*. Por lo tanto, otras formas más de esta realización de la invención se refieren a vacunas que comprenden secuencias de ácido nucleico que codifican una proteína de acuerdo con la invención, a vacunas que comprenden fragmentos de ADN que comprenden dichas secuencias de ácido nucleico o a vacunas que comprenden moléculas de ADN recombinante de acuerdo con la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Son ejemplos de plásmidos de ADN que son adecuados para usar en una vacuna de ADN de acuerdo con la invención plásmidos de clonación o expresión convencionales para células hospedadoras bacterianas, eucariotas y de levaduras, estando muchos de dichos plásmidos disponibles en el mercado. Son ejemplos bien conocidos de dichos plásmidos pBR322 y pcDNA3 (Invitrogen). Los fragmentos de ADN o moléculas de ADN recombinante de acuerdo con la invención deberían ser capaces de inducir la expresión proteica de las secuencias de nucleótidos. Los fragmentos de ADN o moléculas de ADN recombinante pueden comprender una o más secuencias de nucleótidos de acuerdo con la invención. Además, los fragmentos de ADN o moléculas de ADN recombinante pueden comprender otras secuencias de nucleótidos tales como oligonucleótidos inmunoestimulantes que tienen dinucleótidos CpG no metilados o secuencias de nucleótidos que codifican otras proteínas antigénicas o citocinas adyuvantes.

La secuencia de nucleótidos de acuerdo con la presente invención o el plásmido de ADN que comprende una secuencia de nucleótidos de acuerdo con la presente invención, preferiblemente unido operativamente a una secuencia reguladora de la transcripción, para usar en la vacuna de acuerdo con la invención, puede estar desnudo o puede envasarse en un sistema de administración. Son sistemas de administración adecuados vesículas de lípidos, ISCOM®, dendrímeros, niosomas, micropartículas, especialmente micropartículas basadas en quitosana, matrices de polisacáridos y similares (véase a continuación), todos bien conocidos en la técnica. También son muy adecuadas como sistema de administración bacterias vivas atenuadas tales como especies de *Salmonella* y virus vivos atenuados tales como vectores de Herpesvirus, como se han mencionado anteriormente.

Otras formas más de esta realización se refieren a vacunas que comprenden moléculas de ADN recombinante de acuerdo con la invención.

Las vacunas de ADN pueden administrarse fácilmente, por ejemplo, a través de una aplicación por vía intradérmica tal como usando un inyector sin aguja. Este modo de administración libera el ADN directamente en el interior de las células del animal que se va a vacunar. Cantidades de ADN en el intervalo de entre 10 pg y 1000 µg proporcionan buenos resultados. Especialmente si el ADN es autorreplicante, serán suficientes cantidades menores. Preferiblemente, se usan cantidades en el intervalo de microgramos de entre 1 y 100 µg.

En una realización más, la vacuna de acuerdo con la presente invención comprende además uno o más antígenos procedentes de organismos y virus patógenos para el ganado, anticuerpos contra esos antígenos o información genética que codifica dichos antígenos y/o un componente farmacéutico tal como un antibiótico. Por supuesto, dichos antígenos, anticuerpos contra dichos antígenos o información genética pueden proceder de *Ostertagia ostertagi*, tal como, por ejemplo, otro antígeno de *Ostertagia ostertagi*. También pueden ser un antígeno, anticuerpos o información genética seleccionados de otros organismos o virus patógenos para vacas. Dichos organismos y virus se seleccionan preferiblemente del grupo de herpesvirus bovinos, virus de la diarrea viral bovina, virus de la parainfluenza de tipo 3, paramixovirus bovino, virus de la glosopeda, *Pasteurella haemolytica*, virus respiratorio sincitial bovino, *Theileria* sp., *Babesia* sp., *Trypanosoma* sp., *Anaplasma* sp., *Neospora caninum*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Mycoplasma*, *E. coli*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Cryptosporidium*, *Salmonella* y *Streptococcus dysgalactiae*.

También son muy adecuadas vacunas basadas en proteínas de *Ostertagia ostertagi* de acuerdo con la invención como vacunas marcadoras. Una vacuna marcadora es una vacuna que permite distinguir entre vacas vacunadas e infectadas con cepas de campo, por ejemplo, en base a un panel de anticuerpos característico, diferente del panel de anticuerpos inducido por una infección de tipo silvestre. Se induce un panel de anticuerpos diferente, por ejemplo, cuando una proteína inmunogénica presente en un *Ostertagia* de tipo silvestre no está presente en una vacuna: entonces el hospedador no producirá anticuerpos contra esa proteína después de la vacunación. Por lo tanto, una vacuna basada en las proteínas de *Ostertagia ostertagi* de acuerdo con la invención sólo induciría anticuerpos contra esa proteína específica, mientras que una vacuna basada en un *Ostertagia ostertagi* completo vivo de tipo silvestre, vivo atenuado o inactivado induciría anticuerpos contra todas o la mayoría de las proteínas del nematodo.

Un simple ensayo de ELISA, que tiene pocillos que comprenden cualquier otra proteína de *Ostertagia* excepto las proteínas de *Ostertagia ostertagi* de acuerdo con la presente invención y pocillos que comprenden solamente una o más proteínas de *Ostertagia ostertagi* purificadas de acuerdo con la invención es suficiente para evaluar suero de vacas y para saber si las vacas están vacunadas con la vacuna proteica de acuerdo con la invención o padecen una infección de campo de *Ostertagia ostertagi*.

Todas las vacunas de acuerdo con la presente invención comprenden un vehículo farmacéuticamente aceptable. Un vehículo farmacéuticamente aceptable puede ser, por ejemplo, agua estéril o una solución salina fisiológica estéril. En una forma más compleja, el vehículo puede ser, por ejemplo, un tampón.

Los métodos para la preparación de una vacuna comprenden la mezcla de una proteína de acuerdo con la invención y/o de anticuerpos contra esa proteína y/o de una secuencia de ácido nucleico y/o de un fragmento de ADN, una molécula de ADN recombinante, un vector de un microorganismo o virus vivo recombinante o una célula hospedadora de acuerdo con la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En una presentación preferida, las vacunas de acuerdo con la presente invención también pueden contener una sustancia inmunoestimulante, denominada adyuvante. Los adyuvantes en general comprenden sustancias que estimulan la respuesta inmune del hospedador de una forma inespecífica. Se conocen en la técnica varios adyuvantes diferentes. Los ejemplos de adyuvantes que se usan con frecuencia en vacunas para vacas son muramildipéptidos, lipopolisacáridos, varios glucanos y glicanos y Carbopol® (un homopolímero). La vacuna también puede comprender un denominado "excipiente". Un excipiente es un compuesto al que se adhiere la proteína, sin estar covalentemente unida a él. Dichos excipientes son, entre otros, biomicrocápsulas, microalginatos, liposomas y macrosoles, todos conocidos en la técnica. Son muy adecuadas como excipientes vacunales micropartículas, más específicamente las basadas en quitosana, especialmente para su uso en la vacunación por vía oral. Una forma especial de dicho excipiente, en la que el antígeno está parcialmente incluido en el excipiente, es el denominado ISCOM® (documentos EP 109.942, EP 180.564 y EP 242.380). Además, la vacuna puede comprender uno o más compuestos tensioactivos o emulsionantes adecuados, por ejemplo, Span® o Tween®.

Los antígenos se combinarán preferiblemente con adyuvantes que estén fácilmente disponibles y que estén registrados para uso en animales domésticos, por ejemplo, hidróxido de aluminio, un adyuvante modulador de tipo Th2.

Son dos procedimientos alternativos para la administración de antígenos especialmente adecuados para la aplicación de vacunas de acuerdo con la presente invención:

a. la inmunización sistémica con la inclusión de adyuvantes que modulen las respuestas inmunes hacia la mucosa, tales como vitamina D3 (Van der Stede, Y. *et al.*, *Vaccine*, 19, 1870-1878 (2001)) o QuilA® y

b. la administración directa en la mucosa respiratoria por inhalación de ADN desnudo (plasmídico) (Vanrompay, D. *et al.*, *Immunology* 103, 106-112 (2001)).

También se prefiere la adición de secuencias de oligonucleótidos CpG en el interior o exterior del plásmido para mejorar la proyección (Van der Stede, Y. *et al.*, *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 86, 31-41 (2002)).

Con frecuencia, la vacuna se mezcla con estabilizantes, por ejemplo, para proteger a proteínas con tendencia a la degradación de que se degraden, para aumentar la vida útil de la vacuna o para mejorar la eficacia de secado por congelación. Son estabilizantes útiles, entre otros, SPGA (Bovarnik *et al.*; *J. Bacteriology* 59, 509 (1950)), hidratos de carbono, por ejemplo, sorbitol, manitol, trehalosa, almidón, sacarosa, dextrano o glucosa, proteínas tales como albúmina o caseína o productos de degradación de los mismos y tampones, tales como fosfatos de metales alcalinos. Además, la vacuna puede suspenderse en un diluyente fisiológicamente aceptable. No hace falta decir que también se incluyen en la presente invención otras formas de adyuvante, añadiendo compuestos excipientes o diluyentes, emulsionar o estabilizar una proteína.

Pueden administrarse muy convenientemente vacunas de acuerdo con la invención, que están basadas en una proteína de acuerdo con la invención, en cantidades que varían entre 1 y 100 microgramos de proteína por animal, aunque en principio pueden usarse dosis más pequeñas. Una dosis que exceda de 100 microgramos, aunque sea inmunológicamente muy adecuada, será menos atractiva por razones comerciales.

Pueden administrarse en dosis mucho menores vacunas basadas en vectores de microorganismos o virus vivos recombinantes atenuados, tales como los virus, parásitos y bacterias de LRC que se han descrito anteriormente, porque se multiplican por sí solos durante la infección. Por lo tanto, las cantidades muy adecuadas variarán entre  $10^3$  y  $10^9$  UFC/UFU tanto para bacterias como para virus.

Pueden administrarse vacunas de acuerdo con la invención, por ejemplo, por vía intradérmica, subcutánea, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa o en superficies mucosas, tal como por vía oral o intranasal.

Para una protección eficaz contra la enfermedad, es importante un diagnóstico rápido y correcto de una infección por *Ostertagia ostertagi*. Por lo tanto, otro objetivo de esta invención es proporcionar herramientas de diagnóstico adecuadas para la detección de una infección por *Ostertagia ostertagi*.

Las secuencias de ácido nucleico, las proteínas y los anticuerpos de acuerdo con la invención también son adecuados para su uso en el diagnóstico.

Por lo tanto, otra realización de la invención se refiere a secuencias de ácidos nucleicos, proteínas y anticuerpos de acuerdo con la invención para su uso en el diagnóstico.

Las secuencias de ácido nucleico o fragmentos de las mismas de acuerdo con la invención pueden usarse para detectar la presencia de *Ostertagia ostertagi* en vacas. Una muestra tomada del abomaso de vacas infectadas con *Ostertagia ostertagi* comprenderá material de ácidos nucleicos procedentes de dicho parásito, incluyendo secuencias de ácidos nucleicos que codifiquen una proteína de acuerdo con la invención. Estas secuencias de ácido nucleico hibridarán con una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la invención. Los métodos adecuados para la detección de secuencias de ácido nucleico que sean reactivas con las secuencias de ácido nucleico de la presente invención incluyen técnicas de hibridación, incluyendo, pero sin limitación, técnicas de PCR y técnicas de NASBA®. Por lo tanto, las secuencias de ácido nucleico de acuerdo con la invención pueden usarse para preparar sondas y cebadores para su uso en técnicas de PCR y/o NASBA. Un kit de ensayo de diagnóstico para la detección de *Ostertagia ostertagi* puede comprender, por ejemplo, herramientas para permitir la reacción del ácido nucleico de *Ostertagia* aislado de las vacas que se va a ensayar con estas herramientas. Dichas herramientas son, por ejemplo, sondas específicas o cebadores (de PCR), también denominados como fragmentos de cebadores, basados en las secuencias de ácidos nucleicos de acuerdo con la invención. Si hay material genético de *Ostertagia ostertagi* presente en el animal, este se unirá específicamente, por ejemplo, a cebadores de PCR específicos y, por ejemplo, después de la síntesis de ADNc, se amplificará posteriormente en una reacción de PCR. Después, el producto de la reacción de PCR puede detectarse fácilmente en una electroforesis en gel de ADN. Los libros de texto convencionales de PCR proporcionan métodos para determinar la longitud de los cebadores para reacciones de PCR selectivas con ADN de *Ostertagia ostertagi*. Se usan con frecuencia fragmentos de cebadores con una secuencia de nucleótidos de al menos 12 nucleótidos, pero son algo más selectivos cebadores de más 15, más preferiblemente de 18 nucleótidos. Son muy aplicables en general especialmente cebadores con una longitud de al menos 20, preferiblemente de al menos 30 nucleótidos. Se describen ampliamente técnicas de PCR en C. Dieffenbach y G. Dveksler: *PCR primers: a laboratory manual*, CSHL Press, ISBN 879694473 (1995)). Por lo tanto, también son parte de la invención secuencias de ácido nucleico de acuerdo con la invención o cebadores de esas secuencias de ácido nucleico que tienen una longitud de al menos 12, preferiblemente 15, más preferiblemente 18, aún más preferiblemente 20, 22, 25, 30, 35 ó 40 nucleótidos, en ese orden de preferencia, en las que las secuencias de ácido nucleico o las partes de las mismas tienen al menos una homología del 70% con la secuencia de ácido nucleico que se representa en la SEC ID N°: 9. Se entiende que los cebadores tienen una longitud de al menos 12 nucleótidos y una homología de al menos el 70%, más preferiblemente del 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% o incluso del 100%, en ese orden de preferencia, con la secuencia de ácido nucleico que se representa en la SEC ID N°: 9. Dichas secuencias de ácido nucleico pueden usarse como fragmentos de cebadores en reacciones de PCR para aumentar la cantidad de ADN que codifican o en reacciones de hibridación. Esto permite la amplificación o detección rápida en transferencias de secuencias de nucleótidos específicos para su uso como una herramienta de diagnóstico para, por ejemplo, la detección de *Ostertagia ostertagi*, como se ha indicado anteriormente.

Otro ensayo sobre material genético se basa en el material de *Ostertagia* obtenido de, por ejemplo, un hisopo, seguido de una purificación de ADN clásica seguida de una hibridación clásica con fragmentos de cebadores marcados radiactivamente o con colorantes. Los fragmentos marcados con colorantes y marcados radiactivamente se denominan generalmente medios de detección. Se conocen bien en la técnica tanto las reacciones de PCR como las reacciones de hibridación se describen, entre otros, en Sambrook y Russell, anteriormente.

Por lo tanto, una realización de la invención se refiere a un kit de ensayo de diagnóstico para la detección de secuencias de ácido nucleico de *Ostertagia ostertagi*. Dicho ensayo comprende una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la invención o un fragmento de cebador de la misma.

Un kit de ensayo de diagnóstico basado en la detección de material antigénico de las proteínas específicas de *Ostertagia ostertagi* de acuerdo con la invención y, por lo tanto, adecuado para detección de una infección por *Ostertagia ostertagi* puede, entre otros, comprender un ensayo de ELISA convencional. En un ejemplo de dicho ensayo, las paredes de los pocillos de una placa de ELISA se revisten con anticuerpos dirigidos contra cualquiera de las proteínas de acuerdo con la invención. Después de la incubación con material que se va a ensayar, se añaden anticuerpos anti-*Ostertagia ostertagi* marcados a los pocillos. Después, una reacción de color revela la presencia de material antigénico de *Ostertagia ostertagi*. Por lo tanto, otra realización más de la presente invención se refiere a kits de ensayo de diagnóstico para la detección de material antigénico de *Ostertagia ostertagi*. Dichos kits de ensayo comprenden anticuerpos contra una proteína de acuerdo con la invención.

Un kit de ensayo de diagnóstico basado en la detección en suero de anticuerpos contra una proteína de *Ostertagia ostertagi* de acuerdo con la invención y, por lo tanto, adecuado para la detección de una infección por *Ostertagia ostertagi* puede comprender, entre otros, un ensayo de ELISA convencional. En dicho ensayo, las paredes de los pocillos de una placa ELISA pueden revestirse, por ejemplo, con una proteína *Ostertagia ostertagi* de acuerdo con la invención. Después de la incubación con el material que se va a ensayar, se añaden anticuerpos contra esa proteína marcados a los pocillos. Después, una reacción de color revela la presencia de anticuerpos contra *Ostertagia ostertagi*. Por lo tanto, otra realización más de la presente invención se refiere a kits de ensayo de diagnóstico para la detección de anticuerpos contra *Ostertagia ostertagi*. Dichos kits de ensayo comprenden una proteína de *Ostertagia ostertagi* de acuerdo con la invención.

El diseño del inmunoensayo puede variar. Por ejemplo, el inmunoensayo puede basarse en una reacción de competición o directa. Además, los protocolos pueden usar soportes sólidos o pueden usar material celular. La detección del complejo anticuerpo-antígeno puede implicar el uso de anticuerpos marcados; los marcadores pueden ser, por ejemplo, enzimas, moléculas fluorescentes, quimioluminiscentes, radiactivas o colorantes. Los métodos adecuados para detección de anticuerpos reactivos con una proteína de acuerdo con la presente invención en la muestra incluyen el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), el test de inmunofluorescencia (IFT) y los análisis de transferencia de Western.

Las proteínas de acuerdo con la invención, por ejemplo, expresadas como se ha indicado anteriormente, pueden usarse para producir anticuerpos que pueden ser policlonales, monoespecíficos o monoclonales (o derivados de los mismos). Si se desean anticuerpos policlonales, se conocen bien en la técnica técnicas para producir y procesar sueros policlonales (por ejemplo, Mayer y Walter, eds. *Immunochemical Methods in Cell and Molecular Biology*, Academic Press, Londres (1987)). Pueden prepararse anticuerpos monoclonales reactivos contra la proteína de acuerdo con la invención mediante inmunización de ratones endogámicos por técnicas también conocidas en la técnica (Kohler y Milstein, *Nature* 256, 495-497 (1975)).

## Ejemplos

### Ejemplo 1

#### 1.1. Preparación de productos ES y productos EX de parásitos y de suero de conejo anti-ES

Se prepararon productos EX como se describe en Geldhof, P. *et al.*, *Parasite Immunology* 24, 263-270 (2002). El EX que se usa en este ejemplo es comparable al S1 que se describe en esta publicación. Se prepararon productos excretorios-secretores como se describe en Geldhof P. *et al.*, *Parasitology* 121, 639-647 (2000). Se inmunizaron conejos tres veces, con un intervalo de 1 semana, con 100 µg de proteínas ES obtenidas de fases L<sub>3</sub>, L<sub>4</sub> y adulta, junto con adyuvante de Freund, y se extrajo sangre tres semanas después de la última inmunización. Se usaron sueros policlonales de estos conejos para la exploración inmunológica de genotecas de ADN de *O. ostertagi*.

#### 1.2. Construcción de genotecas de ADNc de *Ostertagia ostertagi*

Se preparó el ARN total de parásitos L<sub>3</sub>, L<sub>4</sub> y adultos usando reactivo de TRIZOL® (GibcoBRL, Life Technologies). Se purificó ARN poliA<sup>+</sup> usando el kit mRNA Separator® (Clontech Laboratories, Inc.). Se convirtieron tres µg de ARNm en ADNc de cadena sencilla con cebadores hexaméricos aleatorios (SuperScript® Choice System for cDNA Synthesis, GibcoBRL, Life Technologies). El ADNc bicatenario se modificó con adaptadores EcoRI-NotI y se clonó en el vector lambda gt11 (Stratagene). Se empaquetaron los fagos lambda recombinantes (Gigapack®III Gold Packaging Extract, Stratagene) y se trituró la reacción de empaquetamiento. Se estimó que la genoteca de ADNc de L<sub>3</sub> contenía 1,15 x 10<sup>6</sup> clones independientes; la genoteca de ADNc de L<sub>4</sub> 9,6 x 10<sup>6</sup> y la genoteca de ADNc de adultos

contenía  $3,41 \times 10^6$  unidades formadoras de placas. Tras la amplificación, estas genotecas de ADNc se exploraron inmunológicamente con los sueros de conejo anti-ES.

### 1.3 Exploración inmunológica de genotecas de ADNc

Se sembraron aproximadamente 100.000 placas en agar de caldo de Luria (8.000 placas por placa) y se hicieron réplicas en filtros de nitrocelulosa empapados en isopropiltio- $\beta$ -D-galactósido 10 mM. Tras el bloqueo del fondo (leche en polvo al 5% en PBST, Nestlé Gloria) los filtros se incubaron durante una noche con suero de conejo, diluido (1:200) en tampón de bloqueo. Se usó suero de cabra anti-conejo acoplado con peroxidasa de rábano rusticano (dilución 1:1000) como conjugado y se detectaron los complejos de antígeno-anticuerpo con diaminobenzidina. Se volvieron a explorar las placas que reaccionaban hasta que se obtuvo una población homogénea de fagos recombinantes inmunopositivos. Las placas purificadas se resuspendieron en tampón SM estéril (Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, NaCl 100 mM, MgSO<sub>4</sub> 10 mM) y se conservaron a 4°C.

### 1.4. Clonación y análisis de la secuencia de ADN de los insertos de ADNc

Los insertos de fagos se amplificaron por PCR con cebadores de lambda gt11:

**$\lambda$ gt11F** 5'-GGTGGCGACGACTCCTGGAGCCCG-3' (SEC ID N°: 15)

y

**$\lambda$ gt11R** 5'-TTGACACCAGACCAACTGGTAATG-3' (SEC ID N°: 16),

y se clonaron en un vector plasmídico (pGEM-T<sup>®</sup>, Promega). Se seleccionaron los transformantes de *E. coli* DH5 $\alpha$  que contenían el plásmido recombinante en placas de agar de caldo de Luria suplementadas con ampicilina 0,1 mg/ml, isopropiltio- $\beta$ -D-galactósido 0,1 mM, y 5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactosa 40  $\mu$ g/ml y los insertos de ADNc se amplificaron por PCR con los cebadores del vector:

**SP6** 5'-ATTTAGGTGACACTATAGAA-3' (SEC ID N°: 17)

y

**T7** 5'-GTAATACGACTCACTATAGGGC-3' (SEC ID N°: 18).

Las secuencias de nucleótidos de los clones de ADNc se determinaron mediante el método de terminación de cadena didesoxi, usando terminadores fluorescentes BigDye<sup>™</sup> en un secuenciador de ADN automático 377 (PE Biosystems). Se recopilaron los datos de secuencias de ADN (DNASTAR<sup>®</sup>, Inc.) y se compararon con secuencias de ácidos nucleicos (Blast+Beauty) y de aminoácidos (BlastX+Beauty) en diversas bases de datos (EMBL, GenBank, Wu-Blast2 y Swiss-Prot).

### Resultados del Ejemplo 1

El método de exploración que usaba antisuero de conejo anti-excretor-secretor específicamente preparado para la detección de genes que codifican *Ostertagia ostertagi* inmunorreactivos condujo a la detección de cinco nuevos genes que codifican componentes vacunales. Se descubrió que los cinco genes estaban presentes en la genoteca de ADNc de la fase adulta de *Ostertagia ostertagi*.

1) Se descubrió un gen que codifica una nueva proteína inmunogénica, del que se proporciona la secuencia de nucleótidos que codifica determinantes inmunogénicos importantes en la SEC ID N°: 7. El gen codifica una proteína con una longitud de aproximadamente 1600 aminoácidos y un peso molecular de  $\geq 200$  kD. La secuencia de aminoácidos de una parte inmunorreactiva importante de esta proteína se proporciona en la SEC ID N°: 8. Como puede observarse en la Figura 1, varios clones, uno de los cuales está señalado con una flecha, comprenden al menos partes del gen que codifican una parte inmunogénica de esta proteína. Puede observarse claramente que esta proteína se reconoce intensamente por anticuerpos contra esta proteína.

2) Se descubrió un gen que codifica una nueva proteína inmunogénica de 28 kD. La mayor parte de la secuencia de nucleótidos de este gen se proporciona en la SEC ID N°: 3. La secuencia de aminoácidos de la proteína se proporciona en la SEC ID N°: 4. Como puede observarse en la Figura 2B, en los carriles denominados ES y EX (véase el apartado 1.1. para una explicación) la banda clara de aproximadamente 28 kD que representa esta proteína se reconoce intensamente por antisueros monoespecíficos purificados en los carriles de clones inmunopositivos de placas puras que codifican la proteína.

3) Se descubrió un gen que codifica una nueva proteína inmunogénica de 25 kD. La secuencia de nucleótidos de este gen se proporciona en la SEC ID N°: 5. La secuencia de aminoácidos de la proteína se proporciona en la SEC ID N°: 6. Como puede observarse en la Figura 2C, en el carril denominado EX (véase el apartado 1.1. para una

explicación) la banda clara de aproximadamente 25 kD que representa esta proteína se reconoce intensamente y muy específicamente por antisueros monoespecíficos purificados en los carriles de clones inmunopositivos de placas puras que codifican esta proteína.

4) Se descubrió un gen que codifica una nueva proteína inmunogénica de 31 kD. La secuencia de nucleótidos de este gen se proporciona en la SEC ID N°: 1. La secuencia de aminoácidos de la proteína se proporciona en la SEC ID N°: 2. En la Figura 3B, en la región recuadrada, las cuatro proteínas a la derecha son formas de esta proteína. (Véanse también los resultados del Ejemplo 2). A partir de la Figura 3A se deduce que la proteína se reconoce intensamente por antisueros monoespecíficos purificados en los carriles de clones inmunopositivos de placas puras que codifican esta proteína.

5) Se descubrió un gen que codifica una nueva proteína inmunogénica de 30 kD. La secuencia de nucleótidos de este gen se proporciona en la SEC ID N°: 9. La secuencia de aminoácidos de la proteína se proporciona en la SEC ID N°: 10. En la Figura 3B, en la región recuadrada, las dos proteínas a la izquierda son formas de esta proteína. (Véanse también los resultados del Ejemplo 2). A partir de la Figura 3A se deduce que la proteína se reconoce intensamente por antisueros monoespecíficos purificados en los carriles de clones inmunopositivos de placas puras que codifican esta proteína.

## Ejemplo 2

### 2.1. Preparación de antígenos

Se obtuvieron parásitos adultos de *O. ostertagi* y productos ES de adultos como se describe en Geldhof *et al.* (2000, *Parasitology*, 121, 639-647).

### 2.2. Cromatografía sobre Thiol-Sepharose

Se preincubaron los ES totales con una concentración final de 2,5 mM de ditioneitol (DTT) durante 30 minutos a 37°C antes de la cromatografía. Se retiró el exceso de DTT haciéndolos pasar a través de una columna de 10 x 2,6 cm de Sephadex® G-25 (Pharmacia) y se eluyó con Tris 10 mM; NaCl 0,5 M, pH 7,4 a 5 ml/minuto. Se equilibró una columna activada de Thiol-Sepharose 4B (Sigma) activada, de 5 ml de volumen de lecho, en Tris 10 mM y NaCl 0,5 M a pH 7,4. Se aplicaron las muestras de proteína (10 mg/procesamiento) a la columna de Thiol-Sepharose 4B a una velocidad de flujo de 5 ml/hora. Se eluyó el material no unido mediante el lavado de la columna con tampón de equilibrio (Tris 10 mM y NaCl 0,5 M a pH 7,4) hasta que la  $DO_{280}$  hubiera vuelto a unas medidas basales estables. El material unido se eluyó con tampón de equilibrio que contenía DTT 50 mM a una velocidad de flujo de 5 ml/hora. Las fracciones máximas se combinaron. Se retiró el DTT de las proteínas eluidas haciéndolas pasar a 5 ml/minuto a través de una columna de Sephadex® G-25 (Pharmacia) en Tris 10 mM a pH 7,4. Las fracciones máximas se combinaron de nuevo y el contenido de proteínas se determinó mediante el método de BCA (Pierce). Ambas purificaciones, de S3-tiol y ES-tiol, tuvieron un rendimiento de entre el 10 y el 15%. Se tomaron alícuotas de las fracciones de ES-tiol para el análisis de SDS-PAGE y en gel de sustrato. Después, el resto de los eluidos se conservaron a -70°C hasta que fueron necesarios.

### 2.3. Electroforesis en gel 1D y 2D

Los componentes peptídicos del ES-tiol se visualizaron mediante tinción con Azul de Coomassie (Azul de Coomassie R-250 al 0,1% en metanol al 40% y ácido acético al 10%) después del fraccionamiento de 10 µg de muestra de proteína en SDS-PAGE al 10% en condiciones reductoras. Se realizó la electroforesis en gel 2D usando el sistema 1 PG-SDS/PAGE de acuerdo con Bjellqvist *et al.* (*Electrophoresis* 14, 1357-1365 (1993)). Las muestras de proteína se precipitaron por adición de 10 volúmenes de acetona helada y se dejaron durante 2 horas a -20°C. La acetona se desechó después de la centrifugación. El sedimento se volvió a disolver durante 2 horas en una solución de rehidratación que contenía urea 9 M, CHAPS al 4% (Pharmacia), Azul de Bromofenol, ditioneitol 18 mM y tampón IPG al 2% (Pharmacia). Esta muestra, de aproximadamente 100 µg de proteína, se cargó en tiras de Immobiline de 7 cm (pH 3-10, Pharmacia) para realizar el isoelectroenfoque. La tira se lavó posteriormente durante 30 minutos en Tris-Cl 50 mM a pH 8,8 que contenía urea 6 M, glicerol al 30% (v/v), SDS al 2% (p/v), ditioneitol 64 mM y trazas de azul de bromofenol. La segunda dimensión se realizó en SDS-PAGE al 12%. Los geles se tiñeron mediante tinción con Coomassie Coloidal (Sigma).

### 2.4. Transferencia de Western

Se evaluaron las respuestas de anticuerpos en suero de los terneros a la inmunización con ES-tiol mediante transferencia de Western usando sueros recogidos una semana después de la segunda inmunización. Se fraccionaron cinco µg de ES-tiol usando SDS-PAGE al 10% en condiciones reductoras y después se inmunotransfirieron sobre una membrana de PVDF. Las secciones de transferencia se cortaron en tiras y se bloquearon durante una noche en suero de caballo al 10% en PBST. Después de 2 horas de sondear con sueros combinados (diluidos 1:400 en suero de caballo al 2% en PBST), de los diferentes grupos, se añadió el conjugado (de conejo anti-bovino-HPRO, Sigma, a 1:8000 en suero de caballo al 2% en PBST) durante una hora. Se visualizaron los antígenos reconocidos por adición de tetracloruro de 3,3-diaminobenzidina al 0,05% en PBS que contenía  $H_2O_2$  al 0,01% (v/v).

## 2.5. Análisis espectrométrico de masas

El análisis espectrométrico de masas se realizó esencialmente como se ha analizado anteriormente en Jensen *et al.* (Proteins, Supl. 2, 74-89 (1998)). En resumen, las manchas de proteínas se digirieron en el gel usando tripsina y los péptidos se purificaron posteriormente con la tecnología de AnchorChip®. Las muestras peptídicas se analizaron mediante espectrometría de masas MALDI-TOF. El material restante se usó para un análisis de CL-EM-EM para determinar la secuencia de aminoácidos de los diferentes péptidos.

### Resultados del Ejemplo 2

#### Perfil peptídico del ES-tiol y del ES completo

El análisis de la fracción proteica de ES-tiol en electroforesis en gel 1D y 2D se muestra en la Figura 4. El ES-tiol comprendía una banda destacada a ~30 kD, así como 3 bandas moleculares más bajas y aproximadamente 6 péptidos en el intervalo de tamaños de 45 a 92 kD (Figura 3A). El análisis de esta fracción proteica en gel 2D se muestra en la Figura 3B. La banda visible destacada de 30 kD en el gel 1D migra en aproximadamente 6 manchas entre pI 5-7 en el gel 2D. Eran visibles otras 13 manchas más débiles con valores de pI que variaban entre 4 y 8, con masas moleculares entre 53 y 15 kD, en el ES-tiol en el gel 2D (Figura 3B).

#### Respuestas de anticuerpos de terneros inmunizados

Los animales de control mostraron cierto reconocimiento de fondo minoritario de unos pocos péptidos en el ES-tiol (Figura 4). El grupo del ES-tiol reconoció intensamente los antígenos de 30 y de 31 kD (Figura 4).

### Resultados de la espectrometría de masas

Las 6 manchas abundantes a 30 kD se escindieron del gel y se usaron en un análisis de masas por MALDI para la identificación por huella peptídica (recuadrado en la Figura 3B). Se detectaron dos proteínas diferentes en estas manchas. El análisis de masas para la identificación por huella peptídica indicó que las manchas número 3-6 contenían la misma proteína de 31 kD que se ha descrito anteriormente en 4) y las manchas 1 y 2 contenían la proteína de 30 kD, que se ha descrito anteriormente en 5). El material restante se usó en el análisis de CL-EM-EM, que dio como resultado las secuencias peptídicas de las manchas 1-6. Éstas demostraron una homología del 100% con el antígeno excretor-secretor anteriormente caracterizado como codificado por los genes que codifican una proteína de 31 kD y 30 kD de *Ostertagia ostertagi*, como se describe en el Ejemplo 1 en los apartados 4) y 5).

### Ejemplo 3

#### 3.1. Animales

Un total de 17 terneros, machos y hembras de un cruce de raza Holstein, de entre 6 y 12 meses de edad y de 3 explotaciones diferentes recibieron una infección natural con nematodos gastrointestinales durante una primera estación de pastoreo de al menos 6 meses. Para confirmar el estado inmune de los terneros, se midieron las reducciones en la carga de helmintos después del tratamiento durante la estabulación con benzimidazol y una infección experimental posterior. Los terneros de la explotación 1 (n = 4) recibieron una exposición natural durante un mes en la segunda estación de pastoreo (Claerebout *et al.*, *Veterinary Parasitology* 75, 153-167 (1988)). Los terneros de las explotaciones 2 (n = 6) y 3 (n = 7) recibieron una exposición experimental con 50.000 larvas L<sub>3</sub> de *O. ostertagi* una semana después del tratamiento. Los recuentos de helmintos de *O. ostertagi* de estos animales (animales “inmunizados”) se compararon con los de terneros sin helmintos (n = 6 para cada explotación) que recibieron una exposición similar (animales con una “infección primaria”). Las reducciones en los recuentos de helmintos fueron del 48%, 45% y 24% para los terneros de las explotaciones 1, 2 y 3, respectivamente.

#### Recogida de muestras

#### 3.2. Recogida de moco

Se recogió moco del abomaso de los 17 animales “inmunizados” de las 3 explotaciones diferentes y de los 18 animales con una “infección primaria” raspando suavemente la superficie de la mucosa con un portaobjetos de vidrio. Los raspados de moco se homogeneizaron con un peso equivalente de solución salina tamponada con fosfato (PBS 0,05 M a pH 7,3, Na-azida 3 mM) usando un homogeneizador Ultra-turrax (13.000 RPM, 3 x 1 min). Los homogeneizados se centrifugaron a 20.000 g durante 30 minutos. El sobrenadante se retiró y se conservó a -70°C. Para aislar las inmunoglobulinas, el sobrenadante se trató con perlas de agarosa con proteína G (Roche). El moco (1 ml) se centrifugó (14.000 g, 4°C, 30 min) para eliminar los residuos. Se añadieron 200 µl de tampón de inicio (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 20 mM a pH 7,0) al sobrenadante para asegurarse de que el pH de la muestra se mantuviera neutro. Después del equilibrado de la muestra (2 lavados con tampón de inicio) se añadieron 100 µl de perlas de agarosa con proteína G. La muestra se colocó en un rotor durante 2 h a 4°C para permitir la unión de las partes Fc de las Ig a las perlas. El sobrenadante se recogió y se guardó junto con los 5 primeros lavados (400 µl de tampón de lavado/lavado, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 20 mM; NaCl 150 mM, EDTA 2 mM, pH 7,0). Las Ig unidas se eluyeron con 400 µl de tampón de elución (glicina 100 mM, pH 2,7) hasta que la DO de las eluciones era 0. Las fracciones se neutralizaron inmediatamente con tampón de neutralización.

al 20% (Tris-HCl 1 M a pH 9,0). El sobrenadante/fracción de lavado se trató de nuevo con perlas de agarosa con proteína G para asegurarse de que se recogieran todos los anticuerpos presentes en la muestra de moco. Las muestras de moco tratadas se combinaron en 2 grupos por cada explotación: el grupo “inmunizado” y el grupo con “infección primaria”.

### 3.3 Recogida de sondas de células secretoras de anticuerpo (sondas de ASC)

Se recogieron sondas de ASC de animales de la explotación 3 (n = 13). Las sondas de células secretoras de anticuerpos (sondas de ASC) designan el sobrenadante de un cultivo de células de ganglios linfáticos que se preparó con la técnica originalmente descrita por Meeusen y Brandon (*J. Immunol. Methods* 172, 71-76 (1994a); *Eur. J. Immunol.* 24, 469-474 (1994b)). En resumen, se recogieron ganglios linfáticos del abomaso en la necropsia y se transportaron en PBS frío + penicilina-estreptomicina al 1%. Los linfocitos se recogieron cortando los ganglios y entresacándolos en 5 ml de medio RPMI (Gibco BRL), se lavaron en medio RPMI y se centrifugaron (1.000 g, 10 min, 4°C). Los glóbulos rojos se lisaron añadiendo 20 ml de solución de lisis (Tris al 2% a pH 7,65, NH<sub>4</sub>Cl al 0,8%) durante 10 minutos con agitación suave. Se usaron veinte ml de RPMI que contenía penicilina-estreptomicina al 1% y suero de caballo al 2% para lavar las células 3 veces. Las células se resuspendieron a una concentración final de 5 x 10<sup>6</sup> células/ml en medio de cultivo (RPMI suplementado con suero de caballo al 20%, penicilina-estreptomicina al 1%, piruvato sódico al 1%, aminoácidos no esenciales al 1%, kanamicina al 1%, gentamicina al 0,1% y  $\beta$ -mercaptoetanol al 0,035%). Se incubaron a 37°C matraces de cultivo que contenían 50 ml de la suspensión celular en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5% en aire sin estimulación. Después de 3 días, las células se retiraron por centrifugación (1000 g, 10 minutos) y se recogieron 400 ml de sobrenadante por animal. El sobrenadante (sondas de ASC) se concentró 10 veces en una SpeedVac® y se realizaron combinaciones de anticuerpos tanto de los animales “inmunizados” como de los animales con una “infección primaria” para su exploración en transferencias de Western y genotecas de ADNc.

### 3.4. Exploración de genotecas de ADNc

Se construyeron genotecas de ADNc de L<sub>3</sub>, L<sub>4</sub> y adultos de *O. ostertagi* en fagos  $\lambda$ gt11, se propagaron en células Y1090r<sup>-</sup> y se sembraron en placas por métodos convencionales (Sambrook y Russel, anteriormente). Se exploraron aproximadamente 100.000 placas de las 3 genotecas con sondas de ASC y anticuerpos del moco. Todas las placas se exploraron primero con una combinación de anticuerpos de animales “inmunizados” de las tres explotaciones. Todas las placas positivas se volvieron a explorar hasta que se pudo aislar una placa individual. Estas placas positivas se volvieron a explorar con la combinación de anticuerpos de animales con una “infección primaria” de las tres explotaciones. Se conservaron las placas que se reconocieron exclusivamente por los anticuerpos de los animales “inmunes”, se resuspendieron en 200  $\mu$ l de tampón SM estéril (Tris-HCl 50 mM a pH 7,5 NaCl 100 mM, MgSO<sub>4</sub> 10 mM) y se almacenaron a 4°C con una gota de cloroformo. Las otras se designaron como falsos positivos debido al reconocimiento cruzado de los anticuerpos de los animales con una “infección primaria”. Los insertos se amplificaron mediante una reacción de PCR con cebadores universales de  $\lambda$ gt11 y el amplicón se purificó en gel con un kit de purificación en gel (Qiagen). El fragmento de ADNc se subclonó en un vector pGEM-T (Promega) y se usó para transformar células de *E. coli* DH5 $\alpha$ . Después de la selección azul-blanca (IPTG/X-gal) y de la PCR con los cebadores del vector SP6 y T7, se seleccionaron los clones recombinantes y se aisló el ADN plasmídico usando el kit de aislamiento de plásmidos de Qiagen. La secuencia de nucleótidos de los clones de ADNc se determinó mediante el método de terminación de cadena didesoxi, usando terminadores fluorescentes BigDye™ en un secuenciador de ADN automático 377 (PE Biosystems). La recopilación y el análisis de las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos deducidas se realizaron usando el programa informático DNASTAR®.

### Resultados del Ejemplo 3

El método de exploración usando anticuerpos locales obtenidos a partir del moco y del sobrenadante de cultivo de células secretoras de anticuerpos (ASC) hizo posible que se descubrieran dos nuevos genes adicionales que codifican componentes vacunales:

1) Se descubrió un gen de 900 nucleótidos en la genoteca de ADNc tanto de la fase larvaria L<sub>4</sub> como de la fase adulta. La secuencia de nucleótidos de este gen se proporciona en la SEC ID N°: 11. El gen codifica una proteína con una longitud de 300 aminoácidos y un peso molecular de aproximadamente 24 kD. La proteína tiene un punto isoeléctrico de pI 6,6. La secuencia de aminoácidos de la proteína se proporciona en la SEC ID N°: 12. Las flechas en el dibujo izquierdo de la Figura 5 muestran cómo las bacterias que expresan esta proteína son específicamente reconocidas por anticuerpos que se encuentran en el sobrenadante de ganglios linfáticos aislados a partir de animales inmunes. La importancia de este descubrimiento está subrayada por el hecho de que no todos los anticuerpos aislados a partir de animales con una infección primaria reaccionan con estos clones. Esto indica claramente la importancia de esta proteína en la inducción de la inmunidad. Se describe a grandes rasgos una caracterización adicional de esta proteína en el Ejemplo 4.

2) Se descubrió un gen de 1238 nucleótidos en la genoteca de ADNc de la fase larvaria L<sub>3</sub> y en la de la fase adulta. La secuencia de nucleótidos de este gen se proporciona en la SEC ID N°: 13. El gen codifica una proteína de 65 kD. La secuencia de aminoácidos de la proteína se proporciona en la SEC ID N°: 14. Las flechas en el dibujo izquierdo de la Figura 6 muestran cómo las bacterias que expresan esta proteína son específicamente reconocidas por anticuerpos aislados a partir del moco de animales inmunes. De nuevo, la importancia de este descubrimiento está subrayada por el hecho de que no todos los anticuerpos aislados a partir de animales con una infección primaria reaccionan con estos

clones. Esto indica claramente la importancia de esta proteína en la inducción de la inmunidad. Se describen a grandes rasgos detalles sobre la identificación del gen de longitud completa en el Ejemplo 5.

#### Ejemplo 4

##### 4.1 Clonación del gen para la proteína de 24 kD

Se amplificó por PCR un fragmento de 653 pb a partir del clon de genes que codifica la proteína de 24 kD (De Maere *et al.*, *Parasitology*, 125, 383-391 (2002)), usando cebadores que además incorporan sitios para endonucleasas de restricción (subrayados). Los cebadores usados fueron:

**24kForw** 5'-GAATTCATGAAGTTGGTCGTG-3' (SEC ID N°: 19)

**y**

**24kRev** . 5'-CTCGAGTCAATAGATCCTTGTG-3' (SEC ID N°: 20)

El producto de PCR se digirió con las enzimas de restricción EcoRI y XhoI, se purificaron en un gel (kit de Qiagen) y se clonó en la fase de lectura abierta del vector pET21a marcado con T7/6xHistidina (Novagen). Se confirmó la fase de lectura abierta correcta por secuenciación y la construcción se usó para transformar la cepa BL21 (DE3) de *Escherichia coli*. Se indujo la expresión de proteína recombinante por adición de isopropil- $\beta$ -tio galactosidasa durante 2 h a 37°C. Las células se centrifugaron, se resuspendieron en PBS y se lisaron por adición de 0,1 volúmenes de lisozima. Después de un ciclo de congelación (-70°C) y descongelación, los residuos celulares se centrifugaron y se recogió el sobrenadante. Los residuos celulares se resuspendieron en el T7-BindBuffer® (+ urea 6 M) durante 1 h en hielo para resuspender las proteínas insolubles.

Se purificaron las proteínas recombinantes sobre una columna de afinidad marcada con T7 y después mediante una columna de resina unida a His.

##### 4.2 Anticuerpos policlonales

Se inyectaron 100  $\mu$ g de proteína recombinante 3 veces por vía intramuscular con intervalos de 3 semanas en un conejo. Se extrajo sangre preinmune justo antes de la primera inmunización y la extracción de sangre final se realizó 3 semanas después de la última inmunización.

##### 4.3 Recogida de muestras

En el Ejemplo 3 anterior (secciones 3.3 y 3.4) y en De Maere *et al.* (2002, anteriormente), se describe la recogida del moco y la recogida de sondas de células secretoras de anticuerpos.

##### 4.4 Transferencia de Western

Se evaluó mediante transferencia de Western el reconocimiento de proteína de 24 kD nativa o recombinante por sondas de ASC, anticuerpos del moco o suero de conejo anti-proteína de 24 kD. Se fraccionaron 10  $\mu$ g de extracto de *Ostertagia* o de producto de excreción-secreción usando SDS-PAGE al 10% en condiciones reductoras y después se transfirieron sobre una membrana de PVDF. Las secciones de transferencia se cortaron en tiras, se bloquearon durante 2 h en suero de caballo normal al 10% en PBST y se sondaron durante una noche con sondas de ASC. Después se añadieron anticuerpos del moco o suero de conejo anti-proteína de 24 kD y conjugados: de conejo anti-bovino-HPRO (H+L) (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc.) a 1:8000 o de cabra anti-conejo conjugado con HRPO (Sigma) a 1:6000 en suero de caballo normal al 2% en PBST. Las tiras se incubaron durante una hora. Los antígenos reconocidos se visualizaron añadiendo tetracloruro de 3,3 diaminobenzidina al 0,05% en PBS que contenía H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0,01% (v/v).

##### 4.5. RT PCR cuantitativa

Se usó RT-PCR para investigar los transcritos del gen que codifica la proteína de 24 kD en fases del ciclo parasitario de *O. ostertagi*. Se usaron tres microgramos de ARN total de cada fase del ciclo (L<sub>3</sub>, L<sub>3</sub> desenvainada, L<sub>4</sub> y adulta) para la síntesis de ADNc usando un cebador oligo(dT) (Superscript®, Life technologies). Los cebadores oligonucleotídicos usados para la detección de transcritos del gen que codifica la proteína de 24 kD se diseñaron para amplificar un ADNc de aproximadamente 300 pares de bases de longitud. Se usó actina (Oo-act), descrita por Vercauteren *et al.* (*Molecular and Biochemical Parasitology*, 126, 201-208 (2003)) como control de un gen "constitutivo" que se expresa de forma constitutiva, para determinar la uniformidad de las reacciones de transcripción inversa.

Se amplificó el ADNc del gen que codifica la proteína de 24 kD y se cuantificó usando el Light Cycler® y el kit LightCycler-FastStart DNA Master SYBR Green 1 (Roche, Mannheim, Alemania). La mezcla de reacción consistía en una mezcla maestra que contenía ADN polimerasa Taq, mezcla de dNTP y SYBR Green 1, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, 5 pM de cada cebador y 2  $\mu$ l de molde de ADNc en un total de 20  $\mu$ l. Se llevó a cabo la confirmación de la especificidad de los productos de PCR sometiendo estos productos a un análisis de curva de fusión, y a una posterior electroforesis en gel.

de agarosa y secuenciación. El análisis de PCR se realizó por triplicado y la cuantificación se produjo usando patrones externos de ADNc de proteína de 24 kD y Oo-act. El cálculo se realizó con el programa informático de análisis del Lightcycler. La cantidad relativa de expresión de proteína de 24 kD se representó como una proporción ((número de copias de proteína de 24 kD/número de copias de gen constitutivo) x 10).

#### Resultados del Ejemplo 4

Se reconoció la proteína recombinante de 24 kD (Figura 7A) mediante sondas de ASC y anticuerpos del moco de animales inmunes (Figuras 7B-C). Esto indica que los epítomos de la proteína recombinante recuerdan a los de la proteína nativa y que la proteína recombinante tiene las mismas capacidades protectoras que la proteína nativa. Por lo tanto, los anticuerpos producidos contra la proteína recombinante en conejos también reconocen la proteína nativa en un gel 1D (Figura 7D) y en un gel 2D (Figura 8A). Se usaron anticuerpos contra proteína de 24 kD recombinante para determinar la expresión específica de fase de la proteína en una transferencia de Western (Figura 8B). La RT-PCR mostró expresión de la proteína en todas las fases del ciclo, especialmente en las fases L<sub>3</sub> con vaina (L3+s) y L<sub>4</sub> (Figura 9A). Como la proteína de 24 kD se expresa predominantemente en las larvas de las fases L<sub>3</sub> y L<sub>4</sub>, una vacuna basada en esta proteína interfiere con el desarrollo de las fases parasitarias larvarias L<sub>3</sub> (la fase infectiva) y L<sub>4</sub>. Por lo tanto, reduce o previene el establecimiento de una infección por *Ostertagia*. Esto a su vez conduce a una carga de helmintos reducida en el animal con todas las consecuencias beneficiosas que se exponen en este documento.

#### Ejemplo 5

##### Obtención del gen de longitud completa que codifica la proteína de 65 kD

Utilizando el clon de Ad (De Maere *et al.*, *Parasitology*, 125, 383-391 (2002)) como la base para el diseño de cebadores específicos, se obtuvo la secuencia completa del gen que se representa en la SEC ID N°: 13 mediante la técnica de amplificación rápida de los extremos 5' y 3' del ADNc (RACE). Se empleó el kit 5'-RACE de GibcoBRL para identificar el extremo 5' del gen para la proteína de 65 kD. Se produjo ADNc de cadena sencilla en una reacción de transcripción inversa usando el cebador específico 65Rev1 (véase a continuación) en 2 µg de ARN de adulto. Este ADNc tenía una cola de poli C en su extremo 3' con una desoxittransferasa terminal y se usó como molde en una PCR con el cebador de anclaje acortado (AAP, GibcoBRL):

**AAP: 5'-GGCCACGCGTCGACTAGTACGGGIIIGGGIIGGGIIG-3' (SEC ID N°: 21)**

y el cebador específico de gen 65Rev2 (véase a continuación). El producto de la 5' RACE PCR se clonó y se secuenció. Se empleó el kit 3'-RACE de GibcoBRL para identificar el extremo 3' del gen para la proteína de 65 kD. En resumen, se produjo ADNc de cadena sencilla en una reacción de transcripción inversa usando un cebador adaptador (AP) que contiene oligo(dT) en 2 µg de ARN de adulto. Este ADNc se usó como molde en una PCR con un cebador específico de gen 65kForw (véase a continuación) y con el cebador universal de amplificación (UAP, GibcoBRL):

**UAP: 5'-CUACUACUACUAGGCCACGCGTCGACTAGTAC-3' (SEC ID N°: 22)**

El producto de la 3' RACE PCR se clonó y se secuenció. El alineamiento de todos los datos de secuencias hizo posible diseñar nuevos cebadores específicos de gen que comprenden los codones de inicio y de terminación, For65 y Rev65 (véase a continuación). Se usó el kit SUPERSRIPT™ Preamplification System for First Strand cDNA Synthesis (GibcoBRL) para generar un molde para una PCR con estos cebadores, para obtener el ADNc de longitud completa.

Se emplearon cebadores específicos de gen para identificar la secuencia codificante de longitud completa del ADNc de la proteína de 65 kD:

**65Rev1: 5'-CAGCAATGGATACCGAATGAC-3' (SEC ID N°: 23)**

**65Rev2: 5'-AGTGACTTCATCATTGCTGGTG-3' (SEC ID N°: 24)**

**65kForw: 5'-TGATGATGAAGAACGAGAGGA-3' (SEC ID N°: 25)**

**For65: 5'-GGATCCATGAGGCTGATATTGCTCATTTTA-3' (SEC ID N°: 26)**

**Rev65: 5'-CTCGAGGCAGAGTCCACACGACTTTGG-3' (SEC ID N°: 27)**

#### RT-PCR cuantitativa

Se usó RT-PCR para investigar los transcritos del gen para la proteína de 65 kD en las fases del ciclo parasitario de *O. ostertagi*. Se usaron tres microgramos del ARN total de cada fase del ciclo (L<sub>3</sub>, L<sub>3</sub> desenvainada, L<sub>4</sub> y adulto)

para la síntesis de ADN usando un cebador oligo(dT) (Superscript, Life Technologies). Los cebadores oligonucleotídicos usados para la detección del transcrito para la proteína de 65 kD se diseñaron para amplificar un ADNc de aproximadamente 300-500 pares de bases de longitud. Se usó actina (Oo-act), descrita en Vercauteren *et al.* (2003, anteriormente), como control de un gen “constitutivo” expresado de forma constitutiva para determinar la uniformidad de las reacciones de transcripción inversa. Se amplificó el ADNc para la proteína de 65 kD y se cuantificó como se describe en el Ejemplo 4, sección 4.5.

#### Resultados del Ejemplo 5

La secuencia codificante completa del gen que codifica la proteína de 65 kD, como se representa en la SEC ID N°: 13, tiene una longitud de 1722 pb y codifica una proteína con un peso molecular de 65 kD (SEC ID N°: 14). La secuencia de aminoácidos N-terminal contiene una supuesta secuencia señal que se escinde probablemente entre los aminoácidos 16 y 17 (glicina-glicina). La secuencia proteica codificada contiene 5 sitios de N-glicosilación, una región de unión a cinc (cd00203; HEXXHALGFXHEXXRXDR) y un dominio pfam01400 (HEXXHXXG) que lo coloca en la familia de las astacinas (familia de peptidasas M12A). La RT-PCR reveló una expresión específica de fase del gen para la proteína de 65 kD por *Ostertagia ostertagi*. Se detectaron transcritos en las fases L<sub>3</sub> y adulta con un nivel de expresión particularmente más alto en la fase adulta del ciclo (Figura 9B). Esto está de acuerdo con la exploración de la genoteca de ADNc (De Maere *et al.*, 2002, anteriormente). Como la proteína de 65 kD se expresa predominantemente en las fases adultas, una vacuna basada en esta proteína interfiere con el desarrollo del parásito adulto. Esto conduce a una producción reducida de huevos, que a su vez reduce la contaminación de los campos. Esto reduce la carga de helmintos y los niveles de contaminación al final de la estación.

#### Ejemplo 6

##### Expresión en el sistema de expresión de vector de baculovirus

Las regiones codificantes para las proteínas de 65, 28, 31 y 24 kD de la invención se subclonaron a partir de sus respectivos vectores en un plásmido pFastBac® (Invitrogen) usando técnicas convencionales. Estas construcciones de FastBac se usaron para transfectar células de insecto Sf9 para producir baculovirus recombinantes, de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Invitrogen). Después, se realizaron cultivos de expresión usando células de insecto Sf9 y Sf158, que se cultivaron en matraces rotativos con microportadores de 100 y 250 ml. Los medios de cultivo sin suero usados fueron CCM3™ (Hyclone) y SF900-II™ (Invitrogen). Las células se infectaron a una moi de 0,1-0,5 y se cultivaron durante 3-4 días. Después, los cultivos se centrifugaron, se recogió el sobrenadante de cultivo y se resuspendieron los sedimentos celulares en PBS concentrado 10x. Se añadió Triton X-100® a todas las muestras a una concentración del 0,2% v/v. Las muestras se extrajeron durante una noche a temperatura ambiente, se centrifugaron y los sobrenadantes se conservaron a -20°C hasta su uso. Los sobrenadantes extraídos se procesaron en geles SDS/PAGE convencionales al lado de marcadores apropiados, se transfirieron sobre una membrana de transferencia de Immobilon-P® (Millipore), las membranas se tiñeron con anticuerpo monoclonal anti-marcador His (Sigma) y se visualizaron. La Figura 10 muestra los resultados de estas expresiones en baculovirus en una transferencia de Western; las proteínas de la invención eran más abundantes en las muestras de sedimento de células de insecto. Éstas se han usado para formular vacunas para vacunaciones.

#### Leyenda de las figuras

Figura 1: Transferencia puntual de bacterias lisadas que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica (al menos un parte inmunogénica de) la proteína que se representa en la SEC ID N°: 8. La exploración se realizó con antisuero de conejo anti-excretor-secretor específicamente preparado (véase el Ejemplo 1). Una flecha señala uno de los clones positivos.

Figura 2: Transferencias de Western; en el panel 2B, de la proteína de 28 kD con antisuero de conejo anti-ES y anti-EX (véase el Ejemplo 1) y, en el panel 2C, de la proteína de 25 kD con antisuero de conejo anti-ES y anti-EX (véase el Ejemplo 1).

Figura 3: Análisis de la fracción proteica de ES-tiol (véase también el Ejemplo 2); en el panel 3A, una electroforesis en gel 1D y, en el panel 3B, una electroforesis en gel 2D. El gel 2D muestra la proteína de 31 kD (las cuatro manchas más a la derecha en el área recuadrada) y la proteína de 30 kD (las dos manchas más a la izquierda en el área recuadrada).

Figura 4: Respuesta de anticuerpos de terneros inmunizados con ES-tiol frente a proteínas de la fracción ES.

Figura 5: Transferencia puntual de bacterias lisadas que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica la proteína de 24 kD que se representa en la SEC ID N°: 12. La exploración se realizó con anticuerpos específicamente preparados a partir de sobrenadante de ganglios linfáticos de animales inmunes (dibujo a la izquierda). (Véanse también los Ejemplos 3 y 4). Las flechas señalan algunos de los clones positivos. El dibujo a la derecha muestra una transferencia puntual comparable incubada ahora con anticuerpos de animales con una infección primaria. Con estos anticuerpos no se reconocen clones positivos.

## ES 2 304 526 T3

Figura 6: Transferencia puntual de bacterias lisadas que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica la proteína de 65 kD que se representa en la SEC ID N°: 14. Se realizó una exploración con anticuerpos específicamente preparados a partir del moco de animales inmunes (dibujo a la izquierda). (Véanse también los Ejemplos 3 y 5). Las flechas señalan algunos de los clones positivos. El dibujo a la derecha muestra una transferencia puntual comparable incubada ahora con anticuerpos de animales con una infección primaria. Con estos anticuerpos no se reconocen clones positivos.

Figura 7: Caracterización electroforética de la proteína de 24 kD; en el panel 7A: resultado de la expresión de proteína recombinante de 24 kD en *E. coli*; panel 7B: una transferencia de Western de proteína recombinante de 24 kD revelada con anticuerpos de sondas de ASC a partir de animales inmunes; en el panel 7C: transferencia de Western de proteína recombinante de 24 kD revelada con anticuerpos del moco de animales inmunes y panel 7D: transferencia de Western de extracto de L<sub>4</sub> revelada con anticuerpos de conejo anti-proteína de 24 kD.

Figura 8: Caracterización de la proteína de 24 kD; en el panel 8A: electroforesis en gel 2D y transferencia de Western de extracto de adultos de *Ostertagia ostertagi*, revelada con anticuerpos específicos contra proteína recombinante de 24 kD expresada en *E. coli* producidos en conejos y panel 8B: expresión específica de fase de proteína de 24 kD revelada con anticuerpos anti-proteína recombinante de 24 kD.

Figura 9: Resultados de una RT-PCR cuantitativa para detectar la expresión específica de fase; en el panel 9A, para la proteína de 24 kD (véase el Ejemplo 4) y, en el panel 9B, para la proteína de 65 kD (véase el Ejemplo 5).

Figura 10: Transferencia de Western de proteínas de *Ostertagia* expresadas en el sistema de expresión de vector de baculovirus (véase el Ejemplo 6), la tinción era con anticuerpo anti-His.

25 Carriles 1 y 11: BioRad Protein Precision Marker®.

Carril 2: proteína de 65 kD, sobrenadante + TX-100 al 0,2%.

30 Carril 3: proteína de 65 kD, sedimento celular en PBS + TX-100 al 0,2% (concentración 5x).

Carril 4: proteína de 28 kD, sobrenadante + TX-100 al 0,2%.

Carril 5: proteína de 28 kD, sedimento celular en PBS + TX-100 al 0,2% (concentración 5x).

35 Carril 6: proteína de 31 kD, sobrenadante + TX-100 al 0,2%.

Carril 7: proteína de 31 kD, sedimento celular en PBS + TX-100 al 0,2% (concentración 5x).

40 Carril 8: proteína de 24 kD, sobrenadante + TX-100 al 0,2%.

Carril 9: proteína de 24 kD, sedimento celular en PBS + TX-100 al 0,2% (concentración 5x).

45 Carril 10: vacío.

50

55

60

65

# REIVINDICACIONES

1. Una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína de *Ostertagia ostertagi* de 30 kD, teniendo dicha  
5 secuencia de ácido nucleico una homología de al menos el 85% con la secuencia de ácido nucleico de *Ostertagia ostertagi* que se representa en la SEC ID N°: 9.
2. Un fragmento de ADN que comprende una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 1.
- 10 3. Una molécula de ADN recombinante que comprende una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 1, o un fragmento de ADN de acuerdo con la reivindicación 2, bajo el control de un promotor unido funcionalmente.
4. Un vector de un microorganismo o virus vivo recombinante que comprende una secuencia de ácido nucleico de  
15 acuerdo con la reivindicación 1, un fragmento de ADN de acuerdo con la reivindicación 2 o una molécula de ADN recombinante de acuerdo con la reivindicación 3.
5. Una célula hospedadora que comprende una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 1, un fragmento de ADN de acuerdo con la reivindicación 2, una molécula de ADN recombinante de acuerdo con la  
20 reivindicación 3 o un vector de un microorganismo o virus vivo recombinante de acuerdo con la reivindicación 4.
6. Una proteína de *Ostertagia ostertagi* de 30 kD **caracterizada** por que dicha proteína tiene homología de secuencia de al menos el 90% con la secuencia de aminoácidos que se representa en la SEC ID N°: 10.
- 25 7. Una proteína de *Ostertagia ostertagi* de acuerdo con la reivindicación 6, **caracterizada** por que dicha proteína está codificada por una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 1.
8. Una proteína de *Ostertagia ostertagi* de acuerdo con la reivindicación 6 para su uso en una vacuna.
- 30 9. Uso de una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 1, un fragmento de ADN de acuerdo con la reivindicación 2, una molécula de ADN recombinante de acuerdo con la reivindicación 3, un vector de un microorganismo o virus vivo recombinante de acuerdo con la reivindicación 4, una célula hospedadora de acuerdo con la reivindicación 5 o una proteína de acuerdo con la reivindicación 6 para la fabricación de una vacuna para combatir una infección por *Ostertagia ostertagi*.
- 35 10. Una vacuna para combatir una infección por *Ostertagia ostertagi* **caracterizada** por que dicha vacuna comprende al menos una proteína *Ostertagia ostertagi* de acuerdo con la reivindicación 6 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 40 11. Una vacuna para combatir una infección por *Ostertagia ostertagi* **caracterizada** por que dicha vacuna comprende una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 1, un fragmento de ADN de acuerdo con la reivindicación 2, una molécula de ADN recombinante de acuerdo con la reivindicación 3, un vector de un microorganismo o virus vivo recombinante de acuerdo con la reivindicación 4 o una célula hospedadora de acuerdo con la reivindicación 5 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 45 12. Una vacuna para combatir una infección por *Ostertagia ostertagi* **caracterizada** por que dicha vacuna comprende anticuerpos contra una proteína de acuerdo con la reivindicación 6 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
13. Una vacuna de acuerdo con las reivindicaciones 10-12 **caracterizada** por que dicha vacuna comprende un  
50 adyuvante.
14. Una vacuna de acuerdo con las reivindicaciones 10-13 **caracterizada** por que dicha vacuna comprende un antígeno adicional procedente de un virus o microorganismo patógeno para el ganado, un anticuerpo contra dicho antígeno o información genética que codifique dicho antígeno y/o un componente farmacéutico.
- 55 15. Una vacuna de acuerdo con la reivindicación 14, **caracterizada** por que dicho virus o microorganismo patógeno para el ganado se selecciona del grupo de herpesvirus bovinos, virus de la diarrea viral bovina, virus de la parainfluenza de tipo 3, paramixovirus bovino, virus de la glosopeda, *Pasteurella haemolytica*, virus respiratorio sincitial bovino, *Theileria* sp., *Babesia* sp., *Trypanosoma* sp., *Anaplasma* sp., *Neospora caninum*, *Staphylococcus aureus*,  
60 *Streptococcus agalactiae*, *Mycoplasma*, *E. coli*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Cryptosporidium*, *Salmonella* y *Streptococcus dysgalactiae*.
16. Un método para la preparación de una vacuna de acuerdo con las reivindicaciones 10-15, comprendiendo dicho método la mezcla de una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 1, un fragmento de ADN de  
65 acuerdo con la reivindicación 2, una molécula de ADN recombinante de acuerdo con la reivindicación 3, un vector de un microorganismo o virus vivo recombinante de acuerdo con la reivindicación 4, una célula hospedadora de acuerdo con la reivindicación 5, una proteína de acuerdo con la reivindicación 6 o anticuerpos contra una proteína de acuerdo con la reivindicación 6 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

## ES 2 304 526 T3

17. Un kit de ensayo de diagnóstico para la detección de secuencias de ácido nucleico de *Ostertagia ostertagi*, que comprende una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 1.

5 18. Un kit de ensayo de diagnóstico para la detección de material antigénico de *Ostertagia ostertagi*, que comprende anticuerpos contra una proteína de acuerdo con la reivindicación 6.

19. Un kit de ensayo de diagnóstico para la detección de anticuerpos contra *Ostertagia ostertagi*, que comprende una proteína de *Ostertagia ostertagi* de acuerdo con la reivindicación 6.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Figura 1:

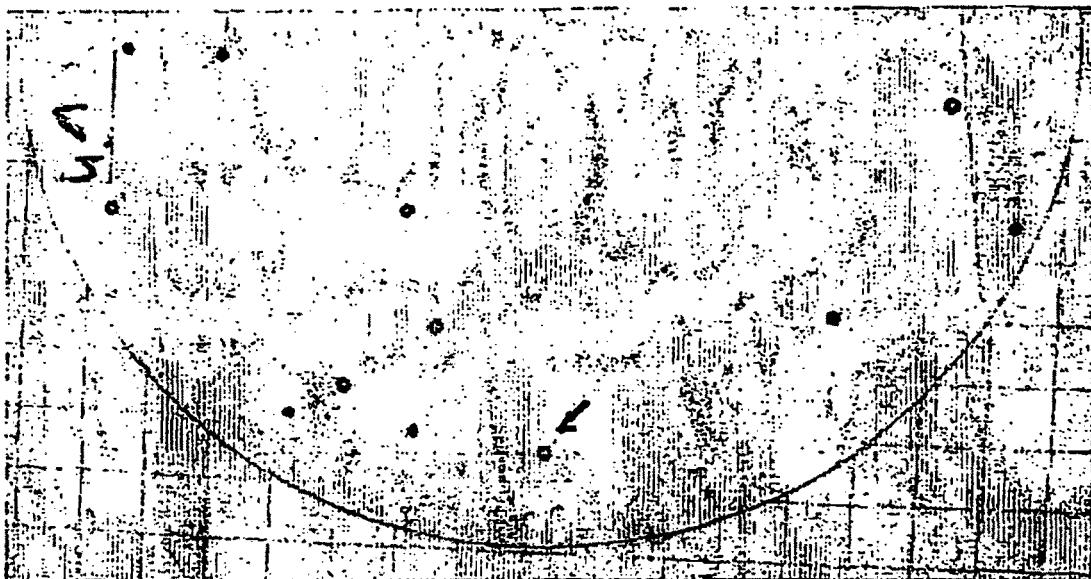


Figura 2:

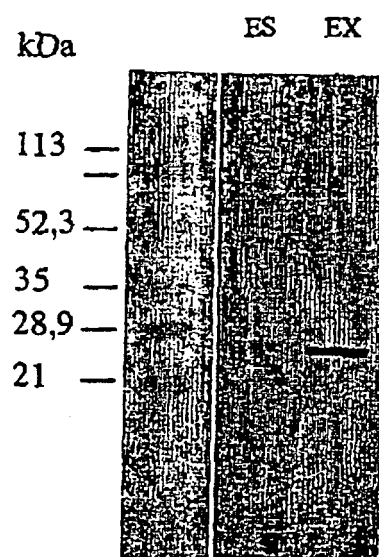
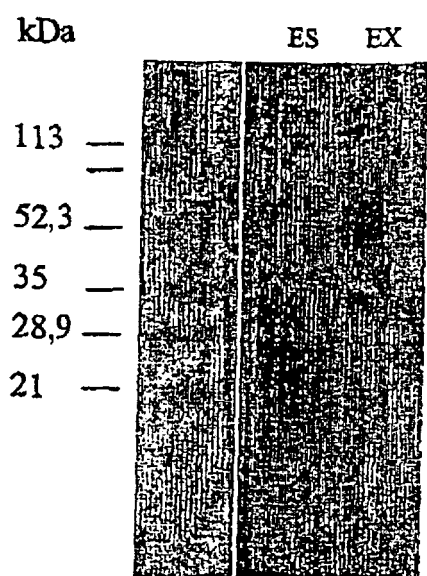


Figura 3 A:

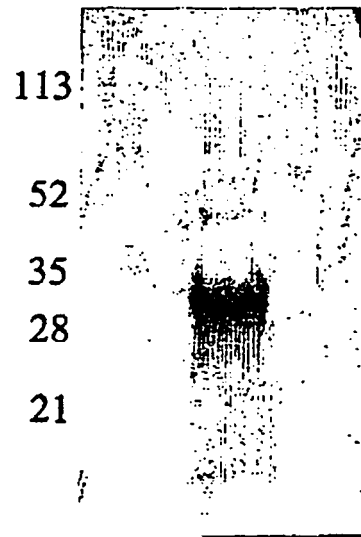


Figura 3 B

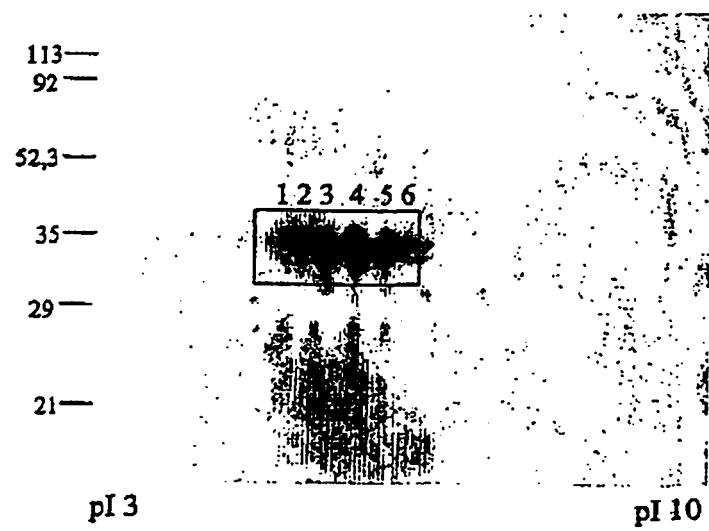


Figura 4

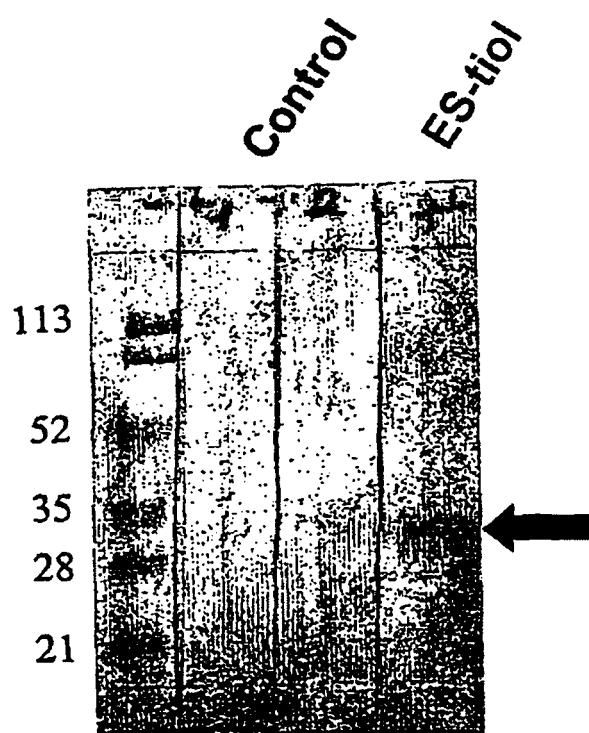


Figura 5



Figura 6

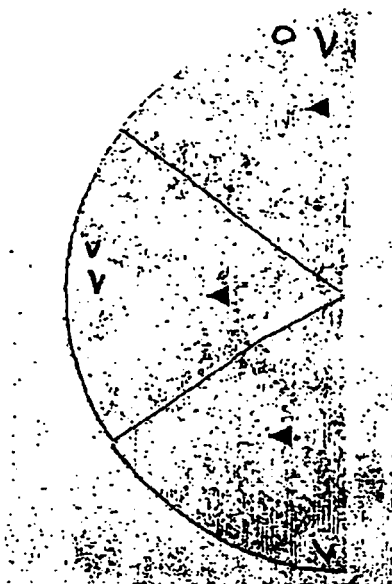


Figura 7

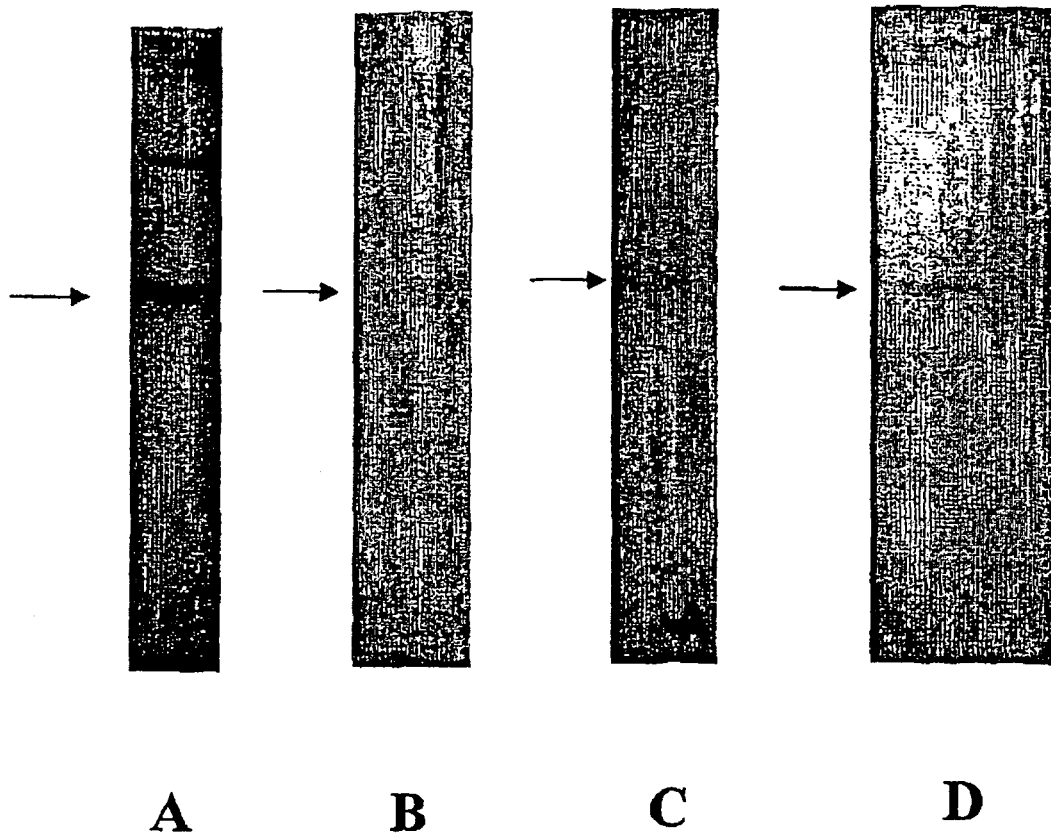


Figura 8 A

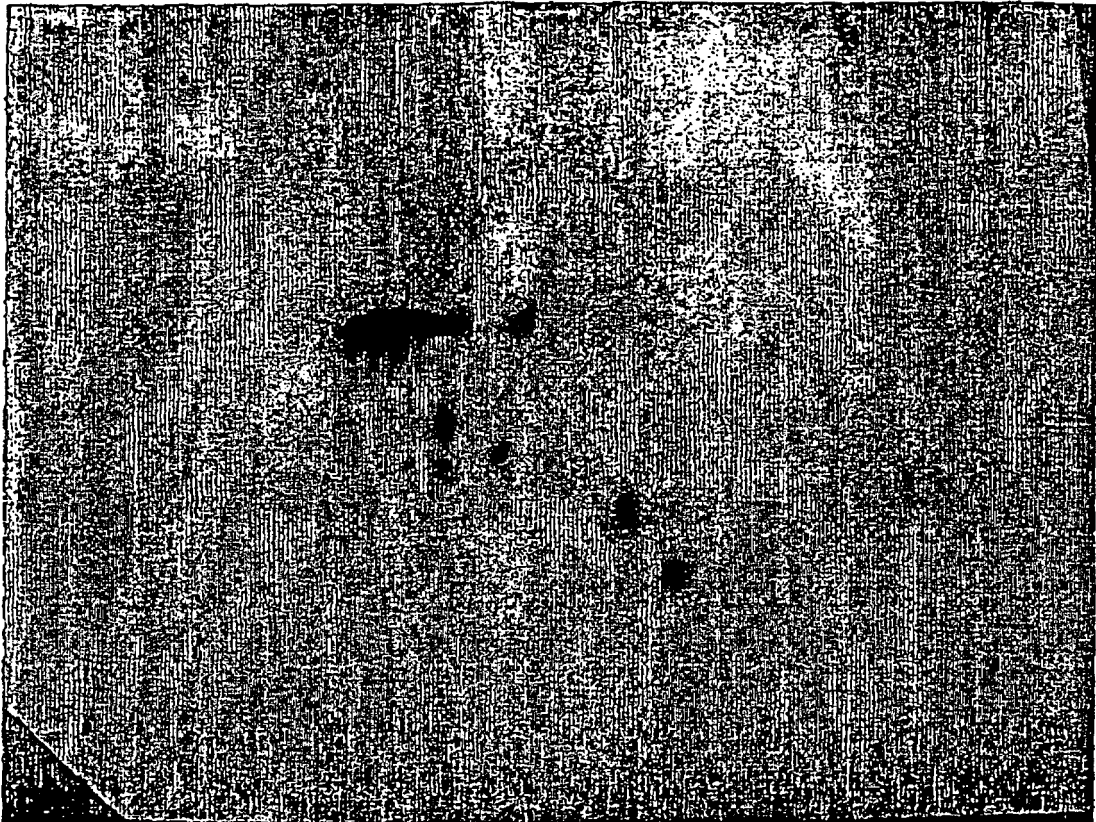


Figura 8 B

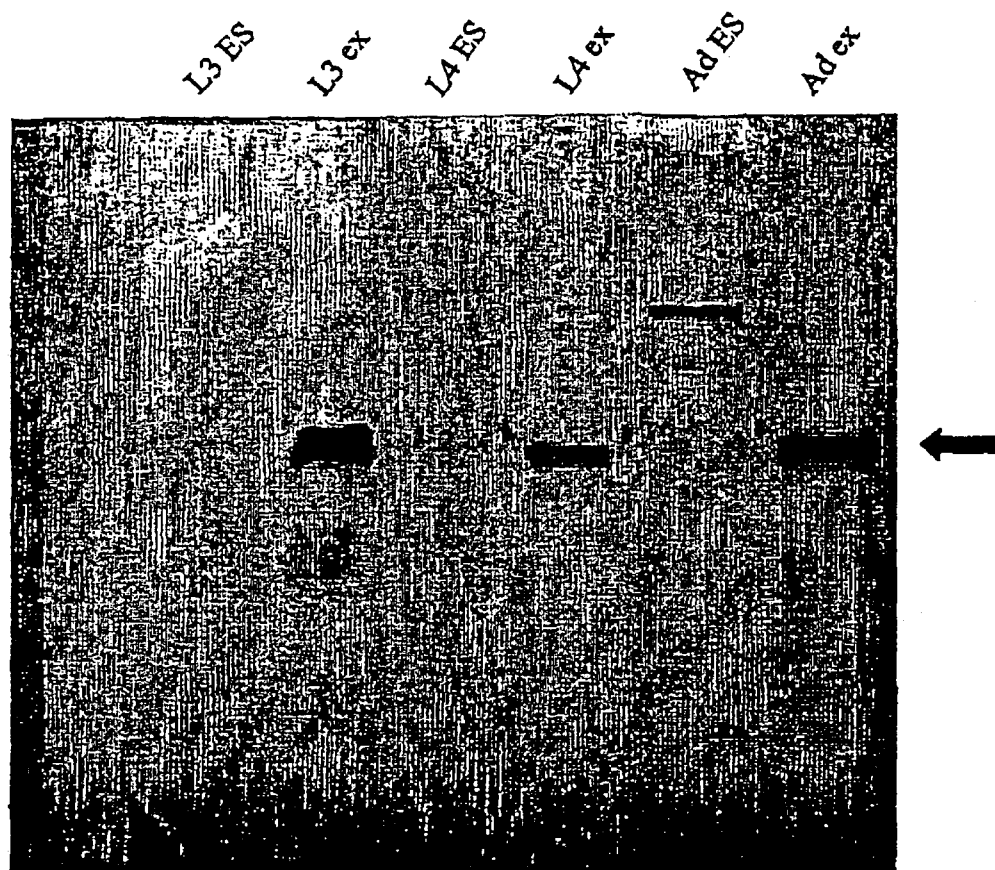


Figura 9 A

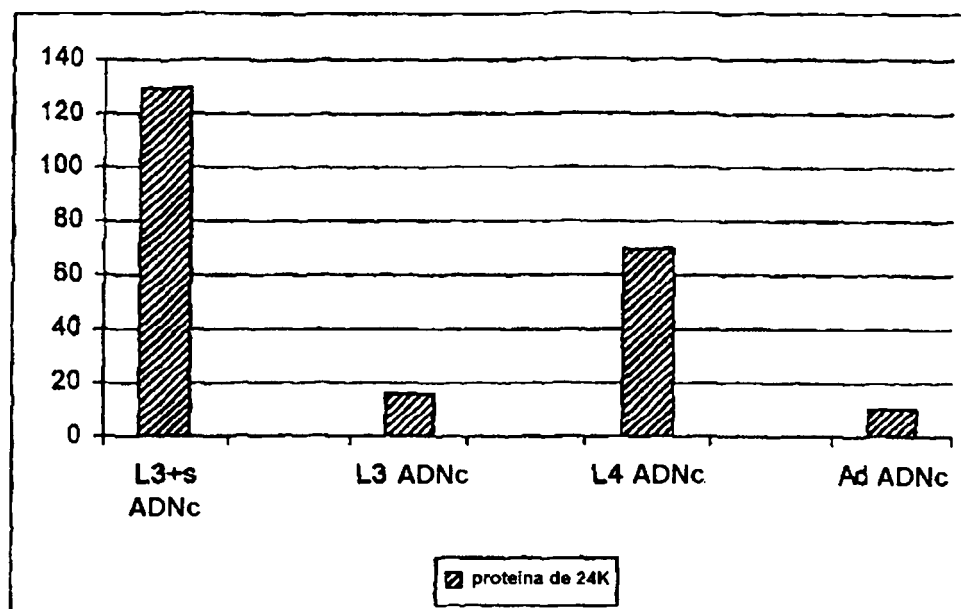


Figura 9 B

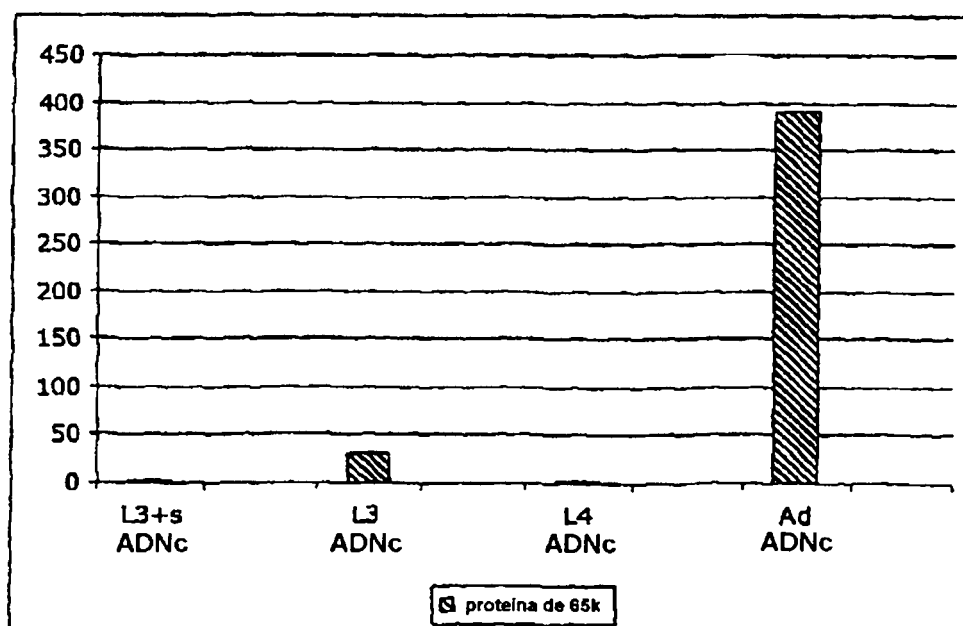
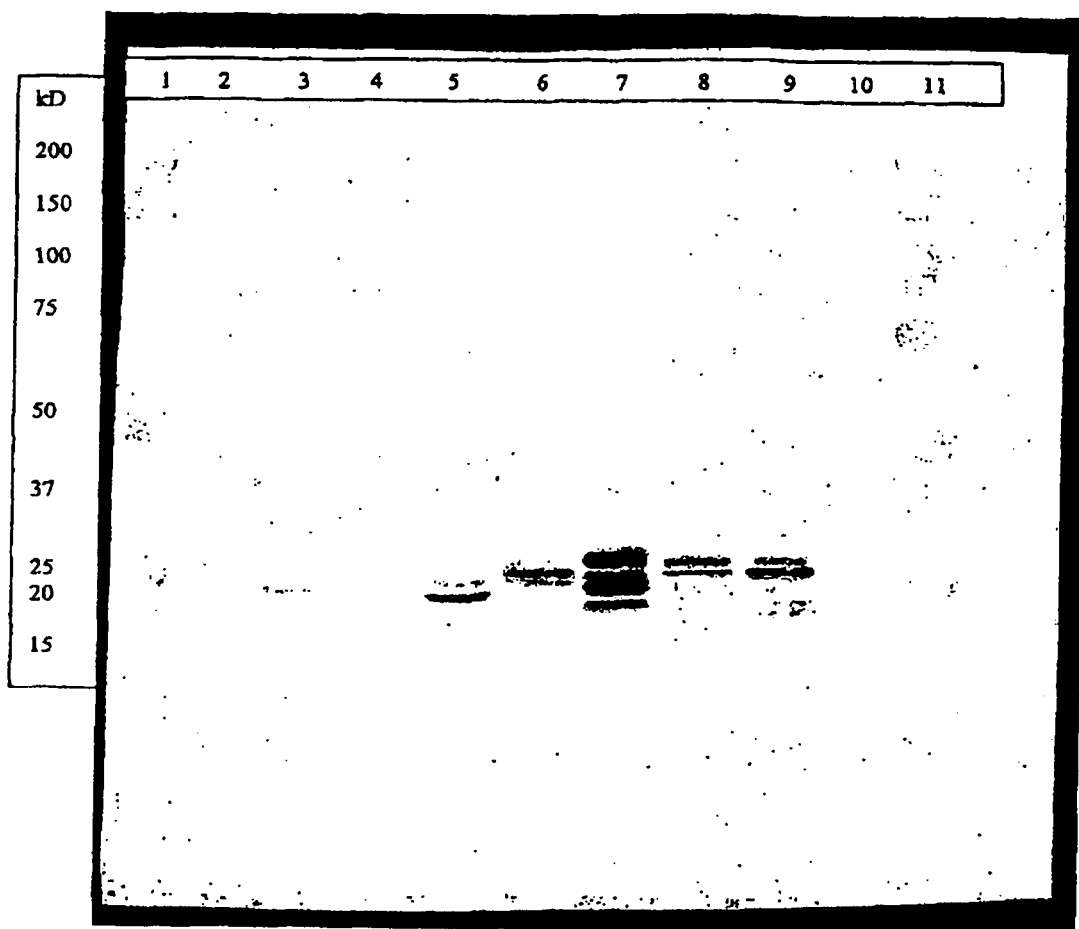


Figura 10



# ES 2 304 526 T3

## LISTA DE SECUENCIAS

<110> Universidad de Gent

5 <120> Vacuna de *Ostertagia*

<130> 2002-015

10 <150> US 10/243.319

<151> 13-09-2002

<160> 27

15 <170> PatentIn versión 3.2

<210> 1

20 <211> 828

<212> ADN

<213> *Ostertagia ostertagi*

25 <220>

<221> CDS

<222> (11)..(721)

30 <400> 1

|    |            |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|----|------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 35 | gcagctcggg | atg | cag | gca | cta | atc | ggg | att | gct | gcc | cta | tac | ctg | gtg | 49  |     |     |
|    | Met        | Gln | Ala | Leu | Ile | Gly | Ile | Ala | Ala | Leu | Tyr | Leu | Val |     |     |     |     |
|    | 1          |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     |     |     |     |
| 40 | ctg        | gtg | aca | tca | aat | acc | gaa | gca | ggg | ttt | tgc | tgc | cca | gca | gat | cta | 97  |
|    | Leu        | Val | Thr | Ser | Asn | Thr | Glu | Ala | Gly | Phe | Cys | Cys | Pro | Ala | Asp | Leu |     |
|    | 15         |     |     |     |     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     |     |
| 45 | aac        | caa | act | gat | gag | gca | aga | maa | atc | ttc | ctc | gat | ttt | cac | aat | caa | 145 |
|    | Asn        | Gln | Thr | Asp | Glu | Ala | Arg | Xaa | Ile | Phe | Leu | Asp | Phe | His | Asn | Gln |     |
|    | 30         |     |     |     | 35  |     |     |     |     | 40  |     |     |     |     | 45  |     |     |
| 50 | gtt        | cgc | cgt | gat | ata | gca | ggg | gca | agc | ccg | ttg | ctc | aac | ctc | acc | gga | 193 |
|    | Val        | Arg | Arg | Asp | Ile | Ala | Gly | Ala | Ser | Pro | Leu | Leu | Asn | Leu | Thr | Gly |     |
|    |            |     |     |     | 50  |     |     |     | 55  |     |     |     |     | 60  |     |     |     |
| 55 | gct        | gtt | car | atg | cga | aat | gtt | ctc | ggg | cca | gct | aag | aac | atg | tac | aga | 241 |
|    | Ala        | Val | Gln | Met | Arg | Asn | Val | Leu | Gly | Pro | Ala | Lys | Asn | Met | Tyr | Arg |     |
|    |            |     |     | 65  |     |     |     | 70  |     |     |     |     | 75  |     |     |     |     |
| 60 | atg        | gac | tgg | gac | tgc | aat | ctg | gaa | gca | aaa | gca | aag | gca | atg | att | tgg | 289 |
|    | Met        | Asp | Trp | Asp | Cys | Asn | Leu | Glu | Ala | Lys | Ala | Lys | Ala | Met | Ile | Trp |     |
|    |            |     | 80  |     |     |     | 85  |     |     |     |     | 90  |     |     |     |     |     |
| 65 | cca        | tgc | act | acg | cct | ctg | cca | ata | gac | acg | agt | att | cca | caa | aat | ctc | 337 |
|    | Pro        | Cys | Thr | Thr | Pro | Leu | Pro | Ile | Asp | Thr | Ser | Ile | Pro | Gln | Asn | Leu |     |
|    |            | 95  |     |     |     | 100 |     |     |     |     |     | 105 |     |     |     |     |     |
| 70 | gct        | car | tgg | cta | ctt | ttc | caa | aac | agt | cag | gaa | amt | gaa | gtg | ttg | acg | 385 |
|    | Ala        | Gln | Trp | Leu | Leu | Phe | Gln | Asn | Ser | Gln | Glu | Xaa | Glu | Val | Leu | Thr |     |
|    | 110        |     |     |     |     | 115 |     |     |     | 120 |     |     |     |     | 125 |     |     |

# ES 2 304 526 T3

|    |                                                                    |     |
|----|--------------------------------------------------------------------|-----|
|    | caa acg ccc tgg tct tgg gta acc gca tca cta cga aat ctt caa cct    | 433 |
|    | Gln Thr Pro Trp Ser Trp Val Thr Ala Ser Leu Arg Asn Leu Gln Pro    |     |
|    | 130 135 140                                                        |     |
| 5  | gat aca gaa gct aac att tat aac tgg caa att aga cca cta tcc aac    | 481 |
|    | Asp Thr Glu Ala Asn Ile Tyr Asn Trp Gln Ile Arg Pro Leu Ser Asn    |     |
|    | 145 150 155                                                        |     |
| 10 | att gcg aac tgg caa aac cta aaa gtt gga tgt gct cac aaa gtg tgc    | 529 |
|    | Ile Ala Asn Trp Gln Asn Leu Lys Val Gly Cys Ala His Lys Val Cys    |     |
|    | 160 165 170                                                        |     |
| 15 | aaa ttc ccc acc ggg aca aat atg gtt gtg tct tgc gct tat ggc ggc    | 577 |
|    | Lys Phe Pro Thr Gly Thr Asn Met Val Val Ser Cys Ala Tyr Gly Gly    |     |
|    | 175 180 185                                                        |     |
| 20 | gaa gta ctc caa gat aac gaa gtt gta tgg gac aag gga cca act tgc    | 625 |
|    | Glu Val Leu Gln Asp Asn Glu Val Val Trp Asp Lys Gly Pro Thr Cys    |     |
|    | 190 195 200 205                                                    |     |
| 25 | atg tgc aat gct tat ccc aac tcg ttc tgc tgc aac aat ctg tgt gac    | 673 |
|    | Met Cys Asn Ala Tyr Pro Asn Ser Phe Cys Cys Asn Asn Leu Cys Asp    |     |
|    | 210 215 220                                                        |     |
| 30 | aca ata gct gct gcg aca ctt cgc aag cag cct tgt aaa tcg act tga    | 721 |
|    | Thr Ile Ala Ala Ala Thr Leu Arg Lys Gln Pro Cys Lys Ser Thr        |     |
|    | 225 230 235                                                        |     |
| 35 | agcgaaaagg cggttggtgat gtcccgaaga gaacggaagt gatcacatca cagtatccca | 781 |
| 40 | taatgtcggtt catcataata aacgcacttc tctgaaaaaa aaaaaaa               | 828 |

- 35 <210> 2  
 <211> 236  
 <212> PRT  
 <213> *Ostertagia ostertagi*
- 40 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (37)..(37)
- 45 <223> El "Xaa" de la posición 37 representa Lys o Gln.
- 50 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (121)..(121)  
 <223> El "Xaa" de la posición 121 representa Asn o Thr.

55

60

65

# ES 2 304 526 T3

<400> 2

|    |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 5  | Met | Gln | Ala | Leu | Ile | Gly | Ile | Ala | Ala | Leu | Tyr | Leu | Val | Leu | Val | Thr | 1   | 5   | 10  | 15  |
| 10 | Ser | Asn | Thr | Glu | Ala | Gly | Phe | Cys | Cys | Pro | Ala | Asp | Leu | Asn | Gln | Thr | 20  | 25  | 30  |     |
| 15 | Asp | Glu | Ala | Arg | Xaa | Ile | Phe | Leu | Asp | Phe | His | Asn | Gln | Val | Arg | Arg | 35  | 40  | 45  |     |
| 20 | Asp | Ile | Ala | Gly | Ala | Ser | Pro | Leu | Leu | Asn | Leu | Thr | Gly | Ala | Val | Gln | 50  | 55  | 60  |     |
| 25 | Met | Arg | Asn | Val | Leu | Gly | Pro | Ala | Lys | Asn | Met | Tyr | Arg | Met | Asp | Trp | 65  | 70  | 75  | 80  |
| 30 | Asp | Cys | Asn | Leu | Glu | Ala | Lys | Ala | Lys | Ala | Met | Ile | Trp | Pro | Cys | Thr | 85  | 90  | 95  |     |
| 35 | Thr | Pro | Leu | Pro | Ile | Asp | Thr | Ser | Ile | Pro | Gln | Asn | Leu | Ala | Gln | Trp | 100 | 105 | 110 |     |
| 40 | Leu | Leu | Phe | Gln | Asn | Ser | Gln | Glu | Xaa | Glu | Val | Leu | Thr | Gln | Thr | Pro | 115 | 120 | 125 |     |
| 45 | Trp | Ser | Trp | Val | Thr | Ala | Ser | Leu | Arg | Asn | Leu | Gln | Pro | Asp | Thr | Glu | 130 | 135 | 140 |     |
| 50 | Ala | Asn | Ile | Tyr | Asn | Trp | Gln | Ile | Arg | Pro | Leu | Ser | Asn | Ile | Ala | Asn | 145 | 150 | 155 | 160 |
| 55 | Trp | Gln | Asn | Leu | Lys | Val | Gly | Cys | Ala | His | Lys | Val | Cys | Lys | Phe | Pro | 165 | 170 | 175 |     |
| 60 | Thr | Gly | Thr | Asn | Met | Val | Val | Ser | Cys | Ala | Tyr | Gly | Gly | Glu | Val | Leu | 180 | 185 | 190 |     |
| 65 | Gln | Asp | Asn | Glu | Val | Val | Trp | Asp | Lys | Gly | Pro | Thr | Cys | Met | Cys | Asn | 195 | 200 | 205 |     |
|    | Ala | Tyr | Pro | Asn | Ser | Phe | Cys | Cys | Asn | Asn | Leu | Cys | Asp | Thr | Ile | Ala | 210 | 215 | 220 |     |
|    | Ala | Ala | Thr | Leu | Arg | Lys | Gln | Pro | Cys | Lys | Ser | Thr | 225 | 230 | 235 |     |     |     |     |     |

65 <210> 3  
 <211> 306  
 <212> ADN

## ES 2 304 526 T3

<213> *Ostertagia ostertagi*

<220>

5 <221> CDS

<222> (3)..(284)

<220>

10 <221> misc\_feature

<222> (10)..(10)

<223> n es a, c, g o t

15 <220>

<221> misc\_feature

<222> (16)..(16)

20 <223> n es a, c, g o t

<220>

<221> misc\_feature

25 <222> (82)..(82)

<223> n es a, c, g o t

<220>

30 <221> misc\_feature

<222> (226)..(226)

<223> n es a, c, g o t

35 <220>

<221> misc\_feature

<222> (240)..(240)

40 <223> n es a, c, g o t

<220>

<221> misc\_feature

45 <222> (248)..(248)

<223> n es a, c, g o t

50

55

60

65

# ES 2 304 526 T3

<400> 3

```

5      gc ggc cgc gnc gac cnt gtg atc agc atc atg gct ctg tgg ccc gtg      47
      Gly Arg Xaa Asp Xaa Val Ile Ser Ile Met Ala Leu Trp Pro Val
      1          5          10          15

10     gac cgt ttc gag cgc atg ctg gaa gag ccg ttc ang cgt gtg gat cgt      95
      Asp Arg Phe Glu Arg Met Leu Glu Glu Pro Phe Xaa Arg Val Asp Arg
      20          25          30

15     ttc tgc ccg atg aga gat gcg gac tgg atg agc cgt cag att atg ccc      143
      Phe Cys Pro Met Arg Asp Ala Asp Trp Met Ser Arg Gln Ile Met Pro
      35          40          45

20     tac tgg aga gat gcc gat cac tct gtg ctt cat gtg gga aat caa aca      191
      Tyr Trp Arg Asp Ala Asp His Ser Val Leu His Val Gly Asn Gln Thr
      50          55          60

25     aag gat gtc gtg aat gac gag aag aaa ttc gca gnc gct ttg gat gtg      239
      Lys Asp Val Val Asn Asp Glu Lys Lys Phe Ala Xaa Ala Leu Asp Val
      65          70          75

30     nca cac ttn agg cca gaa gag ttg aag gta caa ttg gaa gtg acg      284
      Xaa His Xaa Arg Pro Glu Glu Leu Lys Val Gln Leu Glu Val Thr
      80          85          90

      tgaccttaca atcgaaggac at      306

```

<210> 4

<211> 94

<212> PRT

35 <213> *Ostertagia ostertagi*

<220>

<221> misc\_feature

40 <222> (3)..(3)

<223> El "Xaa" de la posición 3 representa Asp, Gly, Ala o Val.

<220>

45 <221> misc\_feature

<222> (5)..(5)

<223> El "Xaa" de la posición 5 representa His, Arg, Pro o Leu.

50 <220>

<221> misc\_feature

<222> (27)..(27)

55 <223> El "Xaa" de la posición 27 representa Lys, Arg, Thr o Met.

<220>

<221> misc\_feature

60 <222> (75)..(75)

<223> El "Xaa" de la posición 75 representa Asp, Gly, Ala o Val.

<220>

65 <221> misc\_feature

<222> (80)..(80)

## ES 2 304 526 T3

<223> El "Xaa" de la posición 80 representa Thr, Ala, Pro o Ser.

<220>

5 <221> misc\_feature

<222> (82)..(82)

<223> El "Xaa" de la posición 82 representa Leu o Phe.

10 <400> 4

```

      Gly Arg Xaa Asp Xaa Val Ile Ser Ile Met Ala Leu Trp Pro Val Asp
      1           5           10           15
15
      Arg Phe Glu Arg Met Leu Glu Glu Pro Phe Xaa Arg Val Asp Arg Phe
           20           25           30
20
      Cys Pro Met Arg Asp Ala Asp Trp Met Ser Arg Gln Ile Met Pro Tyr
           35           40           45
25
      Trp Arg Asp Ala Asp His Ser Val Leu His Val Gly Asn Gln Thr Lys
           50           55           60
30
      Asp Val Val Asn Asp Glu Lys Lys Phe Ala Xaa Ala Leu Asp Val Xaa
      65           70           75           80
35
      His Xaa Arg Pro Glu Glu Leu Lys Val Gln Leu Glu Val Thr
           85           90

```

<210> 5

<211> 583

40 <212> ADN

<213> *Ostertagia ostertagi*

<220>

45 <221> CDS

<222> (2)..(583)

50

55

60

65

# ES 2 304 526 T3

<400> 5

|    |                                                                   |     |
|----|-------------------------------------------------------------------|-----|
| 5  | g gct ttt atc gga aaa ccc gca ccc gac ttc gcc aca aag gcc gtc tat | 49  |
|    | Ala Phe Ile Gly Lys Pro Ala Pro Asp Phe Ala Thr Lys Ala Val Tyr   |     |
|    | 1 5 10 15                                                         |     |
| 10 | aat ggc gac ttc atc gac gtg aaa ctg tct gac tac aag ggc aag tac   | 97  |
|    | Asn Gly Asp Phe Ile Asp Val Lys Leu Ser Asp Tyr Lys Gly Lys Tyr   |     |
|    | 20 25 30                                                          |     |
| 15 | acc gtc ctc ttc ttc tat cca ctg gat ttc acg ttt gtc tgt cct acg   | 145 |
|    | Thr Val Leu Phe Phe Tyr Pro Leu Asp Phe Thr Phe Val Cys Pro Thr   |     |
|    | 35 40 45                                                          |     |
| 20 | gaa atc atc gcc ttt tcc gac cgt gtc gaa gaa ttc aaa aaa atc gat   | 193 |
|    | Glu Ile Ile Ala Phe Ser Asp Arg Val Glu Glu Phe Lys Lys Ile Asp   |     |
|    | 50 55 60                                                          |     |
| 25 | gct gcg gtc ctc gct tgt tca amt gat tcc gtt ttc tct cat ctg gcg   | 241 |
|    | Ala Ala Val Leu Ala Cys Ser Xaa Asp Ser Val Phe Ser His Leu Ala   |     |
|    | 65 70 75 80                                                       |     |
| 30 | tgg atc aat act cct cgc aag atg ggc ggc ctt ggt gac atg aac att   | 289 |
|    | Trp Ile Asn Thr Pro Arg Lys Met Gly Gly Leu Gly Asp Met Asn Ile   |     |
|    | 85 90 95                                                          |     |
| 35 | ccc gtt ctt gct gac acc aac cac caa att gca aag gac tat ggt gta   | 337 |
|    | Pro Val Leu Ala Asp Thr Asn His Gln Ile Ala Lys Asp Tyr Gly Val   |     |
|    | 100 105 110                                                       |     |
| 40 | ctg aaa gaa gac gaa gga atc gct tac aga ggt ctt ttc att att gac   | 385 |
|    | Leu Lys Glu Asp Glu Gly Ile Ala Tyr Arg Gly Leu Phe Ile Ile Asp   |     |
|    | 115 120 125                                                       |     |
| 45 | cct aag gga att ctg cga cag atc act gtc aat gac ctt cct gtc ggt   | 433 |
|    | Pro Lys Gly Ile Leu Arg Gln Ile Thr Val Asn Asp Leu Pro Val Gly   |     |
|    | 130 135 140                                                       |     |
| 50 | cgc tct gtg gat gag act ctc cgt ctg gtg cag gcc ttc caa tac gtt   | 481 |
|    | Arg Ser Val Asp Glu Thr Leu Arg Leu Val Gln Ala Phe Gln Tyr Val   |     |
|    | 145 150 155 160                                                   |     |
| 55 | gac aag cat ggt gag gtg tgc cca gct ggt tgg act cct gga aaa gct   | 529 |
|    | Asp Lys His Gly Glu Val Cys Pro Ala Gly Trp Thr Pro Gly Lys Ala   |     |
|    | 165 170 175                                                       |     |
| 60 | acc atc aag cca ggt gtc aag gac agc aag gag tac ttc agc aaa gca   | 577 |
|    | Thr Ile Lys Pro Gly Val Lys Asp Ser Lys Glu Tyr Phe Ser Lys Ala   |     |
|    | 180 185 190                                                       |     |
| 65 | aac taa                                                           | 583 |
|    | Asn                                                               |     |

<210> 6

<211> 193

<212> PRT

<213> *Ostertagia ostertagi*

<220>

<221> misc\_feature

<222> (72)..(72)

<223> El "Xaa" de la posición 72 representa Asn o Thr.

# ES 2 304 526 T3

<400> 6

|    |                                                                 |                 |
|----|-----------------------------------------------------------------|-----------------|
| 5  | Ala Phe Ile Gly Lys Pro Ala Pro Asp Phe Ala Thr Lys Ala Val Tyr | 1 5 10 15       |
| 10 | Asn Gly Asp Phe Ile Asp Val Lys Leu Ser Asp Tyr Lys Gly Lys Tyr | 20 25 30        |
| 15 | Thr Val Leu Phe Phe Tyr Pro Leu Asp Phe Thr Phe Val Cys Pro Thr | 35 40 45        |
| 20 | Glu Ile Ile Ala Phe Ser Asp Arg Val Glu Glu Phe Lys Lys Ile Asp | 50 55 60        |
| 25 | Ala Ala Val Leu Ala Cys Ser Xaa Asp Ser Val Phe Ser His Leu Ala | 65 70 75 80     |
| 30 | Trp Ile Asn Thr Pro Arg Lys Met Gly Gly Leu Gly Asp Met Asn Ile | 85 90 95        |
| 35 | Pro Val Leu Ala Asp Thr Asn His Gln Ile Ala Lys Asp Tyr Gly Val | 100 105 110     |
| 40 | Leu Lys Glu Asp Glu Gly Ile Ala Tyr Arg Gly Leu Phe Ile Ile Asp | 115 120 125     |
| 45 | Pro Lys Gly Ile Leu Arg Gln Ile Thr Val Asn Asp Leu Pro Val Gly | 130 135 140     |
| 50 | Arg Ser Val Asp Glu Thr Leu Arg Leu Val Gln Ala Phe Gln Tyr Val | 145 150 155 160 |
| 55 | Asp Lys His Gly Glu Val Cys Pro Ala Gly Trp Thr Pro Gly Lys Ala | 165 170 175     |
| 60 | Thr Ile Lys Pro Gly Val Lys Asp Ser Lys Glu Tyr Phe Ser Lys Ala | 180 185 190     |

Asn

<210> 7

<211> 693

<212> ADN

<213> *Ostertagia ostertagi*

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(693)

<220>

## ES 2 304 526 T3

<221> misc\_feature  
<222> (11)..(11)  
<223> n es a, c, g o t  
5  
<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (35)..(36)  
10 <223> n es a, c, g o t  
  
<220>  
<221> misc\_feature  
15 <222> (41)..(41)  
<223> n es a, c, g o t  
  
<220>  
20 <221> misc\_feature  
<222> (43)..(43)  
<223> n es a, c, g o t  
25  
<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (53)..(53)  
30 <223> n es a, c, g o t  
  
<220>  
<221> misc\_feature  
35 <222> (67)..(67)  
<223> n es a, c, g o t  
  
<220>  
40 <221> misc\_feature  
<222> (199)..(199)  
<223> n es a, c, g o t  
45  
<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (555)..(555)  
50 <223> n es a, c, g o t  
  
<220>  
<221> misc\_feature  
55 <222> (590)..(590)  
<223> n es a, c, g o t  
  
<220>  
60 <221> misc\_feature  
<222> (648)..(648)  
<223> n es a, c, g o t  
65  
<220>  
<221> misc\_feature

# ES 2 304 526 T3

<222> (662)..(662)

<223> n e s a, c, g o t

5 <220>

<221> misc\_feature

<222> (669)..(669)

<223> n e s a, c, g o t

10

<220>

<221> misc\_feature

<222> (682)..(682)

15

<223> n e s a, c, g o t

<400> 7

20

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |    |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|----|
| cta | act | cct | tng | cat | cca | acg | cgt | tgg | gag | ctc | tnn | cta | tng | ngg | gaa | 48 |
| Leu | Thr | Pro | Xaa | His | Pro | Thr | Arg | Trp | Glu | Leu | Xaa | Leu | Xaa | Xaa | Glu |    |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |    |

25

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |    |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|----|
| ttg | cna | tgt | ggt | ggc | gac | nac | tcc | tgg | agc | ccg | tca | gta | tcg | gcg | gaa | 96 |
| Leu | Xaa | Cys | Gly | Gly | Asp | Xaa | Ser | Trp | Ser | Pro | Ser | Val | Ser | Ala | Glu |    |
|     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     |     | 30  |     |     |    |

30

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| ttc | gcg | gcc | gcg | tcg | acc | gtg | ggt | gtg | gcc | ctc | gcg | gtc | cac | caa | aca | 144 |
| Phe | Ala | Ala | Ala | Ser | Thr | Val | Gly | Val | Ala | Leu | Ala | Val | His | Gln | Thr |     |
|     |     | 35  |     |     |     |     | 40  |     |     |     |     | 45  |     |     |     |     |

35

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| ctt | gac | ctg | ctt | cct | ctg | aag | cca | cgc | aag | gag | tac | gtc | ttc | cgc | ttt | 192 |
| Leu | Asp | Leu | Leu | Pro | Leu | Lys | Pro | Arg | Lys | Glu | Tyr | Val | Phe | Arg | Phe |     |
|     | 50  |     |     |     |     | 55  |     |     |     |     | 60  |     |     |     |     |     |

40

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| gaa | gga | nat | gtt | cac | tcc | gga | atc | ccg | ctc | cca | acc | gac | acc | acc | atc | 240 |
| Glu | Gly | Xaa | Val | His | Ser | Gly | Ile | Pro | Leu | Pro | Thr | Asp | Thr | Thr | Ile |     |
| 65  |     |     |     |     | 70  |     |     |     | 75  |     |     |     |     |     | 80  |     |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| tct | cgc | ata | cag | gct | atg | gta | cat | gtc | cag | atc | cct | gac | gac | cac | cac | 288 |
| Ser | Arg | Ile | Gln | Ala | Met | Val | His | Val | Gln | Ile | Pro | Asp | Asp | His | His |     |
|     |     |     | 85  |     |     |     |     | 90  |     |     |     |     | 95  |     |     |     |

45

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| gcc | att | ctc | aag | ctg | aga | gat | gtt | cgc | ttt | gct | act | gga | gaa | gac | gaa | 336 |
| Ala | Ile | Leu | Lys | Leu | Arg | Asp | Val | Arg | Phe | Ala | Thr | Gly | Glu | Asp | Glu |     |
|     |     |     | 100 |     |     |     | 105 |     |     |     |     |     | 110 |     |     |     |

50

55

60

65

# ES 2 304 526 T3

|    |                                                                                                                                                       |     |
|----|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
|    | cgc aga gaa ctc ttc aaa ccg atc gat gac ctg aaa atg cgc aca atc<br>Arg Arg Glu Leu Phe Lys Pro Ile Asp Asp Leu Lys Met Arg Thr Ile<br>115 120 125     | 384 |
| 5  | tca agg gag cac ctc gat ctc ctt gag ttg cca gtc cgt ttt gtc tac<br>Ser Arg Glu His Leu Asp Leu Leu Glu Leu Pro Val Arg Phe Val Tyr<br>130 135 140     | 432 |
| 10 | aag aac ggc atg att tcc gat gta atc ttt gtc gac aag gag gag acc<br>Lys Asn Gly Met Ile Ser Asp Val Ile Phe Val Asp Lys Glu Glu Thr<br>145 150 155 160 | 480 |
| 15 | tgg tcc cgc cag cgt gaa gcc gat ctg tca tca aca tgc tcc act tta<br>Trp Ser Arg Gln Arg Glu Ala Asp Leu Ser Ser Thr Cys Ser Thr Leu<br>165 170 175     | 528 |
| 20 | acc tcc aca aga tgg gac gaa ctg acn agc ttt aca atg gac agg tcc<br>Thr Ser Thr Arg Trp Asp Glu Leu Thr Ser Phe Thr Met Asp Arg Ser<br>180 185 190     | 576 |
| 25 | aag gtg gac ccg tng aca aac gag tac ttt cac tgg tta ccc gaa ccg<br>Lys Val Asp Pro Xaa Thr Asn Glu Tyr Phe His Trp Leu Pro Glu Pro<br>195 200 205     | 624 |
| 30 | aac cca ttc gaa ggg aaa ctt gtn aag gtt ggc tta cnc cgg ttn tta<br>Asn Pro Phe Glu Gly Lys Leu Val Lys Val Gly Leu Xaa Arg Xaa Leu<br>210 215 220     | 672 |
| 35 | aag aaa aaa ngg acc ttt tgg<br>Lys Lys Lys Xaa Thr Phe Trp<br>225 230                                                                                 | 693 |
|    | <210> 8                                                                                                                                               |     |
|    | <211> 231                                                                                                                                             |     |
|    | <212> PRT                                                                                                                                             |     |
|    | <213> <i>Ostertagia ostertagi</i>                                                                                                                     |     |
|    | <220>                                                                                                                                                 |     |
|    | <221> misc_feature                                                                                                                                    |     |
|    | <222> (4)..(4)                                                                                                                                        |     |
|    | <223> El "Xaa" de la posición 4 representa Trp, Ser o Leu.                                                                                            |     |
|    | <220>                                                                                                                                                 |     |
|    | <221> misc_feature                                                                                                                                    |     |
|    | <222> (12)..(12)                                                                                                                                      |     |
|    | <223> El "Xaa" de la posición 12 representa Tyr, Trp, Cys, Ser, Leu o Phe.                                                                            |     |
|    | <220>                                                                                                                                                 |     |
|    | <221> misc_feature                                                                                                                                    |     |
|    | <222> (14)..(14)                                                                                                                                      |     |
|    | <223> El "Xaa" de la posición 14 representa Trp, Ser o Leu.                                                                                           |     |
|    | <220>                                                                                                                                                 |     |
|    | <221> misc_feature                                                                                                                                    |     |
|    | <222> (15)..(15)                                                                                                                                      |     |
|    | <223> El "Xaa" de la posición 15 representa Arg, Gly o Trp.                                                                                           |     |
|    | <220>                                                                                                                                                 |     |
|    | <221> misc_feature                                                                                                                                    |     |
|    | <222> (18)..(18)                                                                                                                                      |     |

ES 2 304 526 T3

<223> El “Xaa” de la posición 18 representa Gln, Arg, Pro o Leu.

 $\langle 220 \rangle$ 

5 <221> misc feature

<222> (23)..(23)

<223> El “Xaa” de la posición 23 representa Asn, Asp, His o Tyr.

10  $\langle 220 \rangle$ 

<221> misc\_feature

<222> (67)..(67)

<223> El “Xaa” de la posición 67 representa Asn, Asp, His o Tyr.

15

 $\langle 220 \rangle$ 

<221> misc\_feature

<222> (197)..(197)

<223> El “Xaa” de la posición 197 representa Trp, Ser o Leu.

 $\langle 220 \rangle$ 

25 <221> misc\_feature

$\langle 222 \rangle$  (221)..(221)

<223> El “Xaa” de la posición 221 representa His, Arg, Pro o Leu.

30  $\langle 220 \rangle$ 

<221> misc feature

 $\langle 222 \rangle$  (223)..(223)

<223> El “Xaa” de la posición 223 representa Leu o Phe.

35

 $\langle 220 \rangle$ 

<221> misc feature

$\langle 222 \rangle$  (228)..(228)

<sup>40</sup> <223> El “Xaa” de la posición 228 representa Arg, Gly o Trp.

<400> 8

45           Leu Thr Pro Xaa His Pro Thr Arg Trp Glu Leu Xaa Leu Xaa Xaa Glu  
            1                         5                         10                         15

Leu Xaa Cys Gly Gly Asp Xaa Ser Trp Ser Pro Ser Val Ser Ala Glu  
20 25 30

Phe Ala Ala Ala Ser Thr Val Gly Val Ala Leu Ala Val His Gln Thr  
35 40 45

55           Leu Asp Leu Leu Pro Leu Lys Pro Arg Lys Glu Tyr Val Phe Arg Phe  
              50                      55                                  60

Glu Gly Xaa Val His Ser Gly Ile Pro Leu Pro Thr Asp Thr Thr Ile  
60           65                 70                      75                          80

Ser Arg Ile Gln Ala Met Val His Val Gln Ile Pro Asp Asp His His  
85 90 95

65

# ES 2 304 526 T3

Ala Ile Leu Lys Leu Arg Asp Val Arg Phe Ala Thr Gly Glu Asp Glu  
100 105 110

5 Arg Arg Glu Leu Phe Lys Pro Ile Asp Asp Leu Lys Met Arg Thr Ile  
115 120 125

10 Ser Arg Glu His Leu Asp Leu Leu Glu Leu Pro Val Arg Phe Val Tyr  
130 135 140

15 Lys Asn Gly Met Ile Ser Asp Val Ile Phe Val Asp Lys Glu Glu Thr  
145 150 155 160

20 Trp Ser Arg Gln Arg Glu Ala Asp Leu Ser Ser Thr Cys Ser Thr Leu  
165 170 175

25 Thr Ser Thr Arg Trp Asp Glu Leu Thr Ser Phe Thr Met Asp Arg Ser  
180 185 190

Lys Val Asp Pro Xaa Thr Asn Glu Tyr Phe His Trp Leu Pro Glu Pro  
195 200 205

30 Asn Pro Phe Glu Gly Lys Leu Val Lys Val Gly Leu Xaa Arg Xaa Leu  
210 215 220

35 Lys Lys Lys Xaa Thr Phe Trp  
225 230

<210> 9

<211> 763

40 <212> ADN

<213> *Ostertagia ostertagi*

<220>

45 <221> CDS

<222> (11)..(706)

50 <400> 9

gagaactgct atg tcg gcg gct gtt gta gtt gct gtt ctc ctg gcc ctg 49  
Met Ser Ala Ala Val Val Val Ala Val Leu Leu Ala Leu  
1 5 10

55 ttc tcc tat gcc gaa gca ggc ttt tgt tgt ccg aat agt cta agc caa 97  
Phe Ser Tyr Ala Glu Ala Gly Phe Cys Cys Pro Asn Ser Leu Ser Gln  
15 20 25

60 agt gac agc gcg agg cag att ttc ctc gat ttt cac aat gat gtt cgt 145  
Ser Asp Ser Ala Arg Gln Ile Phe Leu Asp Phe His Asn Asp Val Arg  
30 35 40 45

65

# ES 2 304 526 T3

|    |                                                                   |     |
|----|-------------------------------------------------------------------|-----|
|    | cga aat ata gca ctt gga aat ggt ttg ata aac tgg aca gta aat gca   | 193 |
|    | Arg Asn Ile Ala Leu Gly Asn Gly Leu Ile Asn Trp Thr Val Asn Ala   |     |
|    | 50 55 60                                                          |     |
| 5  | gac gcg gtc att ctt ggt cca gct cag aac atg tac aaa gtg gac tgg   | 241 |
|    | Asp Ala Val Ile Leu Gly Pro Ala Gln Asn Met Tyr Lys Val Asp Trp   |     |
|    | 65 70 75                                                          |     |
| 10 | gat tgc aac ttg gaa gaa gta gca gca caa cag att gcg cca tgc aat   | 289 |
|    | Asp Cys Asn Leu Glu Glu Val Ala Ala Gln Gln Ile Ala Pro Cys Asn   |     |
|    | 80 85 90                                                          |     |
| 15 | gat ccc cta ccg ata aat acc agc ctg gct caa aat atc gct aga tgg   | 337 |
|    | Asp Pro Leu Pro Ile Asn Thr Ser Leu Ala Gln Asn Ile Ala Arg Trp   |     |
|    | 95 100 105                                                        |     |
| 20 | ctg tac ttc aaa gac agt gaa gaa gag aca gtt ctg caa caa gta tcg   | 385 |
|    | Leu Tyr Phe Lys Asp Ser Glu Glu Glu Thr Val Leu Gln Gln Val Ser   |     |
|    | 110 115 120 125                                                   |     |
| 25 | tgg tat tgg gtg agc gca tgc ctg gga ttt atg aaa ggc acg aaa ctt   | 433 |
|    | Trp Tyr Trp Val Ser Ala Ser Leu Gly Phe Met Lys Gly Thr Lys Leu   |     |
|    | 130 135 140                                                       |     |
| 30 | gac caa ttt gct aac cag tgg gct gaa cct cta gca aac att gca aac   | 481 |
|    | Asp Gln Phe Ala Asn Gln Trp Ala Glu Pro Leu Ala Asn Ile Ala Asn   |     |
|    | 145 150 155                                                       |     |
| 35 | tat aga aac cga aag gtt gga tgt gcc cat aag atc tgc ccc gct cag   | 529 |
|    | Tyr Arg Asn Arg Lys Val Gly Cys Ala His Lys Ile Cys Pro Ala Gln   |     |
|    | 160 165 170                                                       |     |
| 40 | caa aac atg gta gta tcc tgc gtg tat gga agc ccc aaa ctt gca ccg   | 577 |
|    | Gln Asn Met Val Val Ser Cys Val Tyr Gly Ser Pro Lys Leu Ala Pro   |     |
|    | 175 180 185                                                       |     |
| 45 | aac gaa gtt atc tgg cag gaa gga aag gct tgt gtg tgc gac gct cgt   | 625 |
|    | Asn Glu Val Ile Trp Gln Glu Gly Lys Ala Cys Val Cys Asp Ala Arg   |     |
|    | 190 195 200 205                                                   |     |
| 50 | cca gat tca ttc tgc tgc gac aac ctg tgt gac acg cga gat gct gcg   | 673 |
|    | Pro Asp Ser Phe Cys Cys Asp Asn Leu Cys Asp Thr Arg Asp Ala Ala   |     |
|    | 210 215 220                                                       |     |
| 55 | agt gtt cgc cac cag tgt tgc gcg tcg cca tga agcgaaaaga aattggtagt | 726 |
|    | Ser Val Arg His Gln Cys Cys Ala Ser Pro                           |     |
|    | 225 230                                                           |     |
| 60 | caccccgaaat aaaatattca tgcaaaaaaa aaaaaaa                         | 763 |

<210> 10

<211> 231

<212> PRT

<213> *Ostertagia ostertagi*

# ES 2 304 526 T3

<400> 10

|    |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |
|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|
|    | Met | Ser | Ala | Ala | Val | Val | Val | Ala | Val | Leu | Leu | Ala | Leu | Phe | Ser | Tyr |  |
|    | 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |  |
| 5  | Ala | Glu | Ala | Gly | Phe | Cys | Cys | Pro | Asn | Ser | Leu | Ser | Gln | Ser | Asp | Ser |  |
|    |     |     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |     |     |  |
| 10 | Ala | Arg | Gln | Ile | Phe | Leu | Asp | Phe | His | Asn | Asp | Val | Arg | Arg | Asn | Ile |  |
|    |     |     | 35  |     |     |     |     | 40  |     |     |     |     | 45  |     |     |     |  |
| 15 | Ala | Leu | Gly | Asn | Gly | Leu | Ile | Asn | Trp | Thr | Val | Asn | Ala | Asp | Ala | Val |  |
|    |     | 50  |     |     |     |     | 55  |     |     |     |     | 60  |     |     |     |     |  |
| 20 | Ile | Leu | Gly | Pro | Ala | Gln | Asn | Met | Tyr | Lys | Val | Asp | Trp | Asp | Cys | Asn |  |
|    | 65  |     |     |     |     | 70  |     |     |     |     | 75  |     |     |     |     | 80  |  |
| 25 | Leu | Glu | Glu | Val | Ala | Ala | Gln | Gln | Ile | Ala | Pro | Cys | Asn | Asp | Pro | Leu |  |
|    |     |     |     |     | 85  |     |     |     |     | 90  |     |     |     |     | 95  |     |  |
| 30 | Pro | Ile | Asn | Thr | Ser | Leu | Ala | Gln | Asn | Ile | Ala | Arg | Trp | Leu | Tyr | Phe |  |
|    |     |     |     | 100 |     |     |     |     | 105 |     |     |     |     | 110 |     |     |  |
| 35 | Lys | Asp | Ser | Glu | Glu | Glu | Thr | Val | Leu | Gln | Gln | Val | Ser | Trp | Tyr | Trp |  |
|    |     | 115 |     |     |     |     |     | 120 |     |     |     |     | 125 |     |     |     |  |
| 40 | Val | Ser | Ala | Ser | Leu | Gly | Phe | Met | Lys | Gly | Thr | Lys | Leu | Asp | Gln | Phe |  |
|    |     | 130 |     |     |     |     | 135 |     |     |     |     | 140 |     |     |     |     |  |
| 45 | Ala | Asn | Gln | Trp | Ala | Glu | Pro | Leu | Ala | Asn | Ile | Ala | Asn | Tyr | Arg | Asn |  |
|    | 145 |     |     |     |     | 150 |     |     |     |     | 155 |     |     |     |     | 160 |  |
| 50 | Arg | Lys | Val | Gly | Cys | Ala | His | Lys | Ile | Cys | Pro | Ala | Gln | Gln | Asn | Met |  |
|    |     |     |     | 165 |     |     |     |     |     | 170 |     |     |     |     | 175 |     |  |
| 55 | Val | Val | Ser | Cys | Val | Tyr | Gly | Ser | Pro | Lys | Leu | Ala | Pro | Asn | Glu | Val |  |
|    |     |     |     | 180 |     |     |     |     | 185 |     |     |     |     | 190 |     |     |  |
| 60 | Ile | Trp | Gln | Glu | Gly | Lys | Ala | Cys | Val | Cys | Asp | Ala | Arg | Pro | Asp | Ser |  |
|    |     |     | 195 |     |     |     |     | 200 |     |     |     |     | 205 |     |     |     |  |
| 65 | Phe | Cys | Cys | Asp | Asn | Leu | Cys | Asp | Thr | Arg | Asp | Ala | Ala | Ser | Val | Arg |  |
|    |     | 210 |     |     |     |     | 215 |     |     |     |     | 220 |     |     |     |     |  |
|    | His | Gln | Cys | Cys | Ala | Ser | Pro |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |
|    | 225 |     |     |     |     | 230 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |

<210> 11

<211> 893

<212> ADN

<213> *Ostertagia ostertagi*

# ES 2 304 526 T3

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(684)

5

<220>

<221> misc\_feature

<222> (813)..(813)

10

<223> n e s a, c, g o t

<220>

<221> misc\_feature

15

<222> (858)..(858)

<223> n e s a, c, g o t

20

<400> 11

25

|                                                                 |    |
|-----------------------------------------------------------------|----|
| atg aag ttg gtc gtg ctc tgc gtt ctg tgt gga atc gct ctt gct gcc | 48 |
| Met Lys Leu Val Val Leu Cys Val Leu Cys Gly Ile Ala Leu Ala Ala |    |
| 1 5 10 15                                                       |    |

30

|                                                                 |    |
|-----------------------------------------------------------------|----|
| cag aga cag aaa cgc ctt act gtg ggc acg atc gct gtc acc gga gga | 96 |
| Pro Arg Gln Lys Arg Leu Thr Val Gly Thr Ile Ala Val Thr Gly Gly |    |
| 20 25 30                                                        |    |

35

|                                                                 |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|
| gtc ggc gga tcc acg ggg tgt gta gtg act gga aat gtc ctc tac gca | 144 |
| Val Gly Gly Ser Thr Gly Cys Val Val Thr Gly Asn Val Leu Tyr Ala |     |
| 35 40 45                                                        |     |

40

|                                                                 |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|
| aac ggt ttc cgc ctt cgt gaa ctc aac cca tcg gag cag caa gaa ctc | 192 |
| Asn Gly Phe Arg Leu Arg Glu Leu Asn Pro Ser Glu Gln Gln Glu Leu |     |
| 50 55 60                                                        |     |

45

|                                                                 |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|
| gta aac tat gag aag cag gtg gcc gac tac aaa gcg gct gtg aag caa | 240 |
| Val Asn Tyr Glu Lys Gln Val Ala Asp Tyr Lys Ala Ala Val Lys Gln |     |
| 65 70 75 80                                                     |     |

50

|                                                                 |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|
| gcc ctc aag gaa cgc cag gaa agc ctg aaa tcg cgc atg gct ggt aag | 288 |
| Ala Leu Lys Glu Arg Gln Glu Ser Leu Lys Ser Arg Met Ala Gly Lys |     |
| 85 90 95                                                        |     |

55

|                                                                 |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|
| aag gag aag gct gtg act ccc aag gag gaa gat cta ccc aaa gct cca | 336 |
| Lys Glu Lys Ala Val Thr Pro Lys Glu Glu Asp Leu Pro Lys Ala Pro |     |
| 100 105 110                                                     |     |

60

|                                                                 |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|
| cag aag ccc tca ttc tgc act gag gac gac acc acc cag ttc tac ttt | 384 |
| Gln Lys Pro Ser Phe Cys Thr Glu Asp Asp Thr Thr Gln Phe Tyr Phe |     |
| 115 120 125                                                     |     |

65

|                                                                 |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|
| gat gga tgc atg gtt cag ggc aac aag gtc tac gtt ggc aac aca ttc | 432 |
| Asp Gly Cys Met Val Gln Gly Asn Lys Val Tyr Val Gly Asn Thr Phe |     |
| 130 135 140                                                     |     |

|                                                                 |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|
| gcg cgc gat ttg gac cag aac gag att caa gag ctg aag gag ttt gag | 480 |
| Ala Arg Asp Leu Asp Gln Asn Glu Ile Gln Glu Leu Lys Glu Phe Glu |     |
| 145 150 155 160                                                 |     |

# ES 2 304 526 T3

aag aag cag act gtc tac cag gaa tac gtc cag aag cag att caa gcg 528  
 Lys Lys Gln Thr Val Tyr Gln Glu Tyr Val Gln Lys Gln Ile Gln Ala  
 165 170 175  
 5 caa gtg agc aat ctg ttc ggc ggt gcc gac ttc ttt tca tgc ttc ttc 576  
 Gln Val Ser Asn Leu Phe Gly Gly Ala Asp Phe Phe Ser Ser Phe Phe  
 180 185 190  
 10 aac ggc gga tct gag aaa ggc tct tca acc acc act gtg gcc cca gtg 624  
 Asn Gly Gly Ser Glu Lys Gly Ser Ser Thr Thr Thr Val Ala Pro Val  
 195 200 205  
 15 ctt cct gaa gat gca cca gaa caa cca gct ggg ccc aac ttt tgc aca 672  
 Leu Pro Glu Asp Ala Pro Glu Gln Pro Ala Gly Pro Asn Phe Cys Thr  
 210 215 220  
 agg atc tat tga tgggggtatatt ttatgatgac aaagtattta aataaatgca 724  
 Arg Ile Tyr  
 20 225  
 gtagttgcct gttgctgtga attccacagc actcctactc acggtgtcga ctggtgattt 784  
 agtcacttta tttgcaatat tttttatgng ttaccgcaat tcggtgtata tttgtgttat 844  
 25 aaacattaac atcnaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 893

<210> 12  
 30 <211> 227  
 <212> PRT  
 <213> *Ostertagia ostertagi*  
 35 <400> 12

Met Lys Leu Val Val Leu Cys Val Leu Cys Gly Ile Ala Leu Ala Ala  
 1 5 10 15  
 40 Pro Arg Gln Lys Arg Leu Thr Val Gly Thr Ile Ala Val Thr Gly Gly  
 20 25 30  
 45 Val Gly Gly Ser Thr Gly Cys Val Val Thr Gly Asn Val Leu Tyr Ala  
 35 40 45  
 50 Asn Gly Phe Arg Leu Arg Glu Leu Asn Pro Ser Glu Gln Gln Glu Leu  
 50 55 60  
 55 Val Asn Tyr Glu Lys Gln Val Ala Asp Tyr Lys Ala Ala Val Lys Gln  
 65 70 75 80  
 60 Ala Leu Lys Glu Arg Gln Glu Ser Leu Lys Ser Arg Met Ala Gly Lys  
 85 90 95

65

# ES 2 304 526 T3

Lys Glu Lys Ala Val Thr Pro Lys Glu Glu Asp Leu Pro Lys Ala Pro  
100 105 110

5

Gln Lys Pro Ser Phe Cys Thr Glu Asp Asp Thr Thr Gln Phe Tyr Phe  
115 120 125

10

Asp Gly Cys Met Val Gln Gly Asn Lys Val Tyr Val Gly Asn Thr Phe  
130 135 140

15

Ala Arg Asp Leu Asp Gln Asn Glu Ile Gln Glu Leu Lys Glu Phe Glu  
145 150 155 160

20

Lys Lys Gln Thr Val Tyr Gln Glu Tyr Val Gln Lys Gln Ile Gln Ala  
165 170 175

25

Gln Val Ser Asn Leu Phe Gly Gly Ala Asp Phe Phe Ser Ser Phe Phe  
180 185 190

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

30

Leu Pro Glu Asp Ala Pro Glu Gln Pro Ala Gly Pro Asn Phe Cys Thr  
210 215 220

35

Arg Ile Tyr  
225

<210> 13

40 <211> 1761

<212> ADN

<213> *Ostertagia ostertagi*

45 <220>

<221> CDS

<222> (1)..(1725)

50

<400> 13

atg agg ctg ata ttg ctc att tta ctc ttg gtt gtt gcc act aat ggg 48  
Met Arg Leu Ile Leu Leu Ile Leu Leu Leu Val Val Ala Thr Asn Gly  
1 5 10 15

55

ggc ata att gac aaa ctg aaa gga ttg ttc act gga gaa ggc ggc ttt 96  
Gly Ile Ile Asp Lys Leu Lys Gly Leu Phe Thr Gly Glu Gly Gly Phe  
20 25 30

60

gga caa aaa gtg aag aat gca act gct gtt ggc ttc aaa aag ctc ttc 144  
Gly Gln Lys Val Lys Asn Ala Thr Ala Val Gly Phe Lys Lys Leu Phe  
35 40 45

65

ES 2 304 526 T3

|    |                                                                 |     |
|----|-----------------------------------------------------------------|-----|
|    | Gaa aac acg gca ctc ttc aga atc aat gat aag atc agg agc atg aag | 192 |
|    | Glu Asn Thr Ala Leu Phe Arg Ile Asn Asp Lys Ile Arg Ser Met Lys |     |
|    | 50 55 60                                                        |     |
| 5  | Gaa aaa gtg ttg aag acc ttg gaa cta tca cca gca atg atg aag tca | 240 |
|    | Glu Lys Val Leu Lys Thr Leu Glu Leu Ser Pro Ala Met Met Lys Ser |     |
|    | 65 70 75 80                                                     |     |
| 10 | ctg caa kmg agg cta rwg aaw tsg cgr cck yct rma grw cga yma wrt | 288 |
|    | Leu Gln Xaa Arg Leu Xaa Xaa Xaa Arg Xaa Xaa Xaa Xaa Arg Xaa Xaa |     |
|    | 85 90 95                                                        |     |
| 15 | rsr mga gmt sss aga crc gtw kka ygc rag gtc art aaa aat agt gag | 336 |
|    | Xaa Xaa Xaa Xaa Arg Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Val Xaa Lys Asn Ser Glu |     |
|    | 100 105 110                                                     |     |
| 20 | gtt gac caa tac ctc tac caa ggc gac atg gtt tta aca gag gag caa | 384 |
|    | Val Asp Gln Tyr Leu Tyr Gln Gly Asp Met Val Leu Thr Glu Glu Gln |     |
|    | 115 120 125                                                     |     |
| 25 | gcc gat gag atc gtt gag gac ata gaa gat cag gtc gcc ggt gga aat | 432 |
|    | Ala Asp Glu Ile Val Glu Asp Ile Glu Asp Gln Val Ala Gly Gly Asn |     |
|    | 130 135 140                                                     |     |
| 30 | cgt aca aaa cgt caa gca ttc aag gat cat aaa tat ccc aaa acg ttg | 480 |
|    | Arg Thr Lys Arg Gln Ala Phe Lys Asp His Lys Tyr Pro Lys Thr Leu |     |
|    | 145 150 155 160                                                 |     |
| 35 | tgg tca caa gga gtc aac tac tac ttc cat gat atg gcc agt aag cag | 528 |
|    | Trp Ser Gln Gly Val Asn Tyr Tyr Phe His Asp Met Ala Ser Lys Gln |     |
|    | 165 170 175                                                     |     |
| 40 | atg aaa agc gta ttc gta aaa gga gcg aaa tgg tgg gaa aag gac acg | 576 |
|    | Met Lys Ser Val Phe Val Lys Gly Ala Lys Trp Trp Glu Lys Asp Thr |     |
|    | 180 185 190                                                     |     |
| 45 | tgt atc aat ttc acg gag aac cgt tct gcc gaa gac cga att atg gta | 624 |
|    | Cys Ile Asn Phe Thr Glu Asn Arg Ser Ala Glu Asp Arg Ile Met Val |     |
|    | 195 200 205                                                     |     |
| 50 | ttc cca cag aaa gga tgt tgg tca aat ata gga aaa atc ggt ggc gaa | 672 |
|    | Phe Pro Gln Lys Gly Cys Trp Ser Asn Ile Gly Lys Ile Gly Gly Glu |     |
|    | 210 215 220                                                     |     |
| 55 | caa aag att tcg ttg gga gga ggt tgt cat tcg gta tcc att gct gcg | 720 |
|    | Gln Lys Ile Ser Leu Gly Gly Gly Cys His Ser Val Ser Ile Ala Ala |     |
|    | 225 230 235 240                                                 |     |
| 60 | cat gag atc ggt cac gca att gga ttc ttc cat act atg tcc cgt cac | 768 |
|    | His Glu Ile Gly His Ala Ile Gly Phe Phe His Thr Met Ser Arg His |     |
|    | 245 250 255                                                     |     |
| 65 | gat cgc gat gaa ttc atc acc gta aac atg cac aat gtt gat gta cac | 816 |
|    | Asp Arg Asp Glu Phe Ile Thr Val Asn Met His Asn Val Asp Val His |     |
|    | 260 265 270                                                     |     |
| 70 | tgg ctg agt caa ttt aat aaa gaa acg acg aag aga aat gat aat tat | 864 |
|    | Trp Leu Ser Gln Phe Asn Lys Glu Thr Thr Lys Arg Asn Asp Asn Tyr |     |
|    | 275 280 285                                                     |     |

# ES 2 304 526 T3

|    |                                                                 |      |
|----|-----------------------------------------------------------------|------|
|    | gga atg acg tac gac tac ggt agc att atg cat tac ggt gga acc agt | 912  |
|    | Gly Met Thr Tyr Asp Tyr Gly Ser Ile Met His Tyr Gly Gly Thr Ser |      |
|    | 290 295 300                                                     |      |
| 5  | gca tcg tac aat aat aag cca aca atg gtg ccg ttt gat gtg gac tat | 960  |
|    | Ala Ser Tyr Asn Asn Lys Pro Thr Met Val Pro Phe Asp Val Asp Tyr |      |
|    | 305 310 315 320                                                 |      |
| 10 | cag caa acc ctt ggc tct cca ttc att tct ttc att gaa ctt tcc atg | 1008 |
|    | Gln Gln Thr Leu Gly Ser Pro Phe Ile Ser Phe Ile Glu Leu Ser Met |      |
|    | 325 330 335                                                     |      |
| 15 | att aat gaa cac tac aaa tgc aaa gag aac tgc aat cca gct aag tcg | 1056 |
|    | Ile Asn Glu His Tyr Lys Cys Lys Glu Asn Cys Asn Pro Ala Lys Ser |      |
|    | 340 345 350                                                     |      |
| 20 | gct aaa tgc gaa atg ggc gga ttc cct cat ccc cga gac tgc agc aaa | 1104 |
|    | Ala Lys Cys Glu Met Gly Gly Phe Pro His Pro Arg Asp Cys Ser Lys |      |
|    | 355 360 365                                                     |      |
| 25 | tgt atc tgt cct ggt gga tac gcc gga gct cga tgc acc gaa aga cca | 1152 |
|    | Cys Ile Cys Pro Gly Gly Tyr Ala Gly Ala Arg Cys Thr Glu Arg Pro |      |
|    | 370 375 380                                                     |      |
| 30 | tca ggg tgt ggc agt gca att caa gct tcg tcc gat tgg aag acc tta | 1200 |
|    | Ser Gly Cys Gly Ser Ala Ile Gln Ala Ser Ser Asp Trp Lys Thr Leu |      |
|    | 385 390 395 400                                                 |      |
| 35 | caa gat acc ctt ggc aag gat gat gat gaa gaa cga gag gac ttc gag | 1248 |
|    | Gln Asp Thr Leu Gly Lys Asp Asp Asp Glu Glu Arg Glu Asp Phe Glu |      |
|    | 405 410 415                                                     |      |
| 40 | aca tgt aat tac tgg att gaa tct cct gcc gga acm gaa atc gaa gtg | 1296 |
|    | Thr Cys Asn Tyr Trp Ile Glu Ser Pro Ala Gly Xaa Glu Ile Glu Val |      |
|    | 420 425 430                                                     |      |
| 45 | agg tta ttg gat ttc acg agg ggt gtt tct gtc gat gga tgc aaa ttt | 1344 |
|    | Arg Leu Leu Asp Phe Thr Arg Gly Val Ser Val Asp Gly Cys Lys Phe |      |
|    | 435 440 445                                                     |      |
| 50 | gcc ggt gta gag atc aag acc aat aag gat caa aca ctc act ggc tac | 1392 |
|    | Ala Gly Val Glu Ile Lys Thr Asn Lys Asp Gln Thr Leu Thr Gly Tyr |      |
|    | 450 455 460                                                     |      |
| 55 | agg ttc tgc aca gct ggc gca gct ggc ata gca ctt cgt tct tac acg | 1440 |
|    | Arg Phe Cys Thr Ala Gly Ala Ala Gly Ile Ala Leu Arg Ser Tyr Thr |      |
|    | 465 470 475 480                                                 |      |
| 60 | aat cgc gtc cca ata atg aca tac aac aga ttt ggt caa tcg acg act | 1488 |
|    | Asn Arg Val Pro Ile Met Thr Tyr Asn Arg Phe Gly Gln Ser Thr Thr |      |
|    | 485 490 495                                                     |      |
| 65 | gtt ctc gaa tac cga cac gtt ccg gcg agt gcg cca aga acg ccc tca | 1536 |
|    | Val Leu Glu Tyr Arg His Val Pro Ala Ser Ala Pro Arg Thr Pro Ser |      |
|    | 500 505 510                                                     |      |
| 70 | cct cca tct gct aca act cgt gct tct att act act act act act acg | 1584 |
|    | Pro Pro Ser Ala Thr Thr Arg Ala Ser Ile Thr Thr Thr Thr Thr Thr |      |
|    | 515 520 525                                                     |      |

# ES 2 304 526 T3

```

aag aaa ccc agc tct act gct gcc ttt aaa tgc gag gac aac cac act 1632
Lys Lys Pro Ser Ser Thr Ala Ala Phe Lys Cys Glu Asp Asn His Thr
530 535 540

tgt ccc tca ctt gta gcg agc ggt ttc tgc aaa ggg cca ctc tca gag 1680
Cys Pro Ser Leu Val Ala Ser Gly Phe Cys Lys Gly Pro Leu Ser Glu
545 550 555 560

gct acc aag aag aaa gtg tgt cca aag tcg tgt gga ctc tgc tga 1725
Ala Thr Lys Lys Lys Val Cys Pro Lys Ser Cys Gly Leu Cys
565 570

tacaacactt tctctgtaat aaaatctgaa caattc 1761

<210> 14
15 <211> 574
    <212> PRT
    <213> Ostertagia ostertagi

20 <220>
    <221> misc_feature
    <222> (83)..(83)
25 <223> El "Xaa" de la posición 83 representa Glu, Ala o Ser.

    <220>
    <221> misc_feature
30 <222> (86)..(86)
    <223> El "Xaa" de la posición 86 representa Glu, Val, Lys o Met.

    <220>
35 <221> misc_feature
    <222> (87)..(87)
    <223> El "Xaa" de la posición 87 representa Lys o Asn.

40 <220>
    <221> misc_feature
    <222> (88)..(88)
45 <223> El "Xaa" de la posición 88 representa Trp o Ser.

    <220>
    <221> misc_feature
50 <222> (90)..(90)
    <223> El "Xaa" de la posición 90 representa Pro.

    <220>
55 <221> misc_feature
    <222> (91)..(91)
    <223> El "Xaa" de la posición 91 representa Pro o Ser.

60 <220>
    <221> misc_feature
    <222> (92)..(92)
65 <223> El "Xaa" de la posición 92 representa Glu, Ala, Lys o Thr.

    <220>

```

## ES 2 304 526 T3

<221> misc\_feature  
<222> (93)..(93)  
<223> El "Xaa" de la posición 93 representa Gly, Glu o Asp.  
5  
<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (95)..(95)  
10 <223> El "Xaa" de la posición 95 representa Gln, Pro o Ser.  
  
<220>  
<221> misc\_feature  
15 <222> (96)..(96)  
<223> El "Xaa" de la posición 96 representa Ser, Asn, Cys o Tyr.  
  
<220>  
20 <221> misc\_feature  
<222> (97)..(97)  
<223> El "Xaa" de la posición 97 representa Gly, Ala, Arg o Thr.  
25  
<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (98)..(98)  
30 <223> El "Xaa" de la posición 98 representa Arg.  
  
<220>  
<221> misc\_feature  
35 <222> (99)..(99)  
<223> El "Xaa" de la posición 99 representa Asp o Ala.  
  
<220>  
40 <221> misc\_feature  
<222> (100)..(100)  
<223> El "Xaa" de la posición 100 representa Gly, Ala, Arg o Pro.  
45  
<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (102)..(102)  
50 <223> El "Xaa" de la posición 102 representa Arg o His.  
  
<220>  
<221> misc\_feature  
55 <222> (103)..(103)  
<223> El "Xaa" de la posición 103 representa Val.  
  
<220>  
60 <221> misc\_feature  
<222> (104)..(104)  
<223> El "Xaa" de la posición 104 representa Gly, Val o Leu.  
65  
<220>  
<221> misc\_feature

# ES 2 304 526 T3

<222> (105)..(105)

<223> El "Xaa" de la posición 105 representa Arg o Cys.

5 <220>

<221> misc\_feature

<222> (106)..(106)

<223> El "Xaa" de la posición 106 representa Glu o Lys.

10

<220>

<221> misc\_feature

<222> (108)..(108)

15

<223> El "Xaa" de la posición 108 representa Ser o Asn.

<220>

20

<221> misc\_feature

<222> (428)..(428)

<223> El "Xaa" de la posición 428 representa Thr.

25 <400> 14

Met Arg Leu Ile Leu Leu Ile Leu Leu Leu Val Val Ala Thr Asn Gly  
1 5 10 15

30

Gly Ile Ile Asp Lys Leu Lys Gly Leu Phe Thr Gly Glu Gly Gly Phe  
20 25 30

Gly Gln Lys Val Lys Asn Ala Thr Ala Val Gly Phe Lys Lys Leu Phe  
35 40 45

35

Glu Asn Thr Ala Leu Phe Arg Ile Asn Asp Lys Ile Arg Ser Met Lys  
50 55 60

40

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

Leu Gln Xaa Arg Leu Xaa Xaa Xaa Arg Xaa Xaa Xaa Xaa Arg Xaa Xaa  
85 90 95

45

Xaa Xaa Xaa Xaa Arg Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Val Xaa Lys Asn Ser Glu  
100 105 110

50

Val Asp Gln Tyr Leu Tyr Gln Gly Asp Met Val Leu Thr Glu Glu Gln  
115 120 125

Ala Asp Glu Ile Val Glu Asp Ile Glu Asp Gln Val Ala Gly Gly Asn  
130 135 140

55

Arg Thr Lys Arg Gln Ala Phe Lys Asp His Lys Tyr Pro Lys Thr Leu  
145 150 155 160

60

Trp Ser Gln Gly Val Asn Tyr Tyr Phe His Asp Met Ala Ser Lys Gln  
165 170 175

Met Lys Ser Val Phe Val Lys Gly Ala Lys Trp Trp Glu Lys Asp Thr  
180 185 190

65

Cys Ile Asn Phe Thr Glu Asn Arg Ser Ala Glu Asp Arg Ile Met Val  
195 200 205

# ES 2 304 526 T3

Phe Pro Gln Lys Gly Cys Trp Ser Asn Ile Gly Lys Ile Gly Gly Glu  
 210 215 220  
 5  
 Gln Lys Ile Ser Leu Gly Gly Gly Cys His Ser Val Ser Ile Ala Ala  
 225 230 235 240  
 10  
 His Glu Ile Gly His Ala Ile Gly Phe Phe His Thr Met Ser Arg His  
 245 250 255  
 15  
 Asp Arg Asp Glu Phe Ile Thr Val Asn Met His Asn Val Asp Val His  
 260 265 270  
 20  
 Trp Leu Ser Gln Phe Asn Lys Glu Thr Thr Lys Arg Asn Asp Asn Tyr  
 275 280 285  
 25  
 Gly Met Thr Tyr Asp Tyr Gly Ser Ile Met His Tyr Gly Gly Thr Ser  
 290 295 300  
 30  
 Ala Ser Tyr Asn Asn Lys Pro Thr Met Val Pro Phe Asp Val Asp Tyr  
 305 310 315 320  
 35  
 Gln Gln Thr Leu Gly Ser Pro Phe Ile Ser Phe Ile Glu Leu Ser Met  
 325 330 335  
 40  
 Ile Asn Glu His Tyr Lys Cys Lys Glu Asn Cys Asn Pro Ala Lys Ser  
 340 345 350  
 45  
 Ala Lys Cys Glu Met Gly Gly Phe Pro His Pro Arg Asp Cys Ser Lys  
 355 360 365  
 50  
 Cys Ile Cys Pro Gly Gly Tyr Ala Gly Ala Arg Cys Thr Glu Arg Pro  
 370 375 380  
 55  
 Ser Gly Cys Gly Ser Ala Ile Gln Ala Ser Ser Asp Trp Lys Thr Leu  
 385 390 395 400  
 60  
 Gln Asp Thr Leu Gly Lys Asp Asp Asp Glu Glu Arg Glu Asp Phe Glu  
 405 410 415  
 65  
 Thr Cys Asn Tyr Trp Ile Glu Ser Pro Ala Gly Xaa Glu Ile Glu Val  
 420 425 430  
 Arg Leu Leu Asp Phe Thr Arg Gly Val Ser Val Asp Gly Cys Lys Phe  
 435 440 445

# ES 2 304 526 T3

|    |                                                                 |           |
|----|-----------------------------------------------------------------|-----------|
|    | Ala Gly Val Glu Ile Lys Thr Asn Lys Asp Gln Thr Leu Thr Gly Tyr |           |
|    | 450 455 460                                                     |           |
| 5  | Arg Phe Cys Thr Ala Gly Ala Ala Gly Ile Ala Leu Arg Ser Tyr Thr |           |
|    | 465 470 475 480                                                 |           |
| 10 | Asn Arg Val Pro Ile Met Thr Tyr Asn Arg Phe Gly Gln Ser Thr Thr |           |
|    | 485 490 495                                                     |           |
| 15 | Val Leu Glu Tyr Arg His Val Pro Ala Ser Ala Pro Arg Thr Pro Ser |           |
|    | 500 505 510                                                     |           |
| 20 | Pro Pro Ser Ala Thr Thr Arg Ala Ser Ile Thr Thr Thr Thr Thr Thr |           |
|    | 515 520 525                                                     |           |
| 25 | Lys Lys Pro Ser Ser Thr Ala Ala Phe Lys Cys Glu Asp Asn His Thr |           |
|    | 530 535 540                                                     |           |
| 30 | Cys Pro Ser Leu Val Ala Ser Gly Phe Cys Lys Gly Pro Leu Ser Glu |           |
|    | 545 550 555 560                                                 |           |
| 35 | Ala Thr Lys Lys Lys Val Cys Pro Lys Ser Cys Gly Leu Cys         |           |
|    | 565 570                                                         |           |
|    | <210> 15                                                        |           |
|    | <211> 24                                                        |           |
|    | <212> ADN                                                       |           |
|    | <213> Artificial                                                |           |
| 40 | <220>                                                           |           |
|    | <223> cebador: Lambdagt11F                                      |           |
|    | <220>                                                           |           |
| 45 | <221> misc_feature                                              |           |
|    | <223> Lambdagt11F                                               |           |
|    | <400> 15                                                        |           |
| 50 | <b>ggtggcgacg actcctggag cccg</b>                               | <b>24</b> |
|    | <210> 16                                                        |           |
|    | <211> 24                                                        |           |
| 55 | <212> ADN                                                       |           |
|    | <213> Artificial                                                |           |
|    | <220>                                                           |           |
| 60 | <223> cebador: Lambdagt11R                                      |           |
|    | <400> 16                                                        |           |
|    | <b>ttgacaccag accaactggt aatg</b>                               | <b>24</b> |
| 65 | <210> 17                                                        |           |
|    | <211> 20                                                        |           |

# ES 2 304 526 T3

<212> ADN  
 <213> Artificial  
 5 <220>  
 <223> cebador: SP6  
 <400> 17  
 10 **atttaggtga cactatagaa** **20**  
 <210> 18  
 <211> 22  
 15 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 20 <223> cebador: T7  
 <400> 18  
**gtaatacgac tcactatagg gc** **22**  
 25 <210> 19  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 30 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> cebador: 24kForw  
 35 <400> 19  
**gaattcatga agttggctgt g** **21**  
 40 <210> 20  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 45 <220>  
 <223> cebador: 24kRev  
 50 <400> 20  
**ctcgagtc aa tagatccttg tg** **22**  
 <210> 21  
 55 <211> 36  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 60 <220>  
 <223> cebador: AAP  
 <220>  
 65 <221> misc\_feature  
 <222> (24)..(25)  
 <223> n = Inosina

# ES 2 304 526 T3

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (29)..(30)  
 5 <223> n = Inosina  
  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 10 <222> (34)..(35)  
 <223> n = Inosina  
  
 <400> 21  
 15 **ggccacgcgt cgactagtac gggnnngggnn gggnnng** **36**  
  
 <210> 22  
 <211> 32  
 20 <212> ADN  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 25 <223> cebador: UAP  
  
 <400> 22  
 30 **cuacuacuac uaggccacgc gtcgactagt ac** **32**  
  
 <210> 23  
 <211> 21  
 35 <212> ADN  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 40 <223> cebador: 65Rev1  
  
 <400> 23  
 45 **cagcaatgga taccgaatga c** **21**  
  
 <210> 24  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 50 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> cebador: 65Rev2  
 55  
 <400> 24  
 60 **agtgacttca tcattgctgg tg** **22**  
  
 <210> 25  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 65 <213> Artificial  
  
 <220>

## ES 2 304 526 T3

<223> cebador: 65kForw

<400> 25

5           **tgatgatgaa gaacgagagg a** **21**

<210> 26

<211> 30

10 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

15 <223> cebador: For65

<400> 26

20           **ggatccatga ggctgatatt gctcatttta** **30**

<210> 27

<211> 27

<212> ADN

25 <213> Artificial

<220>

30 <223> cebador: Rev65

<400> 27

**ctcgaggcag agtccacacg acttttgg** **27**

35

40

45

50

55

60

65