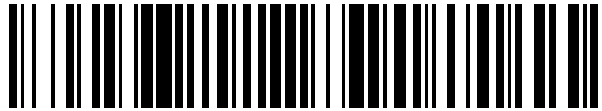


19



OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 453 391**

21 Número de solicitud: 201200865

51 Int. Cl.:

C12N 15/12 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
C07K 14/00 (2006.01)
A61P 33/00 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

05.09.2012

43 Fecha de publicación de la solicitud:

07.04.2014

71 Solicitantes:

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
(100.0%)
Avenida de Séneca, 2
28040 Madrid ES**

72 Inventor/es:

**ALUNDA RODRIGUEZ, Jose María;
CUQUERELLA AYENSA, Montserrat y
MOHAMED FAWZI, Elshaima**

74 Agente/Representante:

PLUMET ORTEGA, Joaquin

54 Título: **Proteína recombinante de Haemonchus contortus y su aplicación para la producción de una vacuna frente a la hemoncosis.**

57 Resumen:

Proteína recombinante de Haemonchus contortus y su aplicación para la producción de una vacuna frente a la hemoncosis.

Se ha procedido a la obtención de una proteína recombinante (rHc23) de H. contortus tras comprobar que la proteína nativa Hc23, de 23kDa de peso molecular, originaria del extracto soluble de adultos del nematodo hematófago H. contortus ha mostrado capacidad inmunoprotectora en el ganado ovino joven de 5 meses de edad frente a la trichostrongilidosis más importante (hemoncosis) desde un punto de vista económico y patológico.

Se ha caracterizado la proteína Hc23, obteniéndose las secuencias aminoacídicas y genómicas de la misma, permitiendo, por técnicas de biología molecular, ADN recombinante, la producción de una proteína estable, la rHc23. Su utilización en composiciones inmunogénicas que incluyen como adyuvante la combinación de Propionibacterium acnes inactivado + lipopolisacáridos de E. coli ha mostrado un elevado grado de protección en los animales (>85% de protección).

ES 2 453 391 A1

DESCRIPCIÓN

Proteína recombinante de *Haemonchus contortus* y su aplicación para la producción de una vacuna frente a la hemoncosis.

5 SECTOR DE LA TÉCNICA

La presente invención se encuadra dentro del campo de la Sanidad Animal. De forma más concreta, se refiere a la elaboración de composiciones inmunogénicas que incluyen la proteína Hc23 o la proteína recombinante rHc23 de *Haemonchus contortus* para su uso en la elaboración de vacunas
10 frente a las infestaciones por *Haemonchus*. También se refiere al uso de adyuvantes para mejorar la protección otorgada por las composiciones inmunogénicas.

ESTADO DE LA TÉCNICA

15 Las nematodosis gastrointestinales ovinas, entre ellas la hemoncosis, producida por *Haemonchus contortus*, representan una de las patologías más relevantes desde un punto de vista económico a nivel mundial. *H. contortus* es un nematodo que se localiza en el abomaso de los rumiantes, muestra una gran fertilidad y tanto los adultos como las fases larvarias (L4) se alimentan
20 de sangre, provocando pérdida sanguínea, llegando a producir anemia, anorexia, depresión, e incluso la muerte.

Esta parasitosis puede presentarse - en dependencia del número de vermes presentes en los hospedadores, edad de éstos, factores medioambientales, estado inmunitario - como un proceso agudo o con carácter crónico,
25 constituyendo en ambos casos una enfermedad importante de rumiantes.

Según la FAO- (<http://www.fao.org>) - la hemoncosis representa el 15 % de las gastroenteritis parasitarias en pequeños rumiantes y causa las mayores pérdidas económicas de todas las trichostrongilidosis.

La introducción de sistemas de explotación más intensivos, en praderas de
30 regadío, conlleva un incremento de la carga ganadera y ciclos de aprovechamiento herbáceo muy cortos. Estas condiciones, junto con la incapacidad aparente de los individuos jóvenes (de menos de 6 meses de

edad) para responder eficazmente a las infestaciones, suponen un incremento de los riesgos de procesos de significación clínica.

El control de esta parasitosis se basa esencialmente en el empleo de tratamientos antihelmínticos y, pese a que los antihelmínticos han sido útiles
5 durante décadas, su utilización indiscriminada ha provocado la aparición de resistencias farmacológicas en todo el mundo (Waller P.J. (1997). Anthelmintic resistance. *Veterinary Parasitol.*, 72: 391–412). Existe, además, una creciente preocupación sobre la posible presencia de residuos tanto en los alimentos como en el medio ambiente.

10 El coste de los tratamientos antihelmínticos (fármacos + mano de obra) ha experimentado una notable elevación. Los costes asociados al desarrollo y comercialización de nuevos compuestos antihelmínticos han provocado que el número de nuevos fármacos sea muy reducido. En estas condiciones la inmunoprofilaxis puede ser una alternativa para el control de la hemoncosis.

15 Las infestaciones por *H.contortus*, naturales o experimentales, provocan una protección parcial frente a las reinfestaciones. La aparición de la respuesta protectora es dependiente de la edad y raza de los animales, estimándose que hasta los 6 meses de edad no logran esta capacidad. Ello determina que los animales, en particular corderos, sean receptivos al parásito tras el
20 destete sin que exista la posibilidad de inmunoprotección natural.

A lo largo de los años se han realizado numerosos estudios dirigidos a provocar respuestas inmunitarias protectoras en el ganado ovino frente a las infestaciones por *H.contortus*, utilizando infestaciones con L3 viables, L3 atenuadas, extractos antigénicos, antígenos individuales. La menor eficacia
25 de las vacunaciones frente a helmintos está relacionada con las variaciones antigénicas asociadas a los cambios de desarrollo que experimentan a lo largo de su ciclo vital (diversos estadios parasitarios hasta alcanzar la etapa adulta); además realizan migraciones intraorgánicas como un mecanismo de evasión de la respuesta inmunitaria y en ocasiones, como es el caso que nos
30 ocupa, se localizan en determinadas zonas del hospedador que no son especialmente sensibles (estómago) frente a los agentes externos lo que dificulta la generación de una respuesta adecuada; sin entrar en la diversidad genética que pueden presentar tanto las poblaciones parásitas como los hospedadores.

Los intentos de desarrollo de una vacuna frente a la hemoncosis han sido muy numerosos utilizando diversos componentes parasitarios (Smith, W.D. and Zarlenga D.S. (2006). Developments and hurdles in generating vaccines for controlling helminth parasites of grazing ruminants. *Veterinary Parasitology*, 139: 347–359) desde aquellos que se encuentran en el nematodo cuando inicia su vida parásita (L3) (US5525508; Goud, G. N.; Zhan, B.; Ghosh, K.; Loukas, A.; Hawdon, J.; Dobardzic, A.; Deumic, V.; Liu, S.; Dobardzic, R.; Zook, R. C.; Qun, J.; Liu, Y. Y.; Hoffman, L.; Chung-Debose, D.; Patel, R.; Mendez, S. and Hotez, P. J. (2004). Cloning, yeast expression, isolation and vaccine testing of recombinant *Ancylostoma* secreted protein 1 (ASP-1) and ASP-2 from *Ancylostoma ceylanicum*. *Journal of Infectious Diseases* 189: 919–929, Goud, G. N.; Bottazzi, M. E.; Zhan, B.; Mendez, S.; Deumic, V.; Plieskatt, J.; Liu, S.; Wang, Y.; Bueno, L.; Fujiwara, R.; Samuel, A.; Ahn, S. Y.; Solanki, M.; Asojo, O. A.; Wang, J.; Bethony, J. M.; Loukas, A.; Roy, M. and Hotez, P. J. (2005). Expression of the *Necator americanus* hookworm larval antigen Na-ASP-2 in *Pichia pastoris* and purification of the recombinant protein for use in human clinical trials. *Vaccine* 23: 4754–4764; Bethony, J. M.; Loukas, A.; Smout, M. J.; Mendez, S.; Wang, Y.; Bottazzi, M. E.; Zhan, B., Williamson, A. L.; Lustigman, S.; Correa-Oliveira, R.; Xiao, S. H. and Hotez, P. J. (2005). Antibodies against a secreted protein from hookworm larvae reduce the intensity of infection in humans and vaccinated laboratory animals. *FASEB Journal* 19: 1743–1755; Méndez *et al.*, 2005) hasta componentes de la fase adulta del parásito, proteasas derivadas de su intestino, incluyendo aspartil-, cisteinil- y metaloproteasas (Knox, D.P. and Smith, W.D. (2001). Vaccination against gastrointestinal nematode parasites of ruminants using gut-expressed antigens. *Veterinary Parasitology*, 100: 21-32; Loukas, A.; Bethony, J. M.; Williamson, A. L.; Goud, G. N.; Mendez, S.; Zhan, B.; Hawdon, J. M.; Bottazzi, M. E.; Brindley, P. J. and Hotez, P. J. (2004). Vaccination of dogs with a recombinant cysteine protease from the intestine of canine hookworms diminishes the fecundity and growth of worms. *Journal of Infectious Diseases* 189: 1952–1961; Loukas, A.; Bethony, J. M.; Mendez, S.; Fujiwara, R. T.; Goud, G. N.; Ranjit, N.; Zhan, B.; Jones, K.; Bottazzi, M. E. and Hotez, P. J. (2005). Vaccination with recombinant aspartic hemoglobinase reduces parasite load and blood loss after hookworm infection in dogs. *PLoS Medicine* 2: e295; Williamson, A. L.; Lecchi, P.; Turk, B. E.; Choe, Y.; Hotez, P. J.; McKerrow, J. H.; Cantley, L. C.; Sajid, M. and Loukas, A. (2004). A multi-enzyme cascade of hemoglobin proteolysis in the intestine of blood-feeding hookworms. *Journal of Biological Chemistry* 279:

3560–3567). La utilización de larvas irradiadas es capaz de inducir una inmunidad protectora en animales adultos aunque no protege a los animales jóvenes. El uso de extractos larvarios purificados (70-83 kDa de L3 desenvainada- Newton, S.E. and Munn, E.A. (1999). The development of vaccines against gastrointestinal nematode parasites, particularly *Haemonchus contortus*. *Parasitology Today*, 15: 116-122) ha mostrado cierta protección, dependiente del adyuvante utilizado, superior con hidróxido de aluminio respecto a QuilA. Se ha logrado una protección parcial en animales mayores con antígenos de excreción y secreción de L4 y adultos del parásito (Hc15/4- Schallig, H.D.F.H.; Van Leeuwen, M.A.W. y Cornelissen, A.W.C.A. (1997). Protective immunity induced by vaccination with two *Haemonchus contortus* excretory secretory proteins in sheep. *Parasite Immunology*, 19: 447-453; Bakker, N.; Vervelde, L.; Kanobana, K.; Knox, D.P.; Cornelissen, A.W.C.A.; de Vries, E. y Yatsuda, A.P. (2004). Vaccination against the nematode *Haemonchus contortus* with a thiol-binding fraction from the excretory/ secretory products (ES). *Vaccine*, 22: 618-628). Las inmunizaciones con fracciones de bajo peso molecular procedentes del extracto soluble de adultos del parásito provocaron reducciones inferiores al 60% (Domínguez-Toraño, I.A.; Cuquerella, M.; Gómez-Muñoz, M.T.; Méndez, S.; Fernández-Pérez, F.J. y Alunda, J.M. (2000). Vaccination of manchego lambs against *Haemonchus contortus* with a somatic fraction (p26/23) of adult parasites. *Parasite Immunology*, 22: 131-138) en corderos de menos de 5 meses de edad. Valores menores se han logrado con 3 fracciones de bajo peso molecular del helminto (Alunda J.M.; Angulo-Cubillán, F. y Cuquerella, M. (2003). Immunization against ovine haemonchosis with three low molecular weight somatic antigens of adult *Haemonchus contortus*. *Journal of Veterinary Medicine, B* 50: 70-74). La utilización de la glicoproteína H11 (110kDa) procedente de las microvellosidades intestinales de L4, preadulto y adultos de *H. contortus* aparentemente redujeron la eliminación de huevos en un 90% y la carga de helmintos adultos en un 75% (Munn, E.A. (1997). Rational design of nematode vaccines: hidden antigens. *International Journal for Parasitology*, 27: 359-366). Los resultados fueron superiores empleando como adyuvante Quil A (Newton, S.E. and Munn, E.A. (1999). The development of vaccines against gastrointestinal nematode parasites, particularly *Haemonchus contortus*. *Parasitology Today*, 15: 116-122). Se han empleado antígenos procedentes de la superficie intestinal del nematodo (complejo de glicoproteínas que contiene galactosa, H-gal-GP), este complejo además, presenta otros componentes como aspartin-cisteinil-metalo-proteasas,

proteínas similares a la trombospondina, cistatina y galactina, por lo que no queda claro cuál de todas ellas es la responsable de su actividad protectora. La utilización como adyuvante de QuilA intensificó su papel protector (Knox , D.P.; Redmond, D.L.; Newlands, G.F.; Skuce, P.J.; Pettit, D. y Smith, W.D. 5 (2003). The nature and prospects for gut membrane proteins as vaccine candidates for *Haemonchus contortus* and other ruminant trichostrongyloids. *International Journal for Parasitology*, 33: 1129-1137). Se han utilizado vacunaciones con cisteín-proteasas con el fin de alterar la alimentación hematófaga del parásito, un complejo de degradación del fibrinógeno (35-55 10 kDa) con reducciones considerables (93% de reducción de huevos, 87% de adultos) (Boisvenue, R.J.; Stiff, M.I.; Tonkinson, L.V.; Cox, G.N. y Hageman, R. (1992). Fibrinogen-degrading proteins from *Haemonchus contortus* used to vaccinate sheep. *American Journal of Veterinary Research*, 53: 1263-1265) y proteínas de unión a tioles (TSBP) similares a la cathepsina B que han 15 conferido una elevada protección (Newton, S.E. and Munn, E.A. (1999). The development of vaccines against gastrointestinal nematode parasites, particularly *Haemonchus contortus*. *Parasitology Today*, 15: 116-122). Ultimamente se ha propuesto el empleo de glicoconjugados en pruebas de vacunación (van Stijn, C. M.W.; van den Broek, M.; Vervelde, L.; Alvarez, R.A.; Cummings, R.D.; Tefsen, B.; Van Die, I. (2010). Vaccination-induced 20 IgG response to Gala1–3GalNAc glycan epitopes in lambs protected against *Haemonchus contortus* challenge infection. *Int. J. Parasitol.* 40 (2010) 215–222).

A pesar de los éxitos parciales con los componentes del helminto en su forma 25 nativa, los antígenos que han sido clonados y expresados no han inducido protección frente a la hemoncosis (Newton, S.E. and Meeusen, E.N.T. (2003). Progress and new technologies for developing vaccines against gastrointestinal nematode parasites of sheep. *Parasite Immunology.*, 25: 283–296; Knox, D.P. (2010). Parasite Vaccines: Recent Progress in, and Problems 30 Associated with their Development. *Open Infect. Dis. J.*, 4: 63-73). El empleo de Hc 15/24 recombinante solo provocó una protección parcial (próxima al 50%) en animales mayores de 9 meses (Vervelde, L.; Van Leewen, M.A.W.; Kruidenier, M.; Kooyman, F.N.J.; Huntley, J.F.; Van Die, I. y Cornelissen, A.W.C.A. (2002). Protection studies with recombinant excretory/secretory 35 proteins of *Haemonchus contortus*. *Parasite Immunology*, 24: 189-201). Las proteínas recombinantes H11, H-gal-GP y la TSBP fueron incapaces de conferir protección frente a la hemoncosis, con independencia de los

adyuvantes empleados. La inmunización con una proteína recombinante defectiva de 21.4 kDa (p26/23) con adyuvante completo e incompleto de Freund no indujo ninguna protección en corderos de menos de 6 meses de edad frente a un reto con *H. contortus* aunque existieron niveles de anticuerpos muy elevados (García Coiradas, L.; Angulo-Cubillán, F.; Valladares, B.; Martínez, E.; de la Fuente, C.; Alunda, JM.; and Cuquerella, M. (2010). Immunization against lamb Haemonchosis with a Recombinant Somatic Antigen of *Haemonchus contortus* (rHcp26/23). *Veterinary Medicine International*. pp. 1-8).

10 Dada la baja eficacia de las proteínas recombinantes empleadas hasta ahora frente a las infestaciones por *H. contortus*, la importancia económica de la hemoncosis, la resistencia antihelmíntica detectada frente a todos los grupos farmacológicos de antihelmínticos, y la imposibilidad práctica de inmunizaciones con proteínas nativas del helminto, existe la necesidad de encontrar proteínas, nativas y especialmente recombinantes, así como
15 formulaciones que sean eficaces frente al parásito citado.

EXPLICACIÓN DE LA INVENCION

Un aspecto de esta invención se refiere a una proteína de adultos de *Haemonchus contortus*, Hc23, caracterizada por SEQ ID NO: 2, a la proteína recombinante rHc23 y a polipéptidos con, al menos, un 80% de identidad con SEQ ID NO: 2 que mantienen las propiedades antigénicas de Hc23. Cualquiera de estas proteínas o polipéptidos puede incluirse en una composición inmunogénica que permite la producción de una vacuna frente a
25 *H. contortus*. El uso de la vacuna así elaborada logra protecciones superiores al 85% de la carga parasitaria y eliminación fecal de huevos del helminto.

La invención también se refiere al gen que codifica la proteína Hc23 de *H. contortus*, caracterizado por SEQ ID NO:1 y a secuencias con un porcentaje de identidad con SEQ ID NO:1 de, al menos, el 70%.

30 En esta memoria descriptiva se entiende por porcentaje de identidad de la secuencia aminoacídica el porcentaje de coincidencias de los mismos aminoácidos entre las dos secuencias alineadas, a lo largo de la longitud completa de ambas secuencias. Además, los polipéptidos con, al menos, un

80% de identidad con SEQ ID NO:2 a los que se refiere la presente memoria son aquellos que mantienen las características antigénicas de la proteína Hc23. Asimismo, se entiende por porcentaje de identidad de la secuencia nucleotídica el porcentaje de coincidencias de los mismos nucleótidos entre dos secuencias alineadas, a lo largo de toda la longitud de ambas secuencias.

Otro aspecto de la invención se refiere a la secuencia del gen de Hc23, o a secuencias con, al menos, un 70% de identidad con dicha secuencias, clonadas en un vector que, asimismo, es susceptible de incluirse en células procariontas o eucariotas hospedadoras en las que se expresan las moléculas nucleotídicas.

La invención también se refiere a a una composición inmunogénica que incluye: la proteína Hc23, la proteína recombinante rHc23 o polipéptidos con, al menos, un 80% de identidad con la proteína Hc23; la molécula nucleotídica del gen de Hc23, o secuencias con, al menos, un 70% de identidad con dicha secuencia; vectores que contienen cualquiera de estas secuencias nucleotídicas o células procariontas o eucariotas portadoras de vectores que incluyen la molécula nucleotídica del gen de Hc23, o secuencias con, al menos, un 70% de identidad con dicha secuencia nucleotídica.

Esta composición inmunogénica se puede utilizar en la elaboración de una vacuna para su administración al ganado ovino con el fin de conferirle protección frente a enfermedades causadas por *H. contortus*. Además, la composición inmunogénica puede incluir adyuvantes para mejorar la respuesta inmune. Los adyuvantes de elección son el hidróxido de aluminio y la combinación de *Propionibacterium acnes* inactivado + lipopolisacáridos de *E. coli*. La vacuna elaborada con la composición inmunogénica que incluye la combinación de *Propionibacterium acnes* inactivado + lipopolisacáridos de *E. coli* como adyuvante frente a la hemoncosis en corderos jóvenes, con valores de protección muy superiores a los logrados hasta ahora con otras vacunas. La vacunación con la composición inmunogénica que hidróxido de aluminio como adyuvante induce una protección parcial frente a la hemoncosis en corderos.

Por otro lado, la invención también se refiere al método para elaborar una composición inmunogénica que comprende la formulación de, al menos, uno

de los siguientes productos: la proteína Hc23, caracterizada por SEQ ID NO:2, la proteína recombinante rHc23 o polipéptidos con, al menos, un 80% de identidad con SEQ ID NO:2; el gen que codifica la proteína Hc23 de *H. contortus*, caracterizado por SEQ ID NO:1, o secuencias con un porcentaje de identidad con SEQ ID NO:1 de, al menos, el 70%; un vector recombinante que incluye una de estas secuencias nucleotídicas; una célula procariota transformada, o una célula eucariota transfectada, con un vector recombinante como el descrito aquí; un adyuvante que, a su vez, se puede seleccionar entre hidróxido de aluminio y *Propionibacterium acnes* inactivado + lipopolisacáridos de *E. coli*.

Hasta ahora, la utilización de vacunas recombinantes frente a la hemoncosis no ha mostrado la eficacia esperada, de hecho se recogen en la bibliografía múltiples fracasos.

La composición inmunogénica de la invención permite la obtención de un grado de protección elevado en los animales, además de una considerable disminución de la contaminación parasitaria del entorno, muestra asimismo la ventaja de ser eficaz en animales jóvenes, sin necesidad de esperar al año de vida (como sostiene la mayoría de la comunidad científica) para que los animales alcancen la madurez inmunitaria y sean capaces de responder frente a la hemoncosis.

La composición inmunogénica que incluye una proteína o un polipéptido recombinantes, evita los problemas asociados a la utilización de vacunas poco caracterizadas procedentes de extractos brutos de parásitos que pueden contener componentes tanto inmunomoduladores como inmunosupresores. Asimismo, el hecho de poder obtener sintéticamente la proteína o los polipéptidos, que se pueden sintetizar fácilmente mediante técnicas de biología molecular, evita la necesidad "cuestionable socialmente" del empleo de animales de experimentación (rumiantes) como donadores permanentes para la obtención del extracto o la proteína nativa del parásito que integra la unidad vacunal.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Figura 1. Fragmento de alrededor de 600 pb obtenido mediante PCR de los halos positivos de *Southern blot* a partir de la genoteca de cDNA de *H. contortus* generada en el vector Uni-ZAP XR.

Figura 2. Banda de 23 KDa resultado de la purificación de la proteína Hc23.

5 **Figura 3.** Eliminación fecal de huevos (hpg) de *H. contortus* durante el ensayo de vacunación descrito en el ejemplo 3.

Figura 4. Recuento de adultos en el abomaso de los animales del ensayo de vacunación descrito en el ejemplo 3.

10 **Figura 5.** Valor de hematocrito a lo largo del ensayo de vacunación descrito en el ejemplo 3. Marcado con una flecha el momento de la infestación.

Figura 6. Recuento de eosinófilos a lo largo del ensayo de vacunación descrito en el ejemplo 3. Marcado con una flecha el momento de la infestación.

15 MODO DE REALIZACIÓN DE LA INVENCION

Ejemplo 1. Producción de la proteína recombinante de Hc23 (rHc23).

Con el fin de obtener el gen completo que codifica la proteína Hc23, se partió del antígeno somático de *H. contortus* p26/23 parcialmente clonado y expresado en *E. coli* (García Coiradas, L.; Angulo-Cubillán, F.; Valladares, B.;
20 Martínez, E.; de la Fuente, C.; Alunda, JM.; and Cuquerella, M. (2010). Immunization against lamb Haemonchosis with a Recombinant Somatic Antigen of *Haemonchus contortus* (rHcp26/23). *Veterinary Medicine International*. pp. 1-8).

25 A partir de los clones positivos que portaban el gen incompleto de p26/23, conservado en el plásmido PGEM-T a -80°C, se realizó una PCR colonia.

Se utilizaron los cebadores del plásmido:

SP6: 5' ATTTAGGTGACACTATAGAA 3', caracterizado por SEQ ID NO:3

T7: 5' TAATACGACTCACTATAGGG 3', caracterizado por SEQ ID NO:4

Ello permitió la amplificación de un fragmento de 757 pb. Se seleccionaron las 3 colonias que en la electroforesis habían mostrado una mayor pureza.

Se procedió a la purificación de las 3 bandas (una por colonia) mediante «gel extraction kit» (QIAGEN) y se secuenciaron. El resultado fue coincidente con la secuencia inicial (incompleta) del gen que codifica p26/23, con lo cual se usaron los cebadores del inserto F y R:

F: 5' GCAGGACTGTTCGCACAT 3', caracterizado por SEQ ID NO:5

R: 5' TCAGTCTTTCGCGGACTTG 3', caracterizado por SEQ ID NO:6

que permitían la amplificación de un fragmento de 580 pb. Posteriormente se eligieron 2 colonias que presentaron la mayor pureza en amplificación y se procedió a la purificación de las dos bandas (una por colonia) a partir del gel de agarosa «gel extraction kit» (Qiagen).

Una vez obtenida la secuencia se procedió a su marcaje, para ello realizamos una PCR con estas 2 colonias usando los mismos cebadores y añadiendo «DIG-DNA labeling mix» como marcador.

Tras la construcción de una biblioteca genómica de cADN de *H. contortus* utilizando el vector Lambda Uni ZAP XR (Stratagene) utilizamos diluciones de 10^{-4} de la genoteca de cADN, que hicieron un total de $1,2 \times 10^4$ unidades formadoras de colonias (ufc) escrutadas; se pusieron en contacto con la sonda previamente construida a una concentración de 25 ng/ μ l, bajo condiciones altamente astringentes (68°C). Se seleccionaron 8 halos positivos.

Se comprobó la presencia del gen de la p26/23 en los 8 fagos aislados mediante una reacción de PCR utilizando los cebadores F y R. Los 8 fagos aislados generaron una amplicón de 580 pb (Fig. 1), lo que confirmaba su presencia en los fagos, sin embargo quedaba por determinar si éste estaba completo.

Se procedió a la purificación del fragmento, utilizando el sistema QiaEX II (Qiagen) siguiendo las indicaciones del fabricante. Las muestras purificadas fueron sometidas a amplificación por PCR utilizando los cebadores T3 del fago y R final de la secuencia para conseguir la secuencia completa del gen:

T3: 5' AATTAACCCTCACTAAAGGG 3', caracterizado por SEQ ID NO:7

R: 5' TCAGTCTTTCGCGGACTTG 3', caracterizado por SEQ ID NO:6

Se obtuvo un amplicón de 612 pb, que denominamos *Hc23*.

Una vez conseguida la secuencia completa del gen que codifica *Hc23*, se procedió a la obtención de la proteína recombinante rHc23. Los productos
5 amplificados por PCR fueron ligados a pGEM®-T Easy Vector (Promega) para asegurar la posición correcta y permitir la purificación de una copia completa del gen correspondiente a *Hc23*. Como células competentes se utilizaron *E. coli* XL2-Blue strain. Se seleccionaron las colonias positivas y el vector de expresión fue digerido con NdeI y XhoI. El inserto fue ligado al
10 vector pET-29b(+) (Novagen); como células competentes empleamos *E. coli* BL21.

Las bacterias fueron cultivadas durante la noche a 37 °C, en medio LB con kanamicina. La inducción de la proteína recombinante se obtuvo con 0,5 mM isopropil-1-tio-b-D-galactopiranosido (IPTG) (Roche) durante 2 h.

15 La proteína se solubilizó en tampón [20 mM Tris-HCl pH 8, 0,5 M NaCl, 5 mM imidazol, β -ME 10 mM e inhibidores de proteasas (Roche)]. La solubilización fue óptima con sarcosil al 0,15%.

La proteína recombinante (rHc23) llevaba asociada una cola de 6 histidinas, lo que permitió su purificación en una columna de níquel-ácido -nitriltriácético
20 (Ni-TNA) (Qiagen) mediante elución con 100 y 250 mM imidazol. Las fracciones obtenidas fueron sometidas a electroforesis SDS-PAGE. La proteína purificada fue analizada mediante electroforesis y *Western blotting*, detectándose 2 bandas, una 23 kDa (rHc23) y la otra 46 kDa (dímero).

La secuencia de nucleótidos de los productos de PCR y los clones de
25 bacterias positivas en *E. coli* XL2- blue y BL 21 fueron determinados en la sección de Genética del Departamento de Producción Animal de la Facultad de Veterinaria de la UCM y en el Servicio de Genómica, Servicios Generales de Apoyo a la Investigación, Universidad de La Laguna, La Laguna, Tenerife.

Ejemplo 2. Purificación de la proteína nativa Hc23

30 La proteína nativa *Hc23* pudo obtenerse mediante 2 cromatografías de afinidad seriadas. Para ello previamente se obtuvieron sueros hiperinmunes anti rHc23 mediante inoculaciones en conejo (raza Nueva Zelanda, blanco) con 150 μ g de rHc23 (intramuscular) -3 veces la primera con 1 mL de

adyuvante completo de Freund y la segunda y la tercera con adyuvante incompleto de Freund.

Se analizó la especificidad de estos sueros mediante electroforesis y *Western blotting*, siendo capaces de reconocer la proteína rHc23. Mediante ELISA se
5 apreciaron títulos de anticuerpos muy elevados.

En una primera cromatografía de afinidad utilizamos una columna de agarosa con proteína A (Roche), siguiendo las recomendaciones del fabricante, y suero hiperinmune, lo que nos permitió la obtención de los anticuerpos policlonales purificados. Para determinar la fracción que contenía las
10 inmunoglobulinas se midieron las fracciones mediante espectrofotometría a 280 nm y las inmunoglobulinas purificadas se dializaron en PBS. Los anticuerpos policlonales se concentraron tras la determinación de su concentración, utilizando el método de Bradford (Bradford, M.M. (1973). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of
15 protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Ann Biochem.*, 72: 248–254).

A continuación se realizó una cromatografía de inmunoafinidad (columna con “CNBr activated Sepharose 4 B beads” + los anticuerpos purificados) con extracto soluble de adultos de *H. contortus* obtenido mediante
20 homogenización de adultos del parásito y posterior centrifugación a 30000xg, durante 30 minutos, para obtener el sobrenadante. La columna se mantuvo a 4°C durante toda la noche, permitiendo a los anticuerpos de la columna acoplarse al extracto soluble de adultos del parásito. Se recogió el flujo que pasó a través de la columna y se lavó la columna con tampón de equilibrado
25 hasta que la lectura de espectrofotómetro a 280nm fue el basal. La proteína fijada se eluyó mediante el tampón de elución y recogida en tampón de neutralización. Las fracciones que contenían proteína (medido a 280nm) fueron purificadas y dializadas con PBS permitiendo la purificación de la Hc23 nativa (Fig. 2).

30 Ejemplo 3. Pruebas de vacunación frente a la hemoncosis ovina con las proteínas Hc23 y rHc23

Parásitos

Para nuestro estudio empleamos L-3 de un aislado de *H. contortus*, gentilmente cedido por Merck, Sharp and Dohme (Madrid, España) y

mantenido en nuestro laboratorio durante más de 2 décadas mediante pases seriados en animales donadores. Las larvas 3 fueron obtenidas mediante la técnica de la migración larvaria [método Baerman, Ministry of Agriculture, Fisheries and Food (MAFF (Ministry of Agriculture, Fisheries and Food) (1971). *Manual of Veterinary Parasitological Laboratory Techniques*. HMSO, London)].

Animales y Diseño experimental

48 corderos de raza Assaf de 4 meses de edad fueron alojados en las instalaciones del Departamento de Sanidad Animal. Se mantuvieron durante los 15 primeros días en observación, a la vez se les pesó y se tomaron muestras de sangre y fecales para determinar su estado parasitológico. Al mes de su llegada, los animales fueron separados al azar en 6 lotes de 7 corderos, los cuales serían sometidos a diversos tratamientos y 1 lote de 6 animales que actuarían como testigos del experimento.

El grupo I fue inmunizado con la proteína nativa Hc23 de *H. contortus* (100µg) en Hidróxido de aluminio [13 mg/ml (SIGMA A-8222)] (900µl), 3 veces, cada 2 semanas y 2 semanas después de la última dosis fue sometido a una infestación (reto) con 15000 L3 del parásito. El grupo II siguió el mismo protocolo de inmunización e infestación pero utilizando la proteína recombinante rHc23 (concentración y dosis infestante similares). El grupo III recibió una primera dosis de la proteína nativa (100µg) en una solución adyuvante que contenía 2mg de lipopolisacáridos de *E. coli* y 25mg de *Propionibacterium* sp (Infervac de Laboratorios Calier, S.A.) (1mL/10kg de peso vivo); 2 días después se repitió la misma inoculación y se procedió a la infestación de los animales; para finalizar, una semana más tarde recibieron una dosis inmunizante de recuerdo que se repitió a la semana siguiente. En el grupo IV se realizó el mismo protocolo de inmunización e infestación del grupo III, pero empleando proteína recombinante, a la misma concentración. El grupo V fue el testigo total de la inmunización e infestación. El grupo VI fue el testigo positivo de la infestación, los animales fueron sometidos exclusivamente al reto parasitario. El grupo VII (con 4 meses y medio de edad) fue primoinfectado con 10000 L3 de *H. contortus*, dicha infestación se terminó el día 35 postinfestación tras un tratamiento antihelmíntico con Valbazen ® 10% Albendazol (Pfizer), 2 semanas más tarde se llevó a cabo la reinfestación (reto) de los animales.

El reto parasitario se mantuvo en todos los grupos durante 45 días, para finalmente proceder al sacrificio de los animales.

Determinaciones parasitológicas

Se realizaron análisis coprológicos semanales para determinar la eliminación fecal de huevos a lo largo del experimento. No obstante, durante el final de la prepatencia y hasta el inicio de la patencia, se llevaron a cabo análisis cada 2 días. Para las determinaciones coprológicas utilizamos el método de McMaster modificado (MAFF (Ministry of Agriculture, Fisheries and Food) (1971). *Manual of Veterinary Parasitological Laboratory Techniques*. HMSO, London).

Tras la necropsia de los animales se procedió al estudio de la población adulta existente. Se abrieron los abomasos por la curvatura menor, situando el contenido gástrico en geles de agarosa al 2% e incubándolo en solución fisiológica salina a 37°C durante toda la noche. Se procedió a la determinación de la carga total de los adultos.

Resultados

Todos los grupos vacunados mostraron una reducción estadísticamente significativa en la eliminación fecal de huevos, de un 57% en G I, 74% en G II y 79% en G III y GIV respecto al grupo que solo recibió el reto parasitario (GVI). Dicha disminución fue significativa en los días 21, 24, 28, 35 y 42 postinfestación, con valores de $p < 0,001$ para todos los grupos vacunados en los días 24 y 28, en el día 35 se apreció una $p < 0,05$ para el GI y $< 0,001$ para el resto de grupos vacunados; asimismo encontramos significación en el día 42 en los grupos GII (con un valor de $p < 0,05$) y en GIII y GIV de $p < 0,001$; además los grupos GII y GIV mostraron reducción significativa ($p < 0,05$) en el día 21 postinfestación.

El grado de contaminación parasitaria del medio, que se estimó como el sumatorio de huevos eliminados (hpg) a lo largo del experimento, fue inferior en todos los grupos vacunados (GI: 75.250, GII: 42.365, GIII: 36.830 y GIV: 37.575 hpg), con disminuciones que oscilaron entre un 4,5% y un 9% menos que el generado por el grupo primoinfestado (GVI) que eliminó un total de 323.942hpg (Fig. 3).

El establecimiento de la población adulta (nº de adultos en abomaso) mostró una disminución significativa en los grupos vacunados, desde el 69% para el GI hasta más del 85% para los otros 3 grupos (GII, GIII y GIV), con cargas parasitarias de 318 ± 385 (GI), 147 ± 203 (GII), 127 ± 127 (GIII), 131 ± 190 (GIV) respecto al grupo primoinfectado (GVI 1030 ± 383). (Fig. 4)

Se observó correlación positiva entre la eliminación fecal de huevos y el establecimiento parasitario ($r = 0,85$, $p < 0,0001$).

Los valores de los parámetros hemáticos determinados (hematocrito y eosinófilos entre otros) guardaron relación con el momento de la infestación y con la capacidad de respuesta de los animales. Los animales vacunados evidenciaron pérdidas sanguíneas inferiores, con valores del hematocrito superiores a los determinados en el grupo primoinfectado, con significación de $p < 0,001$ a lo largo del experimento y de $p < 0,01$ en los días 63, 77 y 88 postvacunación (Fig. 5).

Se observó una correlación negativa entre la eliminación fecal de huevos y el valor hematocrito ($r = - 0,82$, $p < 0,0001$).

El modelo de la respuesta eosinofílica detectada guardó relación con el protocolo de inmunización empleado. Los grupos GI y II mostraron un comportamiento similar a lo largo del ensayo, con incremento de sus valores desde el día 28 postvacunación, con un pico en el día 7 postinfestación (valores medios de $0,87 \times 10^3$ eosinófilos/ μL y de $0,93 \times 10^3$ eosinófilos/ μL , para GI y GII respectivamente).

Por su parte, los grupos GIII y IV mostraron un comportamiento similar a lo largo del ensayo, con un incremento en el número de eosinófilos desde el día 7 postinfestación, con un pico en el día 21 ($1,04 \times 10^3$ eosinófilos/ μL y $0,61 \times 10^3$ eosinófilos/ μL , para GIII y GIV respectivamente).

El análisis estadístico determinó diferencias significativas en los días 49, 63, 77 y 88 entre los grupos vacunados (con elevación en el nº de eosinófilos) y el grupo VI primoinfectado, con valores desde $p < 0,05$ hasta $p < 0,001$ (Fig. 6).

El grupo GVII sometido a una infestación y al reto parasitario se comportó durante la primoinfestación del mismo modo que el grupo VI (solo primoinfectado) con recuentos de la eliminación de huevos elevados. Tras el reto, los animales mostraron una reducción de los recuentos de huevos y de

la carga parasitaria respecto al grupo GVI (estadísticamente significativa); sin embargo, no se apreciaron diferencias significativas con los grupos vacunados.

5 A pesar de que este grupo primoinfectado y re infectado tras el reto mostrara una buena protección, hay que considerar que la infestación previa (imprescindible para alcanzar ese grado de protección) provocó una elevada eliminación de huevos del parásito, con la consiguiente contaminación del medio y una merma inicial en sus condiciones físicas debido a la pérdida sanguínea.

10

APLICACIÓN INDUSTRIAL

El sector veterinario y los productos destinados a la salud animal se enfrentan a la necesidad de aumentar la calidad de los productos empleados para poder hacer frente a una tecnificación del sector y exigencias mayores por parte de los consumidores. El desarrollo de productos eficientes, puros, 15 baratos, seguros y respetuosos con el medio ambiente, representa un salto cualitativo de gran importancia para el futuro del sector veterinario.

Además el desarrollo de productos obtenidos por vía biotecnológica como los de la invención pueden representar la consolidación de la prevención, como 20 alternativa al tratamiento, para patologías tan extendidas en el ganado como las trichostrongilidosis, permitiendo pensar en mejoras significativas en la seguridad y la competitividad de la producción animal.

La incorporación de la proteína recombinante rHc23, o derivados de la misma, a composiciones inmunogénicas para la elaboración de vacunas es 25 capaz de reducir de forma significativa (hasta >80%) la carga parasitaria y eliminación de huevos al medio de *H. contortus*, en dependencia del adyuvante empleado.

TEXTO LIBRE DE LA LISTA DE SECUENCIAS

30 El texto libre utilizado en la lista de secuencias se corresponde en español a las siguientes características:

SEQ ID NO: 3. Cebador SP6 del plásmido PGEM-T;

SEQ ID NO: 4. Cebador T7 del plásmido PGEM-T;

SEQ ID NO: 7. Cebador T3 del plásmido lambda ZAP CMV XR.

REIVINDICACIONES

1. Molécula aislada de ácidos nucleicos, caracterizada por SEQ ID NO:1 o con, al menos, un 70% de identidad con SEQ ID NO:1, que contiene la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína Hc23 de *H. contortus*,
5 caracterizada por SEQ ID NO:2, o un polipéptido con, al menos, un 80% de identidad con SEQ ID NO:2 que mantiene las propiedades antigénicas de Hc23.
2. Molécula aminoacídica purificada que comprende la secuencia de Hc23 de *H. contortus*, caracterizada por SEQ ID NO: 2, o una secuencia con, al
10 menos, un 80% de identidad con SEQ ID NO: 2 que mantiene las características antigénicas de Hc23.
3. Vector recombinante que incluye una secuencia comprendida en la reivindicación 1.
4. Célula hospedadora procariota transformada con los vectores
15 recombinantes de la reivindicación 3.
5. Célula hospedadora eucariota transfectada con los vectores recombinantes de la reivindicación 3.
6. Composición inmunogénica que incluye: la proteína Hc23, la proteína
20 recombinante rHc23 o polipéptidos con, al menos, un 80% de identidad con la proteína Hc23; la molécula nucleotídica del gen de Hc23, o secuencias con, al menos, un 70% de identidad con dicha secuencia; vectores que contienen cualquiera de estas secuencias nucleotídicas; células procariotas portadoras de vectores que incluyen la molécula nucleotídica del gen de Hc23, o secuencias con, al menos, un 70% de identidad con dicha secuencia
25 nucleotídica; o células eucariotas portadoras de vectores que incluyen la molécula nucleotídica del gen de Hc23, o secuencias con, al menos, un 70% de identidad con dicha secuencia nucleotídica.
7. Composición inmunogénica según la reivindicación 6 que incluye un adyuvante.
- 30 8. Composición inmunogénica según la reivindicación 7 en la que el adyuvante es hidróxido de aluminio.

9. Composición inmunogénica según la reivindicación 7 en la que el adyuvante es una combinación de *Propionibacterium acnes* inactivado + lipopolisacáridos de *E. coli*.
10. Uso de la composición de cualquiera de las reivindicaciones 6-9 en la
5 elaboración de una vacuna frente a la hemoncosis en rumiantes.
11. Uso según la reivindicación 10 en que los rumiantes son ovejas.
12. Uso según la reivindicación 11 en que las ovejas tienen entre 4 y 12 meses de vida.

Fig. 1

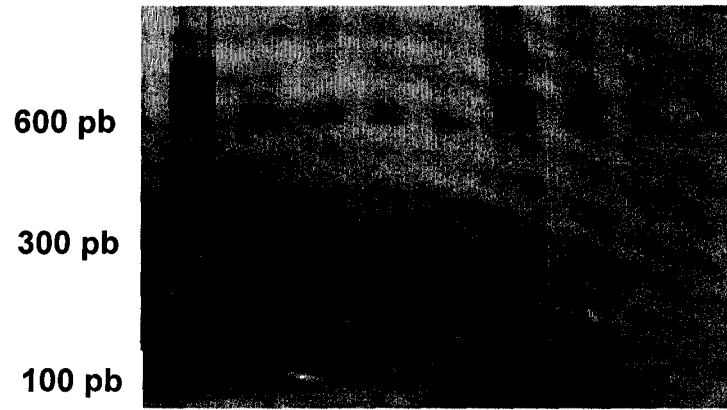


Fig. 2

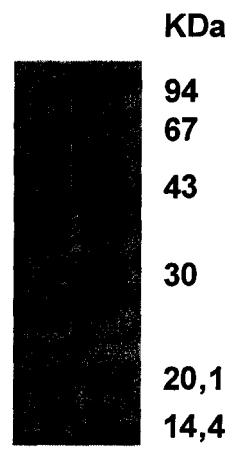


Fig. 3

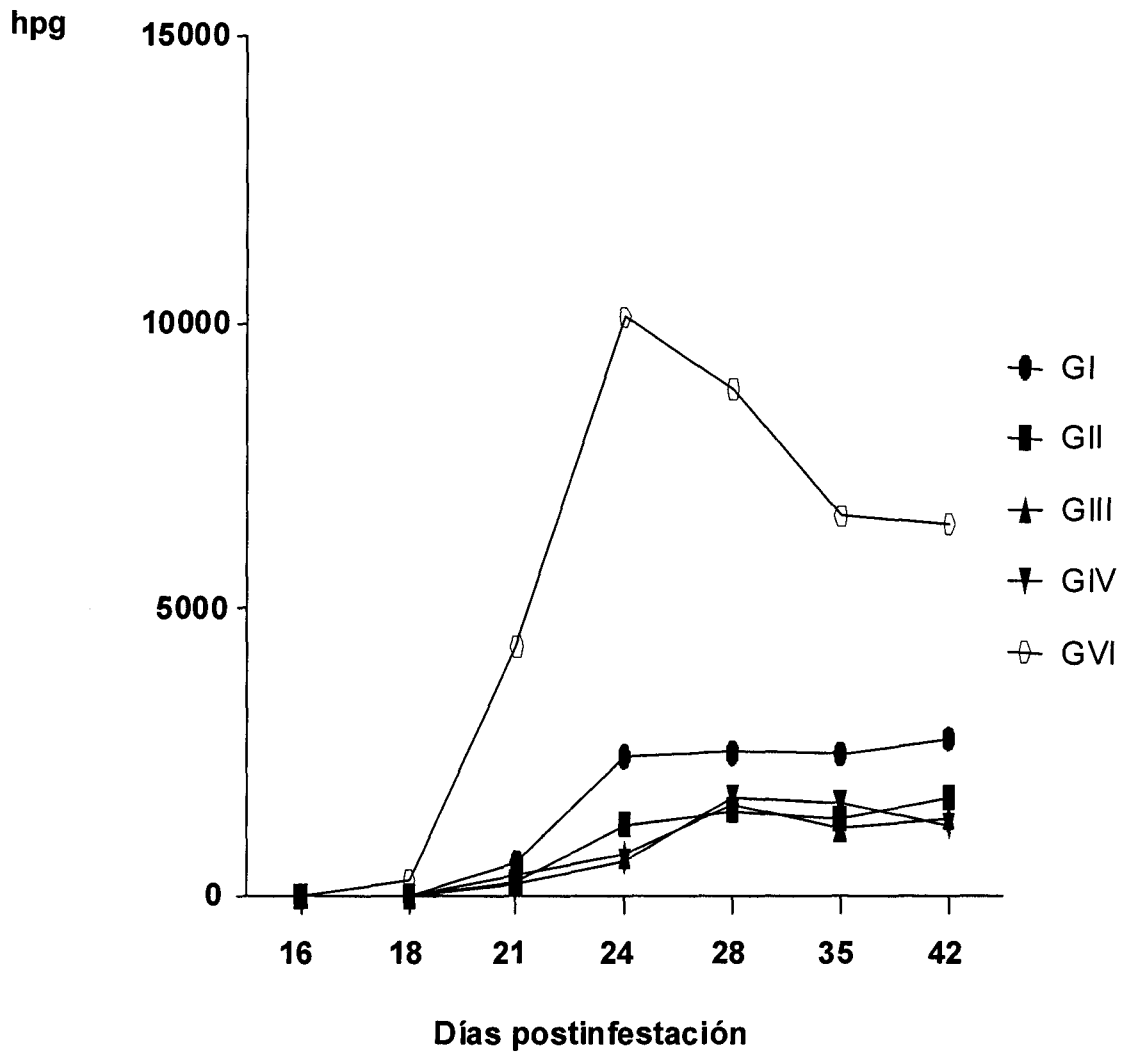


Fig. 4

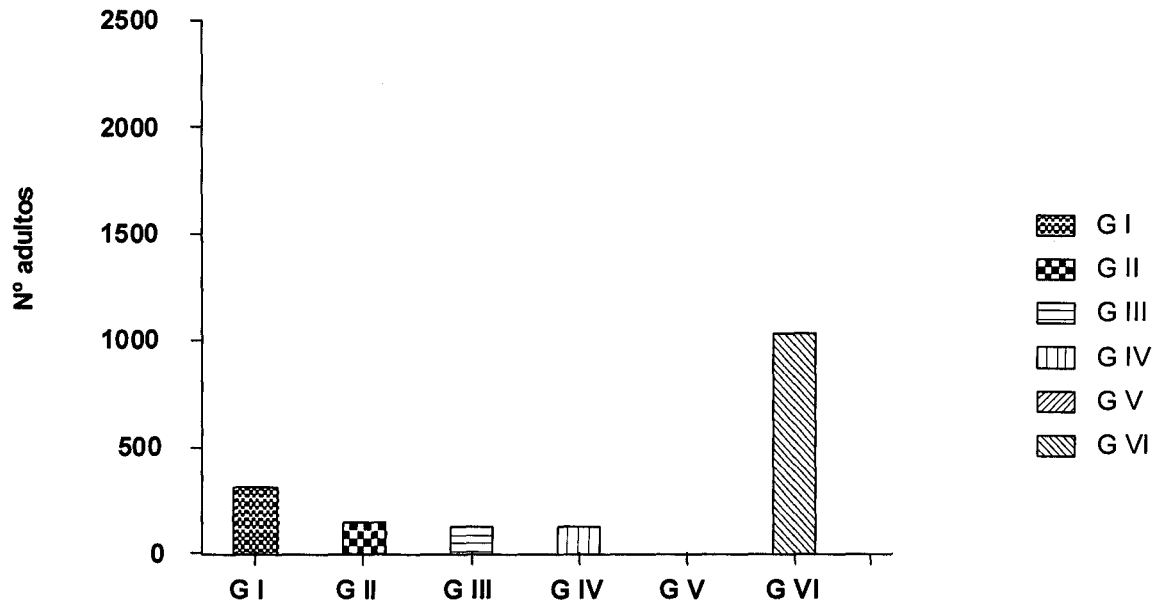


Fig. 5

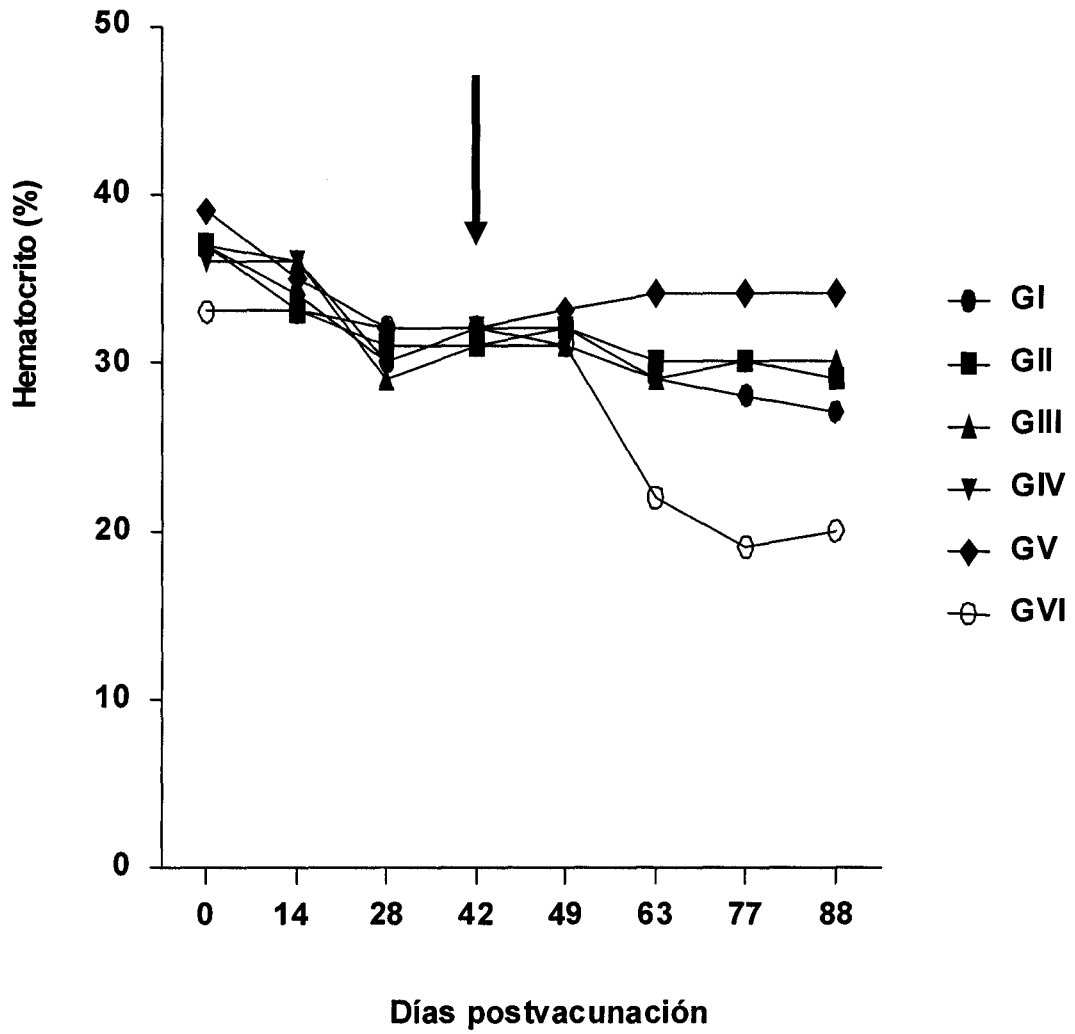
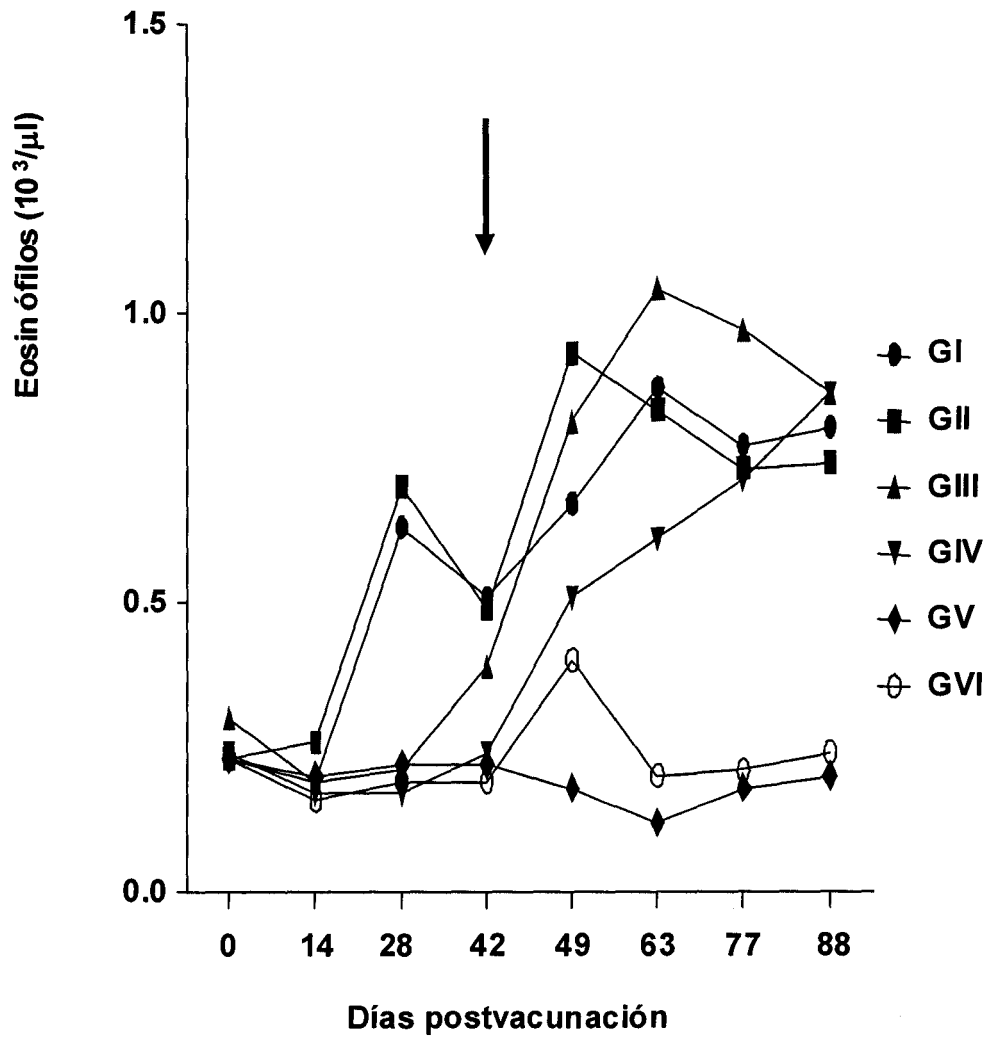


Fig. 6



LISTA DE SECUENCIAS

<110> Universidad Complutense de Madrid

<120> Proteina recombinante de Haemonchus contortus y su aplicacion para la produccion de una vacuna frente a la hemoncosis

<130> 2012_2

<160> 7

<170> BISSAP 1.0

<210> 1

<211> 612

<212> DNA

<213> Haemonchus contortus

<220>

<221> source

<222> 1..612

<223> /mol_type="DNA"
/organism="Haemonchus contortus"

<220>

<221> CDS

<222> 1..609

<223> /transl_table=1
/translation="MRTLVLVAISVAAVSAAGLFAHHPPECGLPPFVNDLPADDQAKLKDIWKN
WKEGDKCYHEQGLTRDLVETLPTTEIRRKISKDALLPPPVRKAPEEVQEQFRKIINDKTIPVEEKH
KKMNELAQKVLGTGDNLKEYNEFTAHIEDRHKAVADKAATLSPEAKAAYDKIAKLEKEKHDIASL
NEQAQEELFQVFKLRHSSAKD"

<400> 1

```
atgcaaacac tggattagt ggcaatcagc gttgcggctg tcagtgtgc aggactgttc      60
gcacatcatc ctctcctga atgtgggctc ccaccattcg tcaacgatct tccagctgat      120
gaccaagcaa agctgaaaga tatttgaag aactggaagg aaggcgataa gtgctatcat      180
gagcaaggcc tcaccagaga tctggtggaa aactcccaa ctgaaattcg tagaaaaatc      240
agcaaggatg cacttctgcc accgcctgtg aggaaggcgc cagaagaagt ccaggaacag      300
ttccgtaaaa tcatcaacga caagacgatc ccagttgaag aaaagcaca gaagatgaat      360
gaactagcac agaaggttct cactggtgac aatctcaagg agtataacga attcactgcg      420
catattgagg atcgccataa ggcggttgcg gacaaggcag ccacactttc accagaagct      480
aaggcggcat acgacaagat cgccaaattg gaaaaggaga aacacgatat tattgcatcg      540
cttaacgagc aggetcaaga agaactattc caggtcttca aactgagaca ctccaagtcc      600
gcgaaagact ga                                                                612
```

<210> 2

<211> 203

<212> PRT

<213> Haemonchus contortus

<220>

<221> SOURCE

<222> 1..203

<223> /mol_type="protein"
/note="[CDS]:1..609 from SEQ ID NO 1"

/organism="Haemonchus contortus"

```

<400> 2
Met Arg Thr Leu Val Leu Val Ala Ile Ser Val Ala Ala Val Ser Ala
1      5      10      15
Ala Gly Leu Phe Ala His His Pro Pro Pro Glu Cys Gly Leu Pro Pro
20      25      30
Phe Val Asn Asp Leu Pro Ala Asp Asp Gln Ala Lys Leu Lys Asp Ile
35      40      45
Trp Lys Asn Trp Lys Glu Gly Asp Lys Cys Tyr His Glu Gln Gly Leu
50      55      60
Thr Arg Asp Leu Val Glu Thr Leu Pro Thr Glu Ile Arg Arg Lys Ile
65      70      75      80
Ser Lys Asp Ala Leu Leu Pro Pro Pro Val Arg Lys Ala Pro Glu Glu
85      90      95
Val Gln Glu Gln Phe Arg Lys Ile Ile Asn Asp Lys Thr Ile Pro Val
100     105     110
Glu Glu Lys His Lys Lys Met Asn Glu Leu Ala Gln Lys Val Leu Thr
115     120     125
Gly Asp Asn Leu Lys Glu Tyr Asn Glu Phe Thr Ala His Ile Glu Asp
130     135     140
Arg His Lys Ala Val Ala Asp Lys Ala Ala Thr Leu Ser Pro Glu Ala
145     150     155     160
Lys Ala Ala Tyr Asp Lys Ile Ala Lys Leu Glu Lys Glu Lys His Asp
165     170     175
Ile Ile Ala Ser Leu Asn Glu Gln Ala Gln Glu Glu Leu Phe Gln Val
180     185     190
Phe Lys Leu Arg His Ser Lys Ser Ala Lys Asp
195     200
    
```

```

<210> 3
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
    
```

```

<220>
<221> source
<222> 1..20
<223> /mol_type="DNA"
      /note="SP6 primer from the PGEM-T plasmid"
      /organism="Artificial Sequence"
    
```

```

<400> 3
atttagtgta cactatagaa                                     20
    
```

```

<210> 4
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
    
```

```

<220>
<221> source
<222> 1..20
<223> /mol_type="DNA"
      /note="T7 primer from the PGEM-T plasmid"
      /organism="Artificial Sequence"
    
```

```

<400> 4
taatacgact cactataggg                                     20
    
```

```

<210> 5
<211> 18
<212> DNA
<213> Haemonchus contortus
    
```

```

<220>
<221> source
<222> 1..18
<223> /mol_type="DNA"
      /organism="Haemonchus contortus"

<400> 5
gcaggactgt tcgcacat                                     18

<210> 6
<211> 19
<212> DNA
<213> Haemonchus contortus

<220>
<221> source
<222> 1..19
<223> /mol_type="DNA"
      /organism="Haemonchus contortus"

<400> 6
tcagtctttc gcggacttg                                     19

<210> 7
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<221> source
<222> 1..20
<223> /mol_type="DNA"
      /note="T3 primer from lambda ZAP CMV XR vector"
      /organism="Artificial Sequence"

<400> 7
aattaaccct cactaaaggg                                     20

```



②① N.º solicitud: 201200865

②② Fecha de presentación de la solicitud: 05.09.2012

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	GARCÍA-COIRADAS L. et al. Immunization against Lamb Haemonchosis with a Recombinant Somatic Antigen of Haemonchus contortus (rHcp26/23). Veterinary Medicine Internacional. 2010. Vol. 2010, páginas: 1-8, todo el documento.	1-12
A	ES 2081097 T3 (BIOTECH AUSTRALIA PTY. LIMITED) 16.02.1996, página 4, línea 34 – página 5, línea 12; reivindicaciones 1-11.	1-12
A	US 5747046 A (MUNN ET AL.) 05.05.1998, resumen.	1-12
A	WO 2010023452 A2 (MOREDUN RESEARCH INSTITUTE [GB/GB]) 04.03.2010, resumen.	1-12
A	WO 2008032073 A2 (MOREDUN RESEARCH INSTITUTE [GB/GB]) 20.03.2008, resumen.	1-12

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
29.04.2013

Examinador
M. D. García Grávalos

Página
1/4

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

C12N15/12 (2006.01)

A61K39/00 (2006.01)

C07K14/00 (2006.01)

A61P33/00 (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12N, A61K, C07K, A61P

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, NPL, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, USPTO PATENT DATABASE, GOOGLE PATENTS, EBI, STN.

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 29.04.2013

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-12	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1-12	SI
	Reivindicaciones	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	GARCÍA-COIRADAS L. et al. Veterinary Medicine Internacional. 2010. Vol. 2010, páginas: 1-8.	2010
D02	ES 2081097 T3	16.02.1996
D03	US 5747046 A	05.05.1998
D04	WO 2010023452 A2	04.03.2010
D05	WO 2008032073 A2	20.03.2008

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La presente solicitud divulga una molécula de ADN, definida como SEQ ID NO: 1, que codifica la proteína "Hc23" de *Haemonchus contortus*, definida como SEQ ID NO: 2, un vector que contiene la secuencia de nucleótidos y una célula hospedadora transformada con dicho vector (reivindicaciones 1-5). Se refiere también a una composición inmunogénica, que contiene las secuencias, vector o células indicados que puede contener un adyuvante y a su uso para elaborar una vacuna frente a la hemoncosis (reivindicaciones 6-12).

El documento D01 divulga la inmunización frente a la hemoncosis de ganado ovino empleando el antígeno recombinante de *H. contortus* "rHcp26/23" (ver todo el documento).

El documento D02 divulga un procedimiento de preparación de una proteína glicosilada, que es un antígeno de nematodo parásito, mediante la expresión de un ácido nucleico recombinante que codifica la correspondiente secuencia de aminoácidos. Se refiere también a la preparación de vacunas para inmunización de animales frente a la infección por nematodos parásitos (ver página 4, línea 34 - página 5, línea 12; reivindicaciones 1-11).

El documento D03 divulga un complejo proteico, compuesto por glicoproteínas del nematodo parásito *H. contortus* y su uso para elaborar una vacuna para inmunización del ganado ovino frente a infecciones producidas por dichos nematodos (ver página 4, línea 34 - resumen).

El documento D04 divulga unos antígenos derivados de nematodos, preferentemente *H. contortus* y su uso para elaborar una vacuna para combatir las infecciones producidas por dichos parásitos (ver resumen).

El documento D05 divulga un método de screening para identificación de nuevos productos antihelmínticos, preferentemente agentes anti-*Haemonchus*, así como la preparación de un péptido o proteína y su uso para elaborar una vacuna frente a estos parásitos (ver resumen).

1. NOVEDAD Y ACTIVIDAD INVENTIVA (Art. 6.1 y 8.1 LP 11/1986)

La presente solicitud divulga una molécula de ADN, definida como SEQ ID NO: 1, que codifica la proteína "Hc23" de *Haemonchus contortus*, definida como SEQ ID NO: 2; así como una composición inmunogénica, que contiene dichas secuencias y su uso para elaborar una vacuna frente a la hemoncosis

1.1. REIVINDICACIONES 1-12

El documento D01 se considera el más cercano al Estado de la Técnica, ya que anticipa la inmunización frente a la hemoncosis ovina empleando el antígeno recombinante de *Haemonchus contortus* "rHcp26/23". Sin embargo, la proteína recombinante "rHcp26/23" empleada en el método de inmunización descrito en D01 difiere de la proteína "rHc23" empleada en el método de la invención.

Debido a que la proteína de la invención está obtenida a partir del antígeno somático de *H. contortus* "p26/23", podría resultar evidente para un experto en la materia la obtención de la proteína "Hc23" y la recombinante "rHc23". Sin embargo, por una parte, en el estado de la técnica no se ha encontrado la proteína "Hc23" y "rHc23"; y, por otra parte, el uso de "rHc23", para inmunizar animales frente a la hemoncosis, produce unos resultados más efectivos que cualquier otro método divulgado en el estado de la técnica empleando otra proteína recombinante, sobre todo en el caso de animales menores de 6 meses de edad.

En consecuencia, según lo divulgado en el documento D01, las reivindicaciones 1-12 cumplen el requisito de novedad y actividad inventiva (Art. 6.1 y Art. 8.1 LP 11/1986)

Los documentos D02 - D05 se refieren al estado de la técnica y no se consideran relevantes en relación con el objeto de la invención.