

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 376 874**

51 Int. Cl.:  
**C12N 15/12** (2006.01)  
**A61K 38/17** (2006.01)  
**A61K 39/00** (2006.01)  
**A61K 39/39** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **04706581 .8**  
96 Fecha de presentación: **30.01.2004**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1592796**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **09.11.2005**

54 Título: **Antígenos derivados de helmintos que tienen la capacidad de proporcionar protección frente a parásitos**

30 Prioridad:  
**31.01.2003 BR 0303266**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**20.03.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**20.03.2012**

73 Titular/es:  
**FUNDACAO OSWALDO CRUZ (FIOCRUZ)**  
**AVENIDA BRASIL 4365, MANGUINHOS**  
**21045-900 RIO DE JANEIRO, BR**

72 Inventor/es:  
**TENDLER, Miriam;**  
**KATZ, Naftale;**  
**SIMPSON, Andrew, J.;**  
**RAW, Isaias;**  
**HO, Paulo, Lee y**  
**RAMOS, Celso, Raul, Romero**

74 Agente/Representante:  
**de Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 376 874 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Antígenos derivados de helmintos que tienen la capacidad de proporcionar protección frente a parásitos

**Campo técnico**

5 La presente invención, en su aspecto más general, se refiere a material antigénico derivado de helmintos que es capaz de proporcionar protección frente a parásitos.

La invención se refiere también a vacunas que proporcionan una inmunidad protectora frente a infección helmíntica.

La invención se refiere también a un sistema de vacunación de hospedador mamífero contra infecciones helmínticas.

**Antecedentes de la invención**

10 Entre los helmintos, los trematodos digenéticos comprenden más de 100 familias. La mayoría de los trematodos son parásitos relativamente poco agresivos que viven en los intestinos y otros órganos de vertebrados; por tanto, han recibido muy poca atención por los parasitólogos que hacen uso de la parasitología aplicada. Los trematodos conocidos por causar enfermedades graves a seres humanos, concretamente los trematodos de la corriente sanguínea *Schistosoma*, así como trematodos hepáticos y pulmonares, son parásitos de infección animal muy importantes.

15 La esquistosomiasis es una enfermedad causada por trematodos sanguíneos pertenecientes a la familia *Schistosomatidae*, clase *Trematoda*, subclase *Diginea* y género *Schistosoma*. Los seres humanos son parasitados principalmente por tres especies de parásitos del género *Schistosoma*: *S. mansoni* (encontrado en África y Sudamérica), *S. haematobium* (África y Oriente Medio) y *S. japonicum* (Asia). Los gusanos adultos de *S. mansoni* y *S. japonicum* se localizan en las venas mesentéricas de los intestinos, mientras que *S. haematobium* aparece en las venas que rodean la vejiga.

20 El *Fasciola*, el trematodo hepático más importante, es el parásito predominante en rumiantes domésticos y es responsable de pérdidas económicas elevadas en todo el mundo, alcanzando al ganado bovino, caprino y ovino.

25 La principal característica de la enfermedad, responsable de la patología, morbilidad y mortalidad de los animales citados, está basada en la destrucción del tejido hepático del hospedador, como resultado de los daños causados en los conductos biliares, donde vive el espécimen adulto de *Fasciola*. Los animales jóvenes, particularmente los infectados por *Fasciola hepatica*, tienen una morbilidad mayor y consiguientemente mueren. El *Fasciola*, a veces, puede parasitar también seres humanos, cuando existe la posibilidad de entrar en contacto con el hábitat del animal enfermo. Este hecho es más frecuente en Cuba y algunos países hispanoamericanos, sin embargo, el verdadero trematodo hepático humano es otro parásito llamado *Clonorchis sinensis*, que está muy extendido en China, Japón, Corea, Vietnam e India. Básicamente, la patología está causada por el engrosamiento de las paredes del conducto biliar y, en los casos más graves, puede causar cirrosis hepática y muerte.

30 Tanto *Fasciola* como *Clonorchis* entran pasivamente en el hospedador, en una forma larval llamada metacercaria que se ingiere con el alimento (pasto y pescado crudo para *Fasciola* y *Clonorchis*, respectivamente); sin embargo, su ruta de migración en el organismo hospedador vertebrado ocurre a través de los conductos biliares y difieren entre sí. Mientras que *Clonorchis* alcanza el árbol biliar a través de los intestinos y la ampolla de Vater, *Fasciola* migra a través de la cavidad abdominal, penetrando activamente en la pared hepática por su cápsula, alcanzando el parénquima y el sistema biliar y causando, por tanto, graves daños a los tejidos del hospedador.

Respecto a la fascioliasis en mascotas, hay resultados contradictorios y pocas evidencias que sugieran que las ovejas o cabras adquieren inmunidad frente a *Fasciola hepatica* (Sinclair, 1967) después de la inmunización con extractos brutos.

40 Hay evidencias que muestran que la infección puede prolongarse durante al menos 11 años en ovejas infectadas experimentalmente (Durbin, 1952). Se ha notificado también muy poca o ninguna reacción del hospedador frente al parásito; por tanto, la supervivencia de las ovejas infectadas dependerá enteramente del número de metacercarias ingeridas (Boray, 1969). El ganado bovino es conocido por ser más resistente frente a *F. hepatica*. En estos casos, el *Fasciola* vive habitualmente en el hospedador durante una media de 9-12 meses; sin embargo, los animales jóvenes son los más afectados clínicamente por la fascioliasis.

45 Se han hecho varios intentos para identificar los antígenos que están comprometidos con la resistencia, que pueden usarse para inmunoprofilaxis y que podrían servir como base para desarrollar vacunas eficaces contra la fascioliasis. Varios científicos han seguido básicamente dos estrategias experimentales independientes basadas en: 1) la inmunidad inducida por cercarias vivas irradiadas, la base de la considerada vacuna viva y 2) la inmunidad inducida por las denominadas vacunas no vivas.

50 Sin embargo, se han publicado pocos trabajos en el contexto de la obtención de resistencia adquirida a *Fasciola hepatica* en terneros usando extractos brutos somáticos del parásito adulto. Ross, 1967, Hall y Lang, 1978, Hillyer, 1979 han notificado datos contradictorios en este contexto.

La inmunidad inducida por vacunas obtenidas por la irradiación de metacercarias, concretamente las llamadas vacunas vivas o no vivas irradiadas o atenuadas, ha conducido también a resultados frustrantes en experimentos efectuados con ratones, conejos y ovejas (Campbell *et al.*, 1978, Hughes, 1963), puesto que no han aparecido evidencias del desarrollo de una inmunidad importante después de la administración de metacercarias irradiadas en estos animales.

5 Adicionalmente, los experimentos con distintos extractos de productos de excreción y secreción de trematodos en su forma adulta, obtenidos directamente de los conductos biliares, han mostrado ser no inmunogénicos, puesto que los animales vacunados con materiales originados en estas formas parasitarias, de forma similar a los controles de los experimentos, presentaban muy poca protección o ninguna y lesiones, desde el punto de vista patológico, en el parénquima hepático.

10 Se espera, basándose en el estado de la técnica, que el ganado bovino pueda responder mejor a la vacunación con vacunas no vivas. Para el ganado caprino, no hay indicaciones experimentales que sugieran que podría preverse una situación similar basándose en la protección únicamente mediocre inducida por la administración de una serie de distintos antígenos en experimentos con estos animales.

15 Campbell *et al.* (1977) se han centrado en la inducción de inmunidad protectora mediante inmunidad heteróloga. El estudio de esta perspectiva ha mostrado que la infección de ovejas por *Cysticercus tenuicollis*, la etapa de metacestodo de la larva de tenia (*Taenia hydatigena*) en perros, produce una protección parcial frente a *Fasciola hepatica*. Sin embargo, Hughes *et al.* (1978) no confirmaron este resultado. En otros experimentos, se observó también la incapacidad de inducir protección con este cestodo frente a *Fasciola hepatica* en animales experimentales.

20 Los ratones adultos de ambos sexos infectados por *S. mansoni* han desarrollado una resistencia estadísticamente significativa frente a *Fasciola hepatica*, así como frente a las infecciones concomitantes de ambos parásitos, dando como resultado una cantidad reducida de la carga parasitaria posterior y también un número reducido de huevos por gusano adulto (Christensen *et al.*, 1978). Los terneros infectados por *S. bovis* han mostrado también cierta resistencia a *Fasciola hepatica* y un daño hepático menos marcado (Sirag *et al.*, 1981).

25 Pelley y Hillyer, 1978 y Hillyer y de Atica, 1980, han notificado antígenos comunes a *Fasciola hepatica* y *Schistosoma mansoni* encontrados en huevos de *Schistosoma*. La aparición de reacciones falsas positivas en zonas en que ambos parásitos son endémicos es otro hallazgo que indica reactividad e inmunidad cruzadas. Hillyer, 1985 (Hillyer, G. V. 1985 "Induction of immunity in mice to *Fasciola hepatica* with *Fasciola/Schistosoma* cross-reactive defined immunity antigen". Am. J. Trop. Med. Hyg. 34(6), pág. 1127-1131) y Hillyer *et al.*, 1987 (Hillyer, G. V., Haroun, E. T. M., Hernández, Al y Soler of Galanes, M. 1987. "Acquired resistance to *F. hepatica* in cattle using a purified adult worm antigen". Am. J. Trop. Med. Hyg. 37(2). pág. 363-369) han demostrado también que una mezcla antigénica derivada de *Fasciola hepatica* puede proporcionar protección frente a infecciones posteriores causadas por *Fasciola hepatica* y *Schistosoma mansoni*.

30 Por tanto, se cree que una vacuna eficaz será el método más potente, y con una mejor relación coste/beneficio, que detenga la transmisión de la enfermedad y la erradique del contexto humano respecto a la esquistosomiasis y del contexto veterinario respecto a la fascioliasis.

35 Una serie de especies hospedadoras pueden desarrollar resistencia parcial a *Schistosoma mansoni* partiendo de la infección inicial o inmunización con cercarias irradiadas (Smithers, S. R. y Doenhoff, M. 1982. "Schistosomiasis" en: "Immunology of Parasitic Infections". Blackwell Scientific Publications, 2ª edición, capítulo 17, pág. 527-607). La información del estado de la técnica respecto a la posibilidad de efectuar la inmunización usando extractos brutos de material originario de formas parasitarias de *Schistosoma mansoni* (Clegg y Smith, 1978) ha posibilitado producir una vacuna definida y eficaz contra el parásito usando antígenos parasitarios, concretamente vacunas no vivas (Tendler, M. 1987. "S. mansoni: Protective antigens". Mem. Inst. Oswaldo Cruz. vol. 82. supl. IV. pág. 125-128). Sin embargo, para la mayoría de los experimentos que usan material químicamente definido y purificado, la mayor limitación era el grado incompleto de protección obtenido en animales. Como se describe por varios autores y se revisa por Smithers en 1982 (Smithers, S. R. 1982. "Fascioliasis and other Trematode Infections" en: "Immunology of Parasitic Infections". Blackwell Scientific Publications, 2ª edición, capítulo 17, pág. 608-621), había ya un consenso sobre la necesidad de aumentar el nivel de protección inducido en la inmunoprofilaxis basada en la experiencia. Sin embargo, ha sido muy difícil fijar un buen modelo animal para el desarrollo de una vacuna de esquistosomiasis eficaz. La progresión hacia este objetivo depende de la identificación y refinamiento de moléculas antigénicas altamente eficaces que pudieran mediar la inmunidad protectora. (Tendler, M. "Schistosoma mansoni: Protective Antigens", Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Río de Janeiro, Vol. 82, supl. IV: 125-128, 1987).

40 En estudios anteriores para encontrar antígenos que medien la inmunidad protectora de esquistosoma, se usó una mezcla compleja (llamada ES) de componentes de *Schistosoma* liberados tempranamente incubando gusanos vivos adultos en disolución salina tamponada (Tendler, M. y Scarpin, M. 1979. "The presence of *S. mansoni* antigens in solutions used for storing adult worms". Rev. Inst. Med. Trop. 21(6), pág. 293-296; Kohn *et al.*, 1979). Con el fin de obtener protección frente a la infección por cercarias mediante una vacuna, se observó un modelo experimental en dos hospedadores animales no singénicos, con distintas sensibilidades a la infección por *S. mansoni*. Uno de ellos, el ratón, era sensible y el otro, el conejo, era parcialmente resistente a la infección.

Fue posible establecer, en el modelo de conejo de Nueva Zelanda con *S. mansoni*, un estándar fiable de infección percutánea, con una recuperación de cargas parasitarias homogénea en número y tamaño de parásitos y en la relación macho/hembra a largo plazo después de la infección (Tendler, M., Lima, A., Pinto, R., Cruz, M., Brascher, H., Katz, N. 1982 "Immunogenic and protective activity of an extract of *S. mansoni*". Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Río de Janeiro. vol. 77(3), pág. 275-283; Tendler, M. 1985 y Tendler, M. 1986). Datos recientes sugieren que el conejo usado como hospedador experimental de *S. mansoni* puede representar un nuevo modelo de inmunidad patológica.

Los experimentos de inmunización efectuados con conejos usando la mezcla de ES dieron como resultado muy altos niveles de protección después de la exposición a la infección (Scarpin, M., Tendler, M. Messineo, L., Katz, N. 1980 "Preliminary studies with a *Schistosoma mansoni* saline extract inducing protection in rabbits against the challenge infection". Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo, 22(4), pág. 164-172; Tendler, M. 1980; Tendler, M. 1982) (un 90% de reducción de la carga parasitaria media de animales vacunados en comparación con animales de control de sexo y edad coincidentes infectados con el mismo lote de cercarias obtenidas de la cepa LE, una cepa brasileña de *S. mansoni*). Además de presentar una protección total frente a infecciones letales, los ratones SW inmunizados con ES mostraron también una protección significativa cuando se expusieron a cercarias (Tendler, 1986). Para valorar la resistencia, se someten los animales vacunados y expuestos conjuntamente con sus controles respectivos a la perfusión venosa del hilio hepático y el sistema mesentérico para recuperar y contar la carga parasitaria adulta. Se calcula el grado de protección mediante la diferencia entre el número de parásitos recuperados de los controles en comparación con los animales vacunados (Tendler *et al.*, 1982).

Basándose en las evidencias "*in vitro*" de la eficacia de anticuerpos contra distintas fases parasitarias evolutivas en ensayos de citotoxicidad eosinofílica o dependiente de complemento (Grzych *et al.*, 1982; Smith *et al.*, 1982), se usa la caracterización de antígenos reconocidos por el suero de animales conocidamente resistentes para identificar moléculas antigénicas potencialmente capaces de mediar la inmunidad protectora (Bickle *et al.*, 1986; Horowitz y Amon, 1985). Se efectuaron experimentos de transferencia Western para analizar la respuesta de anticuerpos en conejos vacunados con ES. Ensayando los antígenos de ES frente a un panel de antisueros de conejos inmunizados con el mismo esquema (ES-CFA: mezcla compleja de los componentes de *Schistosoma*-coadyuvante completo de Freund), los autores pudieron demostrar, en inmunotransferencias, la aparición de dos patrones de reconocimiento de componentes del ES.

De forma interesante, los sueros de conejos que desarrollaron protección total solo reconocían algunos componentes del ES. Este resultado posibilitó a los autores identificar dos grupos de componentes del ES: un grupo común a todos los individuos y otro grupo antigénico reconocido solo por el suero de animales vacunados con ES (conejos) que estaban totalmente protegidos. Estos dos patrones de reconocimiento se denominaron patrones de protección "alta" o "baja" y se usaron como anticuerpos "diferenciales". Basándose en ambos patrones de reconocimiento del componente del ES por sueros policlonales de conejos con diferente respuesta al mismo esquema de inmunización (probablemente debido al patrón individual de variación esperado en poblaciones no singénicas), se usó una estrategia de cribado de colecciones de ADNc en ambos sueros. Teniendo en cuenta la limitación del conocimiento incompleto sobre los mecanismos críticos de respuesta protectora, tanto en animales experimentales como en esquistosomiasis clínica, los procedimientos de cribado adoptados frecuentemente comprenden el uso de sueros humanos de sujetos inmunes o sensibles potencialmente infectados (Carter y Colley, 1986) o anticuerpos monoclonales y policlonales de animales inmunizados dirigidos contra varios antígenos no caracterizados (Lanar *et al.*, 1986; Balloul *et al.*, 1987).

En los intentos iniciales de clonación molecular de componentes protectores potenciales del ES, usando cribado diferencial, los Dres. Klinkert, Universidad de Heidelberg y Donnelson/Henkle, Universidad de Iowa, respectivamente, construyeron dos colecciones de ADNc de gusanos *S. mansoni* y *S. japonicum* adultos. Puede extraerse un paralelismo de los resultados de inmunotransferencia, en que se seleccionaron dos grupos distintos de clones, correspondientes potencialmente al patrón diferencial de reconocimiento de sueros de conejo anti-ES con protección alta y baja. Se compararon experimentos paralelos, cuyo objetivo era identificar los componentes del ES, de inmunotransferencias de sueros policlonales de conejo anti-ES (protección alta y baja) con sueros de conejo frente a paramiosina de *Schistosoma* purificada (proporcionada por el Dr. A. Sher, NIH). Esta proteína se ha definido como una molécula que muestra una protección parcial frente a la infección por *Schistosoma mansoni* de ratones singénicos (Lanar *et al.*, 1986), su peso molecular es Mr ( $\times 10^{-3}$ ) 97 y es sensible a la degradación proteolítica, dando como resultado dos subproductos de Mr ( $\times 10^{-3}$ ) 95 y 78 (Pearce *et al.*, 1986).

Se reconoció el complejo 97/95/78 por sueros anti-ES con protección baja y alta y por suero mono-específico frente a paramiosina. Además de la paramiosina, los sueros anti-ES de alta protección reconocieron también otros péptidos y proteínas en que caracterizar y ensayar su protección y función inmunológica.

La detección de paramiosina como componente del ES refuerza los datos anteriores de ensayos de inmunofluorescencia indirecta efectuados en la sección de gusanos *Schistosoma* adultos, con suero de conejo anti-ES, que reaccionaban con la superficie del parásito y con la zona entre las capas musculares (Mendonça *et al.*, 1987), de forma similar a la demostrada por la paramiosina (Pearce *et al.*, 1986).

El resultado anterior concordaba también con los resultados del cribado de colecciones de ADNc efectuado como se menciona. Se aislaron de nuevo los clones de paramiosina comunes con los sueros anti-paramiosina y anti-ES. Se obtuvieron también los clones reconocidos solo por sueros anti-ES de conejo (alta protección).

Entre los demás componentes de ES que tienen bajo peso molecular, se identificó también el componente de 31/32 kDa, descrito como candidato potencial para el diagnóstico de esquistosomiasis (Klinkert *et al.*, 1987) y notificado recientemente como una proteasa localizada en el tubo digestivo (Klinkert *et al.*, 1988). Estos y otros antígenos identificados en el ES han mostrado inducir una protección muy baja en ensayos de vacunación.

5 Para obtener los antígenos liberados tempranamente de gusanos vivos adultos (especialmente de secreción/excreción y componentes de tegumentos), se usó una incubación de gusanos adultos vivos recién perfundidos con un medio definido químicamente (disolución salina tamponada con PBS-fosfato).

10 Se adoptó esta estrategia basándose en los intentos frustrados anteriores de otros autores dirigidos a la inducción de alta resistencia frente a la infección por *Schistosoma* con distintos extractos brutos de *S. mansoni*, que podrían estar teóricamente desprovistos de antígenos funcionales relevantes. Esta suposición estaba influida principalmente porque los procedimientos de extracción antigénica, adoptados habitualmente por otros autores, han usado parásitos no vivos. Es más, al usar ES emulsionado en CFA (coadyuvante completo de Freund, como coadyuvante preferido), administrado por vía intradérmica/subcutánea, se alcanza una protección alta a largo plazo en dos modelos animales experimentales frente a la infección por *S. mansoni*. La razón de usar un modelo de conejo, que no es común en ensayos de protección, era conseguir una identificación inicial de los antígenos potencialmente protectores en hospedadores parcialmente resistentes (para ensayar después en hospedadores sensibles) que, sin embargo, serían capaces de amplificar la respuesta inmunitaria y los mecanismos eficaces de muerte parasitaria, dado que los conejos son conocidos como potentes productores de anticuerpos.

20 Los estudios sobre respuesta inmunitaria inducida en animales vacunados, dirigidos a identificar componentes protectores del ES funcionales y relevantes, el sitio y mecanismos de la muerte parasitaria, así como los marcadores de protección, han sido objeto de los esfuerzos de los últimos años. Sin embargo, solo recientemente resultó disponible la información sobre la composición del ES, usando la identificación y separación de sus componentes protectores.

25 La patente de EE.UU. nº 4.396.000, publicada el 2 de agosto de 1983, a nombre de Luigi Messineo y Mauro Scarpin (según el certificado de reexamen 461 B1 4.396.000 publicado el 11 de febrero de 1986, la patente fue revocada) describe un extracto de gusanos *Schistosoma mansoni* adultos, obtenido mediante la incubación en fosfato de sodio tamponado-cloruro de sodio-PBS 0,15 M (pH= 5,8) que comprende proteínas, carbohidratos y ácidos nucleicos y/o subproductos de estos últimos, separados en 4 fracciones principales por cromatografía en columna de gel Sephadex G-100 y G-200. Los ensayos de inmunodifusión que usan suero de conejo anti-extracto completo mostraron 3 líneas de precipitación correspondientes a las fracciones I y II y 1 de las fracciones III y IV. Los conejos inmunizados con el extracto completo han desarrollado una resistencia total o parcial (e al menos un 77%) frente a la posterior exposición a la infección. El material antigénico de extracto salino mostró ser una vacuna eficaz en el tratamiento e inmunización de la esquistosomiasis y otras infecciones por *Schistosoma*.

35 De forma ilustrativa, se destaca que la patente de EE.UU. nº 4.396.000 fue revocada basándose en los artículos publicados. Entre el conjunto de datos correspondiente a los antecedentes de la presente invención, están la clonación y secuenciación de un componente derivado del ES identificado como Sm14.

Moser *et al.* (Moser, D., Tendler, M., Griffiths, G. y Klinkert, M. Q., han publicado un estudio "A 14 kDa *Schistosoma mansoni* Polypeptide is Homologous to a gene family of Fatty Acid Binding Proteins", *Journal of Biological Chemistry* vol. 266, nº 13, pág. 8447-8454, 1991). Este estudio describe la secuenciación génica y demuestra la actividad funcional de Sm14 como proteína de unión a ácido graso.

40 Se obtuvo la secuencia nucleotídica completa que codifica la proteína Sm14 de *Schistosoma mansoni* y se determinó a partir de clones de ADNc propagados en el bacteriófago  $\lambda$ gt 11 en *Escherichia coli*. La proteína de 14,8 kDa presenta una similitud significativa, indicando homología, con una familia de polipéptidos relacionados ligados con ligandos hidrófobos. Basándose en su afinidad por los ácidos grasos de cadena larga, se identificaron originalmente los miembros de este grupo de proteínas citosólicas. La proteína recombinante purificada mostraba afinidad por ácidos grasos, en contraposición con un mutante que carece de los primeros 16 aminoácidos N-terminales. La secuencia nucleotídica completa puede describirse como una región cebadora que empieza por el triplete ATG a la altura de los nucleótidos 123-125. La región codificante comprende 399 nucleótidos, terminando en la posición 521. La proteína de 133 residuos aminoácidos tiene una masa molecular de 14.847 kDa calculada basándose en su secuencia.

50 Pérez, J. R. *et al.*, (Pérez, J.R., Medina, J. R. R., Blanco, M. A. G. y Hillyer. 1992. "*Fasciola hepatica*: Molecular Cloning, Nucleotide Sequence and Expression of a Gene Encoding a Polypeptide Homologous to a *Schistosoma mansoni* Fatty Acid-Binding Protein". *Journal of Experimental Parasitology*, vol. 74: nº. 4, pág. 400-407) han probado que un polipéptido que presenta reactividad cruzada con antisuero frente a la proteína inmunoprolifáctica Fh12 comparte una homología significativa con la proteína de 14,8 kDa de *Schistosoma mansoni*, llamada Sm14, respecto a la secuencia aminoácida (Moser *et al.*, 1991). Además se ha probado que Fh12 es un potente inmunógeno y una molécula que es candidata a la inmunoprolifaxis tanto de esquistosomiasis como fascioliasis (Hillyer, 1985; Hillyer *et al.*, 1987), así como un marcador de inmunodiagnóstico importante en la fascioliasis humana (Hillyer *et al.*, 1992). Además, los autores estaban intentando encontrar un antígeno recombinante que contuviera epítopos de Fh15, y dichas porciones de Fh15 podrían representar la misma proteína descrita como Fh12.

Tendler *et al.* han efectuado estudios de protección frente a la esquistosomiasis en ratones y conejos con la proteína recombinante Sm14 (1995, 1996). Por lo tanto, se subclonó ADNc de la proteína Sm14 en el vector pGEMEX-1 (Promega). La construcción obtenida, pGEMEX-Sm14, expresa la proteína Sm14 en forma de una fusión con el producto del gen 10 del bacteriófago T7 (proteína de cápsida T7 principal), dando como resultado una proteína quimérica de aproximadamente 45 kDa. Después de purificar en geles preparativos de PAGE-SDS, esta proteína de fusión proporcionó aproximadamente un 50% de protección frente a la infección por cercarias de *S. mansoni* en animales de experimentación, similar al nivel de protección alcanzado con extracto salino (ES) de estos gusanos, usado como control positivo. Por otro lado, dicha proteína recombinante proporcionó un 100% de protección frente a la infección por metacercarias de *Fasciola hepatica* (Tendler *et al.*, 1995, 1996), mostrando que la proteína Sm14 puede usarse como vacuna antihelmíntica. Además, es importante mencionar la patente de EE.UU. n° 5.730.984, de propiedad del solicitante.

Sin embargo, durante el almacenamiento de la proteína recombinante Sm14, se observó la formación de un precipitado apenas controlado. Además, la obtención de proteínas recombinantes Sm14 según el estado de la técnica, por ejemplo en pGEMEX, presenta desventajas debido a que consume tiempo y tiene un bajo rendimiento para la producción a gran escala.

Por tanto, sigue existiendo la necesidad de obtener un material antigénico que pueda obtenerse con alto rendimiento, a escala piloto, en cumplimiento con las directrices de las GMP y manteniendo las características de estabilidad.

### **Sumario de la invención**

Es un objetivo de la presente invención obtener un material antigénico derivado de helmintos que sea factible generar en forma recombinante y usarse para producir una proteína, a escala piloto, en condiciones de GMP.

Aún otro objetivo está relacionado con formas mutantes más estables de la proteína Sm14.

Es aún otro objetivo de la presente invención la molécula Sm14 definida como un antígeno protector frente a infecciones por helmintos.

Es aún otro objetivo de la invención una vacuna contra infecciones por *Fasciola hepatica* en ganado bovino, caprino y ovino.

Es también un objetivo de la presente invención una vacuna contra infecciones por *Schistosoma mansoni* y todas las demás especies de *Schistosoma* que son responsables de infecciones y enfermedades en seres humanos y animales.

Es un objeto adicional de la presente invención un reactivo de diagnóstico para esquistosomiasis y fascioliasis.

### **Breve descripción de los dibujos**

La Figura 1 muestra la estructura tridimensional del modelo molecular de la proteína Sm14.

La Figura 2A muestra la estrategia de subclonación del ADNc de la proteína Sm14 en los vectores de expresión pRSETA y pET3-His y la obtención del vector de expresión pRSETA-6xHis-Sm14.

La Figura 2B muestra una comparación de las fusiones resultantes en los plásmidos de expresión pRSETA-Sm14, pET3-His-Sm14 y pRSETA-6xHis-Sm14.

Las Figura 3A y 3B muestran la obtención del vector de expresión pAE (Figura 3A) y su sitio de clonación múltiple (Figura 3B).

La Figura 4 muestra la estrategia de mutagénesis para obtener la proteína Sm14-A20.

La Figura 5 muestra los "cebadores" usados en el proceso para la obtención de la forma mutante Sm14-A20.

La Figura 6 muestra el análisis electroforético de los productos de amplificación del proceso de mutagénesis, en que M.—patrón de ADN de 1 kpb; 1.—producto de PCR 1; 2.—producto de PCR 2; 3.—producto amplificado de PCR 1 purificado; 4.—producto amplificado de PCR 2 purificado; 5.—producto de PCR 3; 6.—producto de PCR 4.

La Figura 7 presenta la secuencia parcial del plásmido pAE-Sm14-A20, mostrando la presencia de alanina en la posición 20 de la proteína Sm14.

La Figura 8 muestra el espectro de dicroísmo circular de proteínas Sm14-M20, en que Sm14-M20: proteína Sm14-M20 con el marcaje de 6xHis y Sm14-M20-ΔHis: proteína Sm14-M20 sin el marcaje de 6xHis.

La Figura 9 muestra el espectro de DC de las proteínas Sm14-M20 y Sm14-T20 (con marcaje de 6xHis).

La Figura 10 muestra la desnaturalización de las proteínas Sm14-M20 y Sm14-T20 con urea.

La Figura 11 muestra el análisis electroforético de la proteína Sm14-T20 almacenada durante 3 meses a 4°C.

La Figura 12 muestra el esquema de estrategia usado para la mutagénesis de la cisteína 62 de la proteína Sm14.

La Figura 13 muestra la comparación de la secuenciación parcial de las formas mutantes de Sm14, mostrando los sitios de mutagénesis (mostrado por la barra negra).

5 La Figura 14 muestra la comparación entre las distintas formas de la proteína Sm14 en condiciones no reductoras, en que M: marcador de la masa molecular; 1: Sm14-M20; 2: Sm14-T20; 3: Sm14-A20; 4: Sm14-M20S62; 5: Sm14-M20V62. Todas las proteínas Sm14 tienen el marcaje 6xHis. Para inducir la formación de dímero, se calentaron las muestras a 95°C durante 5 minutos.

La Figura 15 muestra la termoestabilidad de las proteínas Sm14-M20S62 y Sm14-M20V62.

La Figura 16 muestra la estabilidad de las proteínas Sm14-M20C62 y Sm14-M20S62 a 4°C a lo largo del tiempo.

10 La Figura 17 muestra la estabilidad de las isoformas y mutantes de la proteína Sm14 a 28°C.

**Descripción detallada de las realizaciones preferidas**

Se consiguen los objetivos de la presente invención obteniendo un material antigénico que proporcione inmunidad protectora frente a infecciones helmínticas de hospedadores mamíferos.

15 Según un aspecto de la presente invención, se construyeron formas mutantes de la proteína recombinante Sm14, que presentaban mayor estabilidad térmica y mayor estabilidad frente a agentes químicos desnaturizantes, permitiendo su producción a gran escala, en que dichas proteínas mutantes conservan las propiedades funcionales y antigénicas de la proteína rSm14. Debe destacarse que rSm14 designa cualquier forma recombinante de la molécula Sm14, que está en forma de fusión con otra proteína o péptido.

20 Según la presente invención, el antígeno se selecciona entre varias formas mutantes de la proteína Sm14 de *Schistosoma mansoni* que sean capaces de estimular, en hospedadores mamíferos, la inmunidad protectora frente a infecciones helmínticas, particularmente por *Schistosoma mansoni* y *Fasciola hepatica*.

La proteína Sm14 tiene un peso molecular de 14,8 kDa y presenta un grado significativo de identidad con proteínas pertenecientes a la familia de las proteínas de unión a lípido, y se caracteriza por la secuencia aminoacídica siguiente (SEQ ID NO: 1):

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

25

Se predijo la estructura tridimensional de la proteína Sm14 usando modelización molecular a partir de homología informatizada, lo que permitió identificar los epítomos protectores potenciales y posibilitó usar la rSm14 de la presente invención como antígeno de vacunación (Tendler *et al.*, 1996).

Los modelos moleculares contruidos a partir tanto de Sm14 como de Fh15 (siendo la última una molécula homóloga de Sm14 originaria de *Fasciola hepatica*, con que comparte un 44% de homología de identidad de secuencia) muestran que ambas moléculas adoptan configuraciones tridimensionales que son similares a las moléculas de otros miembros de la familia de proteínas unidas a lípido ("proteínas de unión a ácido graso", FABP). El modelo molecular de Sm14 está compuesto por 10 cintas  $\beta$  antiparalelas que forman una estructura "similar a un barril" de tipo "alternada" (o lámina) con conexiones cortas entre cintas que, generalmente, forman bucles  $\beta$ , como se muestra en la Figura 1.

Los modelos permitían también predicciones sobre (1) la importancia de ciertos residuos que proporcionan las propiedades de inmunogenicidad cruzada frente a *S. mansoni* y *F. hepatica*, (como se describe en la solicitud de patente de EE.UU. 10/113.946 y en la patente de EE.UU. nº 5.730.984), (2) los residuos implicados en la interacción con ácidos grasos y (3) los residuos que son importantes para la estabilidad estructural y la agregación covalente. Los residuos implicados en la formación de epítomos discontinuos, que son responsables de la reacción cruzada, se espera que estén localizados principalmente en la región C-terminal de la molécula (aproximadamente a partir del residuo 85).

Las proteínas recombinantes mutantes de la presente invención pueden obtenerse a partir de vectores que permiten la expresión de los genes codificantes de Sm14, apropiadamente modificados, pero que mantienen la característica antigénica de la molécula (epítomos discontinuos y accesibles localizados principalmente en la porción C-terminal de Sm14).

Se demostrará aquí que la capacidad de las formas recombinantes mutantes de la proteína Sm14 proporciona un alta protección frente a infecciones por *Fasciola hepatica* y *Schistosoma mansoni*, así como todas las especies restantes de *Schistosoma* y *Echinococcus*, y potencialmente otros helmintos presuntamente patogénicos en relación con seres humanos y animales.

Un antígeno de vacuna debería ser un componente homogéneo conservado en el parásito que no presentara grandes diferencias en su estructura y secuencia aminoacídica primaria, de modo que la respuesta inmunitaria frente a este antígeno (y al organismo que lo presente) sea también la más homogénea y eficaz en el mamífero vacunado. Por lo tanto, un examen del polimorfismo génico correspondiente a cualquier antígeno de vacuna potencial es un factor relevante para su desarrollo. La secuenciación efectuada en los clones originales (pGEMEX-Sm14) ha verificado una discrepancia respecto a la secuencia descrita por Moser *et al.* (1991), referente al aminoácido presente en la posición 20. Se ha verificado que la discrepancia estaba causada por una mutación existente en la secuencia genómica de la proteína Sm14, debido a un polimorfismo natural de la molécula Sm14.

Los análisis de secuencias mostraron dos isoformas principales de la proteína Sm14: Sm14-M20, cuya secuencia es idéntica a la proteína Sm14 notificada anteriormente en la cepa portorriqueña de *S. mansoni* (Moser *et al.*, 1991), y Sm14-T20, en que se cambió el codón Met20 (ATG) por el codón de Thr (ACG) (polimorfismo M20T).

#### Obtención de la forma mutante de Sm14-A20

Para tener un control de los experimentos de comparación de la estructura y función de las isoformas Sm14-M20 y Sm14-T20, se efectuó una mutagénesis dirigida a sitio del codón ACG de T20 en el vector pRSETA-6xHis-Sm14 a GCG del aminoácido alanina. Por tanto, se obtuvo la proteína Sm14-A20, similar a los mutantes usados en los trabajos de Richieri *et al.* (1997, 1998) para las proteínas A-FABP e I-FABP (proteínas de unión a ácido graso de adipocito e intestino, respectivamente).

Se detalla en la Figura 4 la estrategia de mutagénesis por PCR para la obtención de la proteína Sm14-A20. Para la elección de las secuencias cebadoras mutagénicas F-A20 y R-A20 mostradas en la Figura 5 junto con la secuencia parcial del ADNc de la proteína Sm14, se tuvo cuidado de que el nucleótido vecino en el extremo 5' fuera una timina (mostrada en negrita), dado que existe la tendencia de que la ADN polimerasa Taq añada adenina a los extremos 3' de las amplificaciones. Por tanto, la adenina añadida por la ADN polimerasa Taq en la amplificación se suplementa con timina en el momento de mezclar la amplificación de los productos de PCR 1 y 2. El uso de pRSETA-Sm14 como molde y del cebador F pRSETA facilita la mutagénesis por el tamaño de la amplificación de PCR 1 (véase la Figura 6). Si se usara pRSETA-6xHis-Sm14 como molde, el PCR 1 sería muy pequeño y no facilitará su proceso de purificación. En una última etapa (PCR 4), se usaron los cebadores F Sm14 y R Sm14. Por tanto, todas las proteínas que se analizarán comparativamente tendrán exactamente la misma fusión N-terminal, de modo que las comparaciones dependerán solo de los aminoácidos relacionados con la proteína Sm14. El éxito de la mutagénesis se confirmó mediante un análisis de restricción y secuenciación, como se muestra en la Figura 7.

#### Análisis de estructura y estabilidad de los mutantes de proteína Sm14

Para el estudio de la estructura y estabilidad de las proteínas recombinantes, se obtuvieron los espectros de DC (dicroísmo circular) a 20°C usando proteína 10  $\mu$ M en tampón de fosfato de sodio 10 mM, pH 7,4. Inicialmente, se compararon los espectros de la proteína Sm14-M20 con y sin marcaje de 6xHis en tampón fosfato (Figura 8). Este análisis ha mostrado que no hay diferencias sustanciales en los espectros de ambas formas, lo que genera espectros típicos de proteínas con conformación de estructura  $\beta$ , característica de las FABP. Dichos resultados son consistentes con la modelización de la estructura de la proteína Sm14. Como el marcaje de 6xHis no interfiere significativamente con la estructura de la proteína Sm14, se efectuaron los siguientes experimentos con proteínas marcadas con 6xHis, que se obtienen en mayor cantidad y con un mayor grado de pureza que las proteínas sin marcajes de 6xHis.

Para estudiar la termoestabilidad de las distintas formas de Sm14, se analizaron en primer lugar los espectros de DC de las muestras a distintas temperaturas (datos no mostrados). Se observó que la proteína pierde gradualmente la estructura  $\beta$  a medida que aumenta la temperatura hasta que alcanza un espectro en que se observa la pérdida de la estructura  $\beta$  y un aumento de la estructura aleatoria a 80°C. Para poder caracterizar la transición desde el estado nativo al desnaturalizado, se midió la elipticidad  $[\theta]_0$  a 216 nm durante el cambio de temperatura de 15 °C a 80°C como se muestra en la Figura 9. Dichos experimentos permitieron determinar la temperatura de transición desde el estado nativo al desnaturalizado (temperatura de fusión, Tm) de las proteínas. Se efectuaron también los espectros al inicio y al final de los cambios de temperatura y se generó también un espectro después de enfriar la muestra a 15°C después de calentarla a 80°C, para observar la reversibilidad de la desnaturalización de las proteínas (Figura 9 y Tabla I).

Tabla I: Comparación de los valores de termoestabilidad de las proteínas Sm14-M20, Sm14-T20 y Sm14-A20

Proteína	$[\theta]_0$ , nm (*)		$\Delta[\theta]_0$ , nm	% de renaturalización (**)	Tm en °C (***)
	15°C	15°C R			
M20C62	204,7	202,4	2,3	82,5	55,2
T20C62	204,1	199,0	4,2	59,5	44,6
A20C62	204,6	199,0	5,6	57,2	45,8

Se efectuó el cambio de temperatura a 1°C por minuto tanto para el calentamiento de la muestra como para el enfriamiento de la muestra.

(\*) El desplazamiento de la zona del espectro a  $[\theta]_0$  a longitudes de onda más cortas es un signo de pérdida de estructura  $\beta$  y de aparición de estructura aleatoria; 15°C, espectro inicial y 15 °C R, espectro recogido después de devolver las muestras a 15°C.

(\*\*) Se determinó arbitrariamente el porcentaje de renaturalización comparando la longitud de onda de la zona  $[\theta]_0$  de los espectros de DC con el valor de 191,5 nm (zona a  $[\theta]_0$  del espectro a 80°C, estructura aleatoria) de los espectros a 15°C antes (100% y después de calentar a 80°C (Figura 9).

(\*\*\*) Se determinó la Tm en los experimentos como el punto de inflexión de la curva de desnaturalización, usando la ecuación de Boltzman del programa Microcal Origin™.

Los resultados obtenidos en el estudio de estabilidad de las proteínas se resumen en la Tabla I. A partir de la comparación de las Tm, puede concluirse que las proteínas Sm14-T20 y Sm14-A20 son menos termoestables (Tm 44,6 y 45,8° C, respectivamente) que la proteína Sm14-M20 (Tm 55,2°C). Por lo tanto, es importante observar que un solo cambio de aminoácido (M20T) da como resultado una diferencia de Tm de aproximadamente 10°C en la proteína Sm14 con marcaje de 6xHis, lo que representa una ganancia importante de termoestabilidad en el caso de Sm14-M20. Por otro lado, todas estas proteínas no pueden renaturalizarse al valor de 100% después de calentarse a 80°C, siendo las proteínas más afectadas por el calentamiento las formas Sm14-A20 y Sm14-T20 (57,2 y 59,5% de renaturalización, respectivamente), seguidas de la proteína Sm14-M20 (82,5% de renaturalización).

Se confirmó dicha diferencia de estabilidad usando urea como agente desnaturalizante y midiendo el desplazamiento al rojo de la fluorescencia del triptófano para caracterizar la desnaturalización. Para ello, se diluyeron las muestras con diferentes concentraciones de urea (0-7 M) para una concentración final de 2  $\mu$ M, excitadas a 285 nm, y el registro de espectros registrado estaba en el intervalo de 300 a 400 nm.

Se sometieron los datos obtenidos a una regresión no lineal según el modelo de Boltzman del programa Microcal Origin™. La Figura 10 muestra las curvas obtenidas a partir de este análisis. Los puntos de inflexión de las curvas aparecen a las concentraciones de urea 1,85 y 3,2 M para las proteínas Sm14-T20 y Sm14-M20, respectivamente, confirmando la mayor estabilidad de la forma Sm14-M20. Con dichos datos, puede concluirse que el cambio M20T desestabiliza considerablemente la proteína Sm14 ante la desnaturalización química con urea.

El conjunto de datos presentados anteriormente muestra una mayor estabilidad estructural de la isoforma Sm14-M20 en comparación con el mutante Sm14-T20 o Sm14-A20.

La metionina es más hidrófoba y su cadena lateral es más larga que treonina y alanina, lo que puede favorecer la estabilidad termodinámica de la proteína tanto por entropía (efecto hidrófobo) como por entalpía (interacciones con otros residuos de la proteína mediante fuerzas de Van der Waals, etc.), cuando se compara con treonina o alanina en dicha posición. El modelo estructural tridimensional de Sm14 sugiere un empaquetamiento menos eficaz para alanina o treonina. La última podría conducir a un grupo polar (el hidroxilo de la cadena lateral) insaturado de conexiones de hidrógeno.

### Aumento de la estabilidad de la proteína Sm14

Las preparaciones de vacuna deberían ser estables al almacenamiento durante un tiempo suficientemente prolongado para alcanzar sus destinos con actividad protectora. Específicamente, la estabilidad de la proteína Sm14 era de hecho uno de los aspectos enfocados en la presente invención.

5 Las observaciones realizadas durante más de 3 meses en los lotes almacenados a 4°C han detectado la formación de precipitados proteicos. Igualmente, el nivel de protección frente a esquistosomiasis se reduce con el tiempo de almacenamiento de la proteína y los sueros de animales inmunizados con la proteína recién preparados no reconocen la proteína almacenada (datos no mostrados).

10 Con el fin de aumentar la estabilidad de la proteína Sm14, se ha decidido valorar las causas de precipitación en algunas preparaciones proteicas.

Se sometieron a análisis electroforético las preparaciones de Sm14 que mostraron precipitación. Este análisis mostró la presencia de Sm14 dimérica originada por la formación de puentes disulfuro intermoleculares, como se muestra en la Figura 11. Esta afirmación está basada en la observación de una sola banda en el gel (correspondiente a monómeros de Sm14, Mr ~ 14,9 kDa) en presencia del agente reductor β-mercaptoetanol y de dos bandas en su ausencia. En este último caso, la segunda banda corresponde con una proteína que tiene una masa molecular 2 veces mayor que la Sm14, consistente con la formación de dímero mediante un puente disulfuro. La Figura 11 muestra que casi la mitad de la proteína está en forma dimérica.

20 La secuencia de la proteína Sm14 presenta solo un residuo de cisteína en posición 62, formando una ~~cinta~~ <sup>cinta</sup>. En la estructura de Sm14, la cinta βD no forma puentes de hidrógeno con la cinta βE adyacente. El espacio entre estas cintas β se rellena por las cadenas aminoácidas laterales, con la participación de Cys62. El grupo -SH de la cisteína 62 no es accesible al disolvente. Por consiguiente, la formación de dímero intermolecular debería ocurrir mediante la pérdida de la estructura β de la ~~proteína~~ <sup>proteína</sup> (desnaturalización total o parcial), estado que puede estabilizarse mediante la formación de puentes disulfuro entre proteínas al menos parcialmente desplegadas. El establecimiento de este puente determina posiblemente la irreversibilidad de la desnaturalización proteica. Se observó que el proceso de precipitación de las formas de Sm14 parece depender del tiempo y la temperatura de almacenamiento, así como de la concentración de las preparaciones proteicas. En la forma Sm14-T20, este fenómeno es mayor.

30 En general, uno de los problemas que afectan a la estabilidad de las proteínas recombinantes expresadas en *E. coli* es la formación de puentes disulfuro intermoleculares. Por ejemplo, el interferón de fibroblasto humano se purifica en gran cantidad en *E. coli*, sin embargo, tiene poca actividad y estabilidad en comparación con la proteína silvestre. Mark *et al.* (1984) intercambiaron mediante mutagénesis específica de sitio una Cys no implicada en la formación de puentes disulfuro intramoleculares por serina, dando como resultado una proteína con mayor actividad y alta estabilidad a lo largo del tiempo. Se observó un fenómeno similar con FGF-1 (factor de crecimiento de fibroblastos 1), en que el reemplazo por serina de las tres cisteínas que están presentes en la secuencia de esta proteína (140 aminoácidos) dio como resultado un aumento de su vida fisiológica media. Los estudios termodinámicos no revelaron mayor termoestabilidad de las proteínas mutantes, por lo tanto, la vida media más larga de dichas proteínas estaba relacionada con la eliminación del grupo sulfhidrilo reactivo (formación de dímeros, oxidación a S-sulfonato).

40 La presencia del aminoácido cisteína no es muy común en la familia de FABP. Por tanto, la estructura de algunas FABP se estabiliza mediante puentes disulfuro intramoleculares, como es el caso de la L-FABP de peces tales como *Lepidosiren paradoxa* o *Lateolabrax japonicum*. La L-FABP de rata tiene una cisteína en posición 69 cuya cadena lateral está dirigida hacia el interior de la molécula, como indica su baja reactividad con DTNB [ácido 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoico)]. La I-FABP de rata, una de las proteínas más estudiadas de la familia, no contiene residuos de cisteína. En un estudio, se introdujeron cambios de aminoácidos de la cadena polipeptídica de I-FABP por cisteína con la intención de usar su reactividad con reactivos tales como DTNB para estudiar los cambios conformacionales y funcionales de esta proteína (Jiang y Frieden, 1993). Uno de los estudios de intercambio fue V60C (que corresponde exactamente con la posición 62 de la proteína Sm14), que daba como resultado una proteína menos estable que la silvestre. Por otro lado, la baja reactividad de dicha proteína mutante con el reactivo DNTB revela que el residuo en dicha posición está dirigido hacia el interior de la proteína I-FABP en estado plegado.

50 No siendo importante en la actividad de unión de ácidos grasos, y teniendo como objetivo anular la formación de puentes disulfuro intermoleculares y otros efectos del grupo sulfhidrilo, se planeó cambiar la cisteína 62 en la proteína Sm14 por serina (análogo estructural) y por valina (encontrada en dicha posición en FABP de *S. japonicum*, que tiene una alta identidad con la proteína Sm14 e I-FABP de rata). Con este fin, se efectuó una mutagénesis dirigida a sitio por PCR de acuerdo con la estrategia mostrada en la Figura 12.

Los cebadores usados para las mutagénesis, además del cebador FSm14 ya descrito, fueron:

Cebador R S62: 5' TCGAATTCCTCGCCGAACTTGAACGTAGAAGAAAG 3'

55 Cebador R V62: 5' TCGAATTCCTCGCCGAACTTGAACGTAACAGAAAG 3'

El sitio de reconocimiento de la enzima EcoRI está en negrita, la posición del codón aminoacídico en posición 62 está subrayada. Los nucleótidos cambiados de Cys62 (codón **TGT**) por mutaciones Ser (**TCT**) o Val (**GTT**) se destacan en negrita y cursiva.

- 5 Se analizaron los constructos obtenidos mediante restricción, efectuando digestiones con las endonucleasas EcoRV (resultante del inserto) e HindIII (contenida en el vector). La liberación de un inserto de aproximadamente 600 pb indicó el éxito de las construcciones. Se confirmaron las mutagénesis mediante secuenciación, como se muestra en la Figura 13. Los plásmidos resultantes se llamaron pAE-Sm14-M20S62 (intercambio C62S) y pAE-Sm14-M20V62 (intercambio C62V).
- 10 Las proteínas Sm14-M20S62 y Sm14-M20V62 se expresaron y purificaron en cultivos de la cepa BL21 (DE3) de *E. coli*, transformados con los plásmidos pAE-Sm14-M20S62 o pAE-Sm14-M20V62, usando los mismos procedimientos descritos anteriormente para proteínas marcadas con 6xHis. Los rendimientos en términos de cantidad y pureza fueron los mismos que para todas las formas de Sm14. La Figura 14 muestra el análisis electroforético de las proteínas en condiciones no reductoras.
- 15 En dicho análisis, puede observarse la ausencia de dímeros en las proteínas cuando se reemplazaba la cisteína 62 por serina o valina, indicando el éxito de la mutagénesis y que se había conseguido el objetivo de erradicar la formación de dímeros.

Después, se estudió la termoestabilidad de Sm14-M20S62 y Sm14M20V62, usando la metodología descrita anteriormente para las isoformas Sm14-M20 y Sm14-T20 mediante dicroísmo circular. Los espectros de DC de los mutantes Sm14-M20S62 y Sm14-M20V62 revelaron que mantienen una estructura  $\beta$  similar a la proteína Sm14 nativa. La Figura 15 muestra las curvas de desnaturalización con la temperatura de las proteínas mutantes Sm14-M20S62 y Sm14-M20V62.

Con dichos datos, se calculó la Tm de los mutantes Sm14-M20S62 y Sm14-M20V62 y el porcentaje de renaturalización, que se presentan en la Tabla II, en que se resumen los resultados de termoestabilidad obtenidos para todas las formas de la proteína Sm14 discutidas en la presente invención.

Se valoró la desnaturalización mediante la elipticidad a 216 nm durante la valoración con la temperatura. Se obtuvieron los espectros de DC al inicio (15°C) y al final (80°C) (en azul y rojo, respectivamente). Se recogió un último espectro después de devolver las muestras a 15°C (en verde) para caracterizar la capacidad de renaturalización de la proteína (comparar con la Figura 10).

30 Tabla II. Comparación de los valores de termoestabilidad en distintas formas de la proteína Sm14

Proteína	[ $\theta$ ] <sub>0</sub> , nm (*)		$\Delta$ [ $\theta$ ] <sub>0</sub> , nm	% de renaturalización (**)	Tm en °C (***)
	15°C	15°C R			
M20C62	204,7	202,4	2,3	82,5	55,2
T20C62	204,1	199,0	4,2	59,5	44,6
A20C62	204,6	199,0	5,6	57,2	45,8
M20S62	204,6	204,4	0,2	98,5	52,5
M20V62	204,6	203,8	0,8	93,9	55,8

(\*) datos calculados como se describe en la Tabla I.

A partir de dichos datos, se concluyó que el intercambio de la cisteína 62 en la proteína Sm14-M20 por serina (Sm14-M20S62) no da como resultado una molécula con mayor termoestabilidad, como puede observarse por la ligera diferencia de Tm entre dichas formas. En el caso de la proteína Sm14, la forma mutante Sm14-M20S62 es ligeramente menos termoestable que la proteína silvestre (Sm14-M20), pero la renaturalización de dicha forma mutante era mayor que en el caso de Sm14-M20, como puede observarse comparando los espectros de DC antes y después del calentamiento (Figura 15, Tabla II), lo que puede asociarse con la eliminación de los efectos químicos del grupo sulfhidrilo (ya mencionados) durante el calentamiento de las proteínas, que podrían hacer irreversible el proceso de desnaturalización, como se observa para la proteína FGF-1.

El intercambio de la cisteína 62 por valina (Sm14-M20V62) dio como resultado una proteína ligeramente más termoestable que Sm14-M20. Los resultados mostrados aquí son similares a los obtenidos en la comparación del

mutante V60C con la proteína silvestre I-FABP (Jiang y Frienden, 1993), en que la inserción del grupo cisteína dio como resultado una proteína menos estable.

#### Estabilidad de las formas de proteínas Sm14

5 El objetivo de esta parte del trabajo era obtener proteínas más estables con el tiempo. Por lo tanto, se estudió mediante dicroísmo circular la estabilidad de las proteínas Sm14-M20, Sm14-T20 y Sm14-M20S62 almacenadas a 4°C durante dos meses. La concentración aproximada de proteínas era de 70 µM. Se resumen los resultados de dichos experimentos en la Figura 16, en que se muestra que la proteína Sm14-M20S62 pierde intensidad de espectro con el tiempo, manteniendo sin embargo la estructura β, al contrario que las proteínas Sm14-M20 (Figura 15) y Sm14-T20 (datos no mostrados), que perdían la estructura β durante el almacenamiento.

10 Después, para acelerar el proceso de pérdida de estructura β, se incubaron las proteínas Sm14-M20, Sm14-T20, Sm14-A20, Sm14-M20S62 y Sm14-M20V62 a 28°C durante 80 horas. La concentración de proteínas era de 10 µM para la recogida del espectro de DC. Se recogieron los espectros de DC a intervalos de tiempo de 8 a 12 horas. Se observó que se mantiene el perfil de estructura β, sin embargo, con menos intensidad de las bandas. Basado en estos espectros, se caracterizó la estructura β, independientemente de la intensidad del espectro de DC. Se usó la relación de elipticidad molar a 216 nm/196 nm con este fin. La Figura 17 muestra el análisis de los resultados de dichos experimentos.

20 La desviación de la relación de elipticidad molar a 216 nm/196 nm en un valor de -2 (aproximadamente) indica pérdida de estructura β, y su alteración a valores positivos indica la formación de estructura aleatoria. La reducción de intensidad de las curvas de las formas Sm14-T20 y Sm14-A20 después de 60 horas proporciona evidencias de la agregación de proteína (Figura 16). En dichas condiciones, las proteínas Sm14-T20 y Sm14-A20 perdían estructura β después de 37 horas, mientras que Sm14-M20, Sm14-M20S62 y Sm14-M20V62 mantenían la estructura β durante el tiempo del experimento. Dichos datos concuerdan con la observación del hecho de que la proteína Sm14-M20 es más estable que la proteína Sm14-T20 durante el almacenamiento.

25 Merece la pena destacar que, según la Tm determinada para las proteínas, a 28°C se afectarían más intensamente las formas Sm14-T20 y Sm14-A20. Por tanto, para diferenciar la estabilidad de las formas Sm14-M20, Sm14-M20S62 y Sm14-M20V62 con el tiempo, se usó una temperatura más alta, así como una mayor concentración de proteínas. Teniendo en cuenta los datos de almacenamiento a 4°C, se espera que en condiciones más restrictivas la proteína Sm14-M20 perderá también la estructura β, mientras que las formas Sm14-M20S62 y Sm14-M20V62 serán más estables. Por tanto, las observaciones realizadas durante el análisis de los datos de resonancia magnética nuclear, con las proteínas Sm14-M20, M20S62 y M20V62 expresadas y purificadas sin marcaje de 6xhis, muestran que la forma Sm14-M20V62 se mantenía más estable (no precipitaba) a altas concentraciones (aproximadamente 1 mM) y durante un mes a 20°C.

35 La estabilidad con el tiempo tiene una relación directa con la capacidad de renaturalización de las proteínas recombinantes después de calentarse a 80°C. Por tanto, la eliminación del grupo sulfhidrilo de la proteína Sm14 dio también como resultado proteínas con una mayor estabilidad a lo largo del tiempo. Es posible que, durante el almacenamiento a 4°C o 28°C, las proteínas puedan perder su conformación terciaria y separarse las cintas βD y βE, de modo que el grupo sulfhidrilo de la cisteína pueda oxidarse o interactuar con grupos similares de otras proteínas en el mismo estado, estabilizándose por tanto la pérdida de estructura β. Por otro lado, la estabilidad de las proteínas con el tiempo no depende de la termoestabilidad proteica. Dichos datos pueden ser importantes para planear mutantes con una vida media superior en otras proteínas.

40 Por tanto, se ha conseguido el objetivo de obtener una variante más estable de Sm14. A este respecto, la proteína Sm14-M20V62 (el mutante con mayor estabilidad) se presenta como un candidato adicional a modelo de vacuna contra esquistosomiasis y fascioliasis.

45 Se presentan a continuación experimentos de protección que usan proteínas mutantes de Sm14 de la presente invención contra infecciones helmínticas.

#### **Materiales y procedimientos**

El proceso de obtención, caracterización y purificación de Sm14 recombinante se ha descrito en Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Río de Janeiro, vol. 96, supl.: 131-135, 2001, y se detalla en las Figuras 2A y 2B.

50 Se detalla otro proceso para obtener la caracterización y purificación de la proteína Sm14 recombinante en las Figuras 3A y 3B.

Se efectuó la evaluación de la actividad protectora de las proteínas recombinantes según los ejemplos siguientes.

55 Según la presente invención, la cantidad de proteínas usada en animales para proporcionar protección frente a helmintos puede oscilar ampliamente y está estrechamente relacionada con el peso y la especie del animal receptor y con el helminto contra el que se quiere conferir protección. Preferiblemente, dicha cantidad está en el intervalo de 1 µg a 1000 µg.

**Ejemplo 1**

El ejemplo 1 presenta una tabla comparativa entre los resultados de protección obtenidos en ratones, con varias formas mutantes construidas y obtenidas a partir de rSm14.

Se efectuó el protocolo de vacunación como sigue.

Grupo	0 días	7 días	28 días	88 días	133 días
Vacunado	V	V	V	C	P
De control				C	P

5

En que: V significa vacunación, C significa exposición y P significa perfusión (para la recuperación de gusanos adultos y la evaluación de la protección).

Tabla comparativa

Grupos experimentales	N	Gusanos adultos		X ± EEM	Protección
		Mín	Máx		
Sm14TC + Ribí (1 exp.)*	12	12	28	18,6 ± 0,45	24,10%
Sm14TC + alúmina (4 exp.)	47	2	26	13,8 ± 0,14	43,70%
Sm14TC (3 exp.)	34	6	36	18,3 ± 0,19	25,30%
Sm14AC + alúmina (1 exp.)	14	6	34	19,4 ± 0,6	20,80%
Sm14AC (1 exp.)	13	10	36	20,1 ± 0,6	17,90%
Sm14MS + alúmina (2 exp.)	22	2	24	11,2 ± 0,3	54,30%
Sm14MS (1 exp.)	15	0	20	10,6 ± 0,4	56,70%
Sm14MV + alúmina (2 exp.)	28	2	22	11,8 ± 0,5	51,80%
Sm14MV (1 exp.)	12	6	24	15,2 ± 0,5	38,00%
Sm14TI + alúmina (2 exp.)	28	4	24	10,6 ± 0,2	56,70%
Sm14TI (1 exp.)	12	4	22	14,0 ± 0,4	43,00%
Sm14MC + alúmina (2 exp.)	25	0	20	8,16 ± 0,2	66,70%
Sm14MC (1 exp.)	13	6	20	12,9 ± 0,3	47,40%
Coadyuvante (9 exp.)	120	6	44	22,5 ± 0,06	0%
PBS (disolución salina tamponada con fosfato) (9 exp.)	118	8	46	24,5 ± 0,06	

10 En que N significa el número de animales por grupo experimental y X ± EEM significa la media más o menos el error estándar de la media. La protección media para cada grupo de animales (animales inmunizados/expuestos y los controles respectivos) se calcula como sigue:

$$P = (C - V) / C \times 100$$

15 en que C= parásitos recuperados de los controles; V= parásitos recuperados de los animales vacunados y P= protección

Los coadyuvantes usados según la presente invención pueden seleccionarse entre alúmina, coadyuvante de Freund, MPL+TDM (monofosforil-lípido A + dicorinomicolato de trehalosa), MPL+TDM+CWS, o Quil A; sin embargo, puede emplearse cualquier otro coadyuvante similar en la formulación.

20 La tabla comparativa anterior muestra que las proteínas mutantes planeadas (Sm14-M20S62 y Sm14-M20V62) presentan niveles de protección comparables con la proteína original Sm14-M20 (Sm14-M20C62). La ventaja de los

mutantes, en su uso como base de una vacuna contra helmintos, no se basa en proporcionar niveles de protección mayores, sino en mantener la integridad estructural del ingrediente activo de la vacuna (Sm14) durante más tiempo.

**Ejemplo 2**

5 El ejemplo 2 presenta los resultados de protección obtenidos en ratones con varias de las formas mutantes construidas y obtenidas a partir de rSm14. La metodología usada en el ejemplo 2 era idéntica a la del ejemplo 1.

Se usaron 100 metacercarias/ratón en la exposición. Se efectuó la vacunación usando tres dosis de 10 µg de proteína, según el mismo protocolo descrito en el ejemplo 1.

Resultados

Sm14TC	Sm14MS	Sm14MV	Sm14TI	Sm14MC	Coadyuvante	PBS
2	2	4	6	0	10	10
2	6	4	6	0	12	10
4	6	6	6	0	12	14
4	6	6	8	2	12	14
6	10	6	8	4	16	14
6	12	8	8	4	16	16
6	12	8	10	4	16	16
8	12	8	10	4	16	18
8	14	12	10	6	18	18
12	14	14	10	6	20	20
14	9,4	14	12	8	22	22
14	<b>44,70%</b>	14	12	8	22	22
16		16	16	10	26	22
18		18	<b>9,384615</b>	10	28	22
<b>8,571429</b>		<b>9,857143</b>	<b>44,80%</b>	10	<b>17,57143</b>	<b>17</b>
<b>49,60%</b>		<b>42,40%</b>		<b>5,066667</b>	<b>0%</b>	
				<b>70,20%</b>		

10

Los números enteros (0 a 28) representan el número de gusanos recuperados por ratón y por grupo vacunado. El resultado medio encontrado (media de gusanos/ratón) (concretamente, para Sm14TC: 8,571429) se obtiene mediante la suma del número de gusanos recuperados dividida entre 14 (n= 14).

**Ejemplo 3**

15 El ejemplo 3 muestra los datos del experimento de vacunación contra *F. hepatica* en ratones con mutantes de la proteína Sm14. Se efectuó la exposición usando 3 metacercarias. Los resultados numéricos se presentan del siguiente modo:

Número de animales con lesión hepática/número de animales vivos al final del experimento.

Exp.	Proteína	Número de animales con lesión hepática	Número de animales vivos al final

1	TI (T20C62)	2	18
2	A20C62	4	18
3	T20C62	4	17
4	M20C62	5	20
5	M20S62	4	15
6	M20V62	7	16
Control	—	17	17

No se administraron antígenos para el grupo de control, que recibió solo la infección simultáneamente con los grupos vacunados.

5 A partir de los resultados anteriores, es posible observar que las formas mutantes de los experimentos 5 y 6, más estables que la forma silvestre (Cys62), han proporcionado protección a los animales vacunados. Merece la pena destacar que, aunque las formas mutantes no han alcanzado las altas tasas de protección de su forma silvestre (Cys62), estas nuevas formas mutantes pueden obtenerse perfectamente a gran escala, puesto que se alcanzó una renaturalización de aproximadamente un 100%. Además, el resultado final (%) no puede considerarse separadamente y es también importante observar el impacto de la vacunación en la reducción de la patología.

10 Como ya se ha mencionado anteriormente, el objetivo primario de la presente invención era el desarrollo de nuevas formas mutantes de la proteína Sm14 para producir un mayor volumen de producción. En este sentido, se usaron sistemas de expresión y purificación de *Escherichia coli* para la proteína Sm14 con una fusión de 12 aminoácidos en el extremo N-terminal y sin fusión. La pureza y el rendimiento de la proteína Sm14 en estos sistemas eran mayores que los obtenidos anteriormente con el plásmido pGEMEX-Sm14, permitiendo la producción de esta proteína a mayor escala.

15 Las proteínas recombinantes aquí obtenidas fueron capaces de proporcionar protección contra la infección por cercarias de *S. mansoni*.

20 En cuanto al polimorfismo M20T en la fisiología de los gusanos *S. mansoni*, se estableció una asociación estructural y funcional de la proteína Sm14 y el grupo de proteínas comprendido por FABP de adipocito, cerebro, corazón, epitelio y CRBP.

25 Se encontró que la cisteína única en posición 62 de la proteína Sm14 podría estar participando en la formación de dímeros intermoleculares por puentes disulfuro. Para obtener proteínas recombinantes más estables, se reemplazó este residuo de cisteína por serina (estructura similar) o valina (presente en otras FABP) mediante mutagénesis dirigida a sitio. Las proteínas mutantes obtenidas (Sm14-M2S62 y Sm14-M20V62) no eran tan termoestables como la proteína Sm14-M20 silvestre, sin embargo, alcanzaron aproximadamente un 100% de renaturalización después de calentar a 80°C, diferente de las formas silvestres de la proteína Sm14. Además, después de almacenar durante 2 meses a 4°C, las proteínas mutantes Sm14-M20S62 y Sm14-M20V62 presentaban una menor pérdida de estructuraβ que las formas silvestres, que han mostrado la formación de estructura aleatoria, como se demuestra por análisis de dicroísmo circular, apoyando el éxito de las mutaciones.

30 Según la presente invención, las proteínas mutantes presentan las siguientes secuencias.

ES 2 376 874 T3

SEQ ID N° 3 (M20V62)

Met	Ser	Ser	Phe	Leu	Gly	Lys	Tpr	Lys	Leu	Ser	Glu	Ser	His	Asn
1				5					10					15
Phe	Asp	Ala	Val	Met	Ser	Lys	Leu	Gly	Val	Ser	Tpr	Ala	Thr	Arg
				20					25					30
Gln	Ile	Gly	Asn	Thr	Val	Thr	Pro	Thr	Val	Thr	Phe	Thr	Met	Asp
				35					40					45
Gly	Asp	Lys	Met	Thr	Met	Leu	Thr	Glu	Ser	Thr	Phe	Lys	Asn	Leu
				50					55					60
Ser	Val	Thr	Phe	Lys	Phe	Gly	Glu	Glu	Phe	Asp	Glu	Lys	Thr	Ser
				65					70					75
Asp	Gly	Arg	Asn	Val	Lys	Ser	Val	Val	Glu	Lys	Asn	Ser	Glu	Ser
				80					85					90
Lys	Leu	Thr	Gln	Thr	Gln	Val	Asp	Pro	Lys	Asn	Thr	Thr	Val	Ile
				95					100					105
Val	Arg	Glu	Val	Asp	Gly	Asp	Thr	Met	Lys	Thr	Thr	Val	Thr	Val
				110					115					120
Gly	Asp	Val	Thr	Ala	Ile	Arg	Asn	Tyr	Lys	Arg	Leu	Ser		
				125					130					

SEQ ID N° 4 (A20C62)

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

# ES 2 376 874 T3

SEQ ID N° 5 (T20C62)

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

LISTA DE SECUENCIAS

5 (1) INFORMACIÓN GENERAL

(2) Número de Secuencias: 5

(2) INFORMACIÓN SOBRE LA SEC.ID NO:1

Características de la secuencia:

- 10 (A) longitud: 133 aminoácidos
- (B) Tipo: aminoácido
- (C) Tipo de cadena: simple
- (D) Topología: lineal
- (E) Tipo de molécula: Proteína

15

DESCRIPCIÓN DE LA SEC.ID NO:1

MetSerSerPheLeuGlyLysTrpLysLeuSerGluSerHisAsnPhe  
 AspAlaValMetSerLysLeuGlyValSerTrpAlaThrArgGlnIle  
 GlyAsnThrValThrProThrValThrPheThrMetAspGlyAspLys  
 MetThrMetLeuThrGluSerThrPheLysAsnLeuSerCysThrPhe  
 LysPheGlyGluGluPheAspGluLysThrSerAspGlyArgAsnVal  
 LysSerValValGluLysAsnSerGluSerLysLeuThrGlnThrGln  
 ValAspProLysAsnThrThrValIleValArgGluValAspGlyAsp  
 ThrMetLysThrThrValThrValGlyAspValThrAlaIleArgAsn  
 TyrLysArgLeuSer

(3) INFORMACIÓN SOBRE LA SEC.ID NO:2

20 Características de la secuencia:

- (A) longitud: 133 aminoácidos
- (B) Tipo: aminoácido
- (C) Tipo de cadena: simple
- (D) Topología: lineal
- (E) Tipo de molécula: Proteína

25

DESCRIPCIÓN DE LA SEC.ID NO:2

MetSerSerPheLeuGlyLysTrpLysLeuSerGluSerHisAsnPhe  
 AspAlaValSerSerLysLeuGlyValSerTrpAlaThrArgGlnIle  
 GlyAsnThrValThrProThrValThrPheThrMetAspGlyAspLys  
 MetThrMetLeuThrGluSerThrPheLysAsnLeuSerCysThrPhe  
 LysPheGlyGluGluPheAspGluLysThrSerAspGlyArgAsnVal  
 LysSerValValGluLysAsnSerGluSerLysLeuThrGlnThrGln  
 ValAspProLysAsnThrThrValIleValArgGluValAspGlyAsp  
 ThrMetLysThrThrValThrValGlyAspValThrAlaIleArgAsn  
 TyrLysArgLeuSer

30 (4) INFORMACIÓN SOBRE LA SEC.ID NO:3

Características de la secuencia:

- (A) longitud: 133 aminoácidos
- (B) Tipo: aminoácido
- (C) Tipo de cadena: simple
- 5 (D) Topología: lineal
- (E) Tipo de molécula: Proteína

DESCRIPCIÓN DE LA SEC.ID NO:3

MetSerSerPheLeuGlyLysTrpLysLeuSerGluSerHisAsnPhe  
 AspAlaValValSerLysLeuGlyValSerTrpAlaThrArgGlnIle  
 GlyAsnThrValThrProThrValThrPheThrMetAspGlyAspLys  
 MetThrMetLeuThrGluSerThrPheLysAsnLeuSerCysThrPhe  
 LysPheGlyGluGluPheAspGluLysThrSerAspGlyArgAsnVal  
 LysSerValValGluLysAsnSerGluSerLysLeuThrGlnThrGln  
 ValAspProLysAsnThrThrValIleValArgGluValAspGlyAsp  
 ThrMetLysThrThrValThrValGlyAspValThrAlaIleArgAsn  
 TyrLysArgLeuSer

10

(5) INFORMACIÓN SOBRE LA SEC.ID NO:4

Características de la secuencia:

- (A) longitud: 133 aminoácidos
- (B) Tipo: aminoácido
- 15 (C) Tipo de cadena: simple
- (D) Topología: lineal
- (E) Tipo de molécula: Proteína

DESCRIPCIÓN DE LA SEC.ID NO:4

MetSerSerPheLeuGlyLysTrpLysLeuSerGluSerHisAsnPhe  
 AspAlaValAlaSerLysLeuGlyValSerTrpAlaThrArgGlnIle  
 GlyAsnThrValThrProThrValThrPheThrMetAspGlyAspLys  
 MetThrMetLeuThrGluSerThrPheLysAsnLeuSerCysThrPhe  
 LysPheGlyGluGluPheAspGluLysThrSerAspGlyArgAsnVal  
 LysSerValValGluLysAsnSerGluSerLysLeuThrGlnThrGln  
 ValAspProLysAsnThrThrValIleValArgGluValAspGlyAsp  
 ThrMetLysThrThrValThrValGlyAspValThrAlaIleArgAsn  
 TyrLysArgLeuSer

20

(6) INFORMACIÓN SOBRE LA SEC.ID NO:5

Características de la secuencia:

- (A) longitud: 133 aminoácidos
- 25 (B) Tipo: aminoácido
- (C) Tipo de cadena: simple
- (D) Topología: lineal
- (E) Tipo de molécula: Proteína

DESCRIPCIÓN DE LA SEC.ID NO:5

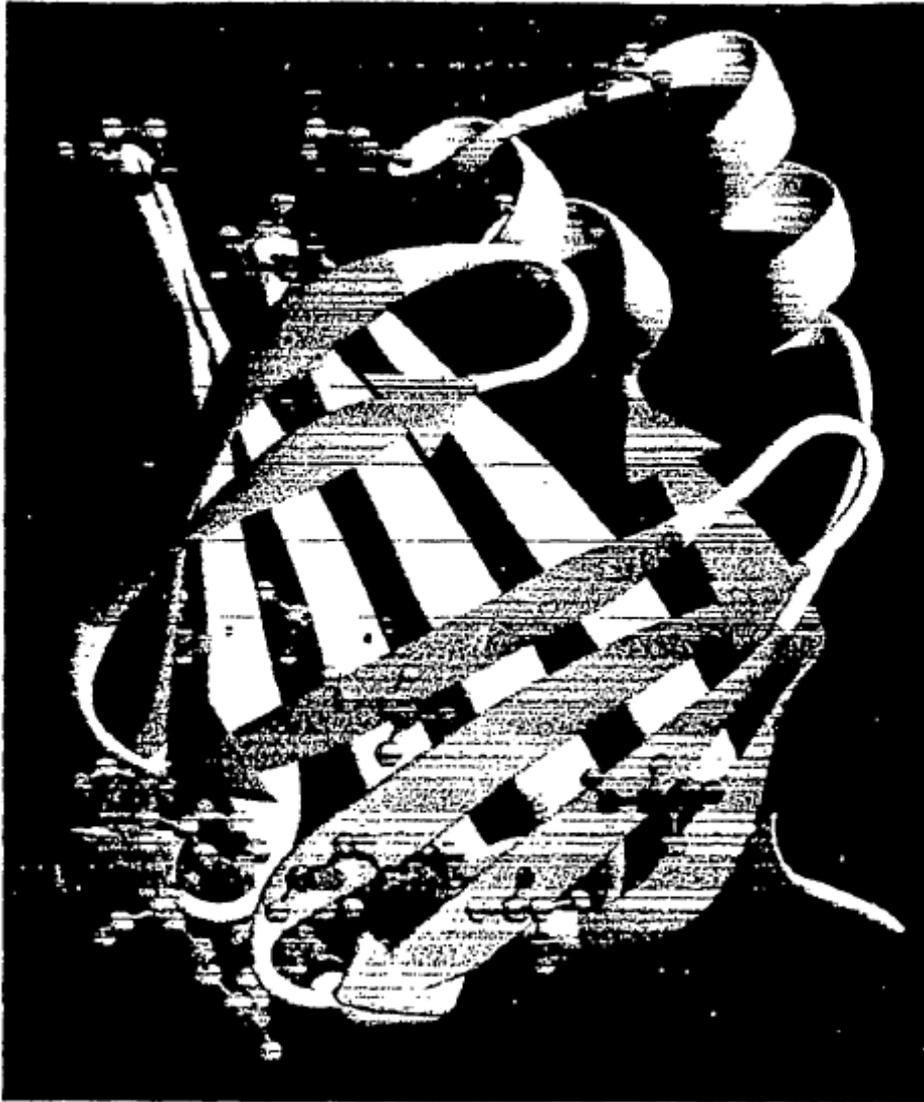
MetSerSerPheLeuGlyLysTrpLysLeuSerGluSerHisAsnPhe  
AspAlaValThr SerLysLeuGlyValSerTrpAlaThrArgGlnIle  
GlyAsnThrValThrProThrValThrPheThrMetAspGlyAspLys  
MetThrMetLeuThrGluSerThrPheLysAsnLeuSerCysThrPhe  
LysPheGlyGluGluPheAspGluLysThrSerAspGlyArgAsnVal  
LysSerValValGluLysAsnSerGluSerLysLeuThrGlnThrGln  
ValAspProLysAsnThrThrValIleValArgGluValAspGlyAsp  
ThrMetLysThrThrValThrValGlyAspValThrAlaIleArgAsn  
TyrLysArgLeuSer

**REIVINDICACIONES**

1. Proteína recombinante Sm14 que tiene la SEQ ID N° 2.
2. Proteína recombinante Sm14 que tiene la SEQ ID N° 3.
3. Proteína recombinante Sm14 que tiene la SEQ ID N° 4.
- 5 4. Proteína recombinante Sm14 que tiene la SEQ ID N° 5.
5. Composición inmunogénica capaz de proporcionar protección frente a infecciones helmínticas, que comprende una cantidad protectora eficaz de cualquier proteína descrita en las reivindicaciones 1 a 4 y un vehículo, diluyente, excipiente y/o coadyuvante veterinaria y/o farmacéuticamente aceptable.
- 10 6. Composición según la reivindicación 5, en la que la cantidad protectora eficaz de cualquier proteína está en el intervalo de 1 µg/dosis a 1000 µg/dosis.
7. Composición según la reivindicación 5, en la que el coadyuvante se selecciona del grupo que comprende alúmina, coadyuvante de Freund o TDM+MPL.
8. Kit de diagnóstico, que comprende al menos una de las proteínas como se describe en las reivindicaciones 1 a 4.
- 15 9. Kit de diagnóstico según la reivindicación 8, que comprende también un vehículo veterinaria y/o farmacéuticamente aceptable.
10. Uso de una proteína recombinante Sm14 según la reivindicación 1 como antígeno protector contra una infección helmíntica que afecta a seres humanos y animales.
- 20 11. Uso de una proteína recombinante Sm14 según la reivindicación 2 como antígeno protector contra una infección helmíntica que afecta a seres humanos y animales.
12. Uso de una proteína recombinante Sm14 según la reivindicación 3 como antígeno protector contra una infección helmíntica que afecta a seres humanos y animales.
13. Uso de una proteína recombinante Sm14 según la reivindicación 4 como antígeno protector contra una infección helmíntica que afecta a seres humanos y animales.

25

Fig. 1



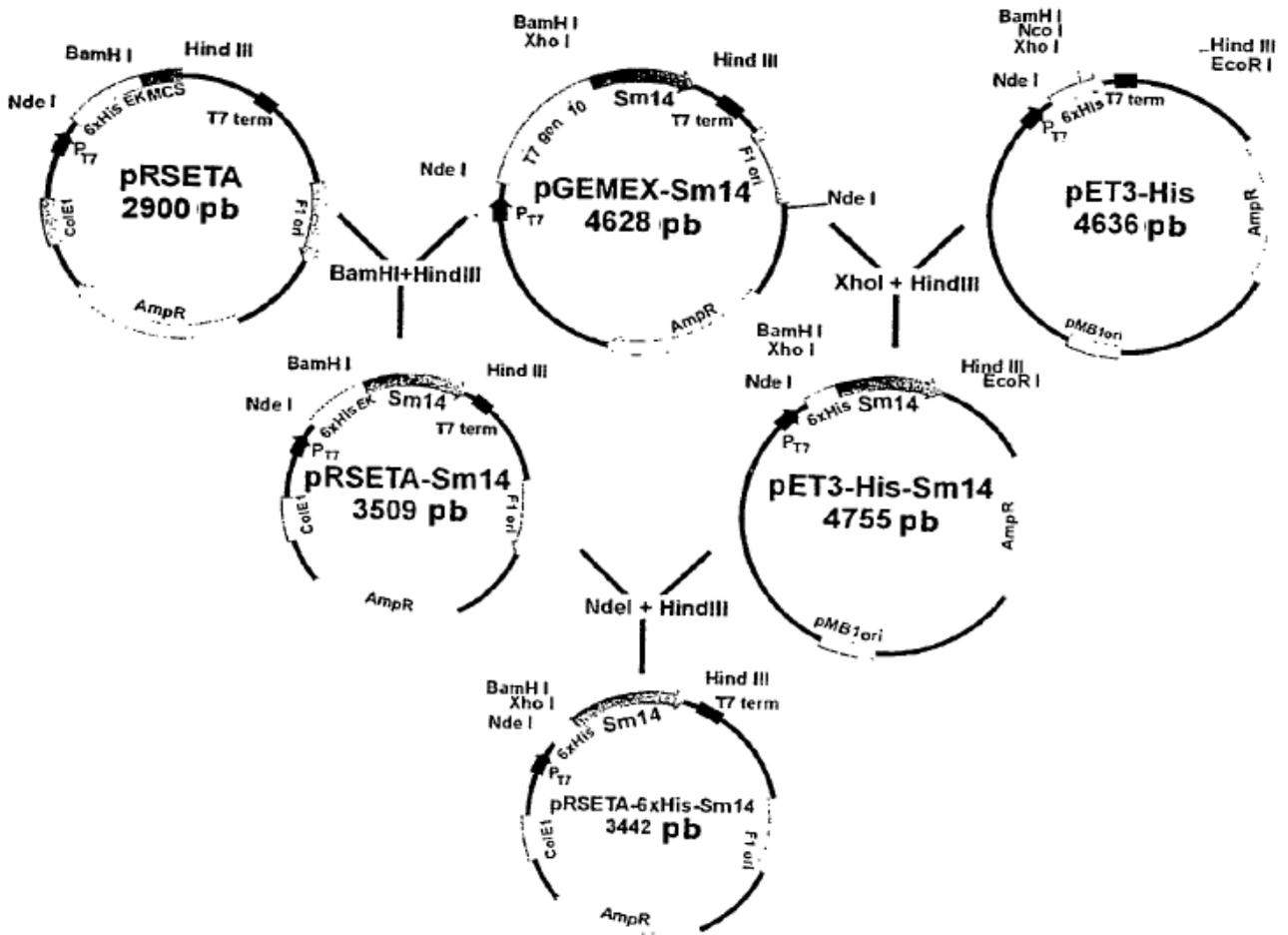


Fig. 2A

**pRSETA-Sm14**

6xHis-tag
T7-tag  
 ATGCGGGGTTCTCATCATCATCATCATGGTATGGCTAGCATGACTGGTGGACAGCAA  
 M R G S H H H H H H G M A S M T G G Q Q  
BamHI
Sm14 ORF  
 ATGGGTCGGGATCTGTACGACGATGACGATAAGGATCGATGGGGATCCGTC ...  
 M G R D L Y D D D D K D R W G S V ...  
*sitio de escisión de enterocinasa*

**pET3-His-Sm14, pRSETA-6xHis-Sm14**

6xHis-tag
BamHI
Sm14 ORF  
 ATGCATCACCATCACCATCACCTCGAGGGATCCGTC ...  
 M H H H H H H L E G S V ...

Fig. 2B

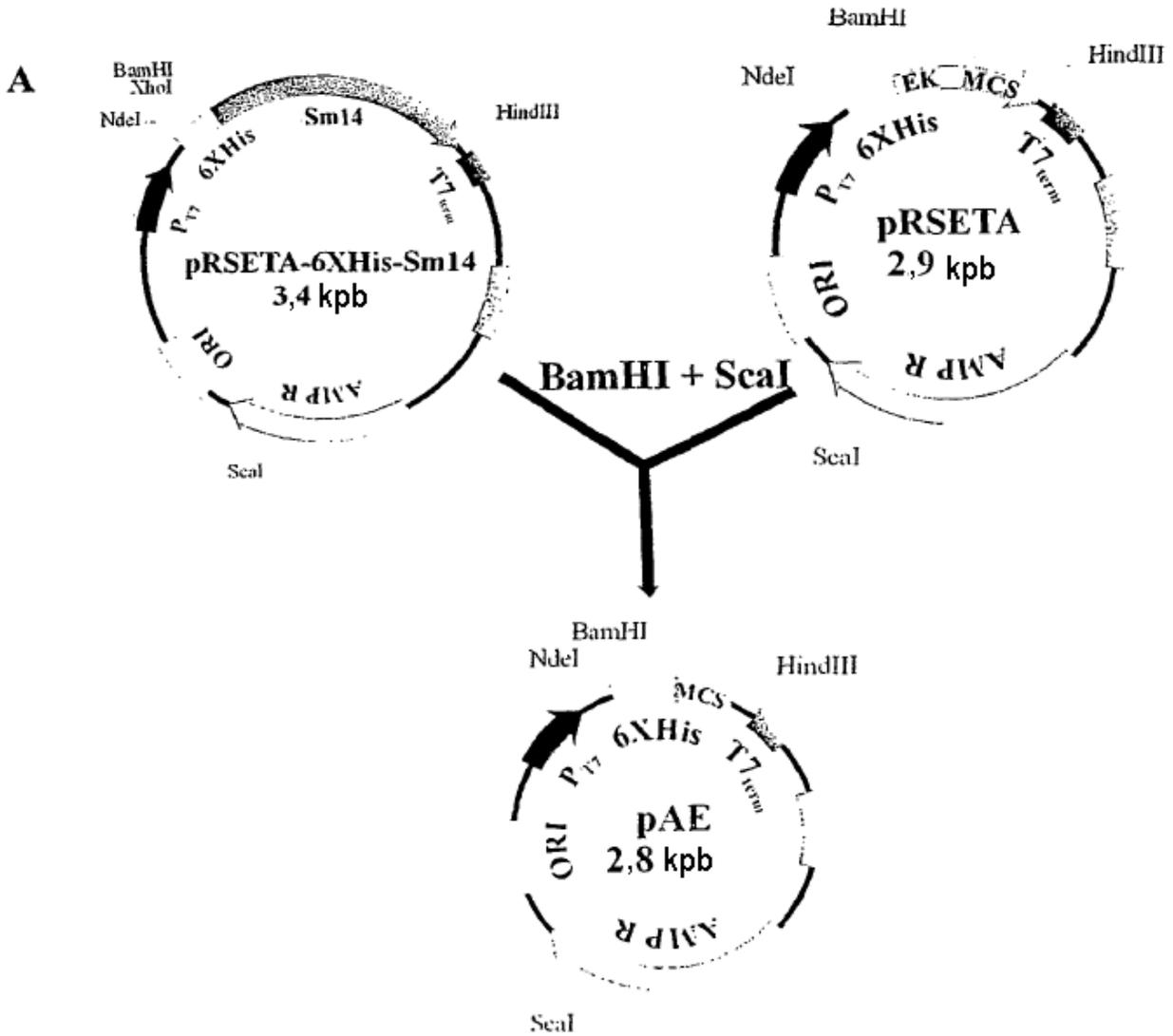


Fig. 3A y 3B

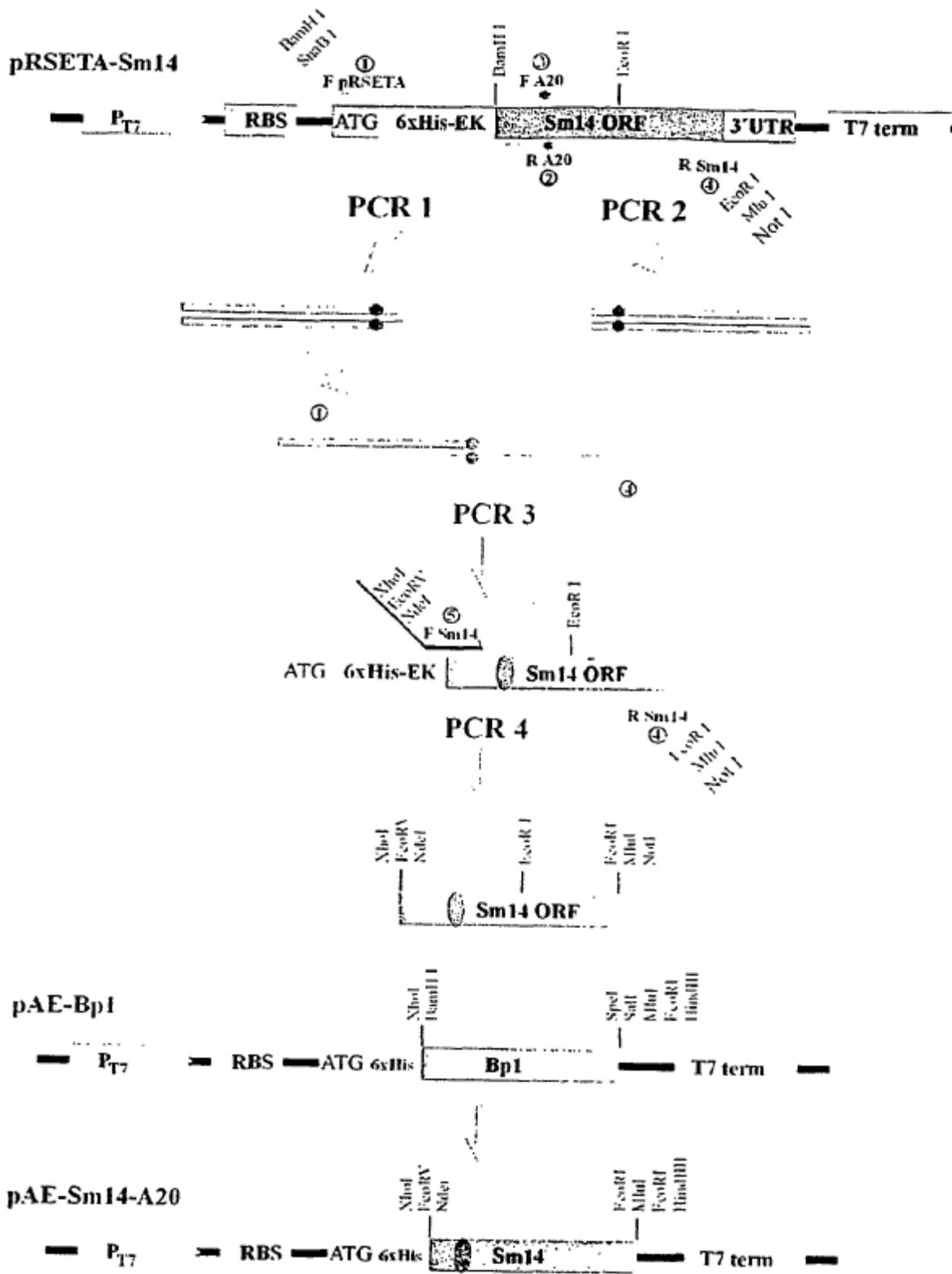


Fig. 4



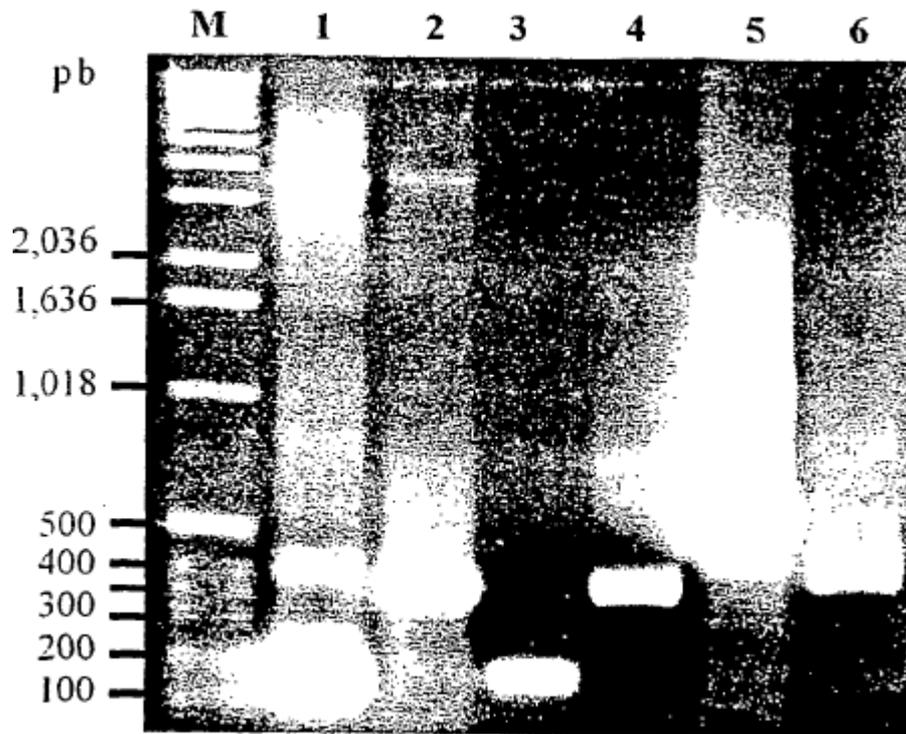


Fig. 6

# Sm14-A20

60  
G A T G C T G T C G C G T C A A A G C T  
D A U A S K L

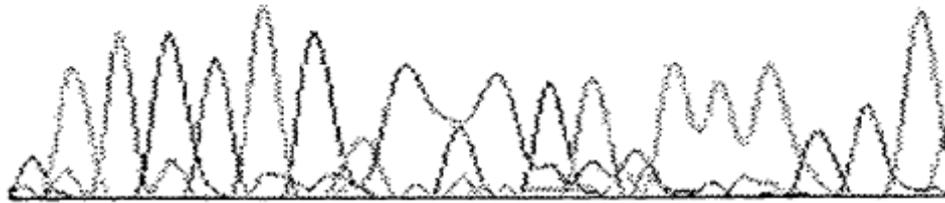


Fig. 7

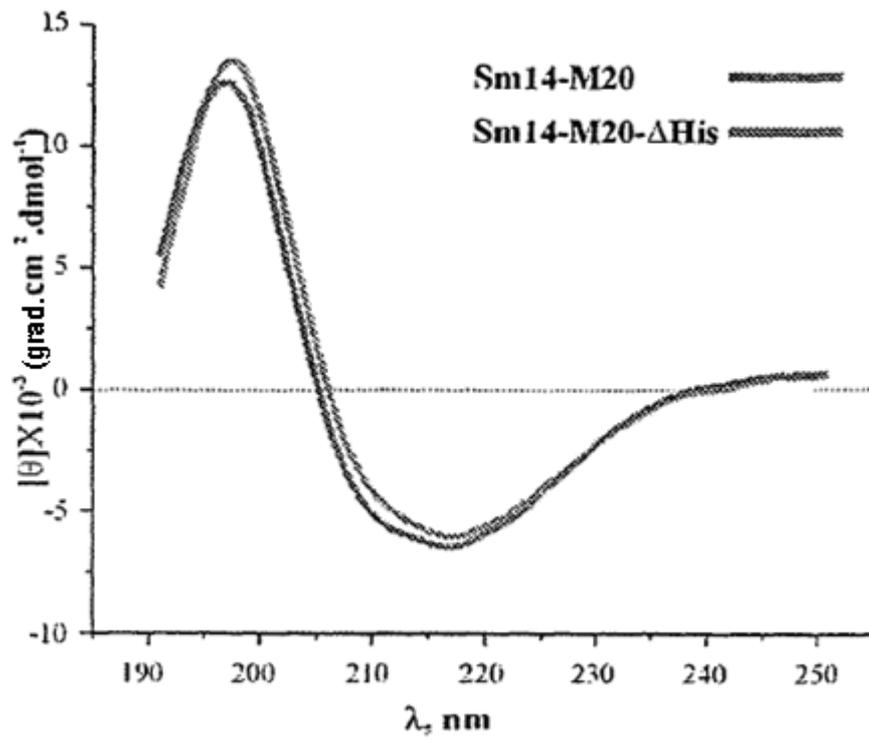


Fig. 8

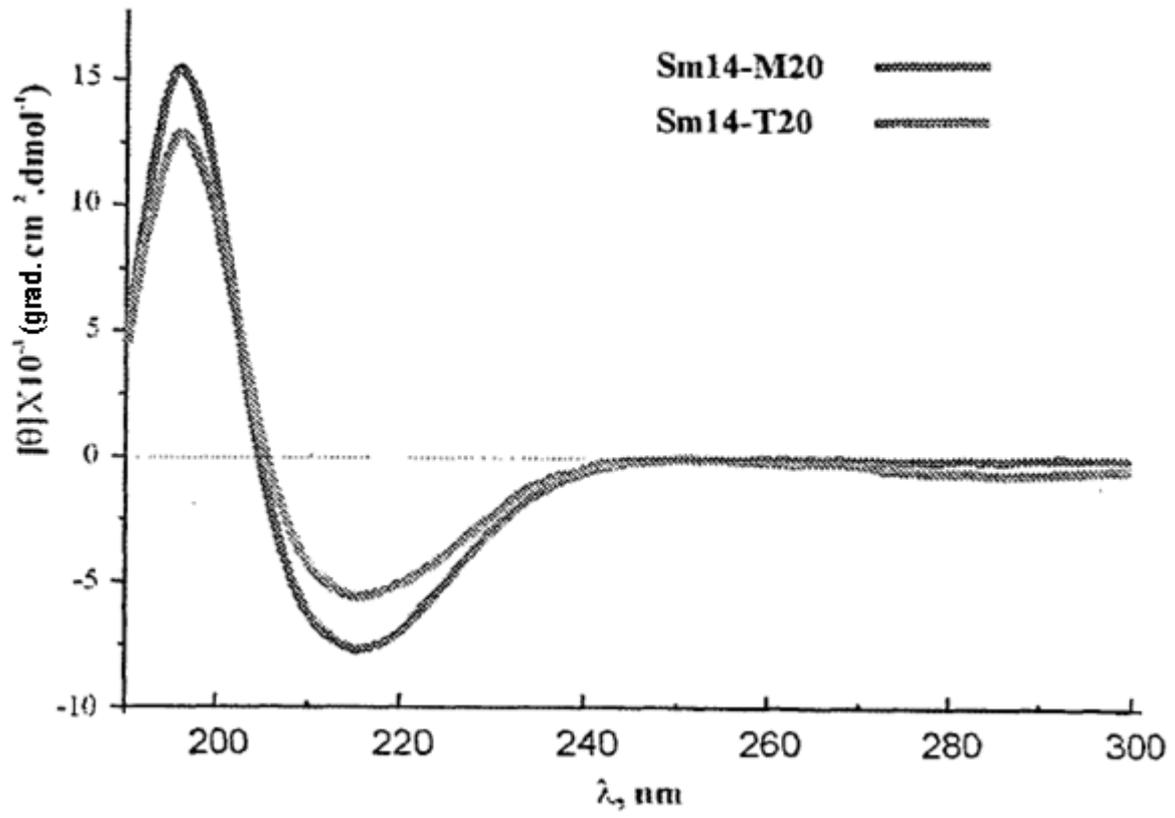


Fig. 9

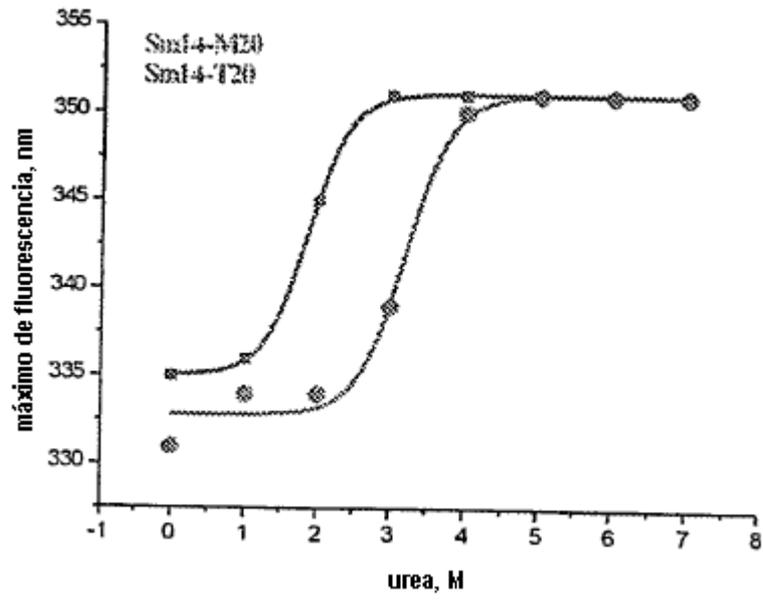


Fig. 10

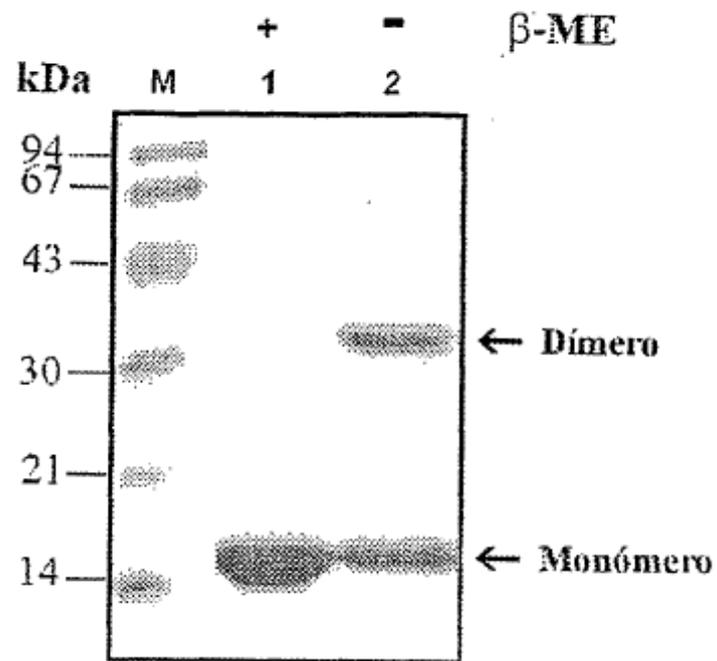


Fig. 11

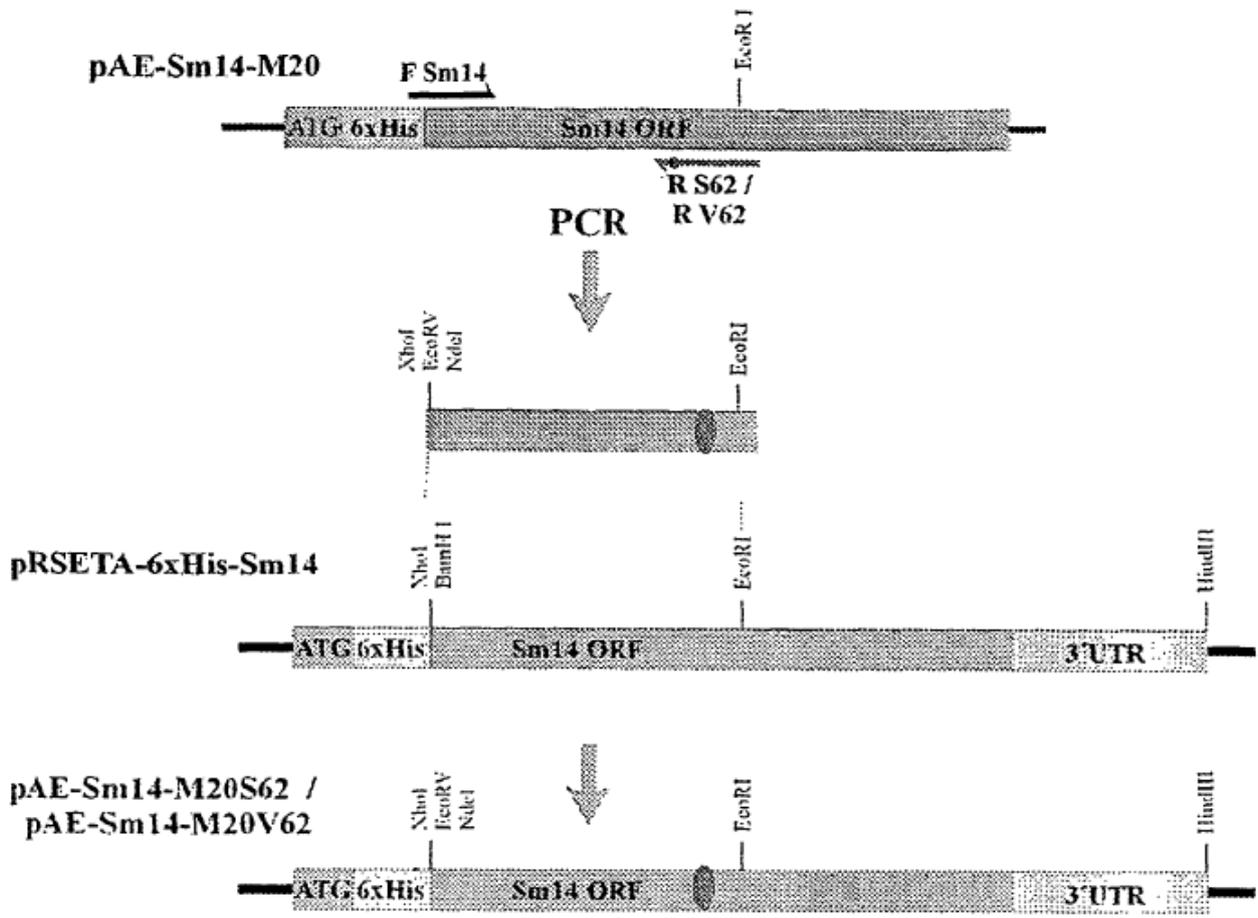


Fig. 12



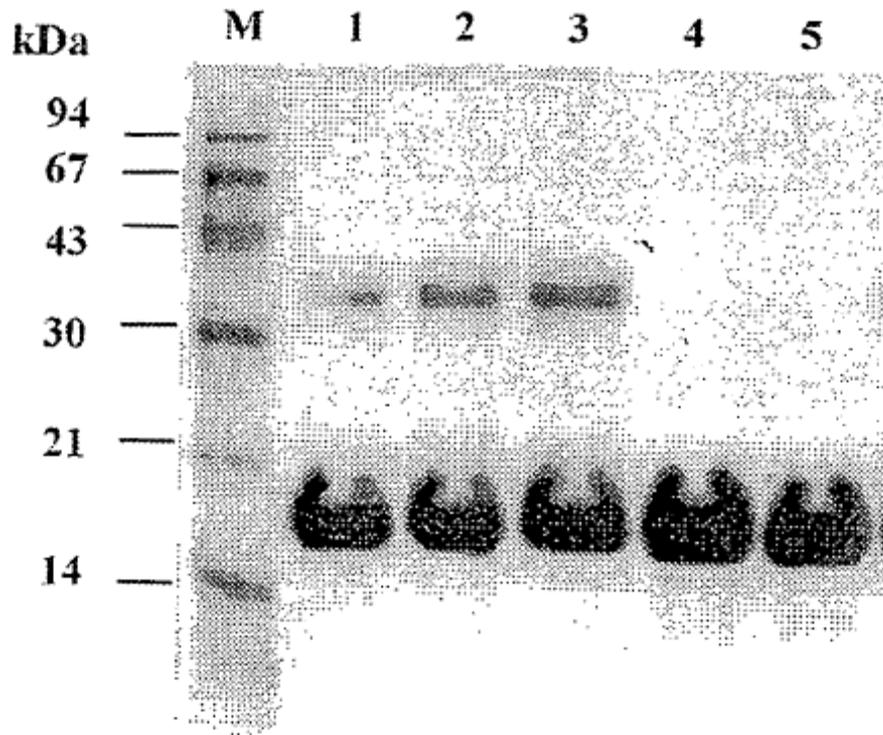


Fig.14

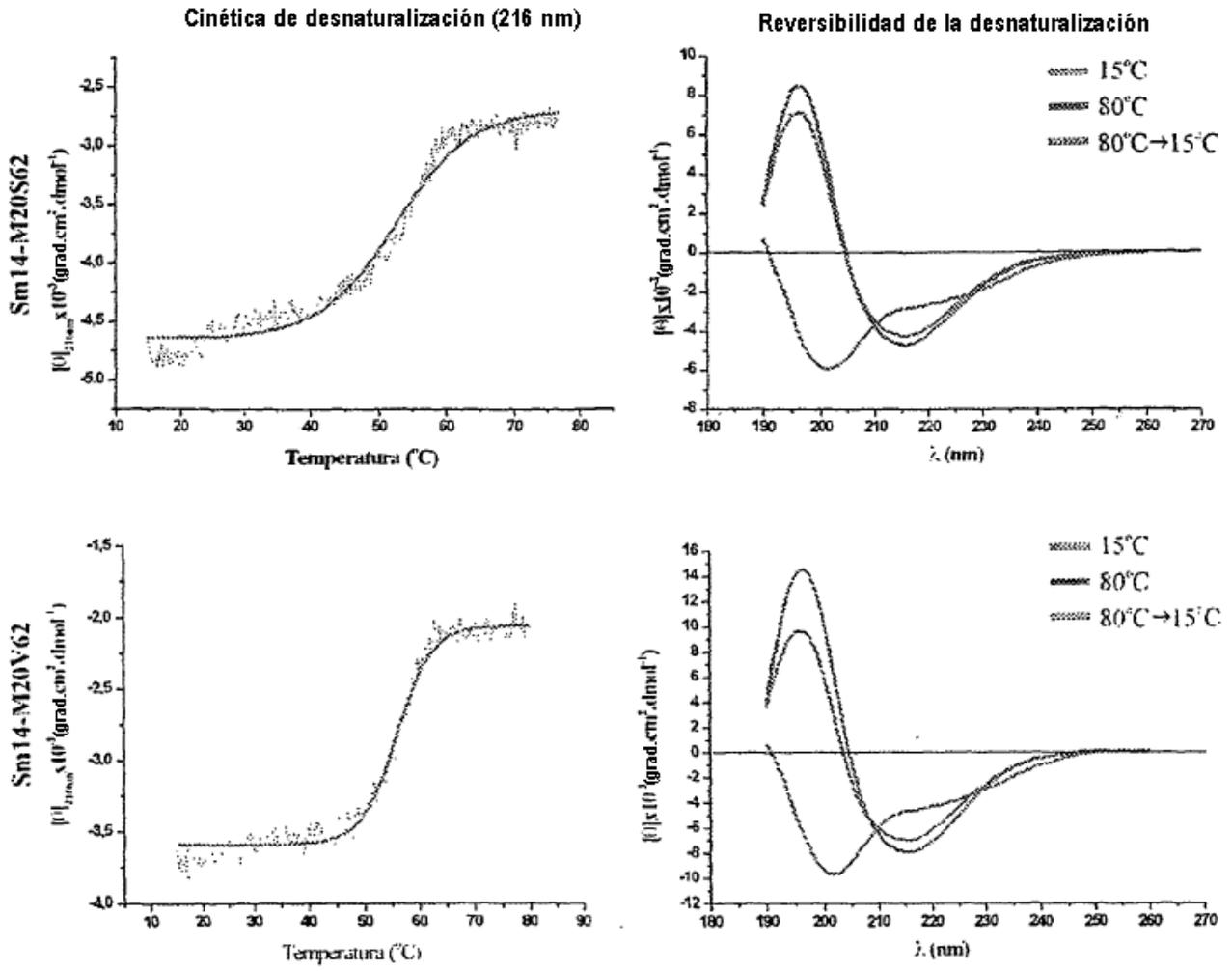


Fig. 15

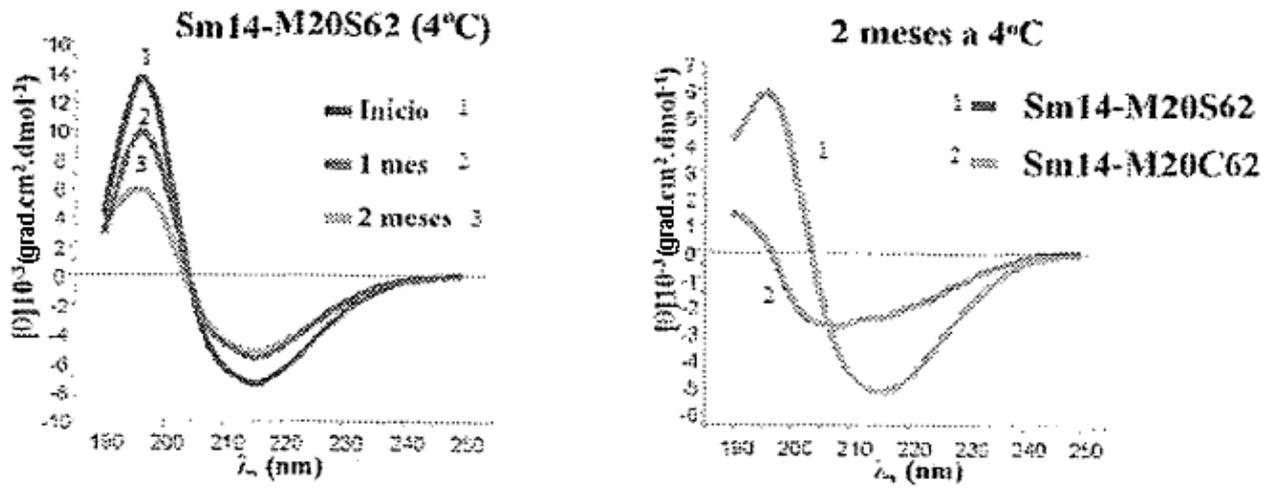


Fig. 16

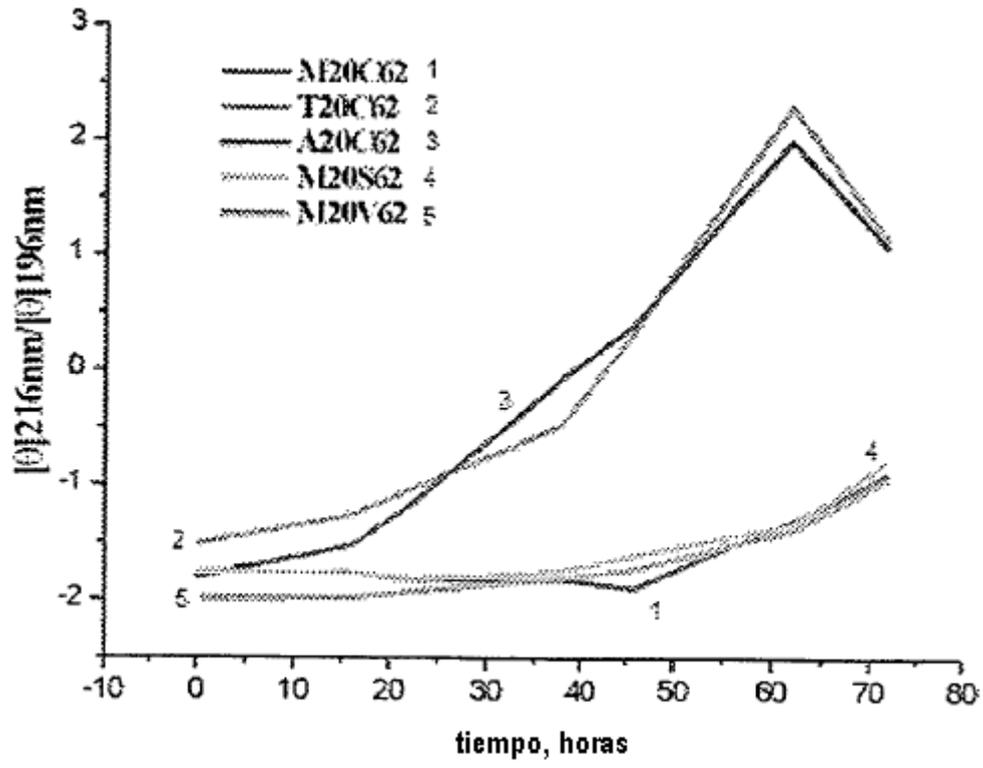


Fig. 17