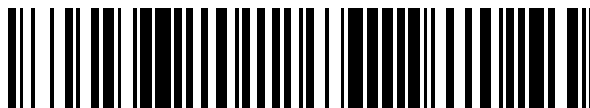


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 501 367**

21 Número de solicitud: 201430840

51 Int. Cl.:

A61K 31/00 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A2

22 Fecha de presentación:

02.06.2014

43 Fecha de publicación de la solicitud:

01.10.2014

71 Solicitantes:

UNIVERSITAT DE LLEIDA (43.8%)

Pl. Victor Siurana 1

25003 Lleida ES;

**CENTRE DE RECERCA EN AGROTECNOLOGIA-
AGROTECNIO (43.8%) y**

**INSTITUCIÓ CATALANA DE RECERCA I ESTUDIS
AVANÇATS (ICREA) (12.5%)**

72 Inventor/es:

NOGAREDA BURCH, Carmen;

MORENO MARTÍNEZ, José Antonio;

ANGULO ASENSIO, Eduardo y

CHRISTOU, Paul

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

54 Título: **MÉTODO DE TRATAMIENTO DE COCCIDIOSIS**

57 Resumen:

La presente invención se relaciona con el uso de una planta de maíz enriquecida en antioxidantes o un derivado de la misma, para la fabricación de un medicamento, composición nutritiva o nutracéutico para la prevención o tratamiento de coccidiosis, pododermatitis o úlceras en un sujeto. Asimismo, la invención se relaciona con una composición que comprende una parte de una planta de maíz enriquecida en antioxidantes o un derivado de la misma y un agente anticoccídico y con el uso de dicha composición para la prevención o tratamiento de pododermatitis o úlceras asociadas a coccidiosis en un sujeto. La invención también se relaciona con el uso de una parte de una planta de maíz enriquecida en antioxidantes o un derivado de la misma para la obtención de una composición nutritiva o nutracéutico y con una composición nutritiva o nutracéutico que comprende una parte de una planta de maíz enriquecida en antioxidantes o un derivado de la misma.

ES 2 501 367 A2

DESCRIPCIÓN

MÉTODO DE TRATAMIENTO DE COCCIDIOSIS

CAMPO DE LA INVENCIÓN

La presente invención se encuadra dentro de los métodos de tratamiento o prevención
5 de enfermedades, concretamente de coccidiosis, pododermatitis y úlceras digitales en un sujeto.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

La coccidiosis es una enfermedad producida por parásitos protozoarios de tamaño
microscópico, conocidos como coccidios, pertenecientes al phylum Apicomplexa; un
10 grupo de protistas caracterizado por la presencia de un orgánulo único denominado complejo apical, que incluye diferentes familias y géneros de parásitos de gran importancia económica y sanitaria (por ejemplo, *Coccidia*, *Piroplasma*, y *Plasmodium*).

Dentro del phylum Apicomplexa, la familia Eimeriidae provoca enfermedades que afectan a la mayoría de los animales criados comercialmente para consumo, por
15 ejemplo, aves de corral (e.g., gallinas, gallos, pollos, pavos, patos, ocas, etc.), mamíferos domésticos (e.g., ovejas, vacas, cerdos, caballos, búfalos de agua, etc.), etc.

El ciclo de vida de estos parásitos depende del género y de la especie, y la mayoría de ellos completan el ciclo en un único hospedador. En el caso del género *Eimeria* que
20 afectan a *Gallus gallus*, el ciclo se desarrolla en un único hospedador; cada especie de *Eimeria* presenta un periodo concreto de de prepatencia (tiempo entre la infección y la eliminación de ooquistes) y patencia (duración de la excreción de ooquistes) (en general, entre 2 y 12 días dependiendo de la especie). La diseminación de los ooquistes, dentro y fuera de la granja, se realiza mediante heces, cama, polvo,
25 artrópodos, herramientas, etc.

La coccidiosis se caracteriza por su gran morbilidad y puede dar lugar a infecciones clínicas o sub-clínicas. El cuadro clínico se caracteriza por diarrea que puede ser hemorrágica, fiebre, anorexia, astenia y, a veces, anemia, ocasionando una
30 disminución de las tasas de crecimiento y producción con grandes pérdidas económicas. La infección por algunas de las especies más patógenas, como *E. tenella*, desencadena un alto índice de mortalidad.

Se han realizado numerosos esfuerzos para frenar y controlar los riesgos de la coccidiosis a la vista de la extraordinaria resistencia de sus agentes etiológicos a los procedimientos aplicados contra ellos. En general, las distintas medidas aplicadas en la lucha frente a la coccidiosis pueden agruparse en dos grupos, medidas de orden terapéutico basadas en el empleo de anticoccidiales, tales como coccidiostáticos (tratamiento preventivo) y coccidicidas (tratamiento curativo); y medidas de orden preventivo basadas en inmunizaciones. Los coccidiostáticos son productos que inhiben o detienen el desarrollo de los parásitos, mientras que los coccidicidas son productos que destruyen dichos parásitos. Los coccidiostáticos, al no eliminar totalmente los ooquistes, permiten el desarrollo de inmunidad en las aves, utilizándose especialmente en pollos de engorde. Los coccidicidas, al destruir los parásitos, inhiben el desarrollo de la inmunidad por lo que actualmente se usan cuando aparecen problemas clínicos en los lotes de aves. Además, se cree que los productos anticoccidiales no actúan sobre todas las especies de *Eimeria sp.* y que pueden inducir resistencia después de un uso continuado. A raíz de la introducción de los coccidiostáticos en la alimentación de las aves, disminuyeron los casos severos de coccidiosis; no obstante, la aparición de resistencias frente a los coccidiostáticos y la presión ejercida por los consumidores en demanda de carne sin residuos farmacológicos han limitado el uso de estos fármacos en alimentación animal. En el marco legal europeo, el Reglamento (CE) No. 1831/2003, establece la supresión progresiva de la utilización de los coccidiostáticos y los histomonóstatos como aditivos para alimentación animal. Por otra parte, a falta de desarrollo de nuevas moléculas, la coccidiosis vuelve a generar graves problemas económicos.

Hoy en día existe un creciente interés por el desarrollo de alternativas no farmacológicas para un control saludable, efectivo y barato de la coccidiosis aviar, entre ellas la modificación de la dieta de los animales.

El extracto de un compuesto antioxidante, proantocianidina de semilla de uva, incorporado en la dieta de pollos tiene efectos beneficiosos en el tratamiento de coccidiosis causada por *E. tenella* (Wang ML. *et al.*, Poultry Sci. 2008; 87: 2273-80). Sin embargo otros estudios como el de Allen PC. *et al.*, (Clin. Microbiol. Rev., 2002, 15: 58–65) demuestran que los antioxidantes en la dieta de las aves no son efectivos en el tratamiento frente a *E. tenella*, pero sí de infecciones causadas por *E. acervulina* y *E. máxima*.

Por lo tanto, el control de la coccidiosis requiere de mejores alternativas y más eficaces, evitando las pérdidas económicas desencadenadas por el parásito y, por otra parte, permitir producir carne de alta calidad sin residuos farmacológicos.

COMPENDIO DE LA INVENCIÓN

- 5 En un primer aspecto, la invención se relaciona con el uso de una parte de una planta de maíz enriquecida en antioxidantes o un derivado de la misma, para la fabricación de un medicamento, composición nutritiva o nutracéutico para la prevención o tratamiento de coccidiosis en un sujeto.

- 10 En un segundo aspecto, la invención se relaciona con el uso de una parte de una planta de maíz enriquecida en antioxidantes o un derivado de la misma para la fabricación de un medicamento, composición nutritiva o nutracéutico para la prevención o tratamiento de pododermatitis o úlceras en un sujeto.

- 15 En un tercer aspecto, la invención se relaciona con una composición que comprende una parte de una planta de maíz enriquecida en antioxidantes o un derivado de la misma y un agente anticoccídico.

En un cuarto aspecto, la invención se relaciona con el uso de la composición de la invención para la prevención o tratamiento de coccidiosis en un sujeto o para la prevención o tratamiento de pododermatitis o úlceras asociadas a coccidiosis en un sujeto.

- 20 En un quinto aspecto, la invención se relaciona con el uso de una parte de una planta de maíz enriquecida en antioxidantes o un derivado de la misma para la obtención de una composición nutritiva o nutracéutico.

- 25 En un sexto aspecto, la invención se relaciona con una composición nutritiva o nutracéutico que comprende una parte de una planta de maíz enriquecida en antioxidantes o un derivado de la misma.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

- Figuras 1 y 2: Pododermatitis y cantidad de úlceras de acuerdo a Welfare Quality® (2009) Welfare Quality® assessment protocol for poultry (broilers, laying hens). Welfare Quality® Consortium, Lelystad, Netherlands. Los datos se han obtenido de 14
30 animales / grupo. T1: dieta control en pollos no infectados, T2: dieta control en pollos

infectados con *E. tenella*, T3: dieta de maíz rico en carotenoides en pollos no infectados, T4: dieta de maíz rico en carotenoides en pollos infectados con *E. tenella*.

Figura 3. Excreción de ooquistes de 6 a 9 días post infección. T2: dieta control en pollos infectados con *E. tenella*, T4: dieta de maíz rico en carotenoides en pollos infectados con *E. tenella*. (Los grupos no infectados T1 y T3 fueron negativos).

Figura 4. De izquierda a derecha: dos patas de cada grupo: T1: dieta control en pollos no infectados, T2: dieta control en pollos desafiados con *E. tenella*, T3: dieta de maíz rico en carotenoides en pollos no infectados, T4: dieta de maíz rico en carotenoides en pollos no infectados con *E. tenella*.

10 Figuras 5 y 6 (mayor aumento). Histopatología de la bolsa de Fabricio del grupo T2 (dieta control en pollos infectados con *E. tenella*) con vacuolización medular y cortical.

Figura 7. Histopatología de la bolsa de Fabricio del grupo T4 (dieta con maíz rico en antioxidantes en pollos infectados con *E. tenella*) con poca vacuolización medular y cortical.

15 **DESCRIPCIÓN DETALLADA**

Los autores de la presente invención han observado que las aves criadas con una dieta de maíz enriquecido en antioxidantes exhiben una reducción de pododermatitis y úlceras en los dedos. Además, dichas aves mostraron una reducción de cerca de cuatro veces en la cantidad de ooquistes de *Eimeria* excretados por las heces, lo que indica que la dieta de maíz enriquecido en antioxidantes es efectiva frente a la coccidiosis. La histopatología de la bolsa de Fabricio permitió la cuantificación de la vacuolización medular y cortical en los folículos y se observó que los animales infectados alimentados con maíz enriquecido en antioxidantes mostraban una reducción significativa de vacuolas. Esta observación demuestra que los carotenoides ejercen un papel protector contra el estrés oxidativo debido a la infección por coccidios y permiten un aumento de la inmunidad. Los resultados demuestran que el maíz enriquecido en antioxidantes es un vehículo sorprendentemente eficaz para mantener la salud y la inmunidad de aves de corral, para reducir la dermatitis en las patas y las úlceras en los pies.

30 **Definiciones**

Por “planta de maíz”, según se emplea en la presente invención, se refiere a un ser vivo fotosintético perteneciente a la especie *Zea mays*. Dicho término incluye también las diversas subespecies.

Una “parte de una planta”, tal y como se usa en la presente invención, se refiere a una
5 parte específica de una planta, tal como tallo, hoja, raíz, flor, semilla, endospermo, grano, fruto o yema.

“Derivado de una parte de la planta” se refiere a cualquier producto obtenido tras el procesamiento de una parte de la planta de la invención a partir de la modificación física y/o química, a modo ilustrativo no limitativo, harina, sémola, aceite, sirope,
10 almidón o fécula.

Según la invención, la planta de maíz se encuentra “enriquecida en antioxidantes”, es decir, presenta niveles superiores de moléculas capaces de retardar o prevenir la oxidación de otras moléculas, comparado con un nivel de referencia. Los antioxidantes se encargan de capturar los radicales libres producidos en las reacciones de oxidación
15 propias del metabolismo. Ejemplos ilustrativos no limitativos de antioxidantes son carotenoides, luteína, licopeno, selenio, vitamina A, vitamina C y vitamina E.

El término “composición nutritiva” de la presente invención se refiere a aquel alimento que, con independencia de aportar nutrientes al sujeto que lo toma, afecta beneficiosamente a una o varias funciones del organismo, de manera que proporciona
20 un mejor estado de salud y bienestar. Como consecuencia, dicha composición nutritiva puede ser destinada a la prevención y/o tratamiento de una enfermedad o del factor causante de una enfermedad. Por tanto, el término “composición nutritiva” de la presente invención se puede emplear como sinónimo de alimento funcional o alimento para fines nutricionales específicos o alimento medicinal. Una composición nutritiva
25 tiene una apariencia similar a la de un alimento convencional y se consume como parte de una dieta normal.

Por “nutracéutico”, palabra derivada de nutrición y farmacéutico, se entiende un producto elaborado a partir de un alimento, pero que se encuentra en forma de píldora, polvos y otras presentaciones farmacéuticas no asociadas generalmente con los
30 alimentos y que presenta propiedades beneficiosas para el tratamiento y/o prevención de enfermedades.

El término “coccidiosis”, tal como aquí se utiliza, se refiere a una enfermedad producida por parásitos protozoarios de tamaño microscópico, conocidos como

“coccidios”. Se incluyen en el phylum Apicomplexa, entre ellos a la familia Eimeriidae y se consideran varios géneros, e.g., *Eimeria*, *Isospora*, etc. Invaden células epiteliales del intestino, o de otros órganos, de los animales infectados, produciendo la destrucción de las células hospedadoras, e.g., enterocitos, etc. Esta enfermedad

5 afecta a la mayoría de los animales criados comercialmente bien con fines alimenticios, por ejemplo, aves (e.g., gallinas, gallos, pollos, pavos, patos, ocas, etc.), mamíferos (e.g., ovejas, vacas, cerdos, conejos, caballos, búfalos de agua, etc.), peces, etc., o bien con otros fines comerciales (e.g., perros, gatos, marsupiales, etc.). La enfermedad se transmite por el contacto con heces o por ingestión de tejidos

10 infectados. El síntoma primario es la diarrea, que pueden llegar a ser sangrienta en los casos severos. La mayoría de los animales infectados por coccidios son asintomáticos; sin embargo, los jóvenes o inmunodeficientes pueden sufrir síntomas severos, incluyendo muerte.

El término “sujeto”, tal como aquí se utiliza, se refiere a un miembro de una especie de animal, preferentemente un ave, un mamífero o un pez, de cualquier sexo, raza o

15 edad. A modo de ejemplo ilustrativo no limitativo el término ave incluye pollos, aves acuáticas y las aves de caza.

“Pododermatitis”, tal y como se usa en la presente invención, se refiere a lesiones en las almohadillas de las patas y los dedos de las patas y en la piel situada en la

20 articulación tibiotarsiana. Pueden variar en tamaño y en profundidad. Al principio se caracteriza por una hiperqueratosis (engrosamiento de la piel). En una segunda etapa, aparece una coloración marrón de la piel que se corresponde con la necrosis de los tejidos. En los casos más graves se produce la erosión y ulceración de los tejidos acompañados de una inflamación del tejido subcutáneo. En la zona central se origina

25 la destrucción completa de la epidermis. La úlcera produce un exudado que forma una costra de aspecto negro. La causa principal de la pododermatitis es la humedad. Todos los factores que pueden favorecer la humedad del suelo, tales como el tipo de cama, el sistema de abastecimiento de agua, la digestibilidad de los alimentos o la presencia de diarrea, también pueden contribuir a su aparición. Por tanto, la

30 pododermatitis o úlceras digitales pueden aparecer de forma secundaria a la coccidiosis por el aumento en la humedad del suelo como consecuencia de las diarreas que sufren los animales.

“Agente anticoccídico”, tal y como se usa en la presente invención, incluye los coccidiostáticos y los coccidiocidas, clasificados así según sus efectos sobre los parásitos.

El término “Eimeria”, tal como aquí se utiliza, incluye cualquier especie del género

5 Eimeria, incluyendo, entre otras, especies de *Eimeria* que infectan aves (e.g., gallinas, gallos, pollos, capones, pintadas (gallinas de Guinea), pulardas, pavos, patos, ocas, faisanes, perdices, codornices, avestruces, etc.), especies de *Eimeria* que infectan mamíferos (e.g., ovejas, vacas, cerdos, conejos, caballos, perros, gatos, etc.), especies de *Eimeria* que infectan peces (e.g., anguilas, congrios, anchoas o

10 boquerones, arenques, sardinas, carpas, bacalaos, merluzas, lubinas, jureles, rapés, etc. Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de dichas especies de *Eimeria* incluyen especies que infectan pollos, tales como *E.tenella*, *E. acervulina*, *E. brunetti*, *E. hagani*, *E. maxima*, *E. mitis*, *E. mivati*, *E. necatrix*, *E. praecox*, , etc., especies que infectan pavos, tales como *E. adenoeides*, *E. gallopavonis*, *E. innocua*, *E. meleagridis*, *E.*

15 *meleagritidis*, *E. subrotunda*, etc., especies que infectan perdices, tales como *E. alectoreae*, *E. caucasica*, *E. gonzalezcastroi*, *E. kofoidi*, *E. phasiani*, etc., especies que infectan codornices, tales como *E. bateri*, *E. coturnicis*, *E. lettyae*, etc., especies que infectan faisanes, tales como *E. colchici*, *E. duodenalis*, *E. langeroni*, *E. megalostomata*, *E. pacifica*, *E. phasiani*, *E. paisana*, etc., especies que infectan

20 pintadas, tales como *E. gorakhpuri*, *E. grenieri*, *E. numidae*, etc., especies que infectan patos, tales como *E. anatis*, *E. aythya*, *E.battakhi*, *E.danailovi*, *E.krilovi*, etc., especies que infectan ocas, tales como *E. stigmosa*, *E. truncata*, etc., especies que infectan vacas, tales como *E. bovis*, *E. zuernii*, *E. ellipsoidalis*, *E. cylindrica*, *E. auburnensis*, *E. alabamensis*, *E. subspherica*, *E. wyomingensis*, etc., especies que infectan cabras,

25 tales como *E. arloingi*, *E. christenseni*, *E. ninakohlyakimovae*, *E. alijevi*, *E. hirci*, *E. caprina*, *E. caprovina*, *E. pallida*, *E. jolchijevi*, *E. apsheronica*, etc., especies que infectan ovejas, tales como *E. ahsata*, *E. bakuensis*, *E.crandallis*, *E. faurei*, *E. intricata*, *E. marsica*, *E. ovinoidalis*, *E. pallida*, *E. parva*, *E. weybridgensis*, *E. gilruthi*, *E. gonzalezi*, *E. granulosa*, *E. punctata*, etc., especies que infectan cerdos, tales como *E.*

30 *scabra*, *E.porci*, *E. polita*, *E.suis*, etc., especies que infectan conejos, tales como *E. stiedae*, *E. irresidua*, *E. magna*, *E. media*, *E. perforans*, etc., especies que infectan caballos, tales como *E. leuckarti*, *E. solipedum*, *E. iniungulsti*, etc.

“Eimeria tenella”, tal y como se usa en la presente invención, se refiere al parásito estenoxeno de la especie de *Eimeria* que causa hemorragias intestinales y afecta

35 principalmente a los ciegos de gallinas y pollos.

“Ave” tal y como se usa en la presente invención, se refiere al animal vertebrado que presentan las extremidades anteriores modificadas como alas, con el cuerpo recubierto de plumas y un pico córneo sin dientes.

5 “Ave de corral”, incluye aves domésticas criadas por el hombre para la obtención de huevos, carne y/o plumas. Los ejemplos de las aves de corral incluyen gallos, gallinas, pavos, patos, gansos, codornices, faisanes, palomas, palomas, emúes, avestruces y ñandúes.

Por “pollo” tal y como se usa en la presente invención, se refiere a una cría de ave especialmente de gallina.

10 Por “maíz transgénico”, según se usa en la presente invención, se refiere a aquella planta de maíz cuyo genoma ha sido modificado mediante ingeniería genética con el objetivo de conseguir características biológicas diferentes y/o mejoradas respecto a las de la planta isogénica silvestre.

15 “Transgén de la ruta de biosíntesis de carotenoides”, tal y como se usa en la presente invención se refiere a un gen que codifica para una enzima que participa en la ruta de síntesis de carotenoides. En el grano, la biosíntesis de carotenos ocurre en las membranas de los cromoplastos.

20 “Carotenoides”, tal y como se usa en la presente invención, se refiere a pigmentos orgánicos que se encuentran de forma natural en plantas y otros organismos fotosintéticos. La mayoría de los carotenoides son tetraterpenoides, compuestos de 40 átomos de carbono formados por ocho unidades isoprenoides y contienen anillos a uno o ambos extremos de la molécula. Pueden funcionar como antioxidantes, protegiendo frente a la auto-oxidación.

25 Ejemplos de genes que participan en la biosíntesis de carotenoides, a modo ilustrativo, no limitativo son fitoeno sintasa, caroteno desaturasa, licopeno β -ciclase, β -caroteno hidroxilasa y carotenoide cetolasa.

Por “Fitoeno sintasa” o *psy1* tal y como se usa en la presente invención se refiere al gen que codifica para la enzima que cataliza la reacción que convierte dos moléculas de GGDP en fitoeno, el primer paso en la síntesis de la provitamina A.

30 “Caroteno desaturasa” o *crtl*, tal y como se usa en la presente invención, se refiere al gen que codifica para la enzima encargada de la producción de licopeno a partir de tres substratos, neurosporeno, un aceptor de electrones y oxígeno.

“Licopeno β-ciclase” o *Lycb*, tal y como se usa en la presente invención, se refiere al gen que codifica para la enzima que transforma el licopeno en provitamina A.

5 “β-caroteno hidroxilase” o *bch*, tal y como se usa en la presente invención, se refiere al gen que codifica para la enzima encargada de la conversión del beta-caroteno a xantofilas.

“Carotenoide cetolase” o *crtw* tal y como se usa en la presente invención, se refiere al gen que codifica para la enzima encargada de añadir un grupo carbonilo con el carbono 4 y 4 'de la molécula de beta caroteno.

10 “Transgén de la biosíntesis de vitamina C” tal y como se usa en la presente invención, se refiere a un gen que codifica para una enzima que participa en la biosíntesis de la vitamina C. Un ejemplo es la dehidroascorbato reductasa.

“Vitamina C”, tal y como se usa en la presente invención, se refiere al compuesto con número CAS 50-81-7, es antioxidante y cofactor en varias reacciones enzimáticas.

15 “Dehidroascorbato reductase” *dhar*, tal y como se usa en la presente invención, se refiere al gen que codifica para la enzima que cataliza la reducción del dehidroascorbato a ascorbato en una reacción dependiente de glutatión.

“Transgén de la biosíntesis de folato”, tal y como se usa en la presente invención, se refiere a un gen que codifica para una enzima que participa en la ruta de biosíntesis de folato, por ejemplo GTP ciclohidrolase.

20 “Folato”, tal y como se usa en la presente invención, se refiere a un conjunto de sustancias derivadas del ácido fólico propiamente dicho, (el ácido pteroil-L-glutámico), que pueden transformarse en él fácilmente.

“GTP ciclohidrolase” o *GCH1*, tal y como se usa en la presente invención, se refiere a la enzima codificada por el gen folE y que cataliza la reacción de hidrólisis del GTP.

25 “Promotor específico de endospermo”, tal y como se usa en la presente invención, se refiere a una molécula de ácido nucleico que permite dirigir o regular la expresión de un gen en el endospermo. El “endospermo” es una formación característica de las semillas de Angiospermas, es un tejido nutritivo para el embrión. El endospermo de maíz se origina a partir de una serie de divisiones nucleares libres, seguidas de la
30 celularización y posterior formación de un rango de dominios celulares funcionales. El endospermo es el órgano de almacenamiento principal de las semillas de maíz; nutre

al embrión mientras la semilla se desarrolla y proporciona nutrientes a la plántula en germinación.

“D-hordeína de cebada”, tal y como se emplea en la presente invención, se refiere a la proteína con el número de acceso Q40054 de la base de datos Uniprot a fecha 17 de marzo de 2014. En una realización particular, el promotor de D-hordeína tiene la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 10

“LMW glutenina de trigo”, tal y como se emplea en la presente invención, se refiere a proteína con el número de acceso Q41603 de la base de datos Uniprot a fecha 17 de marzo de 2014. En una realización particular, el promotor de LMW de glutenina tiene la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 11

“Semilla” tal y como se usa en la presente invención, se refiere a cada uno de los cuerpos que forman parte del fruto que da origen a una nueva planta.

El término “endospermo”, según se usa en la presente invención, se refiere al órgano principal de almacenamiento en las semillas de maíz, nutriendo el embrión mientras la semilla se desarrolla y proporcionando nutrientes a la planta joven en germinación.

Por “derivado de semilla o endospermo”, tal y como se usa en la presente invención se refiere a cualquier producto obtenido a partir de la modificación física y/o química de la semilla o endospermo

El término “harina” según se entiende en la presente invención, es el producto obtenido de la molturación de cualquier semilla de plantas del género *Zea* que puede estar despojado en mayor o menor grado del salvado o la cascarilla de la semilla.

El término “sémola” hace referencia a harina gruesa (semillas de maíz poco molidas), es decir, fragmentos de endospermo con una cantidad variable de cascarilla de semilla.

“Aceite de maíz”, tal y como se usa en la presente invención, se refiere al aceite obtenido tras el secado del grano de maíz germinado.

Por “almidón de maíz”, tal y como se emplea, se refiere a un polvo sedoso finalmente molido blanco hecho del endospermo del maíz seco.

“Fécula de maíz” es el polisacárido obtenido a través de la molienda húmeda.

“Sirope de maíz”, también conocido como jarabe de maíz, es un edulcorante líquido elaborado a partir del almidón o la fécula de maíz tras un proceso de calentamiento e hidrolización.

Usos médicos de la invención

- 5 En un primer aspecto, la invención se relaciona con el uso de una parte de una planta de maíz enriquecida en antioxidantes o un derivado de la misma, para la fabricación de un medicamento, composición nutritiva o nutracéutico para la prevención o tratamiento de coccidiosis en un sujeto.

Alternativamente, la invención se relaciona con una parte de una planta de maíz
10 enriquecida en antioxidantes o un derivado de la misma para su uso en la prevención o tratamiento de coccidiosis en un sujeto.

Asimismo, la invención se relaciona con una parte de una planta de maíz enriquecida en antioxidantes o un derivado de la misma para su uso en medicina.

- En un segundo aspecto, la invención se relaciona con el uso de una parte de una
15 planta de maíz enriquecida en antioxidantes o un derivado de la misma para la fabricación de un medicamento, composición nutritiva o nutracéutico para la prevención o tratamiento de pododermatitis o úlceras en un sujeto.

Alternativamente, la invención se relaciona con una parte de una planta de maíz
20 enriquecida en antioxidantes o un derivado de la misma para su uso en la prevención o tratamiento de pododermatitis o úlceras en un sujeto.

En una realización particular las úlceras se encuentran en las patas o pies.

- Se entiende que una parte de una planta de maíz o un derivado de la misma se encuentra enriquecida en antioxidantes, cuando presenta niveles de antioxidantes superiores a los niveles de una muestra de referencia o muestra control. En particular,
25 se puede considerar que una parte de una planta o derivado de la misma presenta niveles superiores de antioxidantes cuando los niveles son de al menos 1 vez, 1,5 veces, 5 veces, 10 veces, 20 veces, 30 veces, 40 veces, 50 veces, 60 veces, 70 veces, 80 veces, 90 veces, 100 veces o incluso más con respecto a la muestra de referencia o muestra control. El experto en la materia entenderá que no es necesario
30 que una planta enriquecida en antioxidantes contenga niveles elevados de dichos antioxidantes en todos los tejidos de dicha planta, sino que es suficiente con que al menos un tejido de la planta contenga niveles elevados de antioxidantes para que la

planta pueda ser considerada como “enriquecida en antioxidantes”. En ese caso, la muestra de referencia para determinar el grado de enriquecimiento en antioxidantes se determina mediante comparación con los niveles de antioxidantes es una muestra del mismo mismo tejido o parte de una planta control.

- 5 Una muestra control o de referencia, tal y como se usa en la presente invención, puede ser el valor que corresponde a los niveles de antioxidantes presentes en una parte de una planta de maíz o derivado de la misma que se encuentra en estado salvaje, es decir no modificada genéticamente.

El experto en la materia conoce diversos métodos para determinar si una planta de
10 maíz o derivado de la misma se encuentra enriquecida en antioxidantes, por ejemplo determinando los niveles de antioxidantes, particularmente carotenoides mediante HPLC (cromatografía líquida de alta resolución) o determinando el incremento de la capacidad antioxidante.

La capacidad antioxidante puede determinarse mediante la cuantificación de la
15 capacidad que tienen los compuestos antioxidantes para reaccionar con un radical libre determinado, o determinando el potencial que tales compuestos tendrían para reducir el complejo formado entre iones Fe(III) y el reactivo TPTZ (2,4,6-tripiridil-s-triazina).

Entre aquellos ensayos que se basan en la medición de la capacidad de los
20 antioxidantes para reaccionar con un radical libre, caben destacar los siguientes, ensayo ORAC (del inglés Oxygen Radical Absorbance Capacity o capacidad de absorción de radicales de oxígeno), ensayo TEAC (del inglés Trolox Equivalent Antioxidant Capacity o Capacidad Antioxidante como Equivalentes Trolox) y Ensayo DPPH (2,2-Difenil-1-picrilhidrazil).

- 25 En una realización particular, la planta de maíz es maíz blanco o maíz amarillo. Maíz blanco se refiere a una variedad de maíz en el que el endospermo tiene color blanco, como consecuencia de la ausencia de los pigmentos carotenoides que confieren el color amarillo al endospermo del maíz conocido como maíz amarillo.

En una forma preferida de realización, los antioxidantes son carotenoides. En una
30 forma de realización aún más preferida, los carotenoides se seleccionan del grupo formado por β -caroteno, γ -caroteno, α -caroteno, α -criptoxantina, β -criptoxantina, licopeno, luteína y zeaxantina.

En una realización particular, la parte de la planta de maíz enriquecida en antioxidantes es el endospermo o la semilla o derivados de la misma.

A modo de ejemplo ilustrativo no limitativo, el derivado de la semilla o endospermo puede ser una harina, sémola, aceite de maíz, almidón de maíz, fécula de maíz o sirope de maíz entre otros.

El término "tratamiento", tal como se utiliza aquí, se refiere a cualquier tipo de terapia, que tenga como objetivo la terminación, la prevención, la mejora o la reducción de la susceptibilidad a padecer una condición clínica, como se describe aquí. En una forma de realización preferida, el término tratamiento se refiere al tratamiento profiláctico (es decir, una terapia para reducir la susceptibilidad a padecer una condición clínica) de un trastorno o condición. Así, "tratamiento", "tratar", y sus términos equivalentes se refieren a la obtención de un efecto deseado farmacológica o fisiológicamente, que cubre cualquier tratamiento de una afección patológica o trastorno en un mamífero, incluyendo el ser humano. El efecto puede ser profiláctico en términos de proporcionar prevención total o parcial de un trastorno y/o efecto adverso atribuible al mismo. Es decir, "tratamiento" incluye (1) prevenir que la enfermedad ocurra o se repita en un sujeto, (2) inhibir la enfermedad, por ejemplo deteniendo su desarrollo, (3) interrumpir o finalizar el desorden o por lo menos los síntomas asociados al mismo, por lo que el paciente ya no sufriría la enfermedad o sus síntomas, por ejemplo provocar la regresión de la enfermedad o sus síntomas mediante la restauración o reparación de una función perdida, ausente o defectuosa, o estimular un proceso ineficiente, o (4), aminorar, aliviar o mejorar la enfermedad, o los síntomas asociados a la misma, donde aminorar se utiliza en un sentido amplio para referirse a, al menos, una reducción en la magnitud de un parámetro, tal como inflamación, dolor, o deficiencia inmune.

25

En otra realización particular, la coccidiosis está causada por *Eimeria*.

En una realización particular, dichas especies de *Eimeria* se seleccionan entre *E. acervulina*, *E. brunetti*, *E. hagai*, *E. maxima*, *E. mitis*, *E. mivati*, *E. necatrix*, *E. praecox*, *E. tenella*, *E. adenoides*, *E. gallopavonis*, *E. innocua*, *E. meleagridis*, *E. meleagritidis*, *E. subrotunda*, *E. scabra*, *E. porci*, *E. polita*, *E. suis*, *E. bovis*, *E. zuernii*, *E. ellipsoidalis*, *E. cylindrica*, *E. auburnensis*, *E. alabamensis*, *E. subspherica*, *E. wyomingensis*, *E. ahsata*, *E. bakuensis*, *E. crandallis*, *E. faurei*, *E. intricata*, *E. marsica*, *E. ovinoidalis*, *E. pallida*, *E. parva*, *E. weybridgensis*, *E. gilruthi*, *E. gonzalezi*, *E. granulosa*, *E. punctata*, *E. arloingi*, *E. christenseni*, *E. ninakohlyakimovae*, *E. alijevi*, *E.*

hirsi, *E. caprina*, *E. caprovina*, *E. pallida*, *E. jolchijevi*, *E. apsheronica*, *E. stiedae*, *E. irresidua*, *E. magna*, *E. media* y *E. perforans*. Asimismo, el término “*Eimeria*” incluye cualquier cepa de cualquier especie de *Eimeria*, incluyendo las cepas atenuadas y las virulentas.

- 5 En una realización más particular, la especie de *Eimeria* es *E. tenella*.

Un experto en la materia conoce técnicas que permiten diagnosticar a un sujeto que padece coccidiosis. Entre las técnicas destaca la detección de ooquistes en heces mediante una técnica de flotación convencional con recuento posterior, o la detección de ooquistes en el intestino, como la técnica cuantitativa de McMaster. Adicionalmente
10 es posible observar el parásito en raspados seriados de la mucosa intestinal (MRSMI) de manera sencilla empleando métodos de tinción corriente.

En relación con el diagnóstico de pododermatitis en un sujeto, ya sea asociada o no a coccidiosis, suele realizarse por inspección visual y radiológica, para valorar el estado de los tejidos blandos y el hueso. La termografía permite detectar la pododermatitis
15 antes de la aparición de lesiones, por la mayor diferencia entre las temperaturas máxima y mínima de la almohadilla plantar y por el patrón térmico. Existen diversos criterios para determinar la gravedad de las lesiones, entre ellos destacan las escala de 3 puntos o la escala de 11 puntos. Otros métodos están basados en la severidad o
20 en el área de la lesión absoluta o relativa. En otros casos, la severidad y la superficie están combinados.

A modo de ejemplo, la severidad de la pododermatitis puede clasificarse en tres tipos.

- Tipo I: Es el inicio de una lesión en la palma de la garra. Normalmente está localizada en un solo dedo. Es de características inflamatorias y aunque muy debilitado, todavía existe un epitelio de cubierta. La lesión puede ser
25 proliferativa o degenerativa con tendencia a la ulceración. Dentro de este tipo no existen signos clínicos de dolor o molestias al principio. Normalmente se diagnostica por inspección rutinaria. No existe una infección clínica aparente
- Tipo II Es un grado más del tipo anterior. Comienza a aparecer signos de infección. En los cultivos normalmente se aísla *Staphylococcus aureus*, *Proteus*
30 *sp* y *E. Coli*. Estos hallazgos de laboratorio confirman el origen epitelial y fecal de estas infecciones. Comienza a aparecer un dolor marcado, con retirada del apoyo en la pata afectada y carga en la otra. (situación que con el tiempo

termina deteriorando ambas extremidades). Aparecen abscesos supurantes y marcada reacción fibrosa de los tejidos.

- Tipo III Es el grado de pododermatitis más avanzado. Se distinguen deformaciones y una reacción fibrosa abundante. Es muy común la aparición de osteomielitis con compromiso articular grave. En estos casos se suelen intentar tratamientos médicos, pero indefectiblemente terminan con la muerte del animal, ya sea por un deterioro progresivo o por eutanasia. Complicaciones graves: osteomielitis, endocarditis valvular.

Así, en formas preferidas de realización, la parte de una planta de maíz enriquecida en antioxidantes o un derivado de la misma o las composiciones de la invención se emplean de acuerdo a la presente invención para el tratamiento de la pododermatitis de tipo I, de tipo II o de tipo III.

En una realización particular, el sujeto a ser tratado es un ave, más particularmente un ave de corral y más particularmente un pollo.

En otra realización particular, la planta de maíz enriquecida en antioxidantes es un maíz transgénico que expresa al menos un gen de la ruta de biosíntesis de carotenoides. En una realización más particular el gen de la ruta de biosíntesis de carotenoides se selecciona entre un gen que codifica la fitoeno sintasa, un gen que codifica una caroteno desaturasa, un gen que codifica una licopeno β -ciclase, un gen que codifica una β -caroteno hidroxilasa, y un gen que codifica una carotenoide cetolasa.

En otra realización la planta de maíz enriquecida en antioxidantes es un maíz transgénico que expresa al menos 2 genes de la ruta de biosíntesis de carotenoides, más particularmente al menos un gen que codifica una fitoeno sintasa y un gen que codifica una caroteno desaturasa; un gen que codifica una fitoeno sintasa y un gen que codifica una licopeno β -ciclase; un gen que codifica una fitoeno sintasa y un gen que codifica una β -caroteno hidroxilasa; un gen que codifica una fitoeno sintasa y un gen que codifica una carotenoide cetolasa; un gen que codifica una caroteno desaturasa y un gen que codifica una licopeno β -ciclase; un gen que codifica una caroteno desaturasa y un gen que codifica una β -caroteno hidroxilasa, un gen que codifica una caroteno desaturasa y un gen que codifica una carotenoide cetolasa; un gen que codifica una licopeno β -ciclase y un gen que codifica una β -caroteno hidroxilasa; un gen que codifica una licopeno β -ciclase y un gen que codifica una

carotenoide cetolasa o al menos un gen que codifica una β -caroteno hidroxilasa y un gen que codifica una carotenoide cetolasa.

En otra realización la planta de maíz enriquecida en antioxidantes es un maíz transgénico que expresa al menos 3 genes de la ruta de biosíntesis de carotenoides, más particularmente al menos un gen que codifica una fitoeno sintasa, un gen que
 5 codifica una caroteno desaturasa y un gen que codifica una licopeno β -ciclase; un gen que codifica una fitoeno sintasa, un gen que codifica una caroteno desaturasa y un gen que codifica una β -caroteno hidroxilasa; un gen que codifica una fitoeno sintasa, un gen que codifica una caroteno desaturasa y un gen que codifica una carotenoide
 10 cetolasa; un gen que codifica una fitoeno sintasa, un gen que codifica una licopeno β -ciclase y un gen que codifica una β -caroteno hidroxilasa; un gen que codifica una fitoeno sintasa, un gen que codifica una licopeno β -ciclase y un gen que codifica una carotenoide cetolasa; un gen que codifica una fitoeno sintasa, un gen que codifica una β -caroteno hidroxilasa y un gen que codifica una carotenoide cetolasa; un gen que
 15 codifica una caroteno desaturasa, un gen que codifica una licopeno β -ciclase y un gen que codifica una β -caroteno hidroxilasa; un gen que codifica una caroteno desaturasa, un gen que codifica una licopeno β -ciclase y un gen que codifica una carotenoide cetolasa; un gen que codifica una caroteno desaturasa, un gen que codifica una β -caroteno hidroxilasa y un gen que codifica una carotenoide cetolasa o al menos un gen
 20 que codifica una licopeno β -ciclase, un gen que codifica una β -caroteno hidroxilasa y un gen que codifica una carotenoide cetolasa.

En otra realización la planta de maíz enriquecida en antioxidantes es un maíz transgénico que expresa al menos 4 genes de la ruta de biosíntesis de carotenoides, más particularmente al menos un gen que codifica una fitoeno sintasa, un gen que
 25 codifica una caroteno desaturasa, un gen que codifica una licopeno β -ciclase y un gen que codifica una β -caroteno hidroxilasa; un gen que codifica una fitoeno sintasa, un gen que codifica una caroteno desaturasa, un gen que codifica una licopeno β -ciclase y un gen que codifica una carotenoide cetolasa; un gen que codifica una fitoeno sintasa, un gen que codifica una caroteno desaturasa, un gen que codifica una β -
 30 caroteno hidroxilasa y un gen que codifica una carotenoide cetolasa; un gen que codifica una fitoeno sintasa, un gen que codifica una licopeno β -ciclase, un gen que codifica una β -caroteno hidroxilasa y un gen que codifica una carotenoide cetolasa o al menos un gen que codifica una caroteno desaturasa, un gen que codifica una licopeno β -ciclase, un gen que codifica una β -caroteno hidroxilasa y un gen que codifica una
 35 carotenoide cetolasa.

En otra realización particular, la planta de maíz enriquecida en antioxidantes es un maíz transgénico que expresa al menos 5 genes de la ruta de biosíntesis de carotenoides, más particularmente un gen que codifica la fitoeno sintasa, un gen que codifica una caroteno desaturasa, un gen que codifica una licopeno β -ciclase, un gen
5 que codifica una β -caroteno hidroxilasa y un gen que codifica una carotenoide cetolasa.

En otra realización particular, el gen que codifica para la fitoeno sintasa tiene la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 1, de *Zea mays*.

En otra realización particular, el gen que codifica una caroteno desaturasa tiene la
10 secuencia mostrada en SEQ ID NO:2 de *Pantoea ananatis*, formalmente *Erwinia uredovora*.

En otra realización particular, el gen que codifica una licopeno β -ciclase tiene la secuencia mostrada en SEQ ID NO:3 de *Gentiana lutea*

En otra realización particular, el gen que codifica una β -caroteno hidroxilasa tiene la
15 secuencia mostrada en SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 12 de *Zea mays* o el gen con secuencia mostrada en SEQ ID NO: 5 de *Gentiana lutea*.

En otra realización particular, el gen que codifica una carotenoide cetolasa tiene la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 6 de *Paracoccus sp* N81106.

Adicionalmente la planta de maíz enriquecida en antioxidantes puede expresar otros
20 transgenes adicionales tales como un transgén la ruta de biosíntesis de vitamina C, particularmente un gen que codifica para la dehidroascorbato reductasa, más particularmente el gen con la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 7 de *E. coli*.

Adicionalmente la planta de maíz enriquecida en antioxidantes puede expresar otros
25 transgenes adicionales tales como un transgén la ruta de biosíntesis de folato, más particularmente el gen con secuencia mostrada en SEQ ID NO: 8 de *Orazy sativa*.

Un experto en la materia conoce las técnicas adecuadas para la generación de plantas transgénicas. Para una revisión de la transferencia génica a plantas, incluyendo vectores, métodos de transferencia de ADN, etc, véase, por ejemplo, Twyman
RM,2004, Handbook of Plant Biotechnology. John Wiley & Sons Inc., NY, pp 263-289,
30 o Komari et al., 2004 Handbook of Plant Biotechnology. John Wiley & Sons Inc., NY, pp 233-262.

Brevemente dichos métodos pueden incluir: 1) empleo de un vector vivo que lleve el material genético a la célula blanco mediante virus genéticamente modificados o el mecanismo natural de infección de la bacteria del suelo *Agrobacterium tumefaciens* 2) 5 El uso de protoplastos, que son células vegetales a las que se les ha liberado de la pared celular, o 3) la biolística que consiste en bombardear las células con partículas metálicas microscópicas recubiertas del ADN que se desea introducir.

En concreto, para la generación de plantas de maíz transgénico se ha propuesto la introducción de ADN en células de maíz incluyendo la electroporación, microinyección, 10 bombardeo con microproyectiles, fusión de liposomas, transferencia mediada por *Agrobacterium*, macroinyección y la exposición a ADN desnudo en solución.

Para lograr que el gen contenido en la molécula de ADN recombinante se exprese en los niveles y en los tejidos adecuados, es deseable, pero no necesario para genes de origen vegetal, que esté contenido en un cassette de expresión que incluya una 15 secuencia promotora de la transcripción funcional en plantas, la parte codificante del gen de interés y un terminador de la transcripción funcional en plantas. Adicionalmente se puede incluir una secuencia que codifique para un péptido de tránsito que dirija la enzima a un compartimiento específico de la célula. El péptido de tránsito y las señales de procesamiento correspondientes puede ser derivado de cualquier proteína 20 vegetal que se sintetiza en el citoplasma y es translocada al compartimiento subcelular de interés, ya sea este el plástido o la mitocondria. Por ejemplo, para localizar en los plástidos pueden ser usadas secuencias derivadas de genes que codifican para la subunidad pequeña de la ribulosa bisfosfato carboxilasa o las proteínas CAB que son aquellas que se unen a las clorofilas a y b para formar las antenas cosechadoras de 25 luz (Van den Broek et al Nature (London) 313, 358-363 (1985)).

Para el caso de genes que no son de origen vegetal, en la secuencia iniciadora de la transcripción se debe incluir un promotor y se puede emplear también una señal de inicio de la traducción óptima para plantas o uno de los llamados potenciadores de la traducción.

30 Los transgenes que pueden emplearse en la presente invención pueden ponerse bajo el control de elementos reguladores que aseguran la expresión en las células de las plantas. En general, tales elementos reguladores comprenden un promotor activo en las células de las plantas.

Por tanto, los promotores que pueden ser usados incluyen promotores de la planta que se desea transformar, promotores de otras plantas o de cualquier origen que sean funcionales en la planta blanco y dirijan una expresión constitutiva, inducible o tejido específica. Por ejemplo, se pueden utilizar promotores derivados del plásmido Ti de *Agrobacterium tumefaciens* como son los promotores de la octopina sintetasa, la nopalina sintetasa o la sgropina Sintetasa. Además, se pueden incluir otros promotores como el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor o aquellos derivados de geminivirus. Para una revisión de promotores útiles puede verse Peremarti A. et al, Plant Mol Biol 73:363–378.

- 5
- 10 La secuenciadora terminadora de la transcripción puede ser derivada del mismo gen de donde se obtuvo la secuencia promotora de la transcripción o de un gen distinto. La secuencia terminadora puede ser derivada de genes contenidos en el T-DNA del plásmido Ti de *Agrobacterium*, del virus del mosaico de la coliflor o de genes de origen vegetal. Por ejemplo, la secuencia terminadora del gen de la nopalina sintetasa es
- 15 frecuentemente usado en la Ingeniería Genética de plantas.

La diferentes secuencias de ácidos nucleicos que forman parte de la molécula de ADN recombinante pueden ser unidas por métodos convencionales descritos en la literatura. Las secuencias deben ser clonadas y unidas en la orientación y orden correcto para lograr la expresión funcional en células vegetales.

- 20 De acuerdo con uno de los aspectos de esta invención, las plantas de interés son transformadas con una molécula de ADN recombinante que codifica al menos una enzima que participa en la biosíntesis de carotenoides. En el desarrollo de la molécula recombinante, las diferentes secuencias nucleotídicas que la componen y que comprenden las secuencias regulatorias de la transcripción y la secuencia codificante
- 25 de interés, pueden haber sido sujetas a diferentes tipos de procesamiento, como son ligaciones, digestiones con enzimas de restricción, mutagénesis *in vitro*, adición de oligonucleótidos o modificaciones por medio de la reacción de polimerización en cadena (PCR). Por lo tanto, los componentes de la molécula recombinante antes de ser unidos pudieron estar sujetos a deleciones, inserciones o modificaciones internas.
- 30 Como la molécula recombinante es derivada de componentes que se originan de diferentes organismos y que han sido aislados, purificados o sintetizados, no es una molécula que existe como tal en la naturaleza.

Dependiendo del método de transformación utilizado para introducir la molécula recombinante a la célula vegetal de interés, puede ser necesario la inclusión de otras

secuencias de ADN. Por ejemplo, es necesario incluir un vector de clonación molecular que permita su replicación en *E. coli* y, para algunos casos, que permita la replicación en *A. tumefaciens*. Para el uso del sistema de transformación genética mediada por el plásmido Ti de *Agrobacterium* para introducir la molécula recombinante en el genoma de la célula vegetal, es necesario incluir las secuencias bordes del T-DNA, de manera tal que estén presentes a ambos extremos del gen que codifica la enzima que sintetiza ácidos orgánicos y en algunos casos el gen de selección dominante. El uso de cepas de *Agrobacterium* desarmadas, es decir aquellas a las que se les han removido los genes responsables de la formación de tumores, pero que mantienen la capacidad de transferir ADN a células vegetales, permite la regeneración de plantas transgénicas que contienen la molécula recombinante de interés.

También generalmente se incluye un gen de selección dominante que permita identificar y seleccionar las células que incorporaron de manera estable la molécula recombinante en su genoma. A modo de ejemplo ilustrativo no limitativo, los genes marcadores pueden ser la mutación *rrn16* (16S rRNA) que confiere resistencia a espectinomicina y estreptinomicina, la mutación *rps12* (ribosoma) que confiere resistencia a estreptinomicina, gen *aadA* (*E. coli*) que codifica la enzima aminoglucósido 3' adeniltransferasa que confiere resistencia a los antibióticos espectinomicina y estreptinomicina, gen *nptII* procedente del transposón bacteriano Tn5 codifica la enzima neomicina fosfotransferasa que confiere resistencia al antibiótico kanamicina, el gen *aphA-6* de *Acinetobacter baumannii* que codifica la enzima aminoglucósido fosfotransferasa la cual le confiere resistencia al antibiótico kanamicina, gen *cat* de *E. coli* confiere resistencia a cloranfenicol, gen ASA2 responsable de la resistencia a análogos del triptófano, el gen *bar* de *Streptomyces hygroscopicus* que codifica para la enzima fosfinotricina acetil transferasa (PAT) que confiere resistencia a fosfinotricina y el gen *pat* de *Streptomyces viridochromogenes* convierten el glufosinato de amonio en nacetil glufosinato que es un compuesto no fitotóxico para la planta.

En una realización preferida el gen de selección es el gen *bar*. En una realización más particular, el gen *bar* tiene la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 9

Dependiendo del tipo de gen de selección que se incluya, puede ser aconsejable que una vez se ha identificado la planta transgénica, se elimine el gen marcador de selección de la planta.

La expresión temporal, inducible o tejido específica puede ser lograda mediante el uso de promotores o secuencias reguladoras que tienen la especificidad de expresión deseada. Con objeto de conseguir la expresión en tejidos específicos de una planta transgénica es posible utilizar promotores específicos de tejido (véase Stockhaus, 5 EMBO J. 8 (1989), 2245-2251). Se conocen también promotores que son específicamente activos en semillas de diferentes especies de plantas, tales como maíz.

En una realización particular el transgén o transgenes se encuentra bajo el control de un promotor específico de endospermo.

10 Promotores específicos de endospermo útiles en la presente invención, son entre otros los promotores de genes que codifican para proteínas de almacenamiento en semillas, Galili y col., 1993, *Trends Cell Biol* 3:437-442. Las prolaminas, son las proteínas de almacenamiento de cereales más abundantes, en maíz las zeínas (zeínas α , β , γ y δ -zeínas, en trigo las gluteninas, en cebada hordeína, secalina en centeno y acenina en 15 avena.

Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de promotores específicos de endospermo que pueden emplearse en la presente invención son entre otros los promotores de glutenina LMW de trigo, hordeína de cebada, prolamina de arroz, glutelina 1 de arroz, zeína de maíz, de zeína 27 Kda, ADP-glucosa pirofosforilasa de arroz, glutelina I de 20 arroz tal y como se describe en Russel DA. et al., *Transgenic research* 6, 157-168 (1997). También son útiles, los promotores de MEG-1 tal y como se describe en EP1680506B1.

En una realización particular el promotor se selecciona del promotor de D-hordeína de cebada con secuencia mostrada en SEQ ID NO: 10 o del promotor de LMW glutenina 25 de trigo con secuencia mostrada en SEQ ID NO: 11 .

En una forma preferida de realización, el gen de la fitoeno sintasa se encuentra bajo control del promotor de la LMW glutenina, preferiblemente del promotor de la LMW glutenina de trigo. En otra forma preferida de realización, el gen de la carotena desaturasa se encuentra bajo control del promotor de la D-hordeína, preferiblemente 30 del promotor de la D-hordeína de cebada.

Los elementos reguladores pueden comprender adicionalmente intensificadores de la transcripción y/o traducción funcionales en las células de las plantas. Adicionalmente, los elementos reguladores pueden incluir señales de terminación de la transcripción,

tales como una señal poli-A, que conducen a la adición de una cola poli-A al transcrito que puede mejorar su estabilidad.

Composiciones de la invención y usos de las mismas

5 En otro aspecto, la invención se relaciona con una composición que comprende una parte de una planta de maíz enriquecida en antioxidantes o un derivado de la misma y un agente anticoccídico.

En una forma preferida de realización, los antioxidantes son carotenoides. En una forma de realización aún más preferida, los carotenoides se seleccionan del grupo formado por β -caroteno, γ -caroteno, α -caroteno, α -criptoxantina, β -criptoxantina, 10 licopeno, luteína y zeaxantina.

En una forma preferida de realización, el maíz enriquecido en antioxidantes es un maíz transgénico que expresa al menos un transgén de la ruta de biosíntesis de carotenoides. En una forma de realización más preferida, el transgén de la ruta de biosíntesis de carotenoides se selecciona de entre un gen que codifica la fitoeno 15 sintasa, un gen que codifica una caroteno desaturasa, un gen que codifica una licopeno β -ciclase, un gen que codifica una β -caroteno hidroxilasa, y un gen que codifica una carotenoide cetolasa o una combinación de los mismos. En otra forma de realización, el transgén que codifica para la fitoeno sintasa tiene la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 1, el transgen que codifica para la caroteno desaturasa tiene 20 la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 2, el transgén que codifica para la licopeno β -ciclase tiene la secuencia mostrada en SEQ ID NO:3, el transgén que codifica para la β -caroteno hidroxilasa tiene la secuencia mostrada en SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5 o SEQ ID NO:12, el transgén que codifica para la carotenoide cetolasa tiene la secuencia mostrada en SEQ ID NO:6. En una forma de realización aún más preferida, la planta 25 de maíz contiene el transgén de que codifica la fitoeno sintasa y el gen que codifica la caroteno desaturasa. Otras combinaciones, tales como las mencionadas en el contexto del uso terapéutico de la invención son igualmente aplicables.

En otra forma preferida de realización, el transgén o transgenes se encuentra o encuentran bajo el control de un promotor específico de endospermo. En una forma de 30 realización más preferida, el promotor específico de endospermo es el promotor de D-hordeína o el promotor de LMW glutenina. En una forma de realización aún más preferida, el promotor de D-hordeína tiene la secuencia mostrada en SEQ ID NO:10 y el promotor de LMW glutenina tiene la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 11. En una

forma de realización aún más preferida, la planta de maíz contiene el transgén de que codifica la fitoeno sintasa bajo el control del promotor de la glutenina LMW y el gen que codifica la caroteno desaturasa bajo el control de la D-hordeina de cebada.

5 En una forma preferida de realización, la parte de la planta de maíz enriquecida en antioxidantes se selecciona del grupo de endospermo y la semilla.

El agente anticoccídico puede seleccionarse entre coccistáticos y coccidiocidas. Con los coccidiostáticos se observa que el crecimiento intracelular de coccidios se detiene, pero su desarrollo puede continuar después de la retirada del medicamento; en el caso de coccidiocidas los coccidios mueren durante su desarrollo al exponerse al fármaco.

10 Algunos fármacos anticoccidicos pueden ser coccidiostáticos cuando se administran a corto plazo, pero coccidicidas cuando se administran a largo plazo. Otra clasificación de los anticoccídicos es por su origen: ionóforos, que son productos de fermentación, y químicos-sintéticos. Entre los ionóforos se encuentran monensina, salinomina, lasalocida, narasina, maduramicina y semduramicina. La monensina, narasina y
15 salinomina son más eficaces en contra de *E.acervulina*, pero poco eficaces en el control de *E. tenella* y *E. maxima*. La lasolacida y maduramicina son efectivos contra *E. tenella*, pero baja efectividad contra *E. acervulina*. La dosis de los ionóforos va dentro del 25-100 ppm, con excepción de la maduramicina que se dosifica a 5 ppm. Entre los compuestos químicos-sintéticos se encuentran amprolio, clopidol y
20 quinolinas (por ejemplo decoquinato, metilbenzocuat), antagonistas del ácido fólico, entre los que se encuentran las sulfonamidas, las 2,4- diaminopirimidinas y el etopabato, hidrobromuro de halofuginona, nicarbazina, nitrobenzamidias (por ejemplo dinitolmida), robenidina, roxarsona, diclazurilo y toltrazurilo.

25 En otro aspecto la invención se relaciona con el uso de una composición que comprende una parte de una planta de maíz enriquecida en antioxidantes o de un derivado de la misma y un agente anticoccídico para la fabricación de un medicamento, composición nutritiva o nutraceutico para la prevención o tratamiento de pododermatitis o úlceras asociadas a coccidiosis en un sujeto.

30 Alternativamente, la invención se relaciona con una composición que comprende una parte de una planta de maíz enriquecida en antioxidantes o de un derivado de la misma y un agente anticoccídico para su uso en la prevención o tratamiento de pododermatitis o úlceras asociadas a coccidiosis en un sujeto.

Composiciones nutraceuticas de la invención, métodos para su preparación y usos de las mismas

En otro aspecto la invención se relaciona con una composición nutritiva o nutraceutica que comprende una parte de una planta de maíz enriquecida en antioxidantes o un
5 derivado de la misma.

La expresión “composición nutritiva o nutraceutico” se usa en el presente documento en un sentido amplio y cubre alimentos para seres humanos así como alimentos para animales de producción (es decir, un pienso). En un aspecto preferido, la composición nutritiva o nutraceutico es para consumo animal. La composición nutritiva o
10 nutraceutico puede estar en forma de una disolución o como un sólido, dependiendo del uso y/o el modo de aplicación y/o el modo de administración.

En una forma preferida de realización, los antioxidantes son carotenoides. En una forma de realización aún más preferida, los carotenoides se seleccionan del grupo formado por β -caroteno, γ -caroteno, α -caroteno, α -criptoxantina, β -criptoxantina,
15 licopeno, luteína y zeaxantina.

En una forma preferida de realización, el maíz enriquecido en antioxidantes es un maíz transgénico que expresa al menos un transgén de la ruta de biosíntesis de carotenoides. En una forma de realización más preferida, el transgén de la ruta de biosíntesis de carotenoides se selecciona de entre un gen que codifica la fitoeno sintasa, un gen que codifica una caroteno desaturasa, un gen que codifica una licopeno β -ciclase, un gen que codifica una β -caroteno hidroxilasa, y un gen que codifica una carotenoide cetolasa o una combinación de los mismos. En otra forma de realización, el transgén que codifica para la fitoeno sintasa tiene la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 1, el transgen que codifica para la caroteno desaturasa tiene
20 la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 2, el transgén que codifica para la lycopeno β -ciclase tiene la secuencia mostrada en SEQ ID NO:3, el transgén que codifica para la β -caroteno hidroxilasa tiene la secuencia mostrada en SEQ ID NO:4, SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO:12,el transgén que codifica para la carotenoide cetolasa tiene la secuencia mostrada en SEQ ID NO:6. En una forma de realización aún más preferida, la planta de maíz contiene el transgén de que codifica la fitoeno sintasa y el gen que codifica la caroteno desaturasa. Otras combinaciones, tales como las mencionadas en el contexto del uso terapéutico de la invención son igualmente aplicables.
30

En otra forma preferida de realización, el transgén o transgenes se encuentra o encuentran bajo el control de un promotor específico de endospermo. En una forma de realización más preferida, el promotor específico de endospermo es el promotor de D-hordeína o el promotor de LMW glutenina. En una forma de realización aún más preferida, el promotor de D-hordeína tiene la secuencia mostrada en SEQ ID NO:10 y el promotor de LMW glutenina tiene la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 11. En una forma de realización aún más preferida, la planta de maíz contiene el transgén de que codifica la fitoeno sintasa bajo el control del promotor de la glutenina LMW y el gen que codifica la caroteno desaturasa bajo el control de la D-hordeína de cebada.

- 5
- 10 En una forma preferida de realización, la parte de la planta de maíz enriquecida en antioxidantes se selecciona del grupo de endospermo y la semilla.

Las composiciones de la invención o nutracéuticos pueden estar en una forma líquida, semisólida o sólida. En una realización particular las composiciones o nutracéutico de la invención se encuentran en forma sólida y más particularmente es un pienso.

- 15 Las composiciones nutritivas o nutracéuticas de la invención pueden formularse con los excipientes y adyuvantes usuales para las composiciones orales o suplementos alimentarios, como por ejemplo y sin sentido limitativo, componentes grasos, componentes acuosos, humectantes, conservantes, agentes texturizantes, sabores, aromas, antioxidantes y colorantes comunes en el sector alimentario.

- 20 Las composiciones nutritivas o nutracéuticas de la invención comprenden al menos un 0,01 % de la parte de una parte de una planta enriquecida en antioxidantes o derivado de la misma, más preferiblemente al menos un 0,10%, 0,50%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 15% 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, o, al menos un 95%.

- 25 Las necesidades nutritivas de los animales son bien conocidas en el estado de la técnica. Por ejemplo, las necesidades nutritivas de las aves de corral son descritas en Gail Damerow The Chicken Encyclopedia: An Illustrated Reference. Storey Publishing. pp. 118–119, 135–136 y en el libro Animal Nutrition handbook, sección 12 páginas 316-331.

- 30 Composiciones nutritivas útiles para la alimentación de aves de corral, y en concreto de engorde para pollos de carne o broilers, de cría de pollitas (semanas 0 a 8), de recría para pollitas (semana 9 -20) o puesta a partir de la semana 21^a son conocidas en el estado de la técnica, por ejemplo en ES2051706T3.

Según la invención, las composiciones o nutrácéutico de la invención son útiles para el tratamiento y prevención de coccidiosis, pododermatitis y úlceras. Por tanto la parte de una planta de maíz enriquecida en antioxidantes o un derivado de la misma debe encontrarse en una cantidad terapéuticamente eficaz.

- 5 En una realización particular, la composición nutritiva o nutrácéutico de la invención comprende granos de maíz en al menos un 40%, preferiblemente más de un 50%, más preferiblemente más de un 60%.

En otro aspecto, la invención se relaciona con el uso de una parte de una planta de maíz enriquecida en antioxidantes o un derivado de la misma para la obtención de una
10 composición nutritiva o nutrácéutico.

La composición nutritiva o nutrácéutico de acuerdo a la presente invención se puede preparar a partir directamente de la parte de la planta enriquecida en carotenoides. En una forma preferida de realización, la parte de la planta es el endospermo o granos de maíz, en cuyo caso dicha composición contiene al menos un 40%, preferiblemente
15 más de un 50% o más preferiblemente más de un 60%.

Alternativamente, la parte de la planta que se usa para preparar la composición nutritiva o el nutrácéutico de acuerdo a la presente invención puede someterse a una purificación parcial para obtener un derivado enriquecido en el producto antioxidante. Así, en el caso de que los compuestos antioxidantes sean carotenoides y que la parte
20 de la planta que se usa sea el endospermo, la composición nutritiva o el nutrácéutico contienen un extracto de granos de maíz o de endospermo que puede encontrarse parcial- o totalmente purificado de forma que el contenido en carotenoides sea superior al que aparece en la parte de la planta de maíz enriquecida. Derivados de maíz que se pueden usar en la presente invención incluyen harina de maíz, salvado de
25 maíz, aceite de maíz, almidón de maíz, sirope de maíz, y similares.

Así, por ejemplo, de acuerdo a la presente invención, es posible extraer los carotenoides presentes en la parte de las plantas de maíz o derivados de la misma para obtener una composición nutritiva o nutrácéutico.

El experto en la materia conoce diversos métodos para extraer carotenoides de una
30 parte de una planta de maíz, tal y como extracción a partir de endospermos congelados y HPLC, tal y como se describe en Naqvi S. et al., PNAS 2009, vol. 106, no 19.

Se ha comprobado que los carotenoides potencian tanto las funciones inmunológicas específicas como las no específicas. Diversas reacciones de modulación inmunológicas pueden aumentar la actividad tumoricida de las células T citotóxicas, los macrófagos y/o las células asesinas naturales y fomentar las funciones antimicrobianas inmunológicas. Por ejemplo, el beta-caroteno puede reducir la incidencia de sucesos cardiovasculares, habiéndose demostrado en estudios clínicos (Gaziano JM. et al., Circulation 82:201-204). Adicionalmente los grupos de población que consumen alimentos ricos en beta-caroteno están más protegidos contra los cánceres de piel y pulmón, particularmente los fumadores. Se han propuesto varios mecanismos para explicar la actividad fisiológica de los carotenoides. La más plausible se basa en el fuerte carácter antioxidante y en su capacidad para desactivar sustancias químicas perjudiciales como el oxígeno singlete, los radicales libres y los radicales peróxido lipídicos. También hay evidencia de que varios carotenoides producen una estimulación directa del sistema inmunológico y de la respuesta inmunológica.

Como entenderá un experto en la materia, la composición nutritiva o nutracéutico de la invención deben cumplir las normativas y legislación alimentaria del país.

Existen diversos métodos conocidos para la elaboración de composiciones nutritivas y nutracéuticos ampliamente conocidas por el experto en la materia y que pueden emplearse en la presente invención.

La invención se describe ahora en detalle por medio de los siguientes ejemplos que se deben considerar como meramente ilustrativos y no limitantes del ámbito de la invención.

Materiales y métodos

25 *Alimentación y animales*

Pollos comerciales de tipo broilers se criaron en las instalaciones de la Universidad de Lleida (España). Se utilizaron piensos a base de maíz rico en carotenoides y antioxidantes, según se describe en Naqvi S. et al, PNAS vol,. 106, no. 19 páginas 7762-7767) y su isogénico control (wild type). A los 35 días de edad, los animales fueron sacrificados siguiendo las normas de bienestar animal y se necropsiaron. Se recogieron muestras de sangre para análisis bioquímicos y estudios inmunológicos. Se recogieron muestras de carne y piel de la pechuga, carne y piel del muslo, piel de

las patas, la cresta y la grasa abdominal, que se congelaron y liofilizaron para el análisis de carotenoides.

Mediciones

Se midió el color de la carne y la piel de la pechuga, muslo y pata en las canales de
5 pollo mediante un espectrofotómetro CM-700d portátil compacto, Konica Minolta (Japón). El color de cada muestra se midió por el sistema CIELAB tricromático mediante los valores de luminosidad (L), rojos (a) y la amarillos (b). Para el color de la pata también se ha utilizado el clásico abanico de la escala Roche.

Para el análisis de los carotenoides totales, las muestras liofilizadas se extrajeron en
10 20 ml de 50/50 (v/v) de tetrahidrofurano y metanol a 60 °C durante 15-20 min y se cuantificaron midiendo la absorbancia a 450 nm. Para la separación por HPLC, el disolvente se evaporó bajo una corriente de gas nitrógeno a 37 °C, se volvió a disolver en 50 µL de acetona, y una alícuota de 20 µL se inyectó inmediatamente. Las muestras se separaron en una columna Nucleosil C18 de 3-µ con acetonitrilo/ metanol/
15 2 - propanol (85:15:5 , v/v/v) como fase móvil a 25 ° C. En cada caso, la zeaxantina y la luteína se separaron en tramos paralelos en una columna C18 Vydac 218TP54, con metanol que contiene 2 % de agua como fase móvil Romer et al.,2002 Metab. Eng. 4:263–272). Las muestras fueron monitorizadas con una Kontron DAD detector de matriz de fotodiodos 440 con el registro en línea de las medidas. Todos los
20 carotenoides se identificaron por la co-cromatografía con compuestos auténticos de referencia, que fueron biosintetizados en *E. coli* como se describe en Sandmann G.et.al. 2002 Chem. Bio.Chem. 3, 629–635. y la comparación de sus medidas. Estas muestras de referencia también se utilizaron para la cuantificación en combinación con los coeficientes de extinción de Davies B.H. 1976, Chemistry and biochemistry of plant
25 pigments, vol. 2. Academic Press, Inc. (London), Ltd., London.

Desafío con E. tenella

Se criaron 4 grupos de pollos con 14 animales por grupo, y dos grupos se alimentaron con cada una de las dietas y un grupo de cada dieta fue desafiado con *E. tenella*. El desafío con *E. tenella* se llevó a cabo a los 13 días de edad con 3×10^4 ooquistes
30 esporulados de *E. tenella* Houghton, cepa de HIPRA, España. Todos los pollos se pesaron individualmente en el momento de llegada y luego semanalmente. El color de las patas de todos los animales (en el momento de su sacrificio: 8 animales a los 19 días de edad y 6 animales a los 22 días de edad) de todos los grupos se registraron

regularmente y las lesiones (pododermatitis) y las úlceras se contabilizaron el día de su sacrificio (Welfare Quality ® 2009). Ver Tabla 1 y Figuras 1 y 2.

El color de la caña de la pata también se determinó como se describe anteriormente. Los recuentos de ooquistes se determinaron en muestras de heces recogidas
5 diariamente de cada grupo desde el día 6 al día 9 después de la infección. La recogida de heces para su análisis de ooquistes se hizo dos veces al día. Para el recuento de ooquistes se utilizó una solución saturada de NaCl y cámaras de McMaster y los resultados se presentan como el número de ooquistes por gramo de heces frescas. Ver Tabla 2 y Figura 3.

10 La bolsa de Fabricio, el hígado y el ciego se recogieron y se fijaron en formaldehído al 4% tamponado y se procesaron en parafina para su estudio histopatológico.

EJEMPLO 1

Los resultados demuestran que el maíz rico en antioxidantes reduce la excreción de ooquistes de coccidios en animales infectados, reduce la pododermatitis y las úlceras
15 digitales en las patas de los pollos.

La reducción de la pododermatitis y las úlceras en las patas se puede producir no sólo en animales afectados de coccidiosis, sino también entre las enfermedades o condiciones que pueden causar diarrea en aves domésticas como el estrés por frío o calor, bacterias o virus (colibacilosis, leucosis linfoide, enfermedad de Marek),
20 parásitos (Ascardiasis o Capilariasis) etc. La reducción de pododermatitis, las úlceras digitales y la excreción de ooquistes de coccidios también se puede esperar en otras especies animales y posiblemente en humanos.

La histopatología de la bolsa de Fabricio indica que los animales infectados con *Eimeria* y alimentados con la dieta de maíz rico en antioxidantes tuvieron una mejor
25 protección e inmunidad que los animales alimentados con la dieta control, lo cual puede indicar que lo mismo puede ocurrir con otras enfermedades.

Los resultados también demuestran que, incluso en ausencia de infección, los animales del grupo alimentado con la dieta de maíz rico en antioxidantes presentaban una significativa reducción de pododermatitis y úlceras digitales en comparación con
30 el grupo de animales alimentados con la dieta de control (véase T1 y T3 de la Tabla 1).

Grupo	Desafío	Nivel de pododermatitis	Número de úlceras
T1- Dieta Control	No	0,93±0,07 a	2,29±0,44 a**
T3 - Dieta Antiox.	No	0,50±0,14 c	0,79±0,21 c
T2 -Dieta Control	Si	2,43±0,25 b	6,50±0,49 b
T4 - Dieta Antiox	Si	1,30±0,33 a	2,54±0,57 a

Tabla 1. Media±ES de la pododermatitis y número de úlceras plantares de acuerdo a: Welfare Quality ® (2009). Protocolo de evaluación para aves (pollos de engorde, gallinas ponedoras) Welfare Quality ®. Welfare Quality ® Consorcio, Lelystad, Países Bajos. Los datos obtenidos son de 14 animales/grupo. T1: dieta control no infectados, T2: dieta control desafiados con *E. tenella*, T3: dieta de maíz rico en carotenoides no infectado, T4: dieta de maíz rico en carotenoides desafiado con *E. tenella*. a, b, c: Los valores en la misma columna con una letra en común no difieren significativamente. La significación de los datos es la siguiente: **: 0,01> P> 0,001. Prueba de Duncan.

Según esta Tabla 1, se observan diferencias significativas en el nivel de pododermatitis y la cantidad de úlceras entre los grupos no infectados (T1 y T3) lo que indica que la dieta antioxidante incluso en animales no infectados mejora su estado sanitario y su bienestar. Comparando los grupos infectados entre sí, se observan más diferencias significativas importantes con menos pododermatitis y lesiones en el grupo de dieta antioxidante (T2 y T4).

Días post-infección	Ooquistes/g heces T2 (x1000)	Ooquistes/g heces T4 (x1000)
6	132,8±2,9	87±1.2 *
7	223,2±8,6	241.8±3.5
8	29,0±0,7	32,0±1,5
9	56,9±4,3	14,2±0,9 *

Tabla 2. Recuento de ooquistes utilizando solución saturada de NaCl en cámaras de McMaster. Se presentan como el número de ooquistes por gramo de heces. Los datos se obtienen de la mezcla de las heces de todos los animales del grupo y repetido 4 veces. T2: dieta control desafiados con *E. tenella*, T4: dieta de maíz rico en carotenoides desafiado con *E. tenella*. (Los grupos no infectados T1 y T3 fueron negativos y no se presentan en la tabla). *: T4 difiere significativamente de T2 (P <0,05).

5

10

El descenso de ooquistes en los días 8 y 9 después de la infección puede estar relacionado con el ciclo del parásito. Después de la infección, el ciclo de estos protozoos se inicia con la fase asexual (esquizogonia) seguido de la fase sexual (gametogonia) que termina con la expulsión de los ooquistes a través de las heces.

15

Los ooquistes esporulan (esporogonia) en pocos días en el exterior entre las heces y la cama dependiendo de la temperatura y la humedad. La ingestión de un elevado número de nuevos ooquistes esporulados inicia un ciclo nuevo masivo y una nueva ola de ooquistes que se excretan por las heces de nuevo. El grupo con dieta control puede haber iniciado una nueva ola de excreción de ooquistes en el día 9 post infección, pero el grupo de la dieta rica en antioxidantes puede haber mejorado su inmunidad y esta nueva ola puede haberse retrasado o reducido. Podemos especular que en el primer ciclo, la inmunidad específica a los coccidios es similar en ambos tratamientos, pero en el segundo ciclo el grupo con dieta a base de maíz rico en antioxidantes puede haber mejorado la inmunidad humoral.

20

25

Los niveles de retinol en el suero de los animales alimentados con la dieta rica en carotenoides eran casi el doble que los de dieta control, lo que confirma la conversión efectiva de los carotenoides de la provitamina A en vitamina A. Ver Tabla 3.

	Dieta control	Dieta con Antiox.	P
Retinol	0,54±0,02	0,95±0,03	0,0001***

Tabla 3. Los niveles de retinol en el suero de los pollos alimentados con dieta control y con el maíz rico en antioxidantes.

***: 0.001> P> 0,0001 carotenoides de sangre (g / ml de suero)

Grupo	Desafío	Vacuolización Medular	Vacuolización Cortical
T1- Dieta Control	No	0±0. <u>C</u>	0±0 c
T3 - Dieta Antiox.	No	2,28±0,30 c b	2,12± 0,34 c b
T2 - Dieta Control	Si	11,94±2,33 a	12,54± 1,46 a
T4 - Dieta Antiox	Si	5,38±0,22 b	4,32± 0,12 b

Tabla 4. La cuantificación de la vacuolización medular y cortical. Los datos son la media del número de vacuolas en 10 campos de microscopía 40x de 5 animales / grupo. T1: dieta control no infectados, T2: dieta control desafiados con *E. tenella*, T3: dieta de maíz rico en carotenoides no infectado, T4: dieta de maíz rico en carotenoides desafiado con *E. tenella*. a, b, c: Los valores en la misma columna con una letra en común no difieren significativamente. La significación de los datos es la siguiente: *: 0,05>P>0,01.

El término “Sequence listing” en la lista de secuencias se refiere a “Lista de secuencias”, “Artificial Sequence” a “Secuencia artificial” y el término “DNA” se refiere a “ADN” y “misc feature” se refiere a característica miscelánea.

REIVINDICACIONES

1. Uso de una parte de una planta de maíz enriquecida en antioxidantes o de un derivado de la misma, para la fabricación de un medicamento, composición nutritiva o nutracéutico para la prevención o tratamiento de coccidiosis en un sujeto.
5
2. Uso de una parte de una planta de maíz enriquecida en antioxidantes o de un derivado de la misma para la fabricación de un medicamento, composición nutritiva o nutracéutico para la prevención o tratamiento de pododermatitis o úlceras en un sujeto.
10
3. Uso según las reivindicaciones 1 o 2 en donde los antioxidantes son carotenoides.
4. Uso según la reivindicación 3 en donde los carotenoides se seleccionan del grupo formado por β -caroteno, γ -caroteno, α -caroteno, α -criptoxantina, β -criptoxantina, licopeno, luteína y zeaxantina.
15
5. Uso según la reivindicación 4 en donde la planta de maíz enriquecida en antioxidantes es una planta de maíz transgénica que expresa al menos un transgén de la ruta de biosíntesis de carotenoides.
20
6. Uso según la reivindicación 5 en donde el transgén de la ruta de biosíntesis de carotenoides se selecciona de entre un gen que codifica la fitoeno sintasa, un gen que codifica una caroteno desaturasa, un gen que codifica una licopeno β -ciclase, un gen que codifica una β -caroteno hidroxilasa, y un gen que codifica una carotenoide cetolasa.
25
7. Uso según la reivindicación 6 en donde el transgén que codifica para la fitoeno sintasa tiene la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 1, el transgen que codifica para la caroteno desaturasa tiene la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 2, el transgén que codifica para la lycopeno β -ciclase tiene la secuencia mostrada en SEQ ID NO:3, el transgén que codifica para la β -caroteno hidroxilasa tiene la secuencia mostrada en SEQ ID NO:4, SE ID NO:5 o SEQ ID NO:12 ,el transgén que codifica para la carotenoide cetolasa tiene la secuencia mostrada en SEQ ID
30
35 NO:6.

8. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7 en donde el transgén se encuentra bajo el control de un promotor específico de endospermo.
- 5 9. Uso según la reivindicación 8 en donde el promotor específico de endospermo es el promotor de D-hordeína o el promotor de LMW glutenina.
10. Uso según la reivindicación 9 en donde el promotor de D-hordeína tiene la secuencia mostrada en SEQ ID NO:10 y el promotor de LMW glutenina tiene la
10 secuencia mostrada en SEQ ID NO: 11.
11. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 en donde la parte de la planta de maíz enriquecida en antioxidantes se selecciona del grupo de endospermo y semilla.
- 15
12. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 en donde la coccidiosis es causada por *Eimeria*.
13. Uso según la reivindicación 12 en donde la coccidiosis es causada por *E. tenella*.
- 20
14. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 en donde el sujeto es un ave.
15. Uso según la reivindicación 14 en donde el ave es un ave de corral.
- 25
16. Uso según la reivindicación 15 en donde el ave de corral es pollo.
17. Composición que comprende una parte de una planta de maíz enriquecida en antioxidantes o un derivado de la misma y un agente anticoccídico.
- 30
18. Composición según la reivindicación 17 en donde los antioxidantes son carotenoides.
- 35
19. Composición según la reivindicación 18 en donde los carotenoides se seleccionan del grupo formado por β -caroteno, γ -caroteno, α -caroteno, α -criptoxantina, β -criptoxantina, licopeno, luteína y zeaxantina.

20. Composición según la reivindicación 19 en donde la planta de maíz enriquecida en antioxidantes es una planta de maíz transgénica que expresa al menos un transgén de la ruta de biosíntesis de carotenoides.
- 5 21. Composición según la reivindicación 20 en donde el transgén de la ruta de biosíntesis de carotenoides se selecciona de entre un gen que codifica la fitoeno sintasa, un gen que codifica una caroteno desaturasa, un gen que codifica una licopeno β -ciclasa, un gen que codifica una β -caroteno hidroxilasa, y un gen que codifica una carotenoide cetolasa.
- 10 22. Composición según la reivindicación 21 en donde el transgén que codifica para la fitoeno sintasa tiene la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 1, el transgen que codifica para la caroteno desaturasa tiene la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 2, el transgén que codifica para la lycopeno β -ciclasa tiene la secuencia mostrada en
- 15 SEQ ID NO:3, el transgén que codifica para la β -caroteno hidroxilasa tiene la secuencia mostrada en SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5 o SEQ ID NO:12 ,el transgén que codifica para la carotenoide cetolasa tiene la secuencia mostrada en SEQ ID NO:6.
- 20 23. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 20 a 22 en donde el transgén se encuentra bajo el control de un promotor específico de endospermo.
24. Composición según la reivindicación 23 en donde el promotor específico de endospermo es el promotor de D-hordeína o el promotor de LMW glutenina.
- 25 25. Composición según la reivindicación 24 en donde el promotor de D-hordeína tiene la secuencia mostrada en SEQ ID NO:10 y el promotor de LMW glutenina tiene la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 11.
- 30 26. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 17 a 25 en donde la parte de la planta de maíz enriquecida en antioxidantes se selecciona del grupo de endospermo y la semilla.
- 35 27. Uso de la composición cualquiera de las reivindicaciones 17 a 26 para la fabricación de un medicamento, composición nutritiva o nutracéutico para la

prevención o el tratamiento de coccidiosis en un sujeto o para la prevención o tratamiento de pododermatitis o úlceras asociadas a coccidiosis en un sujeto.

5 28. Uso de una parte de una planta de maíz enriquecida en antioxidantes o un derivado de la misma para la obtención de una composición nutritiva o nutracéutico.

29. Uso según la reivindicación 28 en donde los antioxidantes son carotenoides.

10 30. Uso o composición según la reivindicación 29 en donde los carotenoides se seleccionan del grupo formado por β -caroteno, γ -caroteno, α -caroteno, α -criptoxantina, β -criptoxantina, licopeno, luteína y zeaxantina.

15 31. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 29 a 30 en donde el maíz enriquecido en antioxidantes es un maíz transgénico que expresa al menos un transgén de la ruta de biosíntesis de carotenoides.

20 32. Uso según la reivindicación 31 en donde el transgén de la ruta de biosíntesis de carotenoides se selecciona de entre un gen que codifica la fitoeno sintasa, un gen que codifica una caroteno desaturasa, un gen que codifica una licopeno β -ciclase, un gen que codifica una β -caroteno hidroxilasa, y un gen que codifica una carotenoide cetolasa.

25 33. Uso según la reivindicación 32 en donde el transgén que codifica para la fitoeno sintasa tiene la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 1, el transgen que codifica para la caroteno desaturasa tiene la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 2, el transgén que codifica para la lycopeno β -ciclase tiene la secuencia mostrada en SEQ ID NO:3, el transgén que codifica para la β -caroteno hidroxilasa tiene la secuencia mostrada en SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5 o SEQ ID NO:12 ,el transgén
30 que codifica para la carotenoide cetolasa tiene la secuencia mostrada en SEQ ID NO:6.

34. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 31 a 33 en donde el transgén se encuentra bajo el control de un promotor específico de endospermo.

35

35. Uso según la reivindicación 34 en donde el promotor específico de endospermo es el promotor de D-hordeína o el promotor de LMW glutenina.
- 5 36. Uso según la reivindicación 35 en donde el promotor de D-hordeína tiene la secuencia mostrada en SEQ ID NO:10 y el promotor de LMW glutenina tiene la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 11.
- 10 37. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 28 a 36 en donde la parte de la planta de maíz enriquecida en antioxidantes es el endospermo o la semilla o derivados de los mismos.
38. Composición nutritiva o nutracéutico que comprende una parte de una planta de maíz enriquecida en antioxidantes o un derivado de la misma.
- 15 39. Composición según la reivindicación 38 en donde los antioxidantes son carotenoides.
40. Composición según la reivindicación 39 en donde los carotenoides se seleccionan del grupo formado por β -caroteno, γ -caroteno, α -caroteno, α -criptoxantina, β -criptoxantina, licopeno, luteína y zeaxantina.
- 20 41. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 38 a 40 en donde el maíz enriquecido en antioxidantes es un maíz transgénico que expresa al menos un transgén de la ruta de biosíntesis de carotenoides.
- 25 42. Composición según la reivindicación 41 en donde el transgén de la ruta de biosíntesis de carotenoides se selecciona de entre un gen que codifica la fitoeno sintasa, un gen que codifica una caroteno desaturasa, un gen que codifica una licopeno β -ciclase, un gen que codifica una β -caroteno hidroxilasa, y un gen que
- 30 codifica una carotenoide cetolasa.
43. Composición según la reivindicación 42 en donde el transgén que codifica para la fitoeno sintasa tiene la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 1, el transgen que codifica para la caroteno desaturasa tiene la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 2, el transgén que codifica para la licopeno β -ciclase tiene la secuencia mostrada en
- 35 SEQ ID NO:3, el transgén que codifica para la β -caroteno hidroxilasa tiene la

secuencia mostrada en SEQ ID NO:4 , SEQ ID NO:5 o SEQ ID NO:12,el transgén que codifica para la carotenoide cetolasa tiene la secuencia mostrada en SEQ ID NO:6.

5 44. Composición según de las reivindicaciones 41 a 43 en donde el transgén se encuentra bajo el control de un promotor específico de endospermo.

45. Composición según la reivindicación 44 en donde el promotor específico de endospermo es el promotor de D-hordeína o el promotor de LMW glutenina.

10

46. Composición según la reivindicación 45 en donde el promotor de D-hordeína tiene la secuencia mostrada en SEQ ID NO:10 y el promotor de LMW glutenina tiene la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 11.

15 47. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 38 a 46 en donde la parte de la planta de maíz enriquecida en antioxidantes es el endospermo o la semilla o derivados de los mismos.

PODODERMATITIS

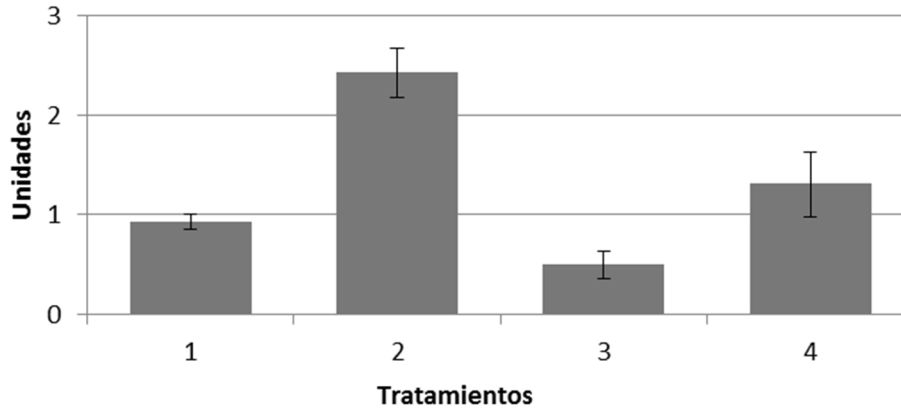


Fig. 1

ULCERAS

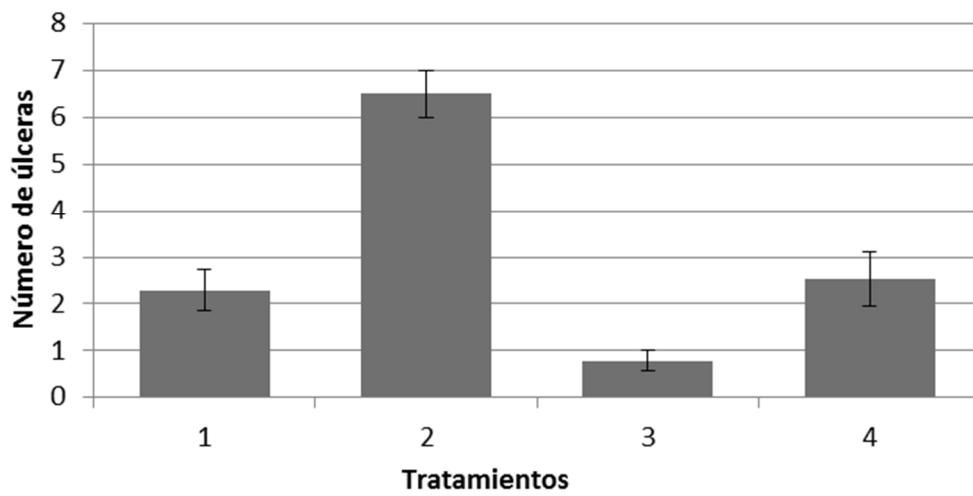


Fig. 2

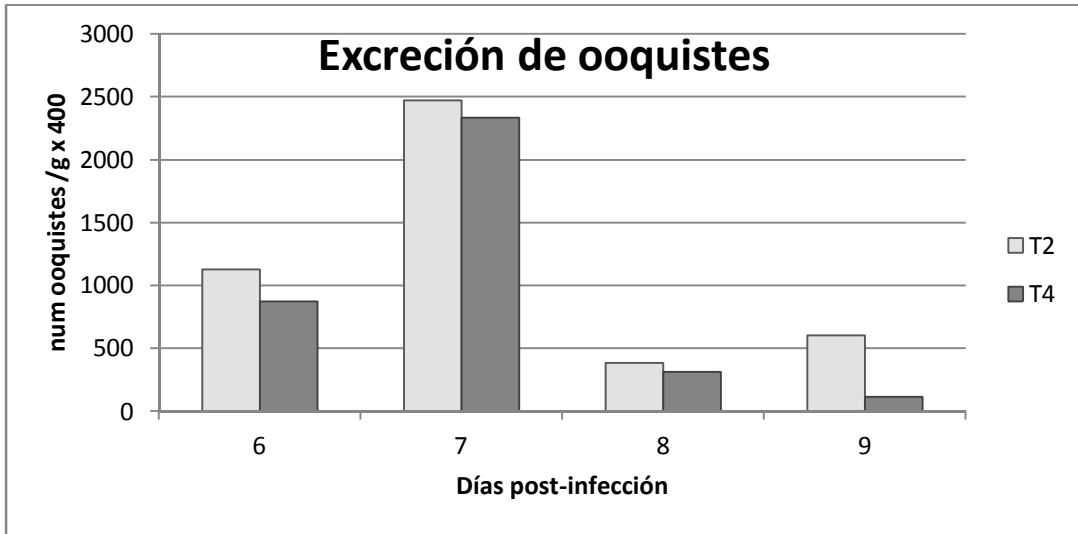


Fig. 3

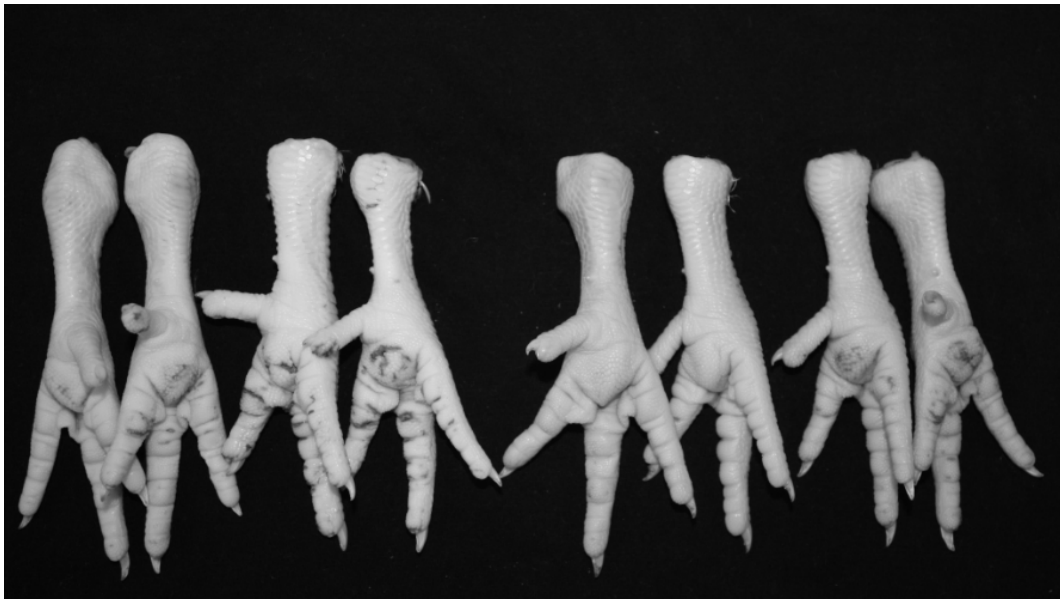


Fig. 4

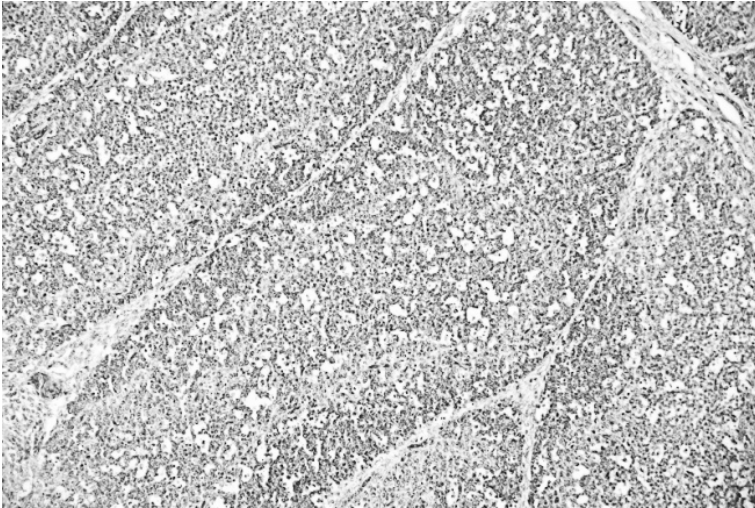


Fig. 5

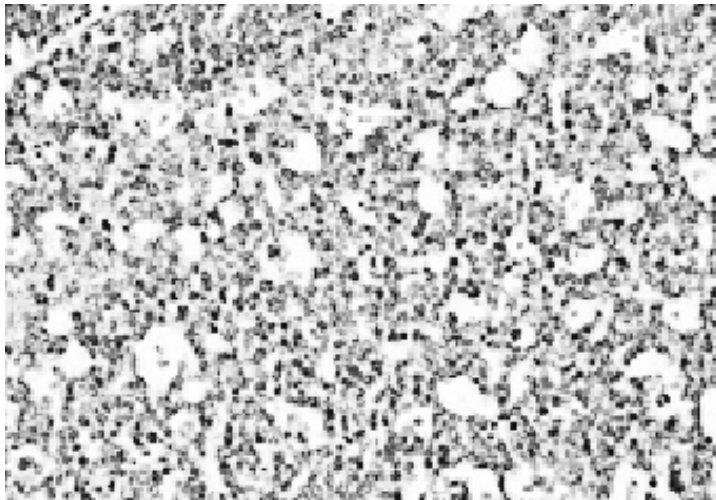


Fig. 6



Fig. 7

Listado de Secuencias

<110> UNIVERSITAT DE LLEIDA
 5 CENTRE DE RECERCA EN AGROTECNOLOGIA-AGROTECNIO
 INSTITUCIÓ CATALANA DE RECERCA I ESTUDIS AVANÇATS

<120> MÉTODO DE TRATAMIENTO DE COCCIDIOSIS

<130> P10337ES00

10 <160> 12

<170> PatentIn version 3.5

15 <210> 1
 <211> 4945
 <212> DNA
 <213> Zea mays

20 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (4944)..(4944)
 <223> n i s a , c , g , o r t

25 <400> 1
 aaaagaaaag aaaaggcaga gccgtaaacg gtaatttatt atacacataa taaataggta 60
 ataagctact ccttcttctg ctaagttaaa attaaattcg ttttagttaa ttaatagatt 120
 30 catataatac ttgatgttga tctatgtggt ttatatgcgt ctagattcat cttcatctat 180
 ttgaatatag acataaaaaat caagagctaa aataactact attttggtat tttggaatgg 240
 agggagtaat agacgacaag tgagcctggt gagttacctg aaacaaaca agccagcaga 300
 35 gccagaggtc gcggtctatg tagtctgact gccatgcatg tcaccgctgg tgtggggggc 360
 gccagcagc cacgtcggac aggagcagcc aggggtgaatc cggccttttc cagggtgtcac 420
 40 cactcagcgt cctccgaaca caggagagtc atgcatgctg agcttgccga taagcttacc 480
 tatccgcacc gcgtcttctt tctcctctgg cgaccggccc ttcttctctc cacgtctctc 540
 ccgccttctt tctccagacc gagcgtacgt atgctacaca cagcaacagc acaacagtac 600
 45 tagttccacc acaagaagat gcccaatgcc aagaaataac ccatgcttct tgtcgcagat 660
 ccagccgcac tagagatggc caaacggggc ggcccggccc ggcccggccc gggcccgggtg 720
 50 aagcccggcc aaaaccgggc cgggcctgct gagccagcgg gcttaagttt ctgtccaagc 780
 ccggcccgc gcgggcctaa acaggccggg ccggcccgtt tagcacgaaa aaacggggcca 840

ES 2 501 367 A2

aaaagcgggc taaacggggc ggtaagcacg ttttagtgta aaaaaaacgg gcttaacggg 900
 cttagaggta aacggggccgt gccgggctag cccgccgtgc ctagtttctt gtccaagccc 960
 5 gcccgcttat tctaccgtgc cgggctcggg cggggcccaa aaagcgggct tcgtgccggg 1020
 ctcacggggc tcgtgctttt tggccatcta tgagccgcac acttagcata catacgcaag 1080
 10 aagaggagag gccggagggtg cgcgtgctcc ttgctgttct gctgactggt ctcaccatct 1140
 catcccacca ccaccaccac caccaccatc tttaggataa gatagcaaat atatggccat 1200
 catactcgta cgagcagcgt cgccggggct ctccgccgcc gacagcatca gccaccaggg 1260
 15 gactctccag tgctccacc tgctcaagac gaagaggccg gcggcgcgcc ggtggatgcc 1320
 ctgctcgctc cttggcctcc acccgtggga ggctggccgt ccctcccccg ccgtctactc 1380
 20 cagcctcgcc gtcaaccocg cgggagaggc cgtcgtctcg tccgagcaga aggtctacga 1440
 cgtcgtgctc aagcaggccg cattgctcaa acgccagctg cgcacgccgg tcctcgacgc 1500
 caggccccag gacatggaca tgccacgcaa cgggctcaag gaagcctacg accgctgcgg 1560
 25 cgagatctgt gaggagtatg ccaagacggt ttacctcggg acgtacggta tatatatggg 1620
 atccatcttc ttctccaatt ccacaatctc atcgtttcag tctgcttcca tcaactatgc 1680
 30 tactagttcg tcgcaggaac tatgttgatg acagaggagc ggcgccgcgc catatggggc 1740
 atctatggta tctgtctgtc tcaaatacaa taatcaccat gcatgtatcc ctccaatgta 1800
 tcagtacat tgctcatacc tagctagtag catgttacgt acggagtatc aatcagtaaa 1860
 35 tttcagaatg gctactactg gaactggatg cgtgtacta gctagtatgt ttccctactt 1920
 aatatataac gtagatacgc acttctgact taattatgct gctgtggcaa aaggattttt 1980
 40 tttttttact ttaacagcag attccaacaa taacagtgca aaattgggct acttttcaag 2040
 taatggtaac aactagcagc tcccagtgga aattaacaat attgaaaaaa gaaacactgc 2100
 tgacttccat gaaggccatt cgtgagtcaa tgggtaataa aggtttaatg cgctttatgt 2160
 45 tgtatgtgga agcaccaaaa taggctttcg gtagcctaaa ttgctactaa atggcttgat 2220
 caatacttga agaccatgtg gaaagttata agaacatatt ctttatagtt caaactaccc 2280
 50 ttttaggaata tgaatctcaa gtattggcaa ttttaaacga aacttcagg cacggtatct 2340
 gacgggtatt gtttctgcag tgtgggtgtag gaggacagat gagctttag atgggcaaaa 2400

ES 2 501 367 A2

cgccaactac attacaccaa cagctttgga cgggtgggag aagagacttg aggatctggt 2460
 cacgggacgt ccttacgaca tgcttgatgc cgctctctct gataccatct caaggttccc 2520
 5 catagacatt caggtactga ctgccttacg ggctgctgta cctagcggat tcattccact 2580
 gatatgacac ttttgactg cagttattga tatttctaac cagcattaga ttctctagct 2640
 10 aggcctcact gtttttagtg caggatgact agacctactg agttgacaag aagctagcag 2700
 aaattgtttt gtttactcaa ctgaatctta agattttttc aacctttagt ctcttctagc 2760
 aatgcttttg tttggttcaa tgaaccttgc gcatatcgta gtggtcctag tctagttata 2820
 15 tggaccagga cccaggagag gtgtttgggt caaagctggt tcaatgtaac ttttttttaa 2880
 ataaaaaatg aactgtttct agagctcagc cctcacagca aaacttggag cgagaggcaa 2940
 20 taatttgaat attacatggc cttggtaatg tgaattaatt agttgggtcta tccttagttg 3000
 gtccgacctt ttaagaaaca aaaggtaact gtatgaccag cgcagaagaa aataggatct 3060
 agatgatgat tgagagagaa acgttttcagg gggaaaaaat ccaatcaatt aaaaattaga 3120
 25 cctgggaaca ttggcagatc gatctagagg gtggacaagg tgggctgatt ttgatcctgc 3180
 taaattatat agatagtttt gatttatttg ctacttttga ttctcatacg ttgtagaact 3240
 30 taaaatgtga actcatttgt ttattgattc tcataagggt ggaccacctt aactttaaat 3300
 cctagatttg cactgggaa gtgaccgaga gaaaactatc tgtgccactt agtggtttga 3360
 taaactatgt tgtgatacca agttaccaac gttttgaaat caataaatgt tgtggcagcc 3420
 35 attcagggac atgattgaag ggatgaggag tgatcttagg aagacaaggt ataacaactt 3480
 cgacgagctc tacatgtact gctactatgt tgctggaact gtcgggttaa tgagcgtacc 3540
 40 tgtgatgggc atcgcaaccg agtctaaagc aacaactgaa agcgtataca gtgctgcctt 3600
 ggctctggga attgcgaacc aactcacgaa catactccgg gatgttggag aggagtaagt 3660
 aacatatata ttcttcctgc gacaggcacg aacatgcatg tgttcaatag cacagatgtg 3720
 45 atgatatgac tgtcaccatg tcttttagtg ctagaagagg aaggatatat ttaccacaag 3780
 atgagcttgc acaggcaggg ctctctgatg aggacatctt caaaggggtc gtcacgaacc 3840
 50 ggtggagaaa cttcatgaag aggcagatca agagggccag gatgtttttt gaggaggcag 3900
 agagaggggt aactgagctc tcacaggcta gcagatggcc agtaagtcca ctcaacttca 3960

ES 2 501 367 A2

	catttcccac ccagtatagc acagcatcct cacttccttt tctttgttac cattgcaggt	4020
	atgggcttcc ctgttggtgt acaggcagat cctggatgag atcgaagcca acgactacaa	4080
5	caacttcacg aagagggcgt atgttggtaa aggaagaag ttgctagcac ttcctgtggc	4140
	atatggaaaa tcgctactgc tcccatgttc attgagaaat ggccagacct agccaccaga	4200
10	gaagctgcaa tgcaaggttc aggttaggct agatagaaag ttaaattgggg caacatcagg	4260
	aggccttgat gaaaaacaga caacctggtg aattgttggt gggatcaggc acagaacaga	4320
	taagagccgc gcagccaacc tagggcatgt ttggtttcaa ttagttctag gactaaactt	4380
15	tagtcctagg actaaacttt agtccctata tgtttggttc tagggactaa atagattcta	4440
	aagtcattaa atacattgtc caaagactca aataccctta gaatatactc atgatattag	4500
20	ttatctataa aaaggttaagg gcaacatgat aattatgagc ttttagtctc ttttagcacc	4560
	tatgtgaagg actaaagact aatcattttt agtccatatt ttagtcctag tgtttggtgcaa	4620
	aaaagggact aaaagggact aaaaactaga gactaatctt tagtccctct aaccaaacac	4680
25	ccccctagat ggatacggaa cattcgctc ttattcggag caatatatgt ctctcaagga	4740
	aagagcccaa catgtatact gccttctttt tctcatccca gatttggggg aaaaacaatg	4800
30	taaatgccaa tggtatcgta ggaagattac tagaagtaaa tgccaatgta aaaacagatg	4860
	agttggcatt tcatgatagg atggtgggat catcagactg aaaatgatag gggatggtgc	4920
35	tccctgcgac tccactatta acang	4945
	<210> 2	
	<211> 1479	
	<212> DNA	
40	<213> Erwinia uredovora	
	<400> 2	
	atgaaaccaa ctacggtaat tgggtgcaggc ttcggtggcc tggcactggc aattcgtcta	60
45	caagctgcgg ggatccccgt cttactgctt gaacaacgtg ataaaccgg cggtcgggct	120
	tatgtctacg aggatcaggg gtttaccttt gatgcaggcc cgacggttat caccgatccc	180
	agtgccattg aagaactggt tgcaactggca ggaaaacagt taaaagagta tgtcgaactg	240
50	ctgccgggta cgccgtttta ccgcctgtgt tgggagtcag ggaaggctct taattacgat	300

ES 2 501 367 A2

	aacgatcaaa cccggctcga agcgcagatt cagcagttta atccccgca tgtcgaaggt	360
	tatcgtcagt ttctggacta ttcacgcgcg gtgtttaaag aaggctatct aaagctcggg	420
5	actgtccctt ttttatcggt cagagacatg cttcgcgcgc cacctcaact ggcgaaactg	480
	caggcatgga gaagcgttta cagtaagggt gccagttaca tcgaagatga acatctgcgc	540
	caggcgTTTT ctttccactc gctgttggtg ggcggcaatc ccttcgccac ctcatccatt	600
10	tatacgttga tacacgcgct ggagcgtgag tggggcgtct ggtttccgcg tggcggcacc	660
	ggcgcattag ttcaggggat gataaagctg tttcaggatc tgggtggcga agtcgtgtta	720
15	aacgccagag tcagccatat ggaacgaca gaaacaaga ttgaagccgt gcatttagag	780
	gacggtcgca ggttctctgac gcaagccgtc gcgtaaagt cagatgtggt tcatacctat	840
	cgcgacctgt taagccagca ccctgccgcg gttaagcagt ccaacaaact gcagactaag	900
20	cgcatgagta actctctggt tgtgctctat tttggtttga atcaccatca tgatcagctc	960
	gcgcatcaca cggtttggtt cggcccgcgt taccgcgagc tgattgacga aatttttaat	1020
25	catgatggcc tcgcagagga cttctcactt tatctgcacg cgccctgtgt cacggattcg	1080
	tcaactggcgc ctgaagggtg cggcagttac tatgtgttgg cgccggtgcc gcatttaggc	1140
	accgogaacc tcgactggac ggttgagggg ccaaaactac gcgaccgtat ttttgcgta	1200
30	cttgagcagc attacatgcc tggcttacgg agtcagctgg tcacgcaccg gatgtttacg	1260
	ccgtttgatt ttcgcgacca gcttaatgcc tatcatggct cagccttttc tgtggagccc	1320
35	gttcttacc agagcgcctg gtttcggccg cataaccgcg ataaaacat tactaatctc	1380
	tacctggtcg gcgcaggcac gcacccggc gcaggcatte ctggcgtcat cggctcggca	1440
40	aaagcgacag caggtttgat gctggaggat ctgatatga	1479
	<210> 3	
	<211> 2272	
	<212> DNA	
45	<213> <i>Gentiana lutea</i>	
	<400> 3	
	ctcgcaggat catcgcact tcatcagttc atccacattt cactgcaagc tcacatccac	60
50	aatctccaag acacatgctg ctaattcca tcatagaaaa cccgaaaacg gaaacggccc	120
	ctcagatttt tagattaca tcagttcaat ggtgagtctg caaattggtt ctagtaattt	180

ES 2 501 367 A2

	atctcctgta	ggcagagata	gcacttcaat	tttatcagca	gttttcaatc	tcttgatgta	240
	gttgaactcg	agccaattct	cgaaatcag	tttgctttct	gggcaacaat	tggaaattcc	300
5	atctggtttc	tgaagaaata	aagtacacc	aatagagaaa	agatggatac	tttagtgaaa	360
	acaccaaata	agcttgaatt	tctgcaccct	ttatgtgggt	ttgttgataa	agtctgctcc	420
10	tttagctggt	tgaggtctca	taatcaagaa	tacaataagt	atctcttgaa	gaagtctcat	480
	ctgaaaacgg	gtagtaaaaa	gggcttttgt	gttaaggctg	gaagtagcag	tgctattttg	540
	gagcttggtc	ctgaaactaa	aatggagaat	cttgaatttg	agctcccatt	atctgatcac	600
15	tcaaaaggga	tagtcggtga	tttggctatt	gttggtgggt	gtcctgccgg	acttgctggt	660
	gcacaacagg	tttccgaggc	ggggctttcg	gtttgttcta	ttgatccatc	tccaaaactg	720
20	atctggccaa	acaattatgg	tgtttggggt	gatgaatttg	aggccatgga	tttattagat	780
	tgctttgatg	ctacatggtc	tggagcagtt	gtatctatag	acgaccataa	aagtaaagat	840
	ctcgggaaggc	cgtatggaag	ggttaatagg	aagcagttga	aatctaaaat	gatgcaaaaa	900
25	tgcatatcga	atgggtgtgaa	gtttcataaa	gctaaagttg	tgaaagttac	tcacgaggaa	960
	tcaaaatcat	tagtaatttg	taacgatggc	gttactatc	aagctgctgt	ggttcttgat	1020
30	gcaaccgggt	tttctagatg	tttggttcaa	tataataagc	catataatcc	tggttatcag	1080
	gtggcttatg	ggatcttagc	tgaagtagaa	gaacaccctt	ttgatataaa	caagatgggt	1140
	ttcatggatt	ggcgcgattc	acatcttaac	aataacacaa	acctaaagga	aagaaacaga	1200
35	aaggtgccca	cctttcttta	tgccatgcca	ttttctaaag	acaaaatctt	tctagaagaa	1260
	acgtcccttg	tagctcgctc	cgggttgcca	atagaagata	tccaagagag	gatgggtgct	1320
40	cgattaaggc	acctcgggat	aaaagtgaag	tccatcgaag	aagatgagcg	ttgtgtgatt	1380
	ccaatggggg	gtccacttcc	tgtaatacct	cagagagtag	ttggaatagg	tggtactgca	1440
	ggaatgggtc	atccatcaac	tggttatatg	gtagcaagaa	ctcttgagcg	agcaccatt	1500
45	gttgctaata	cgatagtgcg	atatcttggg	tccgaaaaga	ggcatttagg	tgctgagtta	1560
	tctgggtgaag	tttgaaaaga	tttgtggcca	attgagagga	gacgccaag	ggaattcttc	1620
50	tgttttggca	tggatatatt	gcttaagctt	gatttagatg	ctttaagaag	atctttcgat	1680
	gcattttttg	atcttagagcc	tcgatattgg	catggattct	tgtcttctcg	gctatttctt	1740

ES 2 501 367 A2

ccagagctgg ctttatttgg gctttctctt ttctctcatg ctaccaacac ctcaaggctt 1800
 5 gaaataatgt caaaaggaac gcttcctctt ataaatatga taaacaactt attgcgggac 1860
 aaagaataac cgaaaacagg ttcatattta ttcttactca ttcaagtggg tactggcatg 1920
 atgaagccat tgggtattata aagcttttatt ctctcttttg ttcatcttgt ttacattcaa 1980
 10 gtcgaatcct agctgaagct gctatatagg tadcagccat atatgctgta aggttcctat 2040
 gaagttggct atcaaccttt tttcctgtaa attatcaaat gcgatgtggt ggtctattgc 2100
 aattgcattg ttgacctttc tgtattctca taggtgctaa gagtgtttca gctcctgtat 2160
 15 tgttgacttt ctgtattctc atagatacta agagtgtttc agctcgtgta acgaatgaac 2220
 ctcaactgtct tactgtcttg aataaagatg tgattgcagg cacaaattac tg 2272
 20
 <210> 4
 <211> 945
 <212> DNA
 <213> Zea mays
 25
 <400> 4
 ccatggccgc cgggtctgtcc ggcgcccgcga tgaccagctt cgtcgccaag aaccgcgtgc 60
 30 tggcggccgc ggcgcccgcg agggcgctgc ctcccctcgc cgggcgcgcc ctgccgttct 120
 cgccgctcac caccgccagc gcccccgcgc gccgcgggct cgggaccgtc acgtgcttcg 180
 tgccgcagga cacggagcac ccggcggcgg cggcaccggc cccggtcgct cccgtgccgg 240
 35 agacggcgct ggacgaggag gccagggccg cggcggcgcg gcgcgctcgc gagaggaagg 300
 cgcggaagcg gtccgagcgg cgtacctacc tgggtggcgc cgtgatgtcc agcctcgggg 360
 40 tcacgtccat ggccgtcgcc gccgtgtact atcgcttcag ctggcaaatg gagggcggcg 420
 cgggtcccggg gagcgagatg ttcggcacgt ttgcgctctc cgtcggcgcg gcggtcggga 480
 tggagtcttg ggcgcgggtg gcgcaccggg cgtgtggca cgcctccctg tggcacatgc 540
 45 acgagtcgca ccaccggccg cgcgagggcc cattcgagct caacgacgtg ttcgccatcg 600
 tcaacgccgt gccggccatc tccctcctcg cctacggctt cttccaccgc ggcctcgtgc 660
 ccggcctatg cttcggcgcg ggccctcggga ttacgctggt cggcatggcc tacatgttcg 720
 50 tccacgacgg cctgggtccac cgccgctttc cggtcggccc catcgccaac gtgcctact 780

ES 2 501 367 A2

	tccgccgagt ggctgccgct cacaagatac accacatgga caagtttgag ggcgtcccgt	840
	atgggctggt cctgggacca aaggagctgg aggaggtcgg tggcctggac gagctggaaa	900
5	aggagctcgc gcgaatcggc cggaccatct gatggattcg tccgg	945
	<p><210> 5 <211> 1519 <212> DNA <213> <i>Gentiana lutea</i></p>	
	<p><400> 5</p>	
15	cttcgtgcac ttaatctgca actccaccgt tcaattcccc aaaatctcct ccatttccat	60
	tttgctctaa ttctctctc tcagctgttt ctccggtttc cggtcacat tttccggtaa	120
	tggagactca atttttggtc tccggtagaa acagcaacat tcattgccgt atcgattcaa	180
20	tttcatcttc ttctcttact ccgaaatcaa gtctgtatc gacatcaacc cctacgctgg	240
	ttgtttttcc gccatttaag ctggtttcga aaagcttaag aacgaggagt aaaccgagat	300
25	tgacggtttg ttttgtgctt gaggaaaagg aattgaaagg aaaattggtg gtggcgagtg	360
	acgacgacga cggcgccggc gaggtgagaa aacagagaga gaaagagatt tcagcttcag	420
	cggagaaaatt agcacagaaa ttggcgagga agaagtcaga gagatttact tatttagttg	480
30	cagctgtcat gtctagcttt ggaattacct ccatggctgt tctctctggt tattacagat	540
	tttcatggca aatggagggc ggcgagatac cgttatccga gatgtttggt acatttgctt	600
35	tgtcagttgg agctgcagtg ggaatggaat tttgggagag atgggctcac gaagcgctgt	660
	ggcatgcttc attatggcac atgcatgagt cacaccataa gccaaaggag ggtcccttcg	720
	agctaaatga catatttgcc attatcaatg cagtcccagc aatagcactc ctctcctatg	780
40	gtttcttcca caaaggcctt atccctggcc tttgttttgg tgcaggcctt ggaattacgg	840
	tgtttggaat ggcgtacatg ttcgtccacg atggtcttgt acacaagcgg ttccctgtag	900
45	gacccatcgc cgatgttcct tatttcagaa gagttgctgc tgctcacacg cttcatcact	960
	ccgacaaaatt caatggcgtc cttatggct tgtttttagg acctaaggaa cttgaagaag	1020
	taggagggct gcaggtggtg gaaatggaga tcaaccgcag aactaaaaac aaccaatcat	1080
50	gattttcttg aggaagatct tgtgatgcca ttaaaaacaa aaattagaaa agaaaacat	1140
	gggatcagtt tcagtttgca tctaactaca atggtgcatg tagccggttt gaaactctcg	1200

ES 2 501 367 A2

	agcgtctata ttacaccac catgattcta ccgataaatc aactacatt tgcatacatc	1260
	caaatcgact ttctgaaagt caattctgtg tttttggtgt ggtgcaccgg tagaatcggg	1320
5	gggggtgcaaa taataagcgt gtgtatgatt ttccattgta tagcttaaaa gttcaaagtt	1380
	gccaatatct gaatagttga agttgaaaaa aagaggcatc tatatgcatg gagtgTTTTT	1440
10	gTTgTTgTaa tctactatgc cgtaatggTT tataatgaag ctgaggtgta aacgTtcatt	1500
	gaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	1519
15	<210> 6 <211> 729 <212> DNA <213> <i>Paracoccus</i> sp. KL1	
20	<400> 6 atgagcgcac atgccctgcc caaggcagat ctgaccgcca ccagcctgat cgtctcgggc	60
	ggcatcatcg ccgcttggtt gccctgcat gtgcatgcgc tgtggTTTTt ggacgcagcg	120
25	gcgcatccca tcctggcgat cgcaaatttc ctggggctga cctggctgtc ggtcggattg	180
	ttcatcatcg cgcatacgc gatgcacggg tcgggtggtgc cggggcgtcc gcgcgccaat	240
	gcgggcgatgg gccagcttgt cctgtggctg tatgccgat tttcgtggcg caagatgac	300
30	gtcaagcaca tggcccatca ccgccatgcc ggaaccgacg acgaccccga tttcgaccat	360
	ggcggccccg tccgctggta cggccgcttc atcggcacct atttcggctg gcgcgagggg	420
35	ctgctgctgc ccgtcatcgt gacggctctat gcgctgatcc ttggggatcg ctggatgtac	480
	gtggTcttct ggccgctgcc gtcgatcctg gcgctgatcc agctgttcgt gttcggcacc	540
	tggctgccgc accgccccgg ccacgacgcg ttcccggacc gccacaatgc gcggctcgtcg	600
40	cggatcagcg accccgtgtc gctgctgacc tgctttcact ttggcggTTa tcatcacgaa	660
	caccacctgc acccgacggT gccgtggTgg cgctgcccc gcacccgcac caagggggac	720
45	accgcatga	729
50	<210> 7 <211> 1067 <212> DNA <213> <i>Escherichia coli</i>	

ES 2 501 367 A2

	<400> 7								
	ccacgcgtcc	gctcgccgcc	gtcgaaaccc	aaaatcttct	cttcccgtac	gtgagaagcg			60
5	ccaggtcgtc	gtcgccgcca	tgggcgtgga	ggtgtgcgtc	aaggccgccg	tcggccaccc			120
	ggacacgctc	ggcgactgtc	cattctcgca	gagggtgctg	ctgactctgg	aggagaagaa			180
	ggtgccctac	gagatgaagc	tcatcgacgt	ccagaacaag	cccgactggt	ttctgaagat			240
10	cagcccagag	gggaaggtgc	ctgtgtttaa	cggtggtgat	ggcaaatgga	ttcctgattc			300
	tgatgtgatc	actcaagtca	ttgaggagaa	gtacccaacc	ccgtctcttg	tcaccctcc			360
	tgagtatgca	tcagtgggat	caaaaatfff	ctcatgcttc	acaacgttct	tgaagagcaa			420
15	ggatccaaat	gatggttcag	agaaggcact	tcttactgaa	ctgcaggcac	tcgaggagca			480
	tctgaaagct	catggcccct	ttatcaacgg	gcagaacatt	tcagctgctg	accttagcct			540
20	ggcaccaaag	ctctaccatc	tccaggttgc	tctggagcat	ttcaaaggct	ggaagatccc			600
	ggaagaccta	accaatgttc	atgcttacac	agaggctctg	tttagccgcg	aatctttcat			660
	caagacgaag	gcagctaagg	agcacctgat	tgctggatgg	gcaccaaag	tgaatgcgta			720
25	agagcctgcc	cttatgctct	ggtgctgctt	ggacaccatg	ctgtttatct	gatcgggtcca			780
	tgtcagtggg	gggcactact	actactcttg	tgtagcttgg	gtgcatgatt	gggttggat			840
30	aatgtagcct	catccgttga	gtaccttgat	atggttggtg	caagtgtgca	ctttttctat			900
	gaactatctc	ctgctggctt	aagtcgaaac	cgtgggtcgg	tttggcctta	tgttcaacta			960
	agagagtgca	tatactgtaa	tggaaccttt	gctagtacaa	tatgttatat	gaataatgga			1020
35	gatgcagcct	gcagctgctc	ttgcttggaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaa			1067	
	<210> 8								
40	<211> 1067								
	<212> DNA								
	<213> orazy sativa								
	<400> 8								
45	ccacgcgtcc	gctcgccgcc	gtcgaaaccc	aaaatcttct	cttcccgtac	gtgagaagcg			60
	ccaggtcgtc	gtcgccgcca	tgggcgtgga	ggtgtgcgtc	aaggccgccg	tcggccaccc			120
	ggacacgctc	ggcgactgtc	cattctcgca	gagggtgctg	ctgactctgg	aggagaagaa			180
50	ggtgccctac	gagatgaagc	tcatcgacgt	ccagaacaag	cccgactggt	ttctgaagat			240

ES 2 501 367 A2

cagcccagag ggaaggtgc ctgtgtttaa cggtggtgat ggcaaatgga ttcctgattc 300
 tgatgtgatc actcaagtca ttgaggagaa gtacccaacc ccgtctcttg tcaccctcc 360
 5 tgagtatgca tcagtgggat caaaaatttt ctcatgcttc acaacgttct tgaagagcaa 420
 ggatccaaat gatggttcag agaaggcact tcttactgaa ctgcaggcac tcgaggagca 480
 10 tctgaaagct catggcccct ttatcaacgg gcagaacatt tcagctgctg acctagcct 540
 ggcaccaaag ctctaccatc tccaggttgc tctggagcat ttcaaaggct ggaagatccc 600
 ggaagaccta accaatgttc atgcttacac agaggctctg tttagccgcg aatctttcat 660
 15 caagacgaag gcagctaagg agcacctgat tgctggatgg gcaccaaag tgaatgcgta 720
 agagcctgcc cttatgctct ggtgctgctt ggacaccatg ctgtttatct gatcggcca 780
 20 tgtcagtggg gggcactact actactcttg ttagcttgg gtgcatgatt gggttggaat 840
 aatgtagcct catccgttga gtaccttgat atggttggtg caagtgtgca ctttttctat 900
 gaactatctc ctgctggctt aagtcgaaac cgtgggtcgg tttggcctta tgttcaacta 960
 25 agagagtgca tatactgtaa tggaaccttt gctagtacaa tatgttatat gaataatgga 1020
 gatgcagcct gcagctgctc ttgcttggaa aaaaaaaaaa aaaaaaa 1067

30 <210> 9
 <211> 555
 <212> DNA
 <213> Streptomyces hygrosopicus

35 <400> 9
 atgagcccag aacgacgccc ggccgacatc cgccgtgcca ccgaggcgga catgccggcg 60
 gtctgcacca tcgtcaacca ctacatcgag acaagcacgg tcaacttccg taccgagccg 120
 40 caggaaccgc aggagtggac ggacgacctc gtccgtctgc gggagcgcta tccctggctc 180
 gtcgccgagg tggacggcga ggtcgccggc atcgccctacg cgggccctg gaaggcacgc 240
 aacgcctacg actggacggc cgagtcgacc gtgtacgtct cccccgcca ccagcggacg 300
 45 ggactgggct ccacgtctta caccacctg ctgaagtccc tggaggcaca gggcttcaag 360
 agcgtggctg ctgtcatcgg gctgccaac gaccgagcg tgcgcatgca cgaggcgctc 420
 50 ggatatgccc cccgcggcat gctgcgggcg gccggcttca agcacgggaa ctggcatgac 480
 gtgggtttct ggcagctgga cttcagcctg ccggtaccgc cccgtccggt cctgcccgtc 540

ES 2 501 367 A2

accgagatct gatga 555

5 <210> 10
 <211> 434
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

10 <220>
 <223> promotor de D-hordeína de cebada

<400> 10
 cttcgagtgc cgcgcatgtt gccagcaatg gctaacagac acatattctg ccaaaacccc 60
 15 agaacaataa tcacttctcg tagatgaaga gaacagacca agatacaaac gtccacgctt 120
 cagcaaacag taccccagaa ctaggattaa gccgattacg cggcttttagc agaccgtcca 180
 20 aaaaaactgt tttgcaaagc tccaattcct ccttgcttat ccaatttctt ttgtgttggc 240
 aaactgcact tgtccaaccg attttgttct tcccgtgttt cttcttaggc taactaacac 300
 agccgtgcac atagccatgg tccggaatct tcacctcgtc cctataaaaag cccagccaat 360
 25 ctccacaatc tcatcatcac cgagaacacc gagaaccaca aaactagaga tcaattcatt 420
 gacagtccac cgag 434

30 <210> 11
 <211> 983
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

35 <220>
 <223> Promotor de glutenina LMW de trigo

<400> 11
 40 gatccgggag aggctgcggc ggcgagcggg ccggccggcg aggaggacgg ggaagggaga 60
 gacgaagacg acgcagaatc ggcggaatgt gggctgggct tgtgactttg aggcctccga 120
 aaactatagc ccagttcgaa ttggtgcctt aacacacaca aacttacgt tgggcctaata 180
 45 cgctcgctcc tgcccctgct caaaatTTTT tttgctccag gctggggggc tctgttccac 240
 ccccatctat cgctccacct ccaaacaaaa aaaaaatcta tcaactccacc tccactccaa 300
 50 aaatataaaa ttctatcaat ccacctacgc ctcgaaaaaa gaaatctatc actccacctc 360
 agcattgatg tctctagctt gtagaaactg ccataccttta catgtaaac ggattcggatg 420

ES 2 501 367 A2

	agtc	atgtca	tgctctatag	acgtcagttc	atcttatcat	cttacaggaa	agtacaaagt	480
	tagt	ttttctg	aaaagcaacc	gaatatagaa	gaacactcca	cactcaaggc	tttactaatc	540
5			gagcatatcc	taacagccca	cacatgattg	caaacttagt	catacacaag	600
	cttg	tttacg	gctgacagcc	tatacaaggt	tccaaactcg	gttgtaaaag	tgatactatc	660
10	ttgataagtg	tgtgacatgt	aaagttaata	aggtgagtca	tatatagcaa	atatcgggg	720	
	ttctgtactt	tgtgtgtgat	cgtatgcaca	actaaaaatc	aactttgatg	atcaatatat	780	
	ccaaaagtac	gcttgtagct	agtgcaaacc	taacccaatg	taacaaaata	attcatttca	840	
15			gatggagcca	aacagaatta	ttaaagctga	tgcaaagaag	gaaaagaggt	900
	ctactataaa	taggcatgaa	gtataaagat	catcacaagc	acaagcatca	gaaccaagca	960	
20	acactagtta	acaccaatcc	acc				983	
	<210>	12						
	<211>	1277						
25	<212>	DNA						
	<213>	Zea mays						
	<400>	12						
30	ccgccacttc	tttcttcccc	gcgagcgcgt	cgaaaagcga	gcctctgggg	agactcgagg	60	
	ccactctgcc	ttccccctcct	atcctcgttc	cattccatc	catcccatcc	ccggaaagtg	120	
	caaggacggg	agggagagcg	gccggcgcgt	cacaaatacc	accagcccag	gggccatggc	180	
35	cgccgcgatg	accagcttcg	tcgccaaagaa	cccgtgctc	gcggccgcgg	cgcggcgcag	240	
	ggcgccctcc	ctcgcggggc	gcgccctgcc	gttctctccg	ctcgccagca	ccagggcccc	300	
	gcgcgcgacc	gtcacgtgct	tcgtgcccga	ggacacggcg	gccccggccg	ctcccgtgcc	360	
40			ggcgctggac	gaggaggcca	gggccgcggc	ggcgcggcgc	420	
	gaagcgggtcc	gagcggcgga	cgtacctggt	ggccgccgtg	atgtctagcc	tcggagtcac	480	
45	gtccatggcc	gtcgccgccc	tgtactatcg	cttcagctgg	caaatggagg	gcggcgaggt	540	
	gccggtgatc	gagacgctgg	gcacgttcgc	gctctccgtc	ggggcggcgg	tcgggatgga	600	
	gttctggggc	cggtggggcg	accgggcgct	gtggcacgcc	tccctgtggc	acatgcacga	660	
50			gtcgcaccac	cggccgcgcg	agggcccctt	cgagctcaac	gacgtgttcg	720
						ccatcgtcaa		

ES 2 501 367 A2

	cgccgcgccc gccatctccc tcctcgcta cggcttcttc caccgcggca tcgtgcccgg	780
	cctctgcttc ggcgcggggc tggggattac gctgttcggc atggcctaca tggtcgtcca	840
5	cgacggcctg gtccaccgcc gctttccggt cggccccatc gccgacgtgc cctacttccg	900
	ccgagtggct gcctcgcaca agatacacca catggacaag ttcggcggcg tcccgtatgg	960
	gctcttcctg ggaccaaagg agctggagga ggttggggc ctggacgagc ttgttagcag	1020
10	tccggtgagt gaagctactg atactgaaga cgcaggagaa gaaaagacgc gtccagttgt	1080
	atgcgttgtc cgaacaagcg tgttcatggg ccagagtgtg ccaaagagt tctagcttta	1140
15	ggcgagtggg ccaaagagt gtgggctgcg tcccagggtg gtataagtac tatgagtctg	1200
	taataatcag gacaagaaga atttaggtaa agtaatacat ctatcgccat cttcctttca	1260
	aaaaaaaaaa aaaaaaa	1277
20		