

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 717 441**

51 Int. Cl.:

C07K 14/435 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.10.2013 PCT/EP2013/070903**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.04.2014 WO14056885**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.10.2013 E 13782991 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.12.2018 EP 2906588**

54 Título: **Vacuna contra Cooperia**

30 Prioridad:

09.10.2012 EP 12187773

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

21.06.2019

73 Titular/es:

**UNIVERSITEIT GENT (100.0%)
Sint-Pietersnieuwstraat 25
9000 Gent, BE**

72 Inventor/es:

**GELDHOF, PETER;
BORLOO, JIMMY;
CLAEREBOUT, EDWIN y
VERCRUYSE, JOZEF**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 717 441 T3

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

DESCRIPCIÓN

Vacuna contra *Cooperia*

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a secuencias de nucleótidos que codifican antígenos de *Cooperia*, así como a moléculas de ADN recombinante que contienen dichas secuencias de nucleótidos y células huésped que expresan estas secuencias de nucleótidos. La invención se refiere además a proteínas en *Cooperia*, a métodos para la producción de las proteínas, las secuencias de nucleótidos, las moléculas de ADN recombinante y los huéspedes.

Por otra parte, la invención se refiere a vacunas que inducen la inmunidad protectora contra la infección por nematodos parásitos tales como la especie del género *Cooperia* y a métodos para preparar dicha vacuna.

10 Antecedentes de la invención

Los nematodos, que son ascárides no segmentados con cuerpos alargados, fusiformes o con forma de saco, cubiertos con cutícula, son virtualmente ubicuos por naturaleza, habitando en el suelo, en el agua y en las plantas, y están considerablemente implicados en una amplia variedad de enfermedades parasitarias en animales y plantas. Las infecciones por nematodos gastrointestinales son un obstáculo principal en el bienestar de los rumiantes (ganado vacuno, ovejas, cabras, etc.) y en su producción a escala mundial. Las infecciones por estos parásitos pueden llevar a enfermedades graves (diarrea o anemia son síntomas típicos). Entre los efectos económicamente importantes en el ganado están la reducción en la producción de leche, de carne y de lana, el aumento de peso y la muerte ocasional.

20 Los parásitos tricostrongílidos importantes en el ganado vacuno (bovino) son : *Cooperia oncophora*, *C. punctata*, *C. pectinata*, *C. curticei* y *Ostertagia ostertagi*. En rumiantes pequeños, por ejemplo, ovejas y cabras, las infecciones por *Haemonchus contortus* y *Teladorsagia circumcincta* son las más importantes. Aunque es considerado un patógeno leve, el helminto *Cooperia oncophora* es uno de los nematodos parásitos intestinales más comunes en el ganado vacuno en la regiones de clima templado a escala mundial (1) y como tal conlleva un impacto económico sustancial ya que contribuye de manera notable a las pérdidas de la producción (2, 3). Un estudio reciente demostró que las infecciones por helmintos incrementaron los costes de producción de ternera en Estados Unidos en casi 190 \$ por cabeza según los precios de mercado de 2005 (4). De manera análoga al uso de antibióticos en seres humanos, los antihelmínticos han sido durante mucho tiempo el método elegido para tratar y prevenir las infecciones por parásitos de una manera razonablemente eficaz y a bajo coste. Para el uso con el ganado vacuno, se dispone en la actualidad de tres clases principales de antihelmínticos, es decir, imidazotiazoles, benzimidazoles y lactonas macrocíclicas, siendo las últimas las usadas con más frecuencia en los tratamientos contra *Cooperia oncophora*. Sin embargo, las consecuencias que esto acarrea se han hecho gradualmente evidentes durante la última década ya que han surgido numerosos informes del desarrollo de la resistencia antihelmíntica por todo el mundo (5-9). Además, hay preocupación acerca de los residuos de los fármacos en la carne y en el medio ambiente. Son muy necesarios, por consiguiente, canales más eficaces de control de las infecciones helmínticas, uno de los cuales puede implicar el desarrollo y la administración de vacunas profilácticas.

40 Como se advierten los problemas acerca de la resistencia antihelmíntica para una multitud de helmintos, numerosos grupos de investigación han invertido en el desarrollo de vacunas recombinantes para, por ejemplo, *Ancylostoma caninum* (10), *Onchocerca volvulus* (11-14), *Ascaris suum* (15-17), *Haemonchus contortus* (18, 19, Patente Internacional WO92/13889), *Necator americanus* (20) y varias especies de *Taenia* (21-23), *Echinococcus* (21, 22), *Fasciola* (24) y *Schistosoma* (25-30). (10), (11-14), (18, 19, (20) y varias especies de (21-23), (21, 22), (24) y (25-30). Sin embargo, se encontró que la eficacia de estas vacunas, medida como reducción de los recuentos de huevos y/o de la carga de gusanos (revisado en (59)), variaba drásticamente y, así, es impredecible.

45 En la actualidad, no existe una vacuna contra *Cooperia oncophora*. Varios grupos de investigación se han centrado en las proteínas de bajo peso molecular (de 12 kDa a 16 kDa) como potenciales candidatos a vacuna, sin embargo sin éxito (60-61; Patente Internacional WO98/01550).

Sumario de la invención

Un objeto de la presente invención es proporcionar vacunas para combatir las infecciones por nematodos gastrointestinales en el ganado vacuno y más específicamente infecciones por *Cooperia* en el ganado vacuno (bovino).

50 Otro objeto de la presente invención es proporcionar polinucleótidos y proteínas (o polipéptidos) útiles para preparar dichas vacunas.

Un aspecto de la invención se refiere a una proteína de *Cooperia oncophora* aislada o un fragmento inmunógeno de dicha proteína, caracterizado por que dicha proteína comprende una secuencia de aminoácidos, o consiste esencialmente en una secuencia de aminoácidos, que presenta una identidad de secuencias de al menos un 85 %,

preferiblemente un 90 %, más preferiblemente un 95 % para la secuencia de aminoácidos representada en SEQ ID NO : 1.

5 También se incluye en la presente invención una secuencia de ácidos nucleicos aislada que codifica dicha proteína o dicho fragmento inmunógeno, en particular una secuencia de ácidos nucleicos que tiene al menos un 85 %, preferiblemente un 90 %, más preferiblemente un 95 % de identidad con la secuencia de ácidos nucleicos representada en SEQ ID NO : 2.

Una realización más se refiere a una molécula de ADN recombinante que comprende la secuencia de ácidos nucleicos descrita en la presente memoria, incluyendo además, en particular, un promotor funcionalmente unido.

10 Una realización más se refiere a un vector que comprende la secuencia de ácidos nucleicos o la molécula de ADN recombinante, descritas en la presente memoria, siendo en particular dicho vector un plásmido, bacteriófago, cósmido, virus o minicromosoma.

15 La invención describe, por otra parte, una célula huésped que comprende la secuencia de ácidos nucleicos, la molécula de ADN recombinante o el vector, descritos en la presente memoria, siendo en particular dicha célula huésped una célula de animal, una célula bacteriana, una célula de levadura, una célula de insecto o una célula vegetal.

20 Otro aspecto de la invención actual se refiere a la proteína o al fragmento inmunógeno, el ácido nucleico, la molécula de ADN recombinante, el vector o la célula huésped, como se describe en la presente memoria, para uso como un medicamento, más específicamente para uso en la prevención o en el tratamiento de una infección por *Cooperia oncophora*. También el uso de la proteína o el fragmento inmunógeno, el ácido nucleico, la molécula de ADN recombinante, el vector o la célula huésped, como se describe en la presente memoria, para la fabricación de una vacuna contra infección por *Cooperia oncophora* es parte de la presente invención.

25 Una realización más se refiere a una vacuna contra infección por *Cooperia oncophora*, caracterizada por que dicha vacuna comprende al menos una proteína o un ácido nucleico, o consta esencialmente de al menos una proteína o un ácido nucleico, descritos en la presente memoria (incluyendo sus combinaciones) o un fragmento de cualquiera de ellos, y un portador o diluyentes farmacéuticamente aceptables, comprendiendo opcionalmente dicha vacuna un adyuvante.

Breve descripción de los dibujos

30 **Figura 1. A-C** : Secuencias de nucleótidos codificadoras y secuencias de aminoácidos de proteínas secretadas asociadas a activación de doble dominio de *C. oncophora*; **D** : Secuencias de nucleótidos codificadoras y secuencias de aminoácidos de proteínas secretadas asociadas a activación de doble dominio de *C. oncophora* incluyendo C- y N-terminales.

35 **Figura 2.** Rendimiento medio de EPG posinfección. Se registraron los huevos de *C. oncophora* por gramo de heces como una función del tiempo, empezando 21 días después de la primera infección, para los grupos vacunados con adyuvante (control) y la fracción de excretoma/secretoma (ES) de peso molecular alto (PMA).

40 **Figura 3.** Respuestas de inmunoglobulina G1 y G2 en suero contra antígenos de *C. oncophora*. Los niveles de IgG1 en suero (barras blancas) e IgG2 (barras grises) contra antígenos de *C. oncophora*, presentes en la fracción ES de PMA, se proporcionan como lecturas de ensayo de inmunoenzimático de adsorción (ELISA, en inglés). Las diferencias estadísticamente significativas comparado con el grupo de control se indican por un asterisco (*) ($P < 0,01$).

Figura 4. Rendimiento medio de HPG posinfección en la prueba práctica. Se registraron los huevos de *C. oncophora* por gramo de las heces para los grupos vacunados con adyuvante (control) y la fracción ES de peso molecular alto (PMA).

45 Descripción detallada de la invención

50 La presente invención prevé el desarrollo de vacunas profilácticas basadas en la identificación proteómica, la caracterización y la evaluación inmunológica de antígenos helmínticos en el excretoma/secretoma (ES) que son la diana de una respuesta inmunitaria protectora en el huésped. En esencia, la fracción ES es secretada del gusano por las aberturas orales y/o su superficie externa y básicamente consiste en una mezcla de proteínas y otros compuestos crucial en la supervivencia y en la propagación de los helmintos, en la infección del huésped y en la evasión de respuestas inmunológicas del huésped (31, 32).

La invención proporciona polinucleótidos aislados que codifican proteínas excretoras-secretoras (ES) de *Cooperia oncophora* (*C. oncophora*) de fase adulta que tienen un peso molecular aproximado de 70 kD cuando se estima por

SDS-PAGE, y se identifican como proteínas secretadas asociadas a activación de doble dominio (las ASP, en inglés); incluyendo sus análogos, homólogos, derivados, partes o combinaciones; proteínas que pueden conferir inmunidad protectora a un huésped contra la infección por nematodos parásitos.

5 En un aspecto, la presente invención se refiere a una secuencia de ácidos nucleicos aislada (también referido como polinucleótido) que comprende una secuencia de ácidos nucleicos, o que consiste esencialmente en una secuencia de ácidos nucleicos, que codifica una proteína secretada asociada a activación de doble dominio (ASP) de *C. oncophora* o una parte de dicha secuencia de ácidos nucleicos que codifica a un fragmento inmunógeno de dicha proteína. En particular, la secuencia de ácidos nucleicos o dicha parte de la misma, es al menos un 85 % idéntica a la secuencia de ácidos nucleicos del gen ASP de *C. oncophora* representada en SEQ ID NO : 2. Incluso más particular, la secuencia de ácidos nucleicos de la presente invención comprende además en el N- y C-terminal, respectivamente, una de las secuencias siguientes o ambas : CTTTGCTGCTTGATAATGGAATGACA (SEQ ID NO : 12) y GATGAAGATTGTAAGTGCAGCTCCTGCAGATGCAGCACACAATTATCCATGT GTATCAACCCTAAC (SEQ ID NO : 13). Los ejemplos de dichos ácidos nucleicos se representan por SEQ ID NO : 19, 20 y 21. En una realización particular, la secuencia de ácidos nucleicos de la invención, o una parte de la misma, es al menos un 85 % idéntica a la secuencia de ácidos nucleicos del gen ASP de *C. oncophora* representada en SEQ ID NO : 19.

Preferiblemente, la secuencia de ácidos nucleicos según la invención que codifica la proteína en *C. oncophora*, o una parte de esa secuencia de ácidos nucleicos que codifica un fragmento inmunógeno de esa proteína, es al menos un 90 %, preferiblemente un 93 %, más preferiblemente un 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o incluso un 100 % idéntica a la secuencia de ácidos nucleicos del gen ASP de *C. oncophora* representada en SEQ ID NO : 2 o SEQ ID NO : 19. Los ácidos nucleicos que tienen al menos un 98 % de identidad con la secuencia de ácidos nucleicos representada en SEQ ID NO : 2, se representan por SEQ ID NO : 4 y SEQ ID NO : 6. Los ácidos nucleicos que tienen al menos un 98 % de identidad con la secuencia de ácidos nucleicos representada en SEQ ID NO : 19, se representan por SEQ ID NO : 20 y SEQ ID NO : 21.

En una realización más, la presente invención se refiere a una proteína en *C. oncophora* aislada y un fragmento inmunógeno de la misma, en donde la secuencia de aminoácidos de la proteína o del fragmento inmunógeno es al menos un 90 %, preferiblemente un 93 %, más preferiblemente un 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o incluso un 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos representada en SEQ ID NO : 1. Las proteínas que tienen al menos un 98 % de identidad con la secuencia de aminoácidos representada en SEQ ID NO : 1, se representan por la SEQ ID NO : 3 y la SEQ ID NO : 5. La invención también incluye una proteína aislada que comprende la secuencia de aminoácidos identificada anteriormente, o consta esencialmente de dicha secuencia, y un N-terminal y/o C-terminal más, preferiblemente caracterizada por los aminoácidos LCSLDNGMT (SEQ ID NO : 14) y DEDCKGSSCRCSTQLSMCINPN (SEQ ID NO : 15), respectivamente. Los ejemplos de dichas proteínas se representan por SEQ ID NO : 16, 17 y 18. Por lo tanto, en una realización específica la presente invención se refiere a una proteína de *C. oncophora* aislada y un fragmento inmunógeno de la misma, en donde la secuencia de aminoácidos de la proteína o el fragmento inmunógeno es al menos un 90 %, preferiblemente un 93 %, más preferiblemente un 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o incluso un 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos representada en SEQ ID NO : 16, así como a un ácido nucleico que codifica dicha proteína, en particular representada por SEQ ID NO : 19.

El porcentaje de identidad de secuencias de ácidos nucleicos y polipéptidos puede calcularse usando algoritmos comercialmente disponibles, que comparan una secuencia de referencia con una secuencia problema. Los siguientes programas (proporcionados por el Centro Nacional para la Información Biotecnológica) pueden usarse para determinar homologías/identidades : BLAST, gapped BLAST, BLASTN y PSI BLAST, que pueden usarse con parámetros por defecto.

El término «aislado» se usa para indicar que una célula, un péptido o un ácido nucleico se separa de su entorno nativo. Los péptidos y los ácidos nucleicos aislados pueden estar sustancialmente puros, es decir, pueden estar esencialmente exentos de otras sustancias con que pueden encontrarse por naturaleza.

El término «fragmento» como se usa en la presente memoria se refiere a secuencias de aminoácidos parciales (y secuencias de ácidos nucleicos codificadoras, por consiguiente) que tienen al menos una propiedad inmunológica o inmunógena en común con la molécula nativa. Dichos fragmentos incluirán al menos un epitopo (o determinante antigénico) de la molécula nativa. Normalmente, tendrán una longitud de al menos 8 aminoácidos, preferiblemente al menos 15 o 20 aminoácidos.

Puesto que la presente invención describe secuencias de ácidos nucleicos que codifican nuevas proteínas en *C. oncophora*, ahora es posible por primera vez obtener estas proteínas en suficiente cantidad. Esto puede hacerse, por ejemplo, usando sistemas de expresión para expresar la totalidad o partes de los genes que codifican las proteínas o sus fragmentos inmunógenos según la invención.

Por consiguiente, en una realización más, la invención se refiere a fragmentos de ADN que comprenden una secuencia de ácidos nucleicos según la invención. Un fragmento de ADN es un trecho de nucleótidos que actúa como un portador para una secuencia de ácidos nucleicos según la invención. Dichos fragmentos de ADN pueden

ser, por ejemplo, plásmidos, en los que se clona una secuencia de ácidos nucleicos según la invención. Dichos fragmentos de ADN son útiles, por ejemplo, para aumentar la cantidad de ADN para uso como cebador y para la expresión de una secuencia de ácidos nucleicos según la invención, como se describe a continuación.

5 Según una realización más de la presente invención, la proteína ASP se produce por la expresión de un polinucleótido como se describe en la presente memoria. Los vectores adecuados para la expresión de proteínas son plásmidos, bacteriófagos, cósmidos, virus, minicromosomas o vectores integradores de manera estable; los últimos, en particular, para células vegetales o animales. En general, estos vectores tienen la propiedad de la replicación autónoma excepto para los vectores integradores de manera estable que se insertan ellos mismos en el material genético de la célula huésped y se replican con material genético del huésped. Las células huésped
10 adecuadas para la expresión de proteínas pueden ser procariontas o eucariotas, tales como bacterias tales como *Escherichia coli*, levaduras tales como *Saccharomyces cerevisiae* y *Pichia pastoris*, células vegetales, de algas, de micoplasma, tales como *Arabidopsis thaliana*, células de vertebrados o baculovirus/células de insectos, pero sin limitarse a estas; las células vegetales o animales pueden cultivarse *in vitro* o pueden formar parte de una planta o un animal intactos, respectivamente. El polinucleótido recombinante puede contener como un inserto un polinucleótido completo que codifique la ASP o un fragmento de la misma. Los sistemas de expresión de células de bacterias, levaduras, hongos, insectos, plantas y vertebrados son sistemas usados con mucha frecuencia. Dichos sistemas son conocidos en la técnica y generalmente están disponibles. Los vectores también se pueden usar como una manera de transportar la secuencia de ácidos nucleicos a una célula diana. Con respecto a esto, los virus usados con frecuencia como vectores son los virus vacuna (62), herpes virus (Patente Europea EP0473210),
20 adenovirus y retrovirus (69). Un ejemplo particular en el contexto de la presente invención es un vector bacteriano. En la presente memoria, las bacterias capaces de colonizar rumiantes se transforman para permitir que expresen la ASP de tal manera que lleve a una respuesta inmunógena contra el parásito. En particular, para obtener una respuesta inmunitaria local fuerte en la superficie de la mucosa del tubo digestivo donde residen normalmente estos parásitos. Las bacterias adecuadas para este fin son, por ejemplo, las bacterias de *Salmonella* y *Lactobacillus*.

25 Un requerimiento esencial para la expresión de la secuencia de ácidos nucleicos es un promotor adecuado unido funcionalmente a la secuencia de ácidos nucleicos, de manera que la secuencia de ácidos nucleicos esté bajo el control del promotor. Es obvio para los expertos en la materia que la elección de un promotor se extiende a cualquier promotor eucariota, procarionta o vírico capaz de dirigir la transcripción génica en las células usadas como células huésped para la expresión de las proteínas. Por consiguiente, una realización particular se refiere a una molécula de ADN recombinante que comprende un fragmento de ADN y/o una secuencia de ácidos nucleicos según la invención en donde la secuencia de ácidos nucleicos según la invención se pone bajo el control de un promotor unido funcionalmente. Esto se puede obtener mediante, por ejemplo, técnicas de biología molecular estándar, por ejemplo, Sambrook & Russell : *Molecular cloning : a laborator y manual* (2001), Cold Spring Harbor Laboratory Press. Los promotores unidos funcionalmente son promotores capaces de controlar la transcripción de las secuencias de ácidos nucleicos a las que están unidos. Dicho promotor puede ser el promotor nativo del gen ASP u otro promotor de *Cooperia oncophora*, siempre que ese promotor sea funcional en las células usadas para expresión. También puede ser un promotor heterólogo. Cuando las células huésped son bacterias, las secuencias de control de expresión útiles, que pueden usarse, incluyen el promotor y el operador Trp (63); el promotor y operador lac (64); el promotor de proteína de membrana exterior (65); los promotores y operadores de bacteriófago lambda (66); el promotor y operador de [alfa]-amilasa (*B. subtilis*), secuencias de terminación y otro aumento de expresión y las secuencias de control compatibles con la célula huésped seleccionada. Cuando las células huésped son levaduras, las secuencias de control de expresión útiles, que pueden usarse, incluyen promotor de AOX. Cuando las células huésped son plantas, las secuencias de control de expresión útiles, que pueden usarse, incluyen promotor de faseolina (67).

45 Por lo tanto, la presente invención se refiere a un vector o una célula huésped que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una proteína según la invención, y una molécula de ADN recombinante que comprende dicha secuencia de ácidos nucleicos bajo el control de un promotor unido funcionalmente. Esta forma también se refiere a una célula huésped que contiene un vector que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína de *C. oncophora* o un fragmento inmunógeno de la misma según la invención.

50 La invención se refiere, por otra parte, a un procedimiento para transformar un huésped para proporcionar un huésped transformado, procedimiento que comprende proporcionar un huésped, hacer al huésped competente para la transformación, e introducir en el huésped una molécula de ADN recombinante como se describe en la presente memoria. La invención también abarca la expresión producto de dicho huésped transformado. Preferiblemente, el producto de expresión está en forma purificada.

55 En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para proteger un huésped de la infección por un nematodo parásito, método que comprende la administración al huésped de al menos una proteína, un ácido nucleico o un vector, como se describe en la presente memoria.

Una realización particular proporciona una composición o una vacuna para elevar la respuesta inmunitaria en un sujeto. Las vacunas pueden usarse terapéutica o profilácticamente, es decir, para evitar la infección parasitaria, en particular la infección con especies del género *Cooperia*, más en particular *Cooperia oncophora*. En casos

específicos la vacuna proporcionada por esta invención puede usarse en un método para prevenir o reducir la infección o la colonización de un huésped por un parásito nematodo.

En particular, los ácidos nucleicos, las proteínas o los vectores como se describe en la presente memoria se usan para fabricar una composición o una vacuna, que incluye típicamente un portador, diluyentes y/o excipientes, farmacéuticamente aceptables, y opcionalmente un adyuvante. De acuerdo con esto, es un objeto de la presente invención proporcionar una composición farmacéutica o una vacuna contra *C. oncophora* que comprenda

- una cantidad terapéuticamente eficaz de una secuencia de ácidos nucleicos, una proteína, un vector o una célula huésped según la invención,
- un portador o diluyente farmacéuticamente aceptables y
- opcionalmente un adyuvante,

que consista esencialmente en lo anterior o que conste de lo anterior.

Los portadores o diluyentes farmacéuticamente aceptables, particulares, empleados son portadores o diluyentes «aceptables desde el punto de vista veterinario» y son convencionales en la técnica. Estos incluyen todos y cada uno de disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes estabilizantes, diluyentes, conservantes, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos, agentes retardantes de la adsorción y similares. Los diluyentes pueden incluir agua, solución salina, dextrosa, etanol, glicerol y similares. Los agentes isotónicos pueden incluir cloruro sódico, dextrosa, manitol, sorbitol y lactosa. Los estabilizantes incluyen, por ejemplo, albúmina.

Se sabe que los adyuvantes actúan de diferentes formas para aumentar la respuesta inmunitaria. En general, los adyuvantes inmunomoduladores producen una regulación por incremento general de ciertas citocinas y una regulación por disminución concomitante de otras llevando a una respuesta de Th1 celular y/o de Th2 humoral.

Como se usa en la presente invención, «adyuvantes» incluye Quil A, ISCOM, ISCOMATRIX, el sistema adyuvante RIBI (Ribi Inc.), alumbre, gel de hidróxido de aluminio, colesterol, emulsiones de aceite en agua, emulsiones de agua en aceite tales como, por ejemplo, adyuvantes completos e incompletos de Freund, copolímero de bloque (CytRx, Atlanta GA), SAF-M (Chiron, Emeryville CA), adyuvante AMPHIGENO, saponina, saponina en asociación con un esteroil (véase, por ejemplo, la Patente Estadounidense US20050220814), QS-21 (Cambridge Biotech Inc., Cambridge MA), GPI-0100 (Galenica Pharmaceuticals, Inc., Birmingham, AL) u otras fracciones de saponina, polímeros tales como dietilaminoetil(DEAE)-dextrano, polietilenglicol y poli(ácido acrílico) (por ejemplo, CARBOPOL®), hidroacetato de N-(2-deoxi-2-L-leucilamino-b-D-glucopiranosil)-N-octadecildodecanoilamida (también conocida por el nombre comercial Bay R1005®), monofosforil lípido A, adyuvante de avridina lípido-amina, enterotoxina termolábil de *E. coli* (recombinante o de otro modo), toxina del cólera, muramil dipéptido o inmunomoduladores tales como citocinas y agonistas TLR, oligonucleótidos que contienen citosina-fosfatoguanosina (CpG) y combinaciones de estos adyuvantes, pero sin limitarse a estos. Un adyuvante preferido es una saponina o el adyuvante puede incluir una saponina, tal como Quil A. En algunas realizaciones, el adyuvante es un adyuvante compuesto que puede comprender una saponina, y opcionalmente un esteroil, al menos uno de un polímero poliacrílico, una amina cuaternaria (por ejemplo, DDA o avridina), un estimulante de Th2 tal como N-(2-deoxi-2-L-leucilamino-b-D-glucopiranosil)-N-octadecildodecanoilamida y/o un oligonucleótido inmunoestimulador.

Los compuestos adyuvantes descritos anteriormente pueden presentarse en forma de una emulsión de aceite en agua, en donde se dispersan gotitas de aceite en una fase acuosa continua. En otros aspectos, el adyuvante puede ser a base de aceite, es decir, puede contener una fase oleosa continua y gotitas de fase acuosa entremezcladas en la misma.

Los adyuvantes de emulsión pueden ser preferiblemente microfluidizados para lograr un tamaño más pequeño (submicrómetro) y una mayor uniformidad entre las partículas de emulsión, dando como resultado, así, estabilidad de la emulsión y pueden incluso incrementar el efecto adyuvante de dicha emulsión microfluidizada.

La Patente Estadounidense n.º 5,961,970 explica aún otra emulsión de aceite en agua submicrométrica para usar como adyuvante de vacuna. En dicha emulsión, el componente hidrófobo se selecciona del grupo que consiste en un aceite de triglicéridos de cadena media, un aceite vegetal y una mezcla de los mismos. El tensioactivo incluido en esta emulsión puede ser un tensioactivo biológicamente compatible natural tal como fosfolípido (por ejemplo, lecitina) o un tensioactivo no natural farmacéuticamente aceptable tal como TWEEN-80.

La Patente Estadounidense n.º 5,084,269 explica que una formulación de adyuvante que contenga lecitina en asociación con aceite de parafina produce una disminución de la irritación en el animal huésped y simultáneamente induce una inmunidad sistémica incrementada. La formulación de adyuvante que resulta de la Patente Estadounidense n.º 5,084,269 se usa comercialmente en vacunas veterinarias con el nombre comercial AMPHIGEN®. La formulación de AMPHIGEN® está constituida por micelas-gotitas de aceite rodeadas por lecitina.

Así, en diferentes realizaciones, la invención inmediata proporciona una composición que comprende un componente de antígeno y un componente de adyuvante. El componente de antígeno puede comprender una subfracción de ES de PMA, una secuencia de aminoácidos al menos un 90 % (por ejemplo, al menos un 93 % o al menos un 94 % o al menos un 95 % o al menos un 96 % o al menos un 97 % o al menos un 98 % o al menos un 99 % o un 100 %) idéntica a la SEQ ID NO : 1 o la SEQ ID NO : 16, o una secuencia de ácidos nucleicos al menos un 90 % (por ejemplo, al menos un 93 % o al menos un 94 % o al menos un 95 % o al menos un 96 % o al menos un 97 % o al menos un 98 % o al menos un 99 % o un 100 %) idéntica a la SEQ ID NO : 2 o la SEQ ID NO : 19 o cualquier combinación de las mismas. El componente de adyuvante puede contener una saponina (tal como, por ejemplo, Quil A), y opcionalmente un esteroide (tal como, por ejemplo, lanosterol, ergosterol o colesterol), al menos uno de : una amina cuaternaria (tal como, por ejemplo, DDA o avridina), un polímero de poliacrílico, el glucolípid (por ejemplo, BayR1005®, y/o un oligonucleótido inmunoestimulador. Adicional o alternativamente, el componente adyuvante puede contener una emulsión de aceite en agua. En otras realizaciones más, la emulsión de agua en aceite puede contener un oligonucleótido inmunoestimulador y DEAE dextrano. Las cantidades y las concentraciones de adyuvantes y aditivos útiles en el contexto de la presente invención pueden ser determinados fácilmente por un trabajador cualificado.

Preferiblemente, la composición como se describe en la presente memoria es una composición inmunógena. Por «inmunógeno» se quiere decir la capacidad para provocar una respuesta inmunitaria en un sujeto contra el patógeno. La presente invención proporciona, de acuerdo con esto, composiciones para uso en la obtención de una respuesta inmunitaria que pueda utilizarse como vacuna contra *C. oncophora*. La respuesta inmunitaria puede ser una respuesta inmunitaria celular mediada principalmente por células NK, células T citotóxicas o una respuesta inmunitaria humoral mediada principalmente por células T colaboradoras, que a su vez active las células B conduciendo a la producción de anticuerpos. Más específicamente, por «obtención o inducción de una respuesta inmunitaria» se quiere decir que un antígeno estimula la síntesis de anticuerpos IgG1 específicos y/o proliferación celular cuando se mide, por ejemplo, por incorporación de timidina ³H de células NK, células T y células B. La administración de la vacuna de la invención obtiene una respuesta inmunitaria que da como resultado una reducción en el recuento de huevos fecales acumulativo medio de al menos aproximadamente un 60 % en un animal en relación con un animal de control no vacunado (por ejemplo, adyuvante solo). Preferiblemente, el nivel de la disminución es aproximadamente un 70 %, más preferiblemente aproximadamente un 80 % y lo más preferiblemente aproximadamente un 90 % o mayor. Por lo tanto, la respuesta inmunitaria confiere algún efecto protector beneficioso al sujeto frente a la exposición subsiguiente al agente infeccioso. Más preferiblemente, la respuesta inmunitaria previene el comienzo de al menos un síntoma de una enfermedad asociada al agente infeccioso, o lo alivia, o reduce la gravedad de al menos un síntoma de enfermedad asociada al agente infeccioso con la exposición subsiguiente. Los síntomas asociados a infecciones por *C. oncophora* incluyen típicamente diarrea y síndrome diarreico crónico, pero no se limita estos.

Por «sujeto» o «huésped» se quiere decir cualquier animal que sea susceptible a *C. oncophora*, tal como el ganado vacuno. El término «ganado vacuno» se refiere a animales bovinos incluyendo bues, toros, vacas y terneros, pero sin limitarse a estos.

En la práctica de los presentes métodos, se administra una vacuna o composición de la presente invención preferiblemente por las vías intramuscular o subcutánea, aunque pueden usarse también otras vías de administración, tales como, por ejemplo, por administración oral, intranasal (por ejemplo, aerosol u otra administración sin aguja), intralinfática, intradérmica, intraperitoneal, rectal o vaginal o por una combinación de vías. La formulación de la composición o la vacuna puede prepararse de varias formas dependiendo de la vía de administración. Por ejemplo, las composiciones pueden prepararse en forma de soluciones o dispersiones acuosas estériles adecuadas para uso inyectable o prepararse en forma liofilizada usando técnicas de liofilización. Las composiciones inmunógenas liofilizadas se mantienen típicamente a aproximadamente 4 °C y pueden reconstituirse en una solución estabilizadora, por ejemplo, solución salina o/y HEPES, con o sin adyuvante.

Puedan requerirse regímenes estimulantes y puede ajustarse la pauta posológica para proporcionar una inmunización óptima. Los protocolos de inmunización pueden optimizarse usando procedimientos conocidos en la técnica. Se puede administrar una sola dosis a los animales o, alternativamente, pueden efectuarse dos, tres o más inoculaciones con intervalos de dos a diez semanas. Dependiendo de la edad del animal, puede volver a administrarse la composición inmunógena o la vacuna. Por ejemplo, la presente invención contempla la vacunación de terneros sanos (de 3 a 12 meses) 6 y/o 3 semanas antes de su primera estación de pastoreo y revacunación al comienzo de la primera estación de pastoreo.

El término «cantidad terapéuticamente eficaz» se refiere a una cantidad suficiente para obtener una respuesta inmunitaria en el animal al que se administra. La respuesta inmunitaria puede comprender, sin limitación, la inducción de inmunidad celular y/o humoral. La cantidad de una vacuna que sea terapéuticamente eficaz puede variar dependiendo del estado del ganado vacuno y/o el grado de infección y puede ser determinada por un veterinario. La extensión y la naturaleza de las respuestas inmunitarias inducidas en el ganado vacuno pueden valorarse usando diversas técnicas. Por ejemplo, puede recogerse suero de los animales inoculados y analizarse la presencia de anticuerpos específicos para *C. oncophora*.

Además de los aspectos ya descritos de la invención e incluyendo las descripciones dadas de todas las modificaciones y los medios de producción y administración, puede proporcionarse una composición o vacuna de proteínas ASP o polinucleótidos en *C. oncophora* como se describe en la presente memoria como polipéptidos o polinucleótidos solos o usarse en combinación.

5 Como tal, en algunas realizaciones, el método, el uso, la composición o la vacuna de la presente invención pueden basarse en dos o más proteínas ASP como se describe en la presente memoria, o fragmentos de las mismas. En una realización específica, se usan al menos dos, tres o más proteínas ASP, o ácidos nucleicos que codifican dichas proteínas, o fragmentos de las mismas, en una sola composición o vacuna. Como tal, en algunas realizaciones, la presente invención se refiere a una composición o vacuna basada en al menos dos proteínas ASP que tienen al
10 menos un 85 % de identidad con la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO : 1 o SEQ ID NO : 16, a una composición o vacuna que comprende al menos esas dos proteínas, que consiste esencialmente en al menos esas dos proteínas o que consta de al menos esas dos proteínas; o al menos dos ácidos nucleicos ASP que tienen al menos un 85 % de identidad con la secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO : 2 o SEQ ID NO :
15 19; o sus fragmentos. En una realización específica, la composición o la vacuna comprende dos o tres de las proteínas seleccionadas del grupo que consiste en la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO : 1, 3, 5, 16, 17 y 18 y; o dos o tres de los ácidos nucleicos que codifican estas proteínas, o como se representa por SEQ ID NO : 2, 4, 6, 19, 20 y 21, respectivamente. Ejemplos de combinaciones de proteínas específicas son : SEQ ID NO : 1 y 3; SEQ ID NO : 1 y 5; SEQ ID NO : 3 y 5; y SEQ ID NO : 1, SEQ ID NO : 3 y SEQ ID NO : 5; o los ácidos nucleicos que codifican estas proteínas y como se proporcionan en la presente memoria.

20 Ejemplos

1. Procedimientos experimentales

1.1 Preparación de productos excretores y secretores de *Cooperia oncophora* adulta

Se infectaron terneros con 100 000 larvas infecciosas de una cepa de *Cooperia oncophora* propia. Se recogió *Cooperia oncophora* de fase adulta del intestino delgado 21 días p. i. Con posterioridad se pusieron los gusanos en un aparato Baermann modificado que se llenó con agua fisiológica a 37 °C. Se recogieron entonces los gusanos que migraron al fondo del embudo y se lavó un mínimo de cinco veces con agua fisiológica a 37 °C. En la siguiente etapa, se transfirieron los helmintos y se cultivaron durante tres días consecutivos en medio RPMI (Gibco®, Invitrogen; Carlsbad, CA, EE. UU.) a 37 °C. Se refrescó el medio sobre una base diaria y se almacenó a -80 °C. Después de este periodo de cultivo de tres días, todos los medios almacenados a -80 °C, que contenían la fracción
25 de proteínas ES, se hicieron pasar por un filtro de 0,22 µm y se concentraron simultáneamente y se dializaron a PBS a 4 °C usando una unidad de ultrafiltración Amicon y discos de ultrafiltración Ultracel Regenerated Cellulose (ambos Millipore; Billerica, MA, EE. UU.). La concentración de proteínas de la muestra ES obtenida se determinó usando el estuche de ensayo de proteínas BCA™ (Pierce, Rockford, IL, EE. UU.) según las instrucciones del fabricante.

1.2. Cromatografía de exclusión por tamaño

35 El fraccionamiento por cromatografía de exclusión por tamaño (SEC, en inglés) de material ES total de *Cooperia oncophora* se llevó a cabo usando una columna Superdex 200 16/70 autoempaquetada (GE Healthcare Bio-Sciences AB; Uppsala, Suecia). Se inyectaron volúmenes máximos de 0,5 ml de una solución de proteína ES concentrada (que correspondía a 300 µg de proteína ES) y se eluyeron en PBS a un caudal de 1 ml/min. Se siguió la elución de la proteína por mediciones de absorbancia a 280 nm, 254 nm y 214 nm, y cuando se recogieron
40 fracciones de 1,0 ml adecuadas (ÅKTA Explorer, GE Healthcare Bio-Sciences AB; Uppsala, Suecia). Las etapas de lavado y de equilibrio de la columna de PBS de al menos dos volúmenes de columna se llevaron a cabo previamente a cada experimento y después de cada uno de los experimentos, respectivamente. Para obtener una cantidad adecuada de proteínas, se realizaron múltiples series de este procedimiento.

1.3. Electroforesis uni- y bidimensional y digestión trípica de proteínas ES

45 Se llevó a cabo electroforesis unidimensional desnaturalizante (SDS-PAGE) según Laemmli (34), incluyendo y omitiendo β-mercaptoetanol en SDS-PAGE reductora y no reductora, respectivamente. Se realizó electroforesis en gel unidimensional nativa con las muestras disueltas en Tris 60 mM pH 6,8, azul de bromofenol al 0,1% y tampón de muestra de glicerol al 20 % operando la electroforesis en las condiciones siguientes : los geles de separación y apilamiento consistieron en Tris-HCl pH 8,5 y Tris-H₃PO₄ pH 9,6, respectivamente, con cantidades apropiadas
50 añadidas de acrilamida-bisacrilamida, mientras el tampón que operaba era un tampón de Tris-glicina a pH 8,9 y la tensión se fijó en 90 V.

Se llevó a cabo electroforesis en gel bidimensional como sigue. Se precipitó proteína añadiendo cinco volúmenes de acetona enfriada en hielo a un volumen de proteína ES. Esto se trató brevemente con un agitador vorticial y se incubó a -20 °C durante una hora, después de lo cual se recuperó el botón de proteína por centrifugación a 523 rad/s
55 (5000 rpm) durante cinco minutos. Se desechó el sobrenadante y se dejó que el botón se secase al aire, después de lo cual se volvió a solubilizar en urea 8 M, tiourea 2 M, CHAPS al 2 % p/v, DTT 20 mM, anfilitos de portador al 0,2 %

v/v (pH 3-10; GE Healthcare Bio-Sciences AB; Uppsala, Suecia). Esto se dejó a temperatura ambiente durante una hora, seguido por centrifugación a 838 rad/s (8000 rpm) durante cinco minutos para retirar la proteína insoluble aún presente. El sobrenadante restante, que correspondía a aproximadamente 150 µg de proteína ES, se aplicó a tiras de 7 cm, pH 3-10, de DryStrip IEF Immobiline™ (GE Healthcare Bio-Sciences AB; Uppsala, Suecia). Esto se dejó, cubierto con aceite de parafina, durante la noche a temperatura ambiente para rehidratación de la tira y absorción de la muestra de proteína. Se llevó a cabo isoelectroenfoque a temperatura ambiente usando un instrumento de isoelectroenfoque Ettan IPGphor3 (GE Healthcare Bio-Sciences AB; Uppsala, Suecia) con un periodo de enfoque inicial de tres horas a 300 V, seguido por un gradiente lineal de cinco horas de 300 a 3500 V y un largo intervalo de tiempo final de 18 horas a 3500 V, que da una carga de tensión total de aproximadamente 73 kWh. Se redujeron las proteínas resueltas en las tiras unidimensionales y se alquilaron previamente a la electroforesis bidimensional incubando las tiras durante 15 minutos a temperatura ambiente en una solución de Tris-HCl 50 mM, pH 8,8, urea 6 M, glicerol al 30 % v/v, SDS al 2 % p/v, DTT al 2 % p/v seguido por otros 15 minutos en una solución idéntica que contenía yodoacetamida al 2,5 % p/v en vez de DTT. La electroforesis bidimensional (SDS-PAGE), con la tira de IEF embebida en el gel de apilamiento, se llevó a cabo como se describe para «electroforesis en gel unidimensional».

Se usó SimplyBlue™ SafeStain (Invitrogen; Carlsbad, CA, EE. UU.) para visualizar las proteínas según las instrucciones del fabricante. El tamaño de poro de los geles, proporcionado como porcentaje de la concentración de monómero de acrilamida-bisacrilamida total, es de 13,5 %.

Previamente a la digestión trípica, las bandas de proteína y/o los lugares de interés se escindieron del gel, se lavaron dos veces durante 20 minutos a 30 °C usando una mezcla de acetonitrilo al 50 % (ACN) - bicarbonato de amonio 200 mM y después se secaron al aire. La tripsina de grado secuenciación (Promega; Madison, WI, EE. UU.) se añadió a una cantidad final de 0,1 µg y se mantuvo después en hielo la mezcla de tripsina-rodajas de gel durante 45 minutos, después de lo cual se añadió bicarbonato de amonio 50 mM hasta que la rodajas de gel se sumergieron completamente. Se realizó digestión por incubación durante la noche a 37 °C. Se extrajeron los péptidos por adición de ACN al 60 % - ácido fórmico al 0,1 % dos veces a los lugares del gel. Se evaporó el tampón de extracción en un aparato Speedvac redisolviéndose los péptidos restantes en 8 µl de ácido fórmico al 0,1%.

1.4. Análisis por espectrometría de masas

Se detectaron péptidos tríplicos en una placa objetivo de ionización/desorción mediante láser asistida por matriz (MALDI) de acero inoxidable y se cubrieron con una matriz de ácido α-ciano-4-hidroxicinámico (7 mg/ml en ACN al 50 %, ácido trifluoroacético al 0,1 %, citrato de amonio 1 mM) en una relación 1 : 1. Previamente a cada conjunto de análisis, se llevó a cabo calibración de los instrumentos usando Cal Mix (Applied Biosystems; Foster City, CA, EE. UU.) según las instrucciones del fabricante. Se obtuvo identificación de proteínas por medición de PMF (huella peptídica, por sus siglas en inglés) en un sistema de MALDI con espectrometría de masas con analizador de tiempo de vuelo en tándem (MALDI-TOF/TOF MS) (analizador proteómico modelo 4800; Applied Biosystems; Foster City, CA, EE. UU.) en modo MS de iones positivos. Se realizaron MS/MS para verificar las secuencias de ciertos péptidos.

1.5. Identificación de proteínas

Para el análisis de huella peptídica en masa, se inspeccionaron los espectros obtenidos frente a la base (33) de datos del transcriptoma basado en EST de *Cooperia oncophora* que consistía en 31 774 secuencias de aminoácidos, suplementadas con deposiciones de NCBI existentes para *C. oncophora*, usando la plataforma informática GPS Explorer™ V2 (Applied Biosystems; Foster City, CA, EE. UU.) que hace uso del buscador Mascot (Matrix Science Inc.; Boston, MA, EE. UU.). Se inspeccionaron los espectros usando una masa de péptidos de 200 ppm y una tolerancia de 0,8 Da MS/MS, con carbamidometilación (Cys) y oxidación con metionina como parámetros de modificación variables y con una tolerancia máxima de dos acontecimientos de división perdidos durante la digestión con tripsina de la proteína.

1.6. Análisis de las secuencias

Después de su identificación por MS, se sometieron las secuencias de aminoácidos con una longitud parcial a algoritmos de búsqueda NemaBLAST (33), que dio varias secuencias de aminoácidos adyacentes y/o solapadas. Con posterioridad se alinearon usando el software MegAlign (DNASTAR, Inc.; Madison, WI, EE. UU.), empleando el algoritmo de alineamiento ClustalW, conduciendo en la mayoría de los casos a un incremento significativo en el cubrimiento de secuencias y mayormente proporcionando secuencias de aminoácidos de longitud completa de las proteínas identificadas. Después se sometieron estas secuencias a análisis BLASTP (35) empleando una base de datos de secuencias de proteínas no redundantes para asignar una identificación basándose en la identidad de las secuencias.

Se determinó la secuencia de longitud completa de ASP de doble dominio como sigue: se diseñaron dos cebadores degenerados (directo, ATGYAACAGKAYTGGGTGAGG (SEQ ID NO: 7) e inverso, ATACACATGGAYAAAYTGTGTGCT (SEQ ID NO : 8), Y y K representando T/C y G/T, respectivamente) basándose en las regiones conservadas en la secuencia ASP de doble dominio putativa. Se llevó a cabo reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) usando la enzima *GoTaq®* (Promega; Madison, WI, EE. UU.)

mezclando 1 μ l de ADNc de *Cooperia oncophora* de fase adulta con 1 μ M de los cebadores tanto directo como inverso y una unidad de *GoTaq*[®] en tampón de reacción conteniendo 0,2 mM de cada uno de dNTP y MgCl₂ 1,2 mM. Se llevaron a cabo experimentos de PCR en un instrumento Mastercycler[®] Ep (Eppendorf; Hauppauge, NY, EE. UU.) donde dos minutos a una temperatura de desnaturalización del 95 °C fueron seguidos por 35 minutos de desnaturalización (30 segundos a 95 °C), hibridación (30 segundos a 58 °C) y elongación (síntesis de ADN durante 90 segundos a 72 °C). Después, se incluyó una etapa de elongación final a 72 °C durante cinco minutos, después de lo cual se mantuvieron las mezclas de PCR a 10 °C. Los productos de la PCR obtenidos se ligaron, con posterioridad, en pGEM[®]-T Easy (Promega; Madison, WI, EE. UU.) según las instrucciones del fabricante, después de lo cual se transformaron células competentes de DH5 α (Invitrogen; Carlsbad, CA, EE. UU.) con estas construcciones de vector como describía el fabricante y se pusieron en placas en medio que contenía X-gal (5-bromo-4-cloro-indolil- β -D-galactopiranosido). Se recolectaron cincuenta y tres colonias blancas y se analizaron mezclando 15 μ l de suspensión de clones (en agua) con cantidades idénticas de los reactivos ya mencionados. También se duplicaron las condiciones de la PCR de las mencionadas, ya sea que solo se llevaron a cabo 32 ciclos de desnaturalización, hibridación y elongación. Los fragmentos de la PCR obtenidos se secuenciaron (en la Unidad de Servicio de Genética, Hospital Universitario de Ghent), seguido por emparejamiento de los datos obtenidos para los espectros de MS y MS/MS registrados previamente.

1.7. Caracterización de proteínas *in silico*

Después de la valoración de las secuencias de aminoácidos de longitud completa de las proteínas identificadas, se determinaron los valores del peso molecular y el punto isoelectrico usando las correspondientes herramientas de cálculo ExPASy (SIB Bioinformatics Resource Portal), al tiempo que se predijeron las secuencias señal N-terminales usando SignalP 3.0 (Centro de Análisis de Secuencias Biológicas en la Universidad Técnica de Dinamarca) (36) o, en su ausencia, se valoraron las proteínas secretoras no clásicas usando SecretomeP 2.0 (37). Teniendo en cuenta las predicciones de SignalP 3.0, se consideraron identificaciones positivas cuando tanto la red neural como los algoritmos del modelo de Markov ocultos ofrecían estimaciones corroborativas. Se predijo que las proteínas secretadas no clásicas daban una puntuación de red neural que excedía del umbral normal de 0,5; pero no contenían un péptido señal.

1.8. Liberación, purificación y derivatización de restos de N- y O-glucano

El material ES total así como las fracciones ES obtenidas por cromatografía de exclusión por tamaño separadas, es decir, las fracciones de PMA, PMM y PMB (pesos moleculares alto, medio y bajo, respectivamente), se sometieron a tratamiento en serie con PNGase F y PNGase A para obtener N-glucanos liberados. Con ese fin, se redisolviéron proteínas liofilizadas en PBS con SDS al 1,3 % y β -mercaptoetanol al 0,1 % y se incubaron a 95 °C durante 10 minutos, seguido por adición de NP-40 al 1,3 %. Se incubaron después las muestras con Sepharose acoplada a tripsina durante 16 horas a 37 °C con agitación. Se hicieron girar abajo las perlas, se transfirió el sobrenadante a un tubo fresco y se añadió PNGase F, seguido por incubación durante 24 horas a 37 °C con agitación. Después se aplicó la mezcla a un cartucho C₁₈ RP (500 mg; JT Baker, Philipsburg, NJ, EE. UU.), y las fracciones del flujo y el lavado (2 ml, acetonitrilo al 10 % (ACN) y 4 ml de agua, respectivamente) se aplicaron con posterioridad a cartuchos de carbono (150 mg Carbograph; Grace, Deerfield, IL, EE. UU.). Después de lavar con 6 ml de agua, se eluyeron los glucanos con 3 ml de ACN al 25 % y 3 ml de ACN al 50 % que contenían TFA al 0,1 %. Los (gluco)-péptidos que quedaban en el cartucho C₁₈ RP se eluyeron por aplicación de 5 ml de ACN al 30 % / TFA al 0,1 % y 5 ml de ACN al 60 % / TFA al 0,1 %, y estos eluatos combinados se secaron a vacío con posterioridad. Se disolvieron los (gluco)-péptidos en acetato sódico (NaAc) pH 4,5 y, después de adición de PNGase A (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania), incubación durante 24 horas a 37 °C. Se aplicó la mezcla a un cartucho C₁₈ RP y un cartucho de carbono como se explicó en líneas generales anteriormente. Cada uno de los N-glucanos liberados con PNGase F- y PNGase A purificados en los eluatos del cartucho de carbono se sometió a etiquetado con ácido 2-aminobenzoico (2-AA) como se describió previamente (38). Para la limpieza, se cargaron restos de glucano etiquetados en Biogel P-10 (BioRad, Veenendaal, Países Bajos) en ACN al 75 % y después de lavado con ACN al 80 % se eluyeron con agua. En paralelo, para obtener O-glucano alditoles, se trataron muestras ES con NaOH 0,1 M / NaBH₄ 1 M a 40 °C durante 24 horas. Después se neutralizaron las muestras en hielo usando ácido acético 4 M y se retiró ácido bórico por evaporación repetida y adición de ácido acético al 1 % en MeOH. Se purificaron los O-glucanos liberados usando cartuchos de C₁₈ y de carbono como se describió anteriormente. Para permetilación, se disolvieron O-glucanos secados en DMSO, después de lo cual se añadió NaOH (punta de espátula con polvo) y se dejó la muestra a temperatura ambiente durante 10 minutos con agitación regular. Después, se añadieron 100 μ l de yodometano, seguido por 10 minutos de agitación regular y la adición, con posterioridad, de 400 μ l de diclorometano y 500 μ l de agua. La agitación por inversión, la eliminación de la capa acuosa y la adición de capa fresca se repitieron cinco veces antes de que se secase la capa orgánica restante en un flujo de nitrógeno.

1.9. Análisis de glucano de excretoma/secretoma por espectrometría de masas

Empleando las secuencias de aminoácidos ensambladas de las proteínas identificadas, se realizaron análisis de glucano unido a N *in silico* usando NetNGlyc 1.0 Server (Universidad Técnica de Dinamarca). Se llevaron a cabo análisis de glucanos experimentales como sigue: se analizaron mezclas de N-glucano 2-AA-etiquetado y O-glucano

permetilado con un espectrómetro de masas Ultraflex II MALDI-TOF (Bruker Daltonics, Bremen, Alemania) operando en modo reflectron de iones negativos (N-glucanos) o iones positivos (O-glucano) usando DHB (Bruker Daltonics) como matriz. Se incubó una muestra de N-glucanos de PMM con Jack bean α

5 α manosidasa (Sigma) en NaAc pH 4,5 durante 16 horas a 37 °C y se analizó por MALDI-TOF MS después de aplicación a Zip-Tip C₁₈ y elución directa en placa objetivo con una solución de 20 mg/ml de DHB en ACN al 30 %. Para análisis de glucopéptidos, una muestra de la mezcla de glucopéptido/péptido tróptico extraída de la rodaja de gel se aplicó a una columna de fase inversa (PepMap, 3 μ m, 75 μ m·100 mm; Dionex /LC Packings, Amsterdam, Países Bajos) usando un sistema Ultimate 3000 nano-LC (Dionex /LC Packings). Se equilibró la columna a temperatura ambiente con eluyente A (ácido fórmico al 0,1 % en agua) a un caudal de 200 nl/min. Después de inyección de la muestra, las condiciones de elución se cambiaron a 10 % de disolvente B (95 % de acetonitrilo, 0,1 % de ácido fórmico) seguido por un gradiente a 60 % de B en 45 min y una elución isocrática posterior con una duración de 10 minutos. La columna LC se acopló a un Esquire HCT-Ultra ESI-Trampa de iones-MS (Bruker-Daltonics, Bremen, Alemania) equipada con una fuente de nanopulverización *online* que operaba en el modo iones positivos. Para electropulverización (1100-1250 V), se usaron emisores LC/MS de acero inoxidable electropulidos (D. E. 150 μ m, D. I. 30 μ m) de Proxeon A/S (Odense, Dinamarca). Se evaporó el disolvente a 175 °C empleando una corriente de nitrógeno de 7 l/min. Se registraron iones desde m/z 500 a m/z 1800 en el modo MS. Cuando se operó en el modo auto MS/MS, registrándose iones desde m/z 140 a 2200, cada barrido de MS fue seguido por la adquisición de espectros MS/MS de hasta tres de los iones más abundantes en el espectro MS.

1.10. Prueba de vacunación

20 Se aleatorizaron catorce terneros MontBéliard macho de 7 meses al comienzo del experimento, en dos grupos de siete animales. El alojamiento de los animales, la alimentación, las inmunizaciones con la fracción de PMA, las infecciones por exposición, los recuentos de huevos fecales y las valoraciones de la longitud de los gusanos se llevaron a cabo como se describió previamente (39), excepto que en este estudio se inmunizaron los animales con 30 μ g de proteína y 750 μ g de adyuvante en cada inmunización. Se extrajo sangre de los animales antes del
25 comienzo de la prueba y una semana después de las inmunizaciones segunda y tercera. Se realizaron en modo ciego todas las técnicas parasitológicas, esto es, sin conocimiento del grupo de tratamiento al que pertenecía el animal.

1.11. Respuestas de anticuerpos

30 Se empleó un enzimoanálisis de adsorción (ELISA) para determinar los niveles en suero de inmunoglobulina IgG1 e IgG2 contra *C. oncophora*. Las fracciones en ES adultas de PMA se recubrieron por separado (1 μ g/ml) en una placa de 96 pozos para ELISA, durante la noche, en tampón de carbonato (0,025 M, pH 9,6), después se bloquearon durante la noche en una solución salina tamponada con fosfato (PBS) con Tween 80 al 0,2 % y se añadió albúmina de suero bovino al 2 % (BSA), seguido por incubación con suero del grupo de control (solo adyuvante) o el correspondiente grupo inmunizado (antígeno con adyuvante) (series de dilución en serie de 1/200 en
35 PBS con Tween 80 al 0,2 % y BSA al 2 %). Las IgG1 y IgG2 antibobinas de oveja acopladas a peroxidasa de rábano (HRP; Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, EE. UU.) se usaron como conjugados (todos diluidos 1 : 200 en PBS con Tween 80 al 0,2 % y BSA al 2 %), con ABTS como el sustrato. Se midió la densidad óptica a 405 nm sirviendo la señal a 492 nm como blanco.

1.12. Análisis estadístico

40 Los datos se presentan como medias aritméticas. La significancia de las diferencias entre los grupos vacunados y el grupo de control de adyuvante se valoró por pares usando un ensayo U de Mann-Whitney de una cola. Las diferencias entre grupos se consideraron estadísticamente significativas siempre que el correspondiente valor P fuera menor que 0,05.

1.13. Expresión en *Pichia pastoris*

45 La proteína que codifica la secuencia se multiplica por PCR a partir de ADNc de *C. oncophora* y se inserta, con posterioridad, como un fragmento *XhoI-NotI* en el vector de expresión de *Pichia* pPIC9 (Invitrogen Ltd, Paisley, R. U.). El plásmido de expresión resultante, pPIC9-OoASP1, se usó para transformar una cepa de *Pichia pastoris* GmM5 (68) por electroporación. Los clones individuales que crecieron en placas mínimas se aislaron y se ensayaron en cuanto a la secreción de proteínas recombinantes por SDS-PAGE seguido por tinción con azul
50 brillante Coomassie e inmunoblot. La glucoforma de las proteínas secretadas se valora usando elaboración de perfiles de glucanos DSA-FACE (68). Los clones individuales se seleccionan, con posterioridad, en placas YPD que contienen nourseotricina y se ensaya la secreción de proteínas recombinantes y se usan para inocular un cultivo en matraz de agitación con medio BMGY. Después de 48 horas de crecimiento a 28 °C, se forma un botón de células por centrifugación durante 5 minutos a 1519 x *g* después de lo cual se vuelven a suspender las células en BMMY y
55 después se cultivan adicionalmente a 28 °C. Cada 12 horas se añade metanol extra (0,5 %) al cultivo y después de 48 horas de inducción se forma un botón de células finalmente. Se recoge el medio celular y se filtra por una membrana de 0,2 micrómetros. Con la adición de sulfato de amonio a saturación al 50 % a 4 °C, se precipitan los

recombinantes y se concentran en una fracción de botón por centrifugación a 18 000 x *g* durante 15 minutos. Se disolvió este botón en tampón de acetato de sodio 40 mM (pH 4,4) y se retiró el sulfato de amonio restante por filtración en gel usando una columna Sephadex G25 (GE Healthcare Bio-Sciences AB; Uppsala, Suecia). Después se aplicó esta fracción a una columna de SP-Sepharose (GE Healthcare Bio-Sciences AB; Uppsala, Suecia) equilibrada en tampón de acetato de sodio 40 mM (pH 4,4) y se eluyeron los recombinantes enlazados empleando un gradiente a cloruro sódico (NaCl) 1 M en el mismo tampón. Se mezclaron las fracciones que contenían proteína recombinante, se dializaron a Tris-HCl 25 mM (pH 7,5) y se cargaron en una columna aMonoQ (GE Healthcare Bio-Sciences AB; Uppsala, Suecia). Los recombinantes se eluyeron de esta columna usando un gradiente a NaCl 1 M en el mismo tampón. Se mezclaron las fracciones que contenían ASP recombinantes y se intercambiaron el tampón a PBS por filtración en gel en una columna Sephadex G25 (GE Healthcare Bio-Sciences AB; Uppsala, Suecia).

1.14. Prueba práctica

La prueba consistió en dos grupos de 12 terneros Holstein-Friesian cada uno. Se dividieron de manera aleatoria veinticuatro terneros sin helmintos de 7 a 9 meses, divididos en doce pares. Cada par se asignó de manera aleatoria a un grupo de tratamiento (control o vacunado). Las inmunizaciones con la fracción de PMA y los recuentos de huevos fecales se llevaron a cabo como se describió en la prueba de vacunación. Se vacunó un grupo tres veces con un intervalo de tres semanas con la vacuna contra *C. oncophora* de PMA/Asp junto con QuilA mientras que al otro se le inyectó tres veces solo QuilA. Después de la última vacunación, se pusieron todos los animales en un pasto que estaba contaminado de manera natural con larvas infecciosas de *Cooperia oncophora* y que se dividió en 12 parcelas idénticas. Se asignaron de manera aleatoria dos animales que pertenecían al mismo grupo (control o vacunado) a una parcela, así, seis parcelas para los animales de control y 6 parcelas para los animales vacunados. Se recogieron semanalmente muestras fecales de los animales para determinar la producción de huevos de *C. oncophora*.

2. Resultados

2.1. Excretoma/secretoma de *Cooperia oncophora* de fase adulta

Para obtener una resolución en gel adecuada y por separación de las proteínas por otra parte, sin comprometer la sensibilidad, se buscó la detección más específica de proteínas poco abundantes, por otra parte, para aplicar dos técnicas complementarias. En el primer caso, la separación electroforética en gel bidimensional (2D-GE) de la fracción de proteínas ES en *Cooperia oncophora* de fase adulta reveló veinticinco lugares de proteínas visibles claramente, agrupados en tres agrupaciones denominadas PMA, PMM y PMB que representaban las mezclas de proteínas de peso molecular alto, medio y bajo, a las que pertenecían, respectivamente. Todos los lugares se escindieron y se sometieron a identificación dirigida por espectrometría de masas con ionización-desorción mediante láser asistida por matriz (MALDI-MS) dando como resultado una anotación exitosa de veintidos lugares (relación de éxito del 88 %). Como se resume en la tabla 1 (y en la tabla S1), más del 90 % de la fracción de PMA consistía en una proteína tipo proteína secretada asociada a activación de doble dominio (ASP) que muestra alguna heterogeneidad en términos de valores de punto isoeléctrico (pI). En cuanto al contenido en proteínas, las agrupaciones de proteínas de PMM y PMB parecían contener un rango más amplio de proteínas. Más en particular, se encontró que la fracción de PMM contenía tres proteínas distintas, es decir, inexina, tiorredoxina peroxidasa y una proteína secretada asociada a activación (ASP), aquí en una conformación de un solo dominio [40]. La mezcla de proteínas de PMB, por otra parte, a pesar de mostrar una multitud de lugares de proteínas, de hecho cubría dos proteínas con funciones aún desconocidas y tres antígenos/proteínas ES de bajo peso molecular previamente documentadas, conocidas como antígeno ES de 14 kDa, antígeno ES 1 y antígeno ES 2 (Tabla 1). Dado el alto grado de complejidad en términos de número de lugares y distribución 2D-GE, lo último se espera que soporte una extensa variación de secuencias de aminoácidos y/o modificaciones químicas, dando de ese modo un considerable número de isoformas proteínicas ambas en términos de valores de masa molecular y de pI.

En paralelo al análisis electroforético 2D se eligió fraccionar el proteoma ES de *C. oncophora* adulta por cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) principalmente por dos razones: i) por aplicación de dicho flujo de trabajo preparativo, se obtuvieron suficientes cantidades de las tres fracciones (PMA, PMM y PMB) y ii) por análisis electroforético en gel unidimensional (1D-GE) de las proteínas poco abundantes de las fracciones obtenidas por SEC, que podían haber sido no detectadas o podían haber sido enmascaradas en 2D-GE, deberían hacerse más visibles y por lo tanto podían extender el conjunto de datos obtenido. Por supuesto, mientras se observaba una distribución de proteínas similar en comparación con las dos metodologías, el fraccionamiento por SEC seguido por análisis 1D-GE reveló la presencia de una serie de proteínas ES adicionales. Como se resume en la tabla 1 (y la tabla S2), la identificación por espectrometría de masas de las bandas de las proteínas demostró que, además de la ASP de doble dominio, la porción de PMA soporta adicionalmente cantidades muy bajas de una «proteína hipotética», que curiosamente se observó solo en condiciones reductoras. De manera similar, nuestra propuesta de cromatografía de exclusión por tamaños desenmascaró dos proteínas adicionales en la mezcla de proteínas de PMM, en particular aldosa reductasa y la proteína 2 específica de la fase parasitaria, la última sin información funcional adicional actualmente disponible. Por el contrario a las fracciones de PMA y PPM, la mezcla de peso molecular bajo no reveló que contuviera proteínas adicionales a las reveladas en el análisis 2D-PAGE.

ES 2 717 441 T3

Concretamente, se observó que las ASP tanto de dominio doble como de un solo dominio migraban como dobletes en la separación electroforética en gel unidimensional de las fracciones de PMA y PMM, respectivamente (datos no mostrados).

Tabla 1				
Anotación dirigida por MS de excretoma/secretoma de <i>Cooperia oncophora</i> de fase adulta				
Las partes superior, media e inferior de la tabla reflejan las fracciones de ES de PMA, PMM y PMB, respectivamente.				
ID basada en homología ^a	Lugares	Bandas	Secr. prev. ^b / N-gluc. (#) ^c	M _r /pI ^d (kDa / -)
ASP de doble dominio	1 - 4	1 - 3	SP / S (2)	53,2/7,67
Proteína hipotética		4	-	-
Aldosa reductasa		5	N / S (2)	35,5 / 8,32
ASP de un solo dominio	5	6, 7	SP / S (1)	30,3/6,26
Inexina	6		-	-
Tiorredoxina peroxidasa	7		N / N	21,8/6,90
Proteína 2 específica de fase parasitaria		8	NC / N	16,4 / 7,14
Proteína ES de 14 kDa	10,24	11	NC / S (1)	14,5 / 8,54
Proteína de antígeno ES 2	11, 12, 19		NC / N	13,2 / 5,49
Antígeno 1 de ES	13 - 16, 18, 20, 21	10, 12	SP / N	13,9 / 5,30
Desconocido 1 (isotig32303)	8	9	SP / N	12,3 / 4,69
Desconocido 2 (isotig10739)	9, 23		SP / N	14,7 / 8,22

^aBasado en búsqueda con BLASTP

^bPredicción de secreción de proteínas usando las secuencias de proteínas completas como se determina en este estudio o cuando están disponibles en GenBank (indicado con un asterisco). SP : Presencia de un péptido señal cuando se determina por SignalP 3.0; NC : Proteína secretora no clásica cuando se determina por SecretomeP 2.0; N : No secretada

^cLa presencia de posibles sitios de N-glicosidación cuando se determina por análisis NetNGlyc 1.0 usando las secuencias de proteínas completas como se determina en este estudio (S: sí; N: no) (el número de sitios de consenso encontrados en la secuencia de aminoácidos se da entre paréntesis)

^dM_r y los valores de pI se determinaron usando el peso molecular de ExPAS y la herramienta de cálculo del punto isoeléctrico. Se proporcionan los valores que corresponden a las proteínas completas. No se tuvo en cuenta la escisión de posibles péptidos señal.

Tabla S1

Anotación dirigida por MS de proteoma ES de <i>Cooperia oncophora</i> como fue revelado por 2D-PAGE.												
Lugar n.º	ID de la base de datos propia	GenBank n.º	Acc.	Organismo (homología más próxima)	valor BLASTP	E	Puntuación Mowse MALDI-MS	Alcance de las secuencias MS (%)	Péptidos emparejados	Péptidos no emparejados	Alcance de la secuencia MS ² (%)	Descripción (éxito BLASTP superior)
1	contig05709	AAK35199.1		<i>C. punctata</i>	3E-94		106	20	6	15	5	Proteína tipo ASP
2	contig05709	AAK35199.1		<i>C. punctata</i>	3E-94		198	20	6	15	11	Proteína tipo ASP
3	contig05709	AAK35199.1		<i>C. punctata</i>	3E-94		188	20	6	15	11	Proteína tipo ASP
4	contig05709	AAK35199.1		<i>C. punctata</i>	3E-94		249	20	6	15	17	Proteína tipo ASP
5	contig55746	AAO63577.1		<i>A. caninum</i>	2E-08		83	12	1	13	12	Prot. Secr. 5 prev.
6	isotig14500	XP_003096841.1		<i>C. remanei</i>	4E-29		43	16	11	24	4	Inexina
7	isotig09291	CAD20737.1		<i>O. ostertagi</i>	5E-133		89	38	8	16	13	Tiorredoxina per.
8	isotig32303						86	32	3	8	32	/
9	isotig10739						108	12	2	15	12	/
10	isotig25459	AAD09212.1		<i>C. oncophora</i>	2E-10		115	24	4	11	11	Prot. ES de 14 kDa
11	isotig09711	AAD09213.1		<i>C. oncophora</i>	7E-62		189	52	18	35	12	Prot. ES antígeno 2

Anotación dirigida por MS de proteoma ES de <i>Cooperia oncophora</i> como fue revelado por 2D-PAGE.													
Lugar n.º	ID de la base de datos propia	GenBank n.º	Acc.	Organismo (homología más próxima)	valor BLASTP	E	Puntuación Mowse MALDI-MS	Alcance de las secuencias MS (%)	Péptidos emparejados	Péptidos no emparejados	Alcance de la secuencia MS ² (%)	Descripción (éxito BLASTP superior)	
12	AAD09213.1	AAD09213.1		<i>C. oncophora</i>	0		128	38	5	10	15	Prot. de antígeno ES 2	
13	isotig11584	CAC38986.1		<i>C. oncophora</i>	3E-13		85	10	1	17	10	Antígeno 1 de ES	
14	isotig11583	CAC38986.1		<i>C. oncophora</i>	3E-13		148	42	8	10	26	Antígeno 1 de ES	
15	isotig14336	CAC38986.1		<i>C. oncophora</i>	5E-20		192	35	11	5	19	Antígeno 1 de ES	
16	contig45229	CAC38986.1		<i>C. oncophora</i>	2E-21		100	35	6	9	8	Antígeno 1 de ES	
17	ID n.º												
18	CAC38986.1	CAC38986.1		<i>C. oncophora</i>	0		160	53	7	4	34	Antígeno 1 de ES	
19	isotig09711	AAD09213.1		<i>C. oncophora</i>	7E-62		189	52	15	38	12	Proteína de antígeno ES 2	
20	isotig17160	CAC38986.1		<i>C. oncophora</i>	1E-13		90	41	4	14	8	Antígeno 1 de ES	
21	isotig26364	CAC38986.1		<i>C. oncophora</i>	9E-91		74	46	5	6	23	Antígeno 1 de ES	
22	ID n.º												

Anotación dirigida por MS de proteoma ES de *Cooperia oncophora* como fue revelado por 2D-PAGE.

Lugar n.º	ID de la base de datos propia	GenBank n.º	Acc.	Organismo (homología más próxima)	valor BLASTP	E	Puntuación Mowse MALDI-MS	Alcance de las secuencias MS (%)	Péptidos emparejados	Péptidos no emparejados	Alcance de la secuencia MS ² (%)	Descripción (éxito BLASTP superior)
23	isotig10740						162	32	5	11	13	/
24	isotig25459	AA09212.1		<i>C. oncophora</i>	2E-10		37	10	1	14	10	Proteína ES de 14 kDa
25	ID n.º											

Tabla S2

Identificación por MS de bandas de proteínas encontradas en las tres fracciones de SEC

N.º de banda	ID de la base de datos propia	GenBank Acc. n.º	Organismo (homología más próxima)	valor BLASTP	E	Puntuación Mowse MALDI-MS	Alcance de las secuencias MS (%)	Péptidos emparejados	Péptidos no emparejados	Alcance de la secuencia MS ² (%)	Descripción (éxito BLASTP superior)
1	contig05709	AAK35199.1	<i>C. punctata</i>	3E-94		315	17	5	16	17	Proteína tipo ASP
2	contig63173	AAK35185.1	<i>C. punctata</i>	1E-89		245	35	7	19	15	Proteína tipo ASP
3	contig05709	AAK35199.1	<i>C. punctata</i>	3E-94		276	30	8	13	19	Proteína tipo ASP
4	isotig24792	XP-003114672.1	<i>C. remanei</i>	5E-13		59	9	2	19	8	Proteína hipotética
5	isotig01086	NP-509242.1	<i>C. elegans</i>	4E-119		345	50	22	15	16	Aldosa reductasa

Identificación por MS de bandas de proteínas encontradas en las tres fracciones de SEC											
N.º de banda	ID de la base de datos propia	GenBank Acc. n.º	Organismo (homología más próxima)	valor BLASTP	Puntuación Mowse MALDI-MS	Alcance de las secuencias MS (%)	Péptidos emparejados	Péptidos no emparejados	Alcance de la secuencia MS ² (%)	Descripción (éxito BLASTP superior)	
6	isotig13456	AAO63577.1	<i>A. caninum</i>	1E-09	180	12	1	14	12	Proteína prev. secretada 5	
7	isotig13456	AAO63577.1	<i>A. caninum</i>	1E-09	154	12	1	14	12	Proteína prev. secretada 5	
8	isotig00466	ADN00784.1	<i>H. contortus</i>	4E-53	61	65	11	7	0	Prot. específica de fase par. 2	
9	isotig32303				75	18	2	9	7	/	
10	isotig11584	CAC38986.1	<i>C. oncophora</i>	3E-13	119	13	3	15	10	Antígeno 1 de ES	
11	isotig21044	AAK35204.1	<i>C. punctata</i>	7E-18	159	33	7	10	12	Proteína ES de 14 kDa	
12	CAC38986.1	CAC38986.1	<i>C. oncophora</i>	0	125	23	1	10	23	Antígeno 1 de ES	

2.2. Complejos multiproteína en el proteoma ES adulto

5 Mientras las condiciones reductoras aplicadas en 2D-GE obstaculizaban su observación, asombrosamente, cuando se compararon perfiles de migración 1D-GE reductores a no reductores, se mostró que había trazas de especies oligómeras a base de puente disulfuro en la fracción de proteínas de PMA. Este hallazgo se corroboró por análisis por electroforesis en gel nativo unidimensional además. Como no se observaron péptidos distintos de los que se originaron a partir de ASP de doble dominio en el análisis MALDI-MS (tabla S2) y la electroforesis en gel de poliacrilamida de porcentaje menor de esta especie oligómera demostró su peso molecular de aproximadamente 140 kDa, se concluye una conformación de ASP de doble dominio dímera para esta población de proteínas de abundancia baja.

10 2.3. Vacunación de terneros con subfracción ES de PMA

15 Cuando se efectuaba la prueba de vacunación se registró la evolución del recuento medio de huevos por gramo (EPG) en heces dependiendo del tiempo para el grupo de PMA, como se muestra en la figura 2. Cuando se compara con el grupo de control, los recuentos de huevos para el grupo vacunado de PMA fueron drásticamente inferiores ($P < 0,01$) para la duración total del experimento, dando niveles medios de reducción de EPG tan altos como un 91 % (tabla 2). Mientras se encontró que la carga de gusanos posnecropsia no difería significativamente entre los grupos de PMA y de control, el grupo de PMA no mostró porcentajes significativamente mayores de larvas L4 inhibidas (29,4 %) (tabla 2). Finalmente, se valoró la longitud de los gusanos adultos hembras y machos, con la encontrada en los animales tratados con PMA que resultaron considerablemente más pequeños cuando se comparó con el grupo de control ($P < 0,05$; tabla 2).

20 La figura 4 muestra los recuentos de huevos de *C. oncophora* acumulativos para la prueba práctica después de un periodo de 5 meses en pasto y de nuevo se demuestra que los recuentos de huevos para el grupo vacunado con PMA son significativamente menores (reducción del 70 %) comparado con el grupo de control. Los datos individuales para la prueba práctica son como sigue :

Controles	Vacunados
1519	5673
11246	3278
9011	138
13167	7311
10533	3022
7505	1776

25

Tabla 2

Sinopsis de parámetros parasitológicos obtenidos durante la prueba de vacunación y después.							
<i>n</i> , número de animales; EPG, recuentos acumulativos medios de huevos; % L4, porcentaje de gusanos L4 observado en recuento de gusanos posnecropsia. Todos los valores representan medias aritméticas (+ rango observado experimentalmente).							
Grupo	<i>n</i>	EPG	Recuento de gusanos	de	% L4	Longitud de los gusanos (mm)	
Control	7	7110 (1100 - 13 200)	6600 (550 - 12 200)	-	1,68 (0 - 8,43)	H : 12,5 (10,7 - 13,2)	

Sinopsis de parámetros parasitológicos obtenidos durante la prueba de vacunación y después.					
<i>n</i> , número de animales; EPG, recuentos acumulativos medios de huevos; % L4, porcentaje de gusanos L4 observado en recuento de gusanos posnecropsia. Todos los valores representan medias aritméticas (+ rango observado experimentalmente).					
Grupo	<i>n</i>	EPG	Recuento de gusanos	% L4	Longitud de los gusanos (mm)
					M : 9,50 (8,52 - 10,1)
PMA	7	656 (0 - 1380)**	3370 (200 - 6050)	29,4 (6,61 - 100)**	H : 10,4 (9,66 - 12,4)*
					M : 8,40 (7,50 - 9,68)*
* <i>P</i> < 0,05, ** <i>P</i> < 0,01; H, hembra; M, macho.					

2.4. Respuestas inmunitarias

5 Cuando se comparó con el grupo de control, se encontró que la subfracción de ES de PMA producía niveles significativamente mayores de niveles de IgG1 específicos de *Cooperia* en suero de los animales inmunizados correspondientes (*P* < 0,01) (figura 3). Adicionalmente, aunque los niveles de IgG2 eran consistentemente mucho menores (aprox. 15 veces) cuando se comparaba con intensidades de IgG1, la fracción de PMA soportaba, sin embargo, cantidades significativamente mayores de IgG2 (*P* < 0,01), respecto al grupo de control.

2.5. Determinación y caracterización *in silico* de secuencias de aminoácidos completas

10 Si bien el genoma de *Cooperia oncophora* completo aún tiene que ser desentrañado totalmente, la base [33] de datos del transcriptoma de *C. oncophora* obtenida recientemente ofrecía una alternativa más que adecuada ya que, después de haberla empleado en identificación de proteínas directas con MS, se pudo extender esas secuencias contig/isotig obtenidas alineándolas a unas solapadas, continuando hasta que se alcanzaron los codones de inicio y de parada. Esta propuesta demostró éxito para nueve de las eventualmente doce proteínas diferentes presentes en el excretoma/secretoma de *C. oncophora* adulta (tabla 1). Para las dos proteínas, más específicamente la proteína hipotética de PMA (isotig27828; la más alta homología a la proteína hipotética *Caenorhabditis remanei*; número acceso GenBank XP_003114672) e inxina (isotig12080; la más alta homología a la inxina *C. remanei*; número acceso GenBank XP_003096841.1), no se pudieron extender sus secuencias en su totalidad y basándose en la homología en otras especies, se esperaba que carecieran de los aminoácidos 733 y 160 en sus N-terminales, respectivamente. Por último, mientras los análisis por espectrometría de masas identificaban inicialmente solo péptidos del dominio del C-terminal de la ASP de doble dominio, aplicando técnicas de PCR se pudo revelar su secuencia hasta casi completa, esto es, basándose en su homóloga *Cooperia punctata* (AAK35199.1), aparte de un péptido señal de 21 residuos. El N- y C-terminal de la ASP de doble dominio identificada consistió en los aminoácidos LCSLDNGMT (SEQ ID NO : 14) y DEDCKSSRCSTQLSMCINPN (SEQ ID NO : 15), respectivamente.

25 Como una caracterización *in silico* bruta inicial, la predicción de la secuencia señal basada en el software junto con búsquedas de sitios de consenso de glucosilación unidos a N, reveló solo los ASP de doble dominio y de un solo dominio y los antígenos ES de PMB que potencialmente transportaban restos azúcar (tabla 1). Además, el análisis *in silico* de las secuencias completas obtenidas dio valores de peso molecular que correspondían a los observados en gel.

30 2.6. Análisis de glucanos del proteoma de ES de *Cooperia oncophora*

35 Se estudió la glucosilación de ES global por análisis MALDI-TOF MS en la liberación de restos glucano unidos a N y O. Mientras se detectó un conjunto claro de glucanos liberados de PNGase F, no podían detectarse señales en la liberación específica de PNGase A (datos no mostrados), indicando de ese modo que no había cantidades significativas de N-glucanos con modificaciones de fucosa unidas en 1-3 de la N-acetilglucosamina unida a asparagina (GlcNAc) en el excretoma/secretoma de *C. oncophora* adulta. Considerando la preparación de O-glucano, se detectaban solo señales minoritarias (datos no mostrados). Para obtener más información sobre la presencia de restos glucano en proteínas específicas en la fracción ES de *C. oncophora*, los N- y O-glucanos,

liberados de las agrupaciones de proteínas de PMB, PMM y PMA, se analizaron por MALDI con espectrometría de masas con analizador de tiempo de vuelo (TOF). Mientras no podían detectarse cantidades significativas de *N*-glucanos en las fracciones de PMB y PMA, también se encontró que las principales señales de *N*-glucano observadas en la mezcla de ES total existían en el espectro del *N*-glucano de PMM. Por otra parte, los niveles marginales de señales de *O*-glucano se detectaron en la fracción de PMA exclusivamente. Sin embargo, estas señales no podían asignarse a estructuras de *O*-glucano comunes (ni incluso putativas) y, por lo tanto, no se investigaron más.

Usando la masa monoisotópica de cada uno de los picos del *N*-glucano observados, se asignaron las composiciones de monosacáridos y se dedujeron estructuras putativas. Las señales principales detectadas en el espectro de los *N*-glucanos de PMM que también aparecían en el espectro de *N*-glucano de ES total se derivaron de restos glucano con las composiciones F1H3N2, H5N2, H6N2 y H7N2 a los valores de *m/z* 1176,4; 1354,4; 1516,5 y 1678,5 [M-H]⁻, respectivamente (F, fucosa, Fuc; H, hexosa, Hex; N, N-acetilhexosamina, HexNAc). Estas composiciones son indicativas para un glucano (F1H3N2) núcleo-fucosilado, paucimanosídico y una serie de glucanos de oligomanosa Man₅₋₇GlcNAc₂ (Man, manosa). Para confirmar estas asignaciones se incubó una muestra de los *N*-glucanos de PMM con α -manosidasa, conduciendo a un espectro que contenía señales detectables solo en *m/z* 706,3 y 852,3 para H1N2 (Man1GlcNAc2) y F1H1N2 (Fuc1Man1GlcNAc2), confirmándose de ese modo la presencia de las extensiones de manosa en la muestra no tratada.

Motivado por la presencia de un sitio de *N*-glucosilación putativa en la ASP de un solo dominio en la agrupación de proteínas de PMM (tabla I), se sometieron los glucopéptidos trípticos derivados de la correspondiente rodaja de gel de ASP de un solo dominio a análisis MS/MS y cromatografía nanolíquida (LC). Con los datos obtenidos se cuestionó la presencia de péptidos glucosilados por búsqueda de espectros MS/MS que contuvieran los iones de fragmentos de glucano comunes H1N1 (*m/z* 366,1 [M+H]⁺) y H2N1 (*m/z* 528,2 [M+H]⁺). Curiosamente, se detectó una serie de iones precursores que podía asignarse a las glucoformas H5N2, H6N2 y H7N2 del péptido tríptico de la ASP de un solo dominio WNCTLEAK (1021,5 [M+H]⁺, con cisteína como carbamidometilderivado) basado en: i) la masa total del glucopéptido, y ii) los espectros de fragmentos de disociación inducida por colisión mostrando los patrones de fragmentación de las uniones glucosídicas en cada glucoforma peptídica. Se proporciona una sinopsis de los restos de glucopéptidos detectados y fragmentados derivados de la misma rodaja de gel en la tabla S3. A partir del ion precursor *m/z* 1201,1 [M+2H]²⁺ una serie clara de iones de fragmentos [M+H]²⁺ indica la pérdida de seis restos hexosa y uno N-acetilhexosamina (HexNAc), dejando el correspondiente ion fragmento peptídico con un único resto *N*-acetil-glucosamina (GlcNAc) unido al resto asparagina en *m/z* 612,8. Se obtuvieron espectros similares (pero menos intensos) para las glucoformas H5N2 y H7N2 del mismo péptido, indicando que los *N*-glucanos Man₅₋₇GlcNAc₂ liberados de las proteínas de PMM existen en un único sitio de glucosilación de la ASP de un solo dominio.

Tabla S3

Variantes de glucopéptidos detectadas en el digesto tríptico de la ASP de un solo dominio, analizado por MS/MS. Se detectaron diferentes glucoformas en línea con el perfil de <i>N</i> -glucano de ES de PMM, dando lugar las glucoformas H5N2 y H6N2 a las intensidades más altas de los iones.						
Ion precursor detectado	Carga iónica	Péptido	Seq ID	Escisiones omitidas	Glucano	
727,7	[M+3H] ³⁺	LRWNCTLEAK	9	1	H3N2	
800,7	[M+3H] ³⁺	WNCTLEAK	10	0	H6N2	
836,4	[M+3H] ³⁺	LRWNCTLEAK	9	1	H5N2	
876,4	[M+3H] ³⁺	WNCTLEAKAR	11	1	H6N2	
890,4	[M+3H] ³⁺	LRWNCTLEAK	9	1	H6N2	
957,4	[M+2H] ²⁺	WNCTLEAK	10	0	H3N2	
1038,4	[M+2H] ²⁺	WNCTLEAK	10	0	H4N2	

Variantes de glucopéptidos detectadas en el digesto trípico de la ASP de un solo dominio, analizado por MS/MS. Se detectaron diferentes glucoformas en línea con el perfil de N-glucano de ES de PMM, dando lugar las glucoformas H5N2 y H6N2 a las intensidades más altas de los iones.						
Ion precursor detectado	Carga iónica	Péptido	Seq ID	Escisiones omitidas	Glucano	
1119,9	[M+2H] ²⁺	WNCTLEAK	10	0	H5N2	
1200,0	[M+2H] ²⁺	WNCTLEAK	10	0	H6N2	
1281,5	[M+2H] ²⁺	WNCTLEAK	10	0	H7N2	

3. Discusión

La combinación de las identificaciones obtenidas por MALDI-MS a partir de fraccionamiento por electroforesis en gel bidimensional y cromatografía de exclusión por tamaños del excretoma/secretoma de *Cooperia oncophora* de fase adulta dio doce proteínas diferentes distribuidas en tres agrupaciones de distinto peso molecular (tabla 1). Mientras un total de doce proteínas puede aparecer como modesto cuando se compara con las fracciones ES de otros helmintos tales como *Ascaris suum* (41), *Schistosoma japonicum* (42) y *Haemonchus contortus* (43), que revelan con frecuencia hasta cien o más proteínas diferentes en su excretoma/secretoma, dichas diferencias cuantitativas pueden surgir de una combinación de: i) la interfase huésped-gusano que difiere sustancialmente entre parásitos y así que planteen exposiciones específicas durante la infección y ii) el excretoma/secretoma de algunos helmintos que ya han sido desarrollados además, con proteínas potencialmente redundantes eliminadas y/o proteínas de alta actividad cruciales que han sido enriquecidas. Sin embargo, aunque se identificó una serie de proteínas con funciones desconocidas, el excretoma/secretoma de *C. oncophora* adulta también lleva un conjunto de proteínas que se han observado previamente en otros nematodos/helmintos y cuyas funciones se han elucidado (parcialmente). Entre ellas encontramos aldosa reductasa y tiorredoxina peroxidasa, dos proteínas que se sabe que están implicadas en mecanismos de desintoxicación, convirtiendo la primera el metilgloxal mutagénico y tóxico, un subproducto de la glucólisis, en acetol (44), y actuando la última como un antioxidante que elimina las especies reactivas de oxígeno generadas durante el metabolismo con oxígeno, procedimientos oxidativos y respuestas inmunitarias del huésped (45). Otra proteína documentada que se identificó de la fracción ES de *C. oncophora* adulta es la inexina (Pfam : PF00876), un equivalente invertebrado a la familia de moléculas de conexina. Estas son proteínas de unión intercelular comunicante que, en la oligomerización, forman canales intercelulares por los que pueden pasar iones y pequeñas moléculas, permitiendo de ese modo la comunicación intercelular (46).

Aparte de dos hasta ahora moléculas no anotadas (isotig32303 e isotig10739), se reveló adicionalmente la agrupación del lugar de peso molecular bajo (PMB) que consistía esencialmente en tres proteínas diferentes, es decir, proteína ES de 14 kDa, proteína ES de antígeno 1 y proteína ES de antígeno 2. Sorprendentemente, aunque funcionalmente aún poco caracterizada, este conjunto de proteínas se ha observado previamente sus equivalentes de *Cooperia punctata* sugeridos como candidatos potenciales a vacuna (47), sin embargo, no se ha publicado ningún informe sobre un resultado exitoso. Por qué muestran estas proteínas dicha extensa diversidad, como se observa en su perfil de lugares 2D-GE, sigue siendo impreciso, pero se ha propuesto la hipótesis de que esto puede crear una diversidad antigénica y/o un conjunto de proteínas redundantes que puede eliminarse por la respuesta inmunitaria del huésped sin efectos perjudiciales serios sobre la viabilidad parasitaria (47).

Curiosamente, se encontró que las dos fracciones tanto de PMA como de PMM presentaban un tipo de proteína en común, es decir, cada una albergaba una proteína secretada asociada a activación (ASP). Dichas proteínas constituyen un subgrupo específico de *Strongylida* de la superfamilia de proteínas CAP (también denominadas proteínas de glucoproteína de espermatozoide /Tpx-1/Ag5/PR-1/Sc7 (SCP/TAPS); Pfam PF00188), que muestra una extrema diversidad tanto en incidencia, alcanzando procariotas y eucariotas, y función, que se ha demostrado que está implicado en procedimientos tan diversos como la reproducción, el cáncer y la regulación inmunitaria [48]. Hasta la fecha, sin embargo, la verdadera función biológica de las ASP sigue siendo un enigma, a pesar de los esfuerzos sustanciales que se han hecho recientemente [49-54], e incluso aunque la investigación en ese campo particular está aún en sus inicios, algunas ASP se han ensayado en pruebas de vacunación, tanto en sus formas nativa como recombinante [55-58]. Hasta ahora, se han encontrado ASP en tres configuraciones: i) como ASP de doble dominio, formadas por dos dominios CAP distintos pero relacionados, ii) como ASP de un solo dominio de tipo C y iii) como ASP de un único dominio de tipo N, soportando el segundo y el último la homología más alta para el C- y N-terminal de la ASP de doble dominio, respectivamente [51]. Nuestro estudio del excretoma/secretoma de *C.*

5 *oncophora* adulta dio una ASP de doble dominio como parte de la agrupación de PMA y una ASP de un solo dominio, perteneciendo al grupo de PMM (tabla 1). Mientras se prevé que la ASP de doble dominio transporte una secuencia señal y soporte dos sitios aceptores de consenso para glucosilación unida a N, se reveló que no transportaba ninguno de esos restos. Por otra parte, en el análisis 2D-GE se observó un tren de cuatro lugares distintos, todos los cuales corresponden a este ASP de doble dominio, reflejando un nivel de diversidad de secuencias, como se describe además en la presente memoria. Si bien no se observó en el análisis 2D-GE, el patrón de migración en gel unidimensional para ASP de doble dominio mostró un doblete en condiciones tanto reductoras como no reductoras. Puesto que no transporta ningún resto azúcar, esta observación puede atribuirse al tratamiento parcial del péptido señal. Quizá la observación más sorprendente teniendo en cuenta esta ASP de doble dominio fue que migrara una pequeña porción como un dímero, exclusivamente en electroforesis en gel no reductora, implicando de ese modo que se basa en puente disulfuro. Si bien se sabe que las ASP de un solo dominio se dimerizan en solución [49], estas son las primeras indicaciones de una ASP de doble dominio que imita este comportamiento.

15 A diferencia de su contrapartida de doble dominio, la ASP de un solo dominio, como se encuentra en la agrupación de proteínas de PMM, no mostró señales signos de diversidad de secuencias detectables u oligomerización. Curiosamente, la corroboración de las predicciones *in silico* en términos de secuencia señal y sitios de consenso de N-glucosilación, se demostró por supuesto que la ASP de un solo dominio transportaba un resto de glucano unido a N en Asn93. Aunque su impacto general en la estructura de la proteína y la inmunogenicidad aún tiene que determinarse de manera concluyente, se encontró que la estructura del grupo glucano se parecía a la de la ASP de un solo dominio de *Ostertagia ostertagi* [53], cuya estructura cristalina se resolvió recientemente y sugiere una función estructural modesta para el resto glucano. De manera análoga a la ASP de doble dominio, en el análisis por electroforesis en gel unidimensional de la ASP de un solo dominio se observó un doblete de bandas con la banda de peso molecular inferior mucho menos abundante cuando se compara con la situación de la ASP de doble dominio, donde las dos bandas del doblete eran casi igualmente intensas. Posiblemente, la banda de ASP de un solo dominio inferior representa la proteína desprovista de su resto glucano unido a Asn93.

25 Nuestra prueba de vacunación demostró que la fracción de proteínas de PMA, consistente esencialmente en la ASP de doble dominio, es particularmente útil para desarrollo de vacunas, con niveles de reducción de EPG que sobrepasan el 90 %, inhibe drásticamente las larvas L4 y disminuye sustancialmente las longitudes de los gusanos cuando se compara con el grupo de control (tabla 2). Es más, en el suelo de terneros inmunizados, los niveles de IgG1 se elevan con su administración, con también una respuesta marginal de IgG2 (figura 3). Finalmente, la vacunación con la fracción de PMA confirió protección contra una infección natural con *Cooperia oncophora* en una prueba práctica.

35 En conclusión, la ASP de doble dominio da niveles sustanciales de protección y muestra baja complejidad en términos de modificaciones postraduccionales, facilitando de ese modo su procedimiento a mayor escala recombinante. Como se observó anteriormente, la fracción de PMA eficaz empleada en la prueba de vacuna consistió mayormente en ASP de doble dominio y es un componente de vacuna contra *Cooperia oncophora* preferido.

Referencias

1. Kloosterman, A., Albers, G. A., and van den Brink, R. (1984) Negative interactions between *Ostertagia ostertagi* and *Cooperia oncophora* in calves. *Vet Parasitol* 15, 135-150.
2. Coles, G. C., and Klei, T. R. (1995) Animal parasites, politics and agricultural research. *Parasitol Today* 11, 276-278.
3. Michel, J. F. (1976) The epidemiology and control of some nematode infections in grazing animals. *Adv Parasitol* 14, 355-397.
4. Lawrence, J. D. a. I., M.A. (2007) Economic analysis of pharmaceutical technologies in modern beef production. *NCCC-134 meeting on Applied Commodity Price Analysis, Forecasting and Market Risk Management, April 16-17, 2007, Chicago.*
5. Anziani, O. S., Suarez, V., Guglielmone, A. A., Warnke, O., Grande, H., and Coles, G. C. (2004) Resistance to benzimidazole and macrocyclic lactone anthelmintics in cattle nematodes in Argentina. *Vet Parasitol* 122, 303-306.
6. Condi, G. K., Soutello, R. G., and Amarante, A. F. (2009) Moxidectin-resistant nematodes in cattle in Brazil. *Vet Parasitol* 161, 213-217.
7. Demeler, J., Van Zeveren, A. M., Kleinschmidt, N., Vercruyssen, J., Høglund, J., Koopmann, R., Cabaret, J., Claerebout, E., Areskog, M., and von Samson-Himmelstjerna, G. (2009) Monitoring the efficacy of ivermectin and albendazole against gastro intestinal nematodes of cattle in Northern Europe. *Vet Parasitol* 160, 109-115.
8. El-Abdellati, A., Geldhof, P., Claerebout, E., Vercruyssen, J., and Charlier, J. (2010) Monitoring macrocyclic lactone resistance in *Cooperia oncophora* on a Belgian cattle farm during four consecutive years. *Vet Parasitol* 171, 167-171.
9. Waghorn, T. S., Leathwick, D. M., Rhodes, A. P., Jackson, R., Pomroy, W. E., West, D. M., and Moffat, J. R. (2006) Prevalence of anthelmintic resistance on 62 beef cattle farms in the North Island of New Zealand. *N Z Vet J* 54, 278-282.
10. Bungiro, R., and Cappello, M. (2004) Hookworm infection: new developments and prospects for control. *Curr Opin Infect Dis* 17, 421-426.
11. Abraham, D., Leon, O., Leon, S., and Lustigman, S. (2001) Development of a recombinant antigen vaccine against infection with the filarial worm *Onchocerca volvulus*. *Infect Immun* 69, 262-270.

12. MacDonald, A. J., Tawe, W., Leon, O., Cao, L., Liu, J., Oksov, Y., Abraham, D., and Lustigman, S. (2004) Ov-ASP-1, the *Onchocerca volvulus* homologue of the activation associated secreted protein family is immunostimulatory and can induce protective anti-larval immunity. *Parasite Immunol* 26, 53-62.
13. Taylor, M. J., Jenkins, R. E., and Bianco, A. E. (1996) Protective immunity induced by vaccination with *Onchocerca volvulus* tropomyosin in rodents. *Parasite Immunol* 18, 219-225.
14. Wu, Y., Egerton, G., Pappin, D. J., Harrison, R. A., Wilkinson, M. C., Underwood, A., and Bianco, A. E. (2004) The Secreted Larval Acidic Proteins (SLAPs) of *Onchocerca* spp. are encoded by orthologues of the alt gene family of *Brugia malayi* and have host protective potential. *Mol Biochem Parasitol* 134, 213-224.
15. Islam, M. K., Miyoshi, T., and Tsuji, N. (2005) Vaccination with recombinant *Ascaris suum* 24-kilodalton antigen induces a Th1/Th2-mixed type immune response and confers high levels of protection against challenged *Ascaris suum* lung-stage infection in BALB/c mice. *Int J Parasitol* 35, 1023-1030.
16. Tsuji, N., Suzuki, K., Kasuga-Aoki, H., Isobe, T., Arakawa, T., and Matsumoto, Y. (2003) Mice intranasally immunized with a recombinant 16-kilodalton antigen from roundworm *Ascaris* parasites are protected against larval migration of *Ascaris suum*. *Infect Immun* 71, 5314-5323.
17. Tsuji, N., Suzuki, K., Kasuga-Aoki, H., Matsumoto, Y., Arakawa, T., Ishiwata, K., and Isobe, T. (2001) Intranasal immunization with recombinant *Ascaris suum* 14-kilodalton antigen coupled with cholera toxin B subunit induces protective immunity to *A. suum* infection in mice. *Infect Immun* 69, 7285-7292.
18. Redmond, D. L., and Knox, D. P. (2004) Protection studies in sheep using affinity-purified and recombinant cysteine proteinases of adult *Haemonchus contortus*. *Vaccine* 22, 4252-4261.
19. Redmond, D. L., and Knox, D. P. (2006) Further protection studies using recombinant forms of *Haemonchus contortus* cysteine proteinases. *Parasite Immunol* 28, 213-219.
20. Winter, J. A., Davies, O. R., Brown, A. P., Garnett, M. C., Stolnik, S., and Pritchard, D. I. (2005) The assessment of hookworm calreticulin as a potential vaccine for necatoriasis. *Parasite Immunol* 27, 139-146.

21. Lightowers, M. W. (2006) Vaccines against cysticercosis and hydatidosis: foundations in taeniid cestode immunology. *Parasitol Int* 55 Suppl, S39-43.
22. Lightowers, M. W., Gauci, C. G., Chow, C., Drew, D. R., Gauci, S. M., Heath, D. D., Jackson, D. C., Dadley-Moore, D. L., and Read, A. J. (2003) Molecular and genetic characterisation of the host-protective oncosphere antigens of taeniid cestode parasites. *Int J Parasitol* 33, 1207-1217.
23. Plancarte, A., Flisser, A., Gauci, C. G., and Lightowers, M. W. (1999) Vaccination against *Taenia solium* cysticercosis in pigs using native and recombinant oncosphere antigens. *Int J Parasitol* 29, 643-647.
24. Hillyer, G. V. (2005) *Fasciola* antigens as vaccines against fascioliasis and schistosomiasis. *J Helminthol* 79, 241-247.
25. Abane, J. L., Oleaga, A., Ramajo, V., Casanueva, P., Arellano, J. L., Hillyer, G. V., and Muro, A. (2000) Vaccination of mice against *Schistosoma bovis* with a recombinant fatty acid binding protein from *Fasciola hepatica*. *Vet Parasitol* 91, 33-42.
26. Boulanger, D., Schneider, D., Chippaux, J. P., Sellin, B., and Capron, A. (1999) *Schistosoma bovis*: vaccine effects of a recombinant homologous glutathione S-transferase in sheep. *Int J Parasitol* 29, 415-418.
27. Boulanger, D., Trottein, F., Mauny, F., Bremond, P., Couret, D., Pierce, R. J., Kadri, S., Godin, C., Sellin, E., Lecocq, J. P., and et al. (1994) Vaccination of goats against the trematode *Schistosoma bovis* with a recombinant homologous schistosome-derived glutathione S-transferase. *Parasite Immunol* 16, 399-406.
28. Loukas, A., Tran, M., and Pearson, M. S. (2007) Schistosome membrane proteins as vaccines. *Int J Parasitol* 37, 257-263.
29. Pacifico, L. G., Fonseca, C. T., Chiari, L., and Oliveira, S. C. (2006) Immunization with *Schistosoma mansoni* 22.6 kDa antigen induces partial protection against experimental infection in a recombinant protein form but not as DNA vaccine. *Immunobiology* 211, 97-104.
30. Tran, M. H., Pearson, M. S., Bethony, J. M., Smyth, D. J., Jones, M. K., Duke, M., Don, T. A., McManus, D. P., Correa-Oliveira, R., and Loukas, A. (2006) Tetraspanins on the surface of *Schistosoma mansoni* are protective antigens against schistosomiasis. *Nat Med* 12, 835-840.
31. Elliott, D. E., Summers, R. W., and Weinstock, J. V. (2007) Helminths as governors of immune-mediated inflammation. *Int J Parasitol* 37, 457-464.

32. Haffner, A., Guilavogui, A. Z., Tischendorf, F. W., and Brattig, N. W. (1998) *Onchocerca volvulus*: microfilariae secrete elastinolytic and males nonelastinolytic matrix-degrading serine and metalloproteases. *Exp Parasitol* 90, 26-33.
33. Martin, J., Abubucker, S., Heizer, E., Taylor, C. M., and Mitreva, M. (2012) Nematode.net update 2011: addition of data sets and tools featuring next-generation sequencing data. *Nucleic Acids Res* 40, D720-728.
34. Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
35. Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., and Lipman, D. J. (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215, 403-410.
36. Bendtsen, J. D., Nielsen, H., von Heijne, G., and Brunak, S. (2004) Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *J Mol Biol* 340, 783-795.
37. Bendtsen, J. D., Jensen, L. J., Blom, N., Von Heijne, G., and Brunak, S. (2004) Feature-based prediction of non-classical and leaderless protein secretion. *Protein Eng Des Sel* 17, 349-356.
38. Ruhaak, L. R., Steenvoorden, E., Koeleman, C. A., Deelder, A. M., and Wuhrer, M. (2010) 2-picoline-borane: a non-toxic reducing agent for oligosaccharide labeling by reductive amination. *Proteomics* 10, 2330-2336.
39. Geldhof, P., Claerebout, E., Knox, D., Vercauteren, I., Looszova, A., and Vercruyse, J. (2002) Vaccination of calves against *Ostertagia ostertagi* with cysteine proteinase enriched protein fractions. *Parasite Immunol* 24, 263-270.
40. Yatsuda, A. P., Eysker, M., Vieira-Bressan, M. C., and De Vries, E. (2002) A family of activation associated secreted protein (ASP) homologues of *Cooperia punctata*. *Res Vet Sci* 73, 297-306.
41. Islam, M. K., Miyoshi, T., Yokomizo, Y., and Tsuji, N. (2004) The proteome expression patterns in adult *Ascaris suum* under exposure to aerobic/anaerobic environments analyzed by two-dimensional electrophoresis. *Parasitol Res* 93, 96-101.
42. Liu, F., Cui, S. J., Hu, W., Feng, Z., Wang, Z. Q., and Han, Z. G. (2009) Excretory/secretory proteome of the adult developmental stage of human blood fluke, *Schistosoma japonicum*. *Mol Cell Proteomics* 8, 1236-1251.
43. Yatsuda, A. P., Krijgsveld, J., Cornelissen, A. W., Heck, A. J., and de Vries, E. (2003) Comprehensive analysis of the secreted proteins of the parasite *Haemonchus*

contortus reveals extensive sequence variation and differential immune recognition. *J Biol Chem* 278, 16941-16951.

44. Rath, J., Gowri, V. S., Chauhan, S. C., Padmanabhan, P. K., Srinivasan, N., and Madhubala, R. (2009) A glutathione-specific aldose reductase of *Leishmania donovani* and its potential implications for methylglyoxal detoxification pathway. *Gene* 429, 1-9.

45. Lu, W., Egerton, G. L., Bianco, A. E., and Williams, S. A. (1998) Thioredoxin peroxidase from *Onchocerca volvulus*: a major hydrogen peroxide detoxifying enzyme in filarial parasites. *Mol Biochem Parasitol* 91, 221-235.

46. Phelan, P., Bacon, J. P., Davies, J. A., Stebbings, L. A., Todman, M. G., Avery, L., Baines, R. A., Barnes, T. M., Ford, C., Hekimi, S., Lee, R., Shaw, J. E., Starich, T. A., Curtin, K. D., Sun, Y. A., and Wyman, R. J. (1998) Innexins: a family of invertebrate gap-junction proteins. *Trends Genet* 14, 348-349.

47. Yatsuda, A. P., De Vries, E., Vieira Bressan, M. C., and Eysker, M. (2001) A *Cooperia punctata* gene family encoding 14 kDa excretory-secretory antigens conserved for trichostrongyloid nematodes. *Parasitology* 123, 631-639.

48. Gibbs, G. M., Roelants, K., and O'Bryan, M. K. (2008) The CAP superfamily: cysteine-rich secretory proteins, antigen 5, and pathogenesis-related 1 proteins--roles in reproduction, cancer, and immune defense. *Endocr Rev* 29, 865-897.

49. Asojo, O. A. (2011) Structure of a two-CAP-domain protein from the human hookworm parasite *Necator americanus*. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 67, 455-462.

50. Asojo, O. A., Goud, G., Dhar, K., Loukas, A., Zhan, B., Deumic, V., Liu, S., Borgstahl, G. E., and Hotez, P. J. (2005) X-ray structure of Na-ASP-2, a pathogenesis-related-1 protein from the nematode parasite, *Necator americanus*, and a vaccine antigen for human hookworm infection. *J Mol Biol* 346, 801-814.

51. Geldhof, P., Vercauteren, I., Gevaert, K., Staes, A., Knox, D. P., Vandekerckhove, J., Vercruyse, J., and Claerebout, E. (2003) Activation-associated secreted proteins are the most abundant antigens in a host protective fraction from *Ostertagia ostertagi*. *Mol Biochem Parasitol* 128, 111-114.

52. Hawdon, J. M., Jones, B. F., Hoffman, D. R., and Hotez, P. J. (1996) Cloning and characterization of *Ancylostoma*-secreted protein. A novel protein associated with the transition to parasitism by infective hookworm larvae. *J Biol Chem* 271, 6672-6678.

53. Meyvis, Y., Callewaert, N., Gevaert, K., Timmerman, E., Van Durme, J., Schymkowitz, J., Rousseau, F., Vercruysse, J., Claerebout, E., and Geldhof, P. (2008) Hybrid N-glycans on the host protective activation-associated secreted proteins of *Ostertagia ostertagi* and their importance in immunogenicity. *Mol Biochem Parasitol* 161, 67-71.
54. Osman, A., Wang, C. K., Winter, A., Loukas, A., Tribolet, L., Gasser, R. B., and Hofmann, A. (2011) Hookworm SCP/TAPS protein structure-A key to understanding host-parasite interactions and developing new interventions. *Biotechnol Adv.*
55. Geldhof, P., Meyvis, Y., Vercruysse, J., and Claerebout, E. (2008) Vaccine testing of a recombinant activation-associated secreted protein (ASP1) from *Ostertagia ostertagi*. *Parasite Immunol* 30, 57-60.
56. Goud, G. N., Zhan, B., Ghosh, K., Loukas, A., Hawdon, J., Dobardzic, A., Deumic, V., Liu, S., Dobardzic, R., Zook, B. C., Jin, Q., Liu, Y., Hoffman, L., Chung-Debose, S., Patel, R., Mendez, S., and Hotez, P. J. (2004) Cloning, yeast expression, isolation, and vaccine testing of recombinant *Ancylostoma*-secreted protein (ASP)-1 and ASP-2 from *Ancylostoma ceylanicum*. *J Infect Dis* 189, 919-929.
57. Mendez, S., Zhan, B., Goud, G., Ghosh, K., Dobardzic, A., Wu, W., Liu, S., Deumic, V., Dobardzic, R., Liu, Y., Bethony, J., and Hotez, P. J. (2005) Effect of combining the larval antigens *Ancylostoma* secreted protein 2 (ASP-2) and metalloprotease 1 (MTP-1) in protecting hamsters against hookworm infection and disease caused by *Ancylostoma ceylanicum*. *Vaccine* 23, 3123-3130.
58. Meyvis, Y., Geldhof, P., Gevaert, K., Timmerman, E., Vercruysse, J., and Claerebout, E. (2007) Vaccination against *Ostertagia ostertagi* with subfractions of the protective ES-thiol fraction. *Vet Parasitol* 149, 239-245.
59. Geldhof, P., De Maere, V., Vercruysse, J., Claerebout, E. Recombinant expression systems: the obstacle to helminth vaccines? *Trends in Parasitology* 2007 23:527-532
60. J Clin Microbiol. 1997 Jul;35(7):1728-33. Use of cloned excretory/secretory low-molecular-weight proteins of *Cooperia oncophora* in a serological assay. Poot J, Kooyman FN, Dop PY, Schallig HD, Eysker M, Cornelissen AW.

61. Int J Parasitol. 2003 Nov;33(13):1503-14. T-cell mediated immune responses in calves primary-infected or re-infected with *Cooperia oncophora*: similar effector cells but different timing. Kanobana K, Koets A, Bakker N, Ploeger HW, Vervelde L.
62. Panicali et al; PNAS USA 79, 4927 (1982).
63. Goeddel, et al., Nucl. Acids Res., 8, 4057 (1980).
64. Chang, et al., Nature, 275, 615 (1978).
65. Nakamura, K. and Inouge, M., EMBO J., 1, 771-775 (1982).
66. Remaut, E. et al., Nucl. Acids Res., 11, 4677-4688 (1983).
67. Nat Biotechnol. 2002 Dec;20(12):1265-8. Epub 2002 Nov 4. Boosting heterologous protein production in transgenic dicotyledonous seeds using *Phaseolus vulgaris* regulatory sequences. De Jaeger G, Scheffer S, Jacobs A, Zambre M, Zobell O, Goossens A, Depicker A, Angenon G.
68. Jacobs et al., Nature protocols 2009 4:58-70.
69. Valerio, D. et al.; in Baum, S. J., Dicke, K. A., Lotzova, E. and Pluznik, D. H. (Eds.), Experimental Haematology today-1988. Springer Verlag, New York: pp. 92-99 (1989).

Listado de secuencias

- 5 <110> Universiteit Gent
- <120> Vacuna contra *Cooperia*
- <130> P2012/058PCT
- 10 <150> Patente Europea EP12187773.2
- <151> 2012-10-09
- <160> 21
- 15 <170> Patentin version 3.3
- <210> 1
- <211> 422
- 20 <212> PRT
- <213> *Cooperia oncophora*
- <400> 1

ES 2 717 441 T3

Asp Glu Ile Arg Lys Val Phe Leu Asp Lys His Asn Glu Tyr Arg Ser
 1 5 10 15

Leu Val Ala Lys Gly Gln Ala Leu Asn Pro Gln Phe Gly Gly Ser Thr
 20 25 30

Pro Lys Ala Ala Arg Met Leu Lys Ala Arg Tyr Asp Cys Asp Val Glu
 35 40 45

Glu Asp Met Thr Lys Trp Ala Gln Ala Gln Cys Thr Tyr Ala Pro Phe
 50 55 60

Lys Ser Ser Lys Arg Tyr Gly Arg Asn Thr Trp Gly Met Gly Val Pro
 65 70 75 80

Asn Tyr Asn Lys Thr Ala Ala Ala Glu Ser Ser Val Tyr Asp Trp Phe
 85 90 95

Phe Glu Leu Arg Arg Tyr Gly Val Pro Gln Asp Asn Val Tyr Thr Arg
 100 105 110

Asp Val Asp Tyr Ser Ala Tyr His Tyr Ala Gln Met Val Trp Gln Asp
 115 120 125

Ser Tyr Lys Ile Gly Cys Val Val Ala Trp Cys Pro Ser Met Thr Trp
 130 135 140

Val Ala Cys Gly Tyr Ser Pro Ala Gly Asp Asn Ile Gly Ser Leu Ile
 145 150 155 160

Tyr Glu Leu Gly Glu Pro Cys Thr Lys Asn Glu Asp Cys Lys Cys Thr

ES 2 717 441 T3

				165						170						175
Asp	Cys	Thr	Cys	Ser	Glu	Gly	Glu	Ala	Leu	Cys	Ile	Pro	Pro	Gly	Gly	
			180					185					190			
Pro	Lys	Pro	Ala	Thr	Thr	Ala	Ser	Thr	Thr	Thr	Lys	Thr	Thr	Thr	Thr	
		195					200					205				
Thr	Lys	Pro	Thr	Thr	Thr	Thr	Thr	Glu	Pro	Ser	Thr	Thr	Thr	Ala	Lys	
	210					215					220					
Pro	Thr	Thr	Thr	Phe	Asp	Arg	Ala	Ala	Trp	Glu	Glu	Ser	Val	Lys	Arg	
225					230					235					240	
Pro	Val	Ala	Arg	Cys	Thr	Leu	Asp	Asn	Gly	Met	Thr	Asp	Glu	Ala	Arg	
				245					250					255		
Gln	Val	Phe	Leu	Asp	Lys	His	Asn	Glu	Tyr	Arg	Gln	Leu	Val	Ala	Arg	
			260					265						270		
Gly	Glu	Ala	Lys	Asn	Lys	Thr	Gly	Leu	Ala	Pro	Pro	Ala	Ala	Arg	Met	
		275					280					285				
Leu	Gln	Met	Arg	Tyr	Asp	Cys	Asp	Leu	Glu	Ala	His	Val	Met	Glu	His	
	290					295					300					
Val	Lys	Gln	Cys	Lys	Gly	Gly	His	Ser	Ser	Phe	Asp	Val	Leu	Lys	Gly	
305					310					315					320	
Arg	Gly	Gln	Asn	Ile	Trp	Ala	Ile	Thr	Val	Pro	Asn	Leu	Asp	Lys	Ala	
				325					330					335		
Asp	Ala	Ala	Asn	Arg	Ser	Val	His	Asp	Trp	Tyr	Ile	Glu	Leu	Thr	Lys	
			340					345					350			
Tyr	Gly	Ile	Thr	Ala	Asp	Asn	Lys	Ile	Ser	Met	Asp	Asn	Ala	Ala	Asn	
		355					360					365				
Thr	Gly	His	Tyr	Ser	Gln	Val	Val	Trp	Gln	Lys	Ser	Asn	Arg	Leu	Gly	
	370					375					380					
Cys	Ala	Ala	Val	Ser	Cys	Pro	Glu	Gln	Gly	Lys	Leu	Phe	Val	Gly	Cys	
385					390					395					400	
Glu	Tyr	Leu	Pro	Gly	Gly	Asn	Thr	Leu	His	His	Leu	Ile	Tyr	Asp	Ile	
				405					410					415		

ES 2 717 441 T3

Gly Glu Pro Cys Lys Arg
420

5 <210> 2
<211> 1266
<212> ADN
<213> *Cooperia oncophora*

<400> 2

gatgagatca	gaaaagtctt	ccttgacaag	cacaatgagt	accggtcact	cgttgctaaa	60
ggacaggctc	tgaatccaca	gtttggcggg	tctactccaa	aggccgctag	aatgctcaaa	120
gcgaggtacg	attgcatgtt	tgaagaagac	atgacgaagt	gggctcaagc	gcagtgcacg	180
tacgcaccat	tcaaaagtag	caaacgttac	ggccggaaca	catggggcat	gggtgtccct	240
aactacaaca	agacagcagc	tgcagaatcg	agtgtttacg	actggttctt	cgaactacgg	300
cgctatggtg	ttcctcaaga	taacgtgtat	acaagagatg	ttgactacag	tgcttatcat	360
tacgctcaga	tggtttgga	agatagttac	aaaattggat	gtgtcgtggc	atgggtgtcca	420
agcatgacct	gggtagcatg	cggatacagt	ccagcaggag	ataatatcgg	atccctaatt	480
tacgagcttg	gagaaccgtg	tacaaagaat	gaagactgta	aatgcaccga	ctgcacatgt	540
agtgaaggag	aagctctttg	tatacctcct	ggaggaccga	aaccgctac	cactgcaagc	600
accacgacca	agacaacgac	cactacaaag	cctacgacga	cgacgacgga	accttcgacc	660
actacggcga	agccaacgac	gaccttcgat	agagctgcgt	gggaggagtc	ggtcaagagg	720
ccagtagcgc	gttgactctt	tgacaacgga	atgacagacg	aggccaggca	ggttttcctt	780
gacaagcaca	acgagtaccg	gcaactagtt	gcaagaggag	aagctaaaaa	caagacagga	840
ttggctccgc	cggcagctag	aatgctacaa	atgaggtacg	attgcgacct	tgaggcacat	900
gttatggagc	acgttaaaca	gtgtaaaggc	ggacattcat	catttgatgt	gcttaaaggt	960
agggggcaga	acatatgggc	cataactgtc	cctaacttgg	acaaggctga	tgctgcaaac	1020
cggagtgtcc	atgactggta	catcgaatta	acgaaatatg	gtataaccgc	agataacaag	1080
atatcaatgg	acaatgctgc	aaactctggt	cattactcgc	aggtagtttg	gcaaaagtcg	1140
aacagacttg	gatgtgcagc	ggtgtcctgt	ccagaacaag	gaaaactctt	tgtaggttgc	1200
gaatatttac	caggagggaa	cacacttcac	catctgattt	acgatatcgg	agagccatgc	1260
aaacgg						1266

10

ES 2 717 441 T3

<210> 3

<211> 422

<212> PRT

<213> *Cooperia oncophora*

5 <400> 3

Asp Glu Ile Arg Lys Val Phe Leu Asp Lys His Asn Glu Tyr Arg Ser

ES 2 717 441 T3

1				5						10					15
Leu	Val	Ala	Lys	Gly	Gln	Ala	Pro	Asn	Pro	Gln	Phe	Gly	Gly	Ser	Thr
			20					25					30		
Pro	Lys	Ala	Ala	Arg	Met	Leu	Lys	Ala	Met	Tyr	Asp	Cys	Asp	Val	Glu
		35					40					45			
Glu	Asp	Met	Thr	Lys	Trp	Ala	Gln	Ala	Gln	Cys	Thr	Tyr	Ala	Pro	Phe
	50					55					60				
Lys	Ser	Ser	Lys	His	Tyr	Gly	Arg	Asn	Thr	Trp	Gly	Met	Gly	Val	Pro
65					70					75					80
Asn	Tyr	Asn	Lys	Thr	Ala	Ala	Ala	Glu	Ser	Ser	Val	Tyr	Asp	Trp	Phe
				85					90					95	
Ser	Glu	Leu	Arg	Arg	Tyr	Gly	Val	Pro	Gln	Asp	Asn	Val	Tyr	Thr	Arg
			100					105					110		
Asp	Val	Asp	Tyr	Ser	Ala	Tyr	Gln	Tyr	Ala	Gln	Met	Val	Trp	Gln	Asp
		115					120					125			
Ser	Tyr	Lys	Ile	Gly	Cys	Val	Val	Ala	Trp	Cys	Pro	Ser	Val	Thr	Trp
	130					135					140				
Val	Ala	Cys	Gly	Tyr	Ser	Pro	Ala	Gly	Asp	Asn	Ile	Gly	Ser	Leu	Ile
145					150					155					160
Tyr	Glu	Leu	Gly	Glu	Pro	Cys	Thr	Lys	Asn	Glu	Asp	Cys	Lys	Cys	Thr
				165					170					175	
Asp	Cys	Thr	Cys	Ser	Glu	Gly	Glu	Ala	Leu	Cys	Ile	Pro	Pro	Gly	Gly
			180					185						190	
Pro	Lys	Pro	Ala	Thr	Thr	Ala	Ser	Thr	Thr	Thr	Lys	Thr	Thr	Thr	Thr
		195					200							205	
Thr	Lys	Pro	Thr	Thr	Thr	Thr	Thr	Lys	Leu	Ser	Thr	Thr	Thr	Ala	Lys
	210					215					220				
Pro	Thr	Thr	Thr	Phe	Asp	Arg	Ala	Ala	Trp	Glu	Glu	Ser	Val	Lys	Arg
225					230					235					240
Pro	Val	Ala	Arg	Cys	Thr	Leu	Asp	Asn	Gly	Met	Thr	Asp	Glu	Ala	Arg
				245					250					255	

ES 2 717 441 T3

Gln Val Phe Leu Asp Lys His Asn Glu Tyr Arg Gln Leu Val Ala Arg
 260 265 270

Gly Glu Ala Lys Asn Lys Thr Gly Leu Ala Pro Pro Ala Ala Arg Met
 275 280 285

Leu Gln Met Arg Tyr Asp Cys Asp Leu Glu Ala His Val Met Glu His
 290 295 300

Val Lys Gln Cys Lys Gly Gly His Ser Ser Phe Asp Val Leu Lys Gly
 305 310 315 320

Arg Gly Gln Asn Ile Trp Ala Ile Thr Val Pro Asn Leu Asp Lys Ala
 325 330 335

Asp Ala Ala Asn Arg Ser Val His Asp Trp Tyr Ile Glu Leu Thr Lys
 340 345 350

Tyr Gly Ile Thr Ala Asp Asn Lys Ile Ser Met Asp Asn Ala Ala Asn
 355 360 365

Thr Gly His Tyr Ser Gln Val Val Trp Gln Lys Ser Asn Arg Leu Gly
 370 375 380

Cys Ala Ala Val Ser Cys Pro Glu Gln Gly Lys Leu Phe Val Gly Cys
 385 390 395 400

Glu Tyr Leu Pro Gly Gly Asn Thr Leu His His Leu Ile Tyr Asp Ile
 405 410 415

Gly Glu Pro Cys Lys Arg
 420

ES 2 717 441 T3

<210> 4
 <211> 1266
 <212> ADN
 <213> *Cooperia oncophora*

5

<400> 4

```

gatgagatca ggaaagtctt ccttgacaag cacaatgagt atcggtcact cgttgctaaa      60
ggacaggctc cgaatccaca gtttggcgga tctactccaa aggccgctag aatgctcaaa      120
gcgatgtacg attgcgatgt tgaagaagac atgacgaagt gggctcaagc gcagtgcacg      180
tacgcaccat tcaaaagtag caaacattac ggccggaaca catggggcat ggggtgtccct      240
aactacaaca agacagcagc tgcagaatcg agtgtttacg actggttctc cgaactacgg      300
cgctatggtg ttctcaaga taacgtgtat acaagagatg ttgactacag tgcttatcaa      360
tacgctcaga tggtttggca agacagttac aaaattggat gtgtcgtggc atggtgtcca      420

agcgtgacct gggtagcgtg cggatacagt ccagcaggag ataatatcgg atccctaatt      480
tacgagcttg gagaaccgtg tacgaagaat gaagactgta aatgcaccga ctgcacatgt      540
agtgaaggag aagctctttg tatacctcct ggaggaccaa aaccgctac cactgcaagc      600
accacaacca agacaacgac cactacaaag cctacgacga cgacgacgaa actttcgacc      660
actacggcga agccaacgac gaccttcgat agagctgcgt gggaggagtc ggtcaagagg      720
ccagtagcgc gttgcaactt tgacaacgga atgacagacg aggccaggca ggttttcctt      780
gacaagcaca acgagtaccg acaactagtt gcaagaggag aagctaaaaa caagacagga      840
ttggctccgc cggcagctag aatgctacaa atgaggtacg attgcgacct tgaggccat      900
gttatggagc acgttaaaca atgtaaaggc ggacattcat catttgatgt gcttaaaggt      960
agggggcaga acatatgggc cataactgtc cctaacttgg acaaggctga tgctgcaaac     1020
cggagtgtcc atgactggta catcgaatta acgaaatatg gtataactgc agataacaag     1080
atatcaatgg acaatgctgc aaacactggt cactactcgc aggtagtttg gcaaaagtgc     1140
aacagacttg gatgtgcagc ggtgtcctgt ccagaacaag gaaaactctt tgtaggttgc     1200
gaatatttac caggagggaa cacacttcac catctgattt acgatatcgg agagccatgc     1260
aaacgg                                             1266
    
```

<210> 5
 <211> 422
 <212> PRT
 <213> *Cooperia oncophora*

10

<400> 5

ES 2 717 441 T3

Asp Glu Ile Arg Lys Val Phe Leu Asp Lys His Asn Glu Tyr Arg Ser
 1 5 10 15

Leu Val Ala Lys Gly Gln Ala Pro Asn Pro Gln Phe Gly Gly Ser Thr
 20 25 30

Pro Lys Ala Ala Arg Met Leu Lys Ala Arg Tyr Asp Cys Asp Val Glu
 35 40 45

Glu Asp Met Thr Lys Trp Ala Gln Ala Gln Cys Thr Tyr Ala Pro Phe
 50 55 60

Lys Ser Ser Lys Arg Tyr Gly Arg Asn Thr Trp Gly Met Gly Val Pro
 65 70 75 80

Asn Tyr Asn Lys Ile Ala Ala Ala Glu Ser Ser Val Asp Asp Trp Phe
 85 90 95

ES 2 717 441 T3

Phe Glu Leu Arg Arg Tyr Gly Val Pro Gln Asp Asn Val Tyr Thr Arg
100 105 110

Asp Val Asp Tyr Ser Ala Tyr His Tyr Ala Gln Met Val Trp Gln Asp
115 120 125

Ser Tyr Lys Ile Gly Cys Val Val Ala Trp Cys Pro Ser Met Thr Trp
130 135 140

Val Ala Cys Gly Tyr Ser Pro Ala Gly Asp Asn Ile Gly Ser Leu Ile
145 150 155 160

Tyr Glu Leu Gly Glu Pro Cys Thr Lys Asn Glu Asp Cys Lys Cys Thr
165 170 175

Asp Cys Thr Cys Ser Glu Gly Glu Ala Leu Cys Ile Pro Pro Gly Glu
180 185 190

Pro Lys Pro Ala Thr Thr Ala Ser Thr Thr Thr Lys Thr Thr Thr Thr
195 200 205

Thr Glu Pro Thr Thr Thr Thr Thr Glu Pro Ser Thr Thr Thr Ala Lys
210 215 220

Pro Thr Thr Thr Phe Asp Arg Ala Ala Trp Glu Glu Ser Val Lys Arg
225 230 235 240

Pro Val Ala Arg Cys Thr Leu Asp Asn Gly Met Thr Asp Glu Ala Arg
245 250 255

Gln Val Phe Leu Asp Lys His Asn Glu Tyr Arg Gln Leu Val Ala Arg
260 265 270

Gly Glu Ala Lys Asn Lys Thr Gly Leu Ala Pro Pro Ala Ala Arg Met
275 280 285

Leu Gln Met Arg Tyr Asp Cys Asp Leu Glu Ala His Val Met Glu His
290 295 300

Val Lys Gln Cys Lys Gly Gly His Ser Ser Phe Asp Val Leu Lys Gly
305 310 315 320

Arg Gly Gln Asn Ile Trp Ala Ile Thr Val Pro Asn Leu Asp Lys Ala
325 330 335

Asp Ala Ala Asn Arg Ser Val His Asp Trp Tyr Ile Glu Leu Thr Lys
340 345 350

ES 2 717 441 T3

Tyr Gly Ile Thr Ala Asp Asn Lys Ile Ser Met Asp Asn Ala Ala Asn
355 360 365

Thr Gly His Tyr Ser Gln Val Val Trp Gln Lys Ser Asn Arg Leu Gly
370 375 380

Cys Ala Ala Val Ser Cys Pro Glu Gln Gly Lys Leu Phe Val Gly Cys
385 390 395 400

Glu Tyr Leu Pro Gly Gly Asn Thr Leu His His Leu Ile Tyr Asp Ile
405 410 415

Gly Glu Pro Cys Lys Arg
420

<210> 6

<211> 1266

5 <212> ADN

<213> *Cooperia oncophora*

<400> 6

ES 2 717 441 T3

gatgagatca	gaaaagtctt	ccttgacaag	cacaatgagt	atcggtcact	cgttgctaaa	60
ggacaggctc	cgaatccaca	gtttggcggg	tctactccaa	aggccgctag	aatgctcaaa	120
gcgaggtacg	attgcgatgt	tgaagaagac	atgacgaagt	gggctcaagc	gcagtgcacg	180
tacgcaccat	tcaaaagtag	caaacgttac	ggccggaaca	catggggaat	gggtgtccct	240
aactacaaca	agatagcagc	tgcagaatcg	agtgttgacg	actggttcct	cgaactacgg	300
cgctatggtg	ttcctcaaga	taacgtgtat	acaagagatg	ttgactacag	tgcttatcat	360
tacgctcaga	tggtttggca	agacagttac	aaaattggat	gtgtcgtggc	atggtgtcca	420
agcatgacct	gggtagcgtg	cggatacagt	ccagcaggag	ataatatcgg	atccctaatt	480
tacgagcttg	gagaaccgtg	tacaaagaat	gaagactgta	aatgcaccga	ctgcacatgt	540
agtgaaggag	aagctctttg	tatacctcct	ggagaaccga	aaccgctac	cactgcaagc	600
accacgacca	agacaacgac	cactacagag	cctacgacaa	cgacgacgga	accgtcgacc	660
actacggcga	agccaacgac	gaccttcgat	agagctgcgt	gggaggagtc	ggtcaagagg	720
ccagtagcgc	gttgcactct	tgacaacgga	atgacagacg	aggccaggca	ggtttccctc	780
gacaagcaca	acgagtaccg	gcaactagtt	gcaagaggag	aagctaaaaa	caagacagga	840
ttggctccgc	cggcagctag	aatgctacaa	atgaggtacg	attgcgacct	tgaggcacat	900
gttatggagc	acgttaaaca	atgtaaaggc	ggacattcat	catttgatgt	gcttaaaggt	960
agggggcaga	acatatgggc	cataactgtc	cctaacttgg	acaaggctga	tgctgcaaac	1020
cggagtggtc	atgactggta	catcgaatta	acgaaatatg	gtataactgc	agataacaag	1080

ES 2 717 441 T3

atatcaatgg acaatgctgc aaacactggt cattactcgc aggtagtttg gcaaaagtgc 1140
 aacagacttg gatgtgcagc ggtgtcctgt ccagaacaag gaaaactctt tgtaggttgc 1200
 gaatatttac caggagggaa cacacttcac catctgattt acgatatcgg agagccatgc 1260
 aaacgg 1266

5 <210> 7
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Cebador

<400> 7
 atgyaacagk aytgggtgag g 21

15 <210> 8
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Cebador

<400> 8
 atacacatgg ayaaytgtgt get 23

25 <210> 9
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Cooperia oncophora

30 <400> 9
 Leu Arg Trp Asn Cys Thr Leu Glu Ala Lys
 1 5 10

<210> 10
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Cooperia oncophora

<400> 10
 Trp Asn Cys Thr Leu Glu Ala Lys
 1 5

40 <210> 11
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Cooperia oncophora

45 <400> 11
 Trp Asn Cys Thr Leu Glu Ala Lys Ala Arg
 1 5 10

ES 2 717 441 T3

<210> 12
 <211> 27
 <212> ADN
 5 <213> *Cooperia oncophora*
 <400> 12
 ctttgctcgc ttgataatgg aatgaca 27

<210> 13
 10 <211> 66
 <212> ADN
 <213> *Cooperia oncophora*
 <400> 13
 gatgaagatt gtaagtgcag ctcctgcaga tgcagcacac aattatccat gtgtatcaac 60

15 cctaac 66

<210> 14
 <211> 9
 <212> PRT
 20 <213> *Cooperia oncophora*
 <400> 14
 Leu Cys Ser Leu Asp Asn Gly Met Thr
 1 5

<210> 15
 <211> 22
 25 <212> PRT
 <213> *Cooperia oncophora*
 <400> 15
 Asp Glu Asp Cys Lys Cys Ser Ser Cys Arg Cys Ser Thr Gln Leu Ser
 1 5 10 15
 Met Cys Ile Asn Pro Asn
 20

30 <210> 16
 <211> 453
 <212> PRT
 <213> *Cooperia oncophora*

35 <400> 16
 Leu Cys Ser Leu Asp Asn Gly Met Thr Asp Glu Ile Arg Lys Val Phe
 1 5 10 15
 Leu Asp Lys His Asn Glu Tyr Arg Ser Leu Val Ala Lys Gly Gln Ala
 20 25 30

ES 2 717 441 T3

Leu Asn Pro Gln Phe Gly Gly Ser Thr Pro Lys Ala Ala Arg Met Leu
 35 40 45
 Lys Ala Arg Tyr Asp Cys Asp Val Glu Glu Asp Met Thr Lys Trp Ala
 50 55 60
 Gln Ala Gln Cys Thr Tyr Ala Pro Phe Lys Ser Ser Lys Arg Tyr Gly
 65 70 75 80
 Arg Asn Thr Trp Gly Met Gly Val Pro Asn Tyr Asn Lys Thr Ala Ala
 85 90 95
 Ala Glu Ser Ser Val Tyr Asp Trp Phe Phe Glu Leu Arg Arg Tyr Gly
 100 105 110
 Val Pro Gln Asp Asn Val Tyr Thr Arg Asp Val Asp Tyr Ser Ala Tyr
 115 120 125
 His Tyr Ala Gln Met Val Trp Gln Asp Ser Tyr Lys Ile Gly Cys Val
 130 135 140
 Val Ala Trp Cys Pro Ser Met Thr Trp Val Ala Cys Gly Tyr Ser Pro
 145 150 155 160
 Ala Gly Asp Asn Ile Gly Ser Leu Ile Tyr Glu Leu Gly Glu Pro Cys
 165 170 175
 Thr Lys Asn Glu Asp Cys Lys Cys Thr Asp Cys Thr Cys Ser Glu Gly
 180 185 190
 Glu Ala Leu Cys Ile Pro Pro Gly Gly Pro Lys Pro Ala Thr Thr Ala
 195 200 205
 Ser Thr Thr Thr Lys Thr Thr Thr Thr Thr Lys Pro Thr Thr Thr Thr
 210 215 220
 Thr Glu Pro Ser Thr Thr Thr Ala Lys Pro Thr Thr Thr Phe Asp Arg
 225 230 235 240
 Ala Ala Trp Glu Glu Ser Val Lys Arg Pro Val Ala Arg Cys Thr Leu
 245 250 255
 Asp Asn Gly Met Thr Asp Glu Ala Arg Gln Val Phe Leu Asp Lys His
 260 265 270
 Asn Glu Tyr Arg Gln Leu Val Ala Arg Gly Glu Ala Lys Asn Lys Thr
 275 280 285

ES 2 717 441 T3

Gly Leu Ala Pro Pro Ala Ala Arg Met Leu Gln Met Arg Tyr Asp Cys
 290 295 300

Asp Leu Glu Ala His Val Met Glu His Val Lys Gln Cys Lys Gly Gly
 305 310 315 320

His Ser Ser Phe Asp Val Leu Lys Gly Arg Gly Gln Asn Ile Trp Ala
 325 330 335

Ile Thr Val Pro Asn Leu Asp Lys Ala Asp Ala Ala Asn Arg Ser Val
 340 345 350

His Asp Trp Tyr Ile Glu Leu Thr Lys Tyr Gly Ile Thr Ala Asp Asn
 355 360 365

Lys Ile Ser Met Asp Asn Ala Ala Asn Thr Gly His Tyr Ser Gln Val
 370 375 380

Val Trp Gln Lys Ser Asn Arg Leu Gly Cys Ala Ala Val Ser Cys Pro
 385 390 395 400

Glu Gln Gly Lys Leu Phe Val Gly Cys Glu Tyr Leu Pro Gly Gly Asn
 405 410 415

Thr Leu His His Leu Ile Tyr Asp Ile Gly Glu Pro Cys Lys Arg Asp
 420 425 430

Glu Asp Cys Lys Cys Ser Ser Cys Arg Cys Ser Thr Gln Leu Ser Met
 435 440 445

Cys Ile Asn Pro Asn
 450

- <210> 17
- <211> 453
- <212> PRT
- <213> *Cooperia oncophora*

5

<400> 17

ES 2 717 441 T3

Leu Cys Ser Leu Asp Asn Gly Met Thr Asp Glu Ile Arg Lys Val Phe
1 5 10 15

Leu Asp Lys His Asn Glu Tyr Arg Ser Leu Val Ala Lys Gly Gln Ala
20 25 30

Pro Asn Pro Gln Phe Gly Gly Ser Thr Pro Lys Ala Ala Arg Met Leu
35 40 45

ES 2 717 441 T3

Lys Ala Met Tyr Asp Cys Asp Val Glu Glu Asp Met Thr Lys Trp Ala
50 55 60

Gln Ala Gln Cys Thr Tyr Ala Pro Phe Lys Ser Ser Lys His Tyr Gly
65 70 75 80

Arg Asn Thr Trp Gly Met Gly Val Pro Asn Tyr Asn Lys Thr Ala Ala
85 90 95

Ala Glu Ser Ser Val Tyr Asp Trp Phe Ser Glu Leu Arg Arg Tyr Gly
100 105 110

Val Pro Gln Asp Asn Val Tyr Thr Arg Asp Val Asp Tyr Ser Ala Tyr
115 120 125

Gln Tyr Ala Gln Met Val Trp Gln Asp Ser Tyr Lys Ile Gly Cys Val
130 135 140

Val Ala Trp Cys Pro Ser Val Thr Trp Val Ala Cys Gly Tyr Ser Pro
145 150 155 160

Ala Gly Asp Asn Ile Gly Ser Leu Ile Tyr Glu Leu Gly Glu Pro Cys
165 170 175

Thr Lys Asn Glu Asp Cys Lys Cys Thr Asp Cys Thr Cys Ser Glu Gly
180 185 190

Glu Ala Leu Cys Ile Pro Pro Gly Gly Pro Lys Pro Ala Thr Thr Ala
195 200 205

Ser Thr Thr Thr Lys Thr Thr Thr Thr Thr Lys Pro Thr Thr Thr Thr
210 215 220

Thr Lys Leu Ser Thr Thr Thr Ala Lys Pro Thr Thr Thr Phe Asp Arg
225 230 235 240

Ala Ala Trp Glu Glu Ser Val Lys Arg Pro Val Ala Arg Cys Thr Leu
245 250 255

Asp Asn Gly Met Thr Asp Glu Ala Arg Gln Val Phe Leu Asp Lys His
260 265 270

Asn Glu Tyr Arg Gln Leu Val Ala Arg Gly Glu Ala Lys Asn Lys Thr
275 280 285

Gly Leu Ala Pro Pro Ala Ala Arg Met Leu Gln Met Arg Tyr Asp Cys

ES 2 717 441 T3

290		295		300											
Asp 305	Leu	Glu	Ala	His	Val	Met	Glu	His	Val	Lys 315	Gln	Cys	Lys	Gly	Gly 320
	His	Ser	Ser	Phe	Asp 325	Val	Leu	Lys	Gly	Arg 330	Gly	Gln	Asn	Ile	Trp 335
	Ile	Thr	Val	Pro 340	Asn	Leu	Asp	Lys	Ala 345	Asp	Ala	Ala	Asn	Arg 350	Ser
	His	Asp	Trp 355	Tyr	Ile	Glu	Leu	Thr 360	Lys	Tyr	Gly	Ile	Thr 365	Ala	Asp
	Lys	Ile 370	Ser	Met	Asp	Asn	Ala 375	Ala	Asn	Thr	Gly	His 380	Tyr	Ser	Gln
	Val 385	Trp	Gln	Lys	Ser	Asn 390	Arg	Leu	Gly	Cys	Ala 395	Ala	Val	Ser	Cys
	Glu	Gln	Gly	Lys	Leu	Phe 405	Val	Gly	Cys	Glu 410	Tyr	Leu	Pro	Gly	Gly 415
	Thr	Leu	His	His 420	Leu	Ile	Tyr	Asp	Ile 425	Gly	Glu	Pro	Cys	Lys 430	Arg
	Glu	Asp	Cys 435	Lys	Cys	Ser	Ser	Cys 440	Arg	Cys	Ser	Thr	Gln 445	Leu	Ser
	Cys	Ile	Asn	Pro	Asn										

<210> 18
 <211> 453
 <212> PRT
 <213> *Cooperia oncophora*

5

<400> 18

ES 2 717 441 T3

Leu Cys Ser Leu Asp Asn Gly Met Thr Asp Glu Ile Arg Lys Val Phe
1 5 10 15

Leu Asp Lys His Asn Glu Tyr Arg Ser Leu Val Ala Lys Gly Gln Ala
20 25 30

Pro Asn Pro Gln Phe Gly Gly Ser Thr Pro Lys Ala Ala Arg Met Leu
35 40 45

Lys Ala Arg Tyr Asp Cys Asp Val Glu Glu Asp Met Thr Lys Trp Ala

ES 2 717 441 T3

50						55										60
Gln	Ala	Gln	Cys	Thr	Tyr	Ala	Pro	Phe	Lys	Ser	Ser	Lys	Arg	Tyr	Gly	
65					70					75					80	
Arg	Asn	Thr	Trp	Gly	Met	Gly	Val	Pro	Asn	Tyr	Asn	Lys	Ile	Ala	Ala	
				85					90					95		
Ala	Glu	Ser	Ser	Val	Asp	Asp	Trp	Phe	Phe	Glu	Leu	Arg	Arg	Tyr	Gly	
			100					105					110			
Val	Pro	Gln	Asp	Asn	Val	Tyr	Thr	Arg	Asp	Val	Asp	Tyr	Ser	Ala	Tyr	
		115					120					125				
His	Tyr	Ala	Gln	Met	Val	Trp	Gln	Asp	Ser	Tyr	Lys	Ile	Gly	Cys	Val	
	130					135					140					
Val	Ala	Trp	Cys	Pro	Ser	Met	Thr	Trp	Val	Ala	Cys	Gly	Tyr	Ser	Pro	
145					150					155					160	
Ala	Gly	Asp	Asn	Ile	Gly	Ser	Leu	Ile	Tyr	Glu	Leu	Gly	Glu	Pro	Cys	
				165					170					175		
Thr	Lys	Asn	Glu	Asp	Cys	Lys	Cys	Thr	Asp	Cys	Thr	Cys	Ser	Glu	Gly	
			180					185					190			
Glu	Ala	Leu	Cys	Ile	Pro	Pro	Gly	Glu	Pro	Lys	Pro	Ala	Thr	Thr	Ala	
		195					200					205				
Ser	Thr	Thr	Thr	Lys	Thr	Thr	Thr	Thr	Thr	Glu	Pro	Thr	Thr	Thr	Thr	
	210						215				220					
Thr	Glu	Pro	Ser	Thr	Thr	Thr	Ala	Lys	Pro	Thr	Thr	Thr	Phe	Asp	Arg	
225					230					235					240	
Ala	Ala	Trp	Glu	Glu	Ser	Val	Lys	Arg	Pro	Val	Ala	Arg	Cys	Thr	Leu	
				245					250					255		
Asp	Asn	Gly	Met	Thr	Asp	Glu	Ala	Arg	Gln	Val	Phe	Leu	Asp	Lys	His	
			260					265					270			
Asn	Glu	Tyr	Arg	Gln	Leu	Val	Ala	Arg	Gly	Glu	Ala	Lys	Asn	Lys	Thr	
		275					280					285				
Gly	Leu	Ala	Pro	Pro	Ala	Ala	Arg	Met	Leu	Gln	Met	Arg	Tyr	Asp	Cys	
290						295					300					

ES 2 717 441 T3

Asp Leu Glu Ala His Val Met Glu His Val Lys Gln Cys Lys Gly Gly
 305 310 315 320

His Ser Ser Phe Asp Val Leu Lys Gly Arg Gly Gln Asn Ile Trp Ala
 325 330 335

Ile Thr Val Pro Asn Leu Asp Lys Ala Asp Ala Ala Asn Arg Ser Val
 340 345 350

His Asp Trp Tyr Ile Glu Leu Thr Lys Tyr Gly Ile Thr Ala Asp Asn
 355 360 365

Lys Ile Ser Met Asp Asn Ala Ala Asn Thr Gly His Tyr Ser Gln Val
 370 375 380

Val Trp Gln Lys Ser Asn Arg Leu Gly Cys Ala Ala Val Ser Cys Pro
 385 390 395 400

Glu Gln Gly Lys Leu Phe Val Gly Cys Glu Tyr Leu Pro Gly Gly Asn
 405 410 415

Thr Leu His His Leu Ile Tyr Asp Ile Gly Glu Pro Cys Lys Arg Asp
 420 425 430

Glu Asp Cys Lys Cys Ser Ser Cys Arg Cys Ser Thr Gln Leu Ser Met
 435 440 445

Cys Ile Asn Pro Asn
 450

<210> 19

<211> 1359

<212> ADN

5 <213> *Cooperia oncophora*

<400> 19

ES 2 717 441 T3

ctttgctcgc ttgataatgg aatgacagat gagatcagaa aagtcttcct tgacaagcac 60
aatgagtacc ggtcactcgt tgctaaagga caggctctga atccacagtt tggcgggtct 120
actccaaagg ccgctagaat gctcaaagcg aggtacgatt gcgatgttga agaagacatg 180
acgaagtggg ctcaagcgca gtgcacgtac gcaccattca aaagtagcaa acgttacggc 240
cggaacacat ggggcatggg tgtccctaac tacaacaaga cagcagctgc agaatcgagt 300
gtttacgact ggttcttcga actacggcgc tatgggtgtc ctcaagataa cgtgtataca 360
agagatgttg actacagtgc ttatcattac gctcagatgg tttggcaaga tagttacaaa 420
attggatgtg tcgtggcatg gtgtccaagc atgacctggg tagcatgcbg atacagtcca 480
gcaggagata atatcggatc cctaatttac gagcttggag aaccgtgtac aaagaatgaa 540

gactgtaa at gcaccgactg cacatgtagt gaaggagaag ctctttgtat acctcctgga 600
ggaccgaaac ccgctaccac tgcaagcacc acgaccaaga caacgaccac tacaagcct 660
acgacgacga cgacggaacc ttcgaccact acggcgaagc caacgacgac cttcgataga 720
gctgcgtggg aggagtcggt caagaggcca gtagcgcgtt gcactcttga caacggaatg 780
acagacgagg ccaggcaggt tttccttgac aagcacaacg agtaccggca actagttgca 840
agaggagaag ctaaaaaaca gacaggattg gctccgccgg cagctagaat gctacaaatg 900
aggtacgatt gcgaccttga ggcacatggt atggagcacg ttaaacagtg taaaggcgga 960
cattcatcat ttgatgtgct taaaggtagg gggcagaaca tatgggcat aactgtccct 1020
aacttgaca aggctgatgc tgcaaaccgg agtgtccatg actggtacat cgaattaacg 1080
aaatatggta taaccgcaga taacaagata tcaatggaca atgctgcaaa cactggtcat 1140
tactcgcagg tagtttgca aaagtcgaac agacttggat gtgcagcggg gtcctgtcca 1200
gaacaaggaa aactctttgt aggttgcgaa tatttaccag gagggaaacac acttcacat 1260
ctgatttacg atatcggaga gccatgcaaa cgggatgaag attgtaagtg cagctcctgc 1320
agatgcagca cacaattatc catgtgtatc aaccctaac 1359

<210> 20

<211> 1359

5 <212> ADN

<213> *Cooperia oncophora*

<400> 20

ES 2 717 441 T3

ctttgctcgc tggataatgg aatgacagat gagatcagga aagtcttcct tgacaagcac 60
 aatgagtatc ggtcactcgt tgctaaagga caggctccga atccacagtt tggcggatct 120
 actccaaagg ccgctagaat gctcaaagcg atgtacgatt gcgatggtga agaagacatg 180
 acgaagtggg ctcaagcgca gtgcacgtac gcaccattca aaagtagcaa acattacggc 240
 cggaacacat ggggcatggg tgtccctaac tacaacaaga cagcagctgc agaatcgagt 300
 gtttacgact ggttctccga actacggcgc tatggtgttc ctcaagataa cgtgtataca 360
 agagatgttg actacagtgc ttatcaatac gctcagatgg tttggcaaga cagttacaaa 420
 attggatgtg tcgtggcatg gtgtccaagc gtgacctggg tagcgtgcbg atacagtcca 480
 gcaggagata atatcggatc cctaatttac gagcttggag aaccgtgtac gaagaatgaa 540
 gactgtaaata gcaccgactg cacatgtagt gaaggagaag ctctttgtat acctcctgga 600
 ggaccaaaaac ccgctaccac tgcaagcacc acaaccaaga caacgaccac taaaaagcct 660
 acgacgacga cgacgaaact ttcgaccact acggcgaagc caacgacgac cttcgataga 720
 gctgcgtggg aggagtcbgt caagaggcca gtagcgcgtt gcactcttga caacggaatg 780
 acagacgagg ccaggcaggt tttccttgac aagcacaacg agtaccgaca actagttgca 840

 agaggagaag ctaaaaaaaa gacaggattg gctccgccgg cagctagaat gctacaaatg 900
 aggtacgatt gcgaccttga ggcacatggt atggagcacg ttaaacaatg taaaggcggg 960
 cattcatcat ttgatgtgct taaaggtagg gggcagaaca tatgggcat aactgtccct 1020
 aacttggaca aggctgatgc tgcaaaccgg agtgtccatg actggtacat cgaattaacg 1080
 aaatatggta taactgcaga taacaagata tcaatggaca atgctgcaaa cactggtcat 1140
 tactcgcagg tagtttggca aaagtcgaac agacttggat gtgcagcggg gtcctgtcca 1200
 gaacaaggaa aactctttgt aggttgcgaa tatttaccag gagggaacac acttcacat 1260
 ctgatttacg atatcggaga gccatgcaaa cgggatgaag attgtaagtg cagctcctgc 1320
 agatgcagca cacaattatc catgtgtatc aaccctaac 1359

<210> 21
 <211> 1359
 <212> ADN
 <213> *Cooperia oncophora*

5

<400> 21

ES 2 717 441 T3

ctttgctcgc tggataatgg aatgacagat gagatcagaa aagtcttcct tgacaagcac	60
aatgagtatc ggtcactcgt tgctaaagga caggctccga atccacagtt tggcgggtct	120
actccaaagg ccgctagaat gctcaaagcg aggtacgatt gcgatgttga agaagacatg	180
acgaagtggg ctcaagcgca gtgcacgtac gcaccattca aaagtagcaa acgttacggc	240
cggaacacat ggggaatggg tgtccctaac tacaacaaga tagcagctgc agaatcgagt	300
gttgacgact ggttcttcga actacggcgc tatggtgttc ctcaagataa cgtgtataca	360
agagatgttg actacagtgc ttatcattac gctcagatgg tttggcaaga cagttacaaa	420
attggatgtg tctgtggcatg gtgtccaagc atgacctggg tagcgtgctg atacagtcca	480
gcaggagata atatcggatc cctaatttac gagcttgag aaccgtgtac aaagaatgaa	540
gactgtaaat gcaccgactg cacatgtagt gaaggagaag ctctttgtat acctcctgga	600
gaaccgaaac ccgctaccac tgcaagcacc acgaccaaga caacgaccac tacagagcct	660
acgacaacga cgacggaacc gtcgaccact acggcgaagc caacgacgac cttcgataga	720
gctgcgtggg aggagtcggt caagaggcca gtagcgcggt gcactcttga caacggaatg	780
acagacgagg ccaggcaggt ttccctcgac aagcacaacg agtaccggca actagttgca	840
agaggagaag ctaaaaacaa gacaggattg gctccgccgg cagctagaat gctacaaatg	900
aggtacgatt gcgaccttga ggcacatggt atggagcacg ttaaacaatg taaaggcgga	960
cattcatcat ttgatgtgct taaaggtagg gggcagaaca tatgggcat aactgtcct	1020
aacttgaca aggctgatgc tgcaaaccgg agtgtccatg actggtacat cgaattaacg	1080
aaatatggta taactgcaga taacaagata tcaatggaca atgctgcaaa cactggtcat	1140
tactcgcagg tagtttggca aaagtogaac agacttggat gtgcagcggg gtcctgtcca	1200
gaacaaggaa aactctttgt aggttgcgaa tatttaccag gagggaacac acttcacat	1260
ctgatttacg atatcggaga gccatgcaaa cgggatgaag attgtaagtg cagctcctgc	1320
agatgcagca cacaattgtc catgtgtatc aaccctaac	1359

REIVINDICACIONES

1. Una proteína de *Cooperia oncophora*, o un fragmento inmunógeno de dicha proteína, aislados, caracterizada por que dicha proteína, o su fragmento inmunógeno, comprende una secuencia de aminoácidos que presenta una identidad de secuencias de al menos un 85 % para la secuencia de aminoácidos representada en SEQ ID NO : 1.
- 5 2. La proteína, o su fragmento inmunógeno, aislados según la reivindicación 1, en donde dicha proteína o dicho fragmento comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencias de al menos un 90 % para la secuencia de aminoácidos representada en SEQ ID NO : 1.
3. Una secuencia de ácidos nucleicos aislada que codifica la proteína o el fragmento inmunógeno según las reivindicaciones 1 o 2.
- 10 4. La secuencia de ácidos nucleicos según la reivindicación 3, que tiene al menos un 85 % de identidad con la secuencia de ácidos nucleicos representada en SEQ ID NO : 2.
5. La secuencia de ácidos nucleicos según la reivindicación 3, que tiene al menos un 90 % de identidad con la secuencia de ácidos nucleicos representada en SEQ ID NO : 2.
- 15 6. Una molécula de ADN recombinante que comprende una secuencia de ácidos nucleicos según las reivindicaciones 3 o 4, y un promotor unido funcionalmente.
7. Un vector que comprende una secuencia de ácidos nucleicos según las reivindicaciones 3 o 4, o una molécula de ADN recombinante según la reivindicación 6.
8. El vector según la reivindicación 7, siendo dicho vector un plásmido, bacteriófago, cósmido, virus o minicromosoma.
- 20 9. Una célula huésped que comprende una secuencia de ácidos nucleicos según las reivindicaciones 3 o 4, una molécula de ADN recombinante según la reivindicación 6, o un vector según las reivindicaciones 7 u 8.
10. La célula huésped según la reivindicación 9, siendo dicha célula huésped una célula animal, una célula bacteriana, una célula de levadura, una célula de insecto o una célula vegetal.
- 25 11. La proteína o el fragmento inmunógeno según las reivindicaciones 1 o 2, el ácido nucleico según las reivindicaciones 3 o 4, la molécula de ADN recombinante según la reivindicación 6, el vector según las reivindicaciones 7 u 8, o la célula huésped según las reivindicaciones 9 o 10, para uso como medicamento.
- 30 12. La proteína o el fragmento inmunógeno según las reivindicaciones 1 o 2, el ácido nucleico según las reivindicaciones 3 o 4, la molécula de ADN recombinante según la reivindicación 6, el vector según las reivindicaciones 7 u 8, o la célula huésped según las reivindicaciones 9 o 10, para uso en la prevención o en el tratamiento de una infección por *Cooperia oncophora*.
13. El uso de una proteína o un fragmento inmunógeno según las reivindicaciones 1 o 2, el ácido nucleico según las reivindicaciones 3 o 4, la molécula de ADN recombinante según la reivindicación 6, el vector según las reivindicaciones 7 u 8, o la célula huésped según las reivindicaciones 9 o 10, para la fabricación de una vacuna contra infección por *Cooperia oncophora*.
- 35 14. Una vacuna contra infección por *Cooperia oncophora*, caracterizada por que dicha vacuna comprende al menos una proteína o un ácido nucleico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, y un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable.
15. La vacuna según la reivindicación 14, caracterizada por que dicha vacuna comprende además un adyuvante.

Figura 1

A. Variante A de ASP de doble dominio

DEIRKVFLDKHNEYRSLVAKGQALNPQFGGSTPKAARMLKARYDCDVEEDMTKWAQAQCTYAPFKSSKRYGRNT
 WGMGVPNYNKTAAAESSVYDWFELRRYGVPQDNVYTRDVEDYSAYHYAQMVMWQDSYKIGCVVAWCPSMTWV
 ACGYSPAGDNIGSLIYELGEPCTKNEDCKCTDCTCSEGEALCIPPGGPKPATTASTTTKTTTTTKPTTTTTTEPSTTTA
 KPTTTTFDRAAWVESVKRPVARCTLDNGMTDEARQVFLDKHNEYRQLVARGEAKNKTGLAPPAARMLQMRYDC
 DLEAHVMEHVKQCKGGHSSFDVLKGRGQNIWAITVFNLDKADAANRSVHDWYIELTKYGITADNKISMDNAANT
 GHYSQVWVWQKSNRLGCAAVSCPEQGKLFVGCYLPGGNTLHHLIYDIGEPCKR (SEQ ID NO: 1)

GATGAGATCAGAAAAGTCTTCCTTGACAAGCACAATGAGTACCGGTCACCTCGTTGCTAAAGGACAGGCTCTGAAT
 CCACAGTTTTGGCGGGTCTACTCCAAAGCCGCTAGAATGCTCAAAGCGAGGTACGATTCGCGATGTTGAAGAAGAC
 ATGACGAAGTGGGCTCAAGCGCAGTGCACGTACGCACCATTCAAAGTAGCAAACGTTACGGCCGGAACACATGG
 GGCATGGGTGTCCCTAACTACAACAAGACAGCAGCTGCAGAATCGAGTGTTTACGACTGGTTCTTCGAACTACGG
 CGCTATGGTGTTCCTCAAGATAACGTGTATAACAAGAGATGTTGACTACAGTGCTTATCATTACGCTCAGATGGTT
 TGGCAAGATAGTTACAAAATTGGATGTGTCTGGCATGGTGTCCAAGCATGACCTGGGTAGCATGCGGATACAG
 TCCAGCAGGAGATAATATCGGATCCCTAATTTACGAGCTTGGAGAACCCTGTACAAAGAATGAAGACTGTAAAT
 GCACCGACTGCACATGTAGTGAAGGAGAAGCTCTTTGTATACCTCCTGGAGGACCGAAAACCGCTACCACTGCAA
 GCACCACGACCAAGACAACGACCACTACAAAGCCTACGACGACGACGACGGAACCTTCGACCACTACGGCGAAGC
 CAACGACGACCTTCGATAGAGCTGCGTGGGAGGAGTCCGGTCAAGAGGCCAGTAGCGCGTTGCACTCTTGACAACG
 GAATGACAGACGAGGCCAGGCAGTTTTCTTGACAAGCACAACGAGTACCGGCAACTAGTTGCAAGAGGAGAA
 GCTAAAAACAAGACAGGATTGGCTCCGCCGGCAGCTAGAATGCTACAAATGAGGTACGATTGCGACCTTGAGGCA
 CATGTTATGGAGCACGTTAAACAGTGTAAGGCGGACATTCATCATTTGATGTGCTTAAAGGTAGGGGGCAGAA
 CATATGGGCCATAACTGTCCCTAACTTGACAAGGCTGATGCTGCAAACCGGAGTGTCCATGACTGGTACATCGA
 ATTAACGAAATATGGTATAACCGCAGATAACAAGATATCAATGGACAATGCTGCAAACACTGGTCATTACTCGC
 AGGTAGTTTTGGCAAAGTCAACAGACTTGGATGTGCAGCGGTGTCCTGTCCAGAACAAGGAAAACCTTTGTGA
 GGTTCGGAATATTTACCAGGAGGGAACACACTTACCATCTGATTTACGATATCGGAGAGCCATGCAAACGG
 (SEQ ID NO: 2)

B. Variante B de ASP de doble dominio

DEIRKVFLDKHNEYRSLVAKGQAPNPQFGGSTPKAARMLKAMYDCDVEEDMTKWAQAQCTYAPFKSSKHRYGRN
 TWGMGVPNYNKTAAAESSVYDWFSELRRYGVPQDNVYTRDVEDYSAYQYAQMVMWQDSYKIGCVVAWCPSVTWV
 ACGYSPAGDNIGSLIYELGEPCTKNEDCKCTDCTCSEGEALCIPPGGPKPATTASTTTKTTTTTKPTTTTTKLSTTT
 AKPTTTFDRAAWVESVKRPVARCTLDNGMTDEARQVFLDKHNEYRQLVARGEAKNKTGLAPPAARMLQMRYD
 CDLEAHVMEHVKQCKGGHSSFDVLKGRGQNIWAITVFNLDKADAANRSVHDWYIELTKYGITADNKISMDNAAN
 TGHYSQVWVWQKSNRLGCAAVSCPEQGKLFVGCYLPGGNTLHHLIYDIGEPCKR (SEQ ID NO: 3)

Figura 1 (continúa)

GATGAGATCAGGAAAGTCTTCCTTGACAAGCACAATGAGTATCGGTCACTCGTTGCTAAAGGACAGGCTCCGAAT
 CCACAGTTTGGCGGATCTACTCAAAGGCCGCTAGAATGCTCAAAGCGATGTACGATTGCGATGTTGAAGAAGAC
 ATGACGAAGTGGGCTCAAGCGCAGTGCACGTACGCACCATTCAAAGTAGCAAACATTACGGCCGGAACACATGG
 GGCATGGGTGTCCTAACTACAACAAGACAGCAGCTGCAGAATCGAGTGTTCGACTGGTTCTCCGAACTACGG
 CGCTATGGTGTTCCTCAAGATAACGTGTATAACAAGAGATGTTGACTACAGTGCCTTATCAATACGCTCAGATGGTT
 TGGCAAGACAGTTACAAAATTGGATGTGTCTGGCATGGTGTCCAAGCGTGACCTGGGTAGCGTGCGGATACAGT
 CCAGCAGGAGATAAATATCGGATCCCTAATTTACGAGCTTGGAGAACCGTGTACGAAGAATGAAGACTGTAAATG
 CACCGACTGCACATGTAGTGAAGGAGAAGCTCTTTGTATACCTCCTGGAGGACCAAACCCGCTACCACTGCAAG
 CACCACAACCAAGACAACGACCACTACAAAGCCTACGACGACGACGACGAACTTTTCGACCACTACGGCGAAGCC
 AACGACGACCTTCGATAGAGCTGCGTGGGAGGAGTCCGTCAAGAGGCCAGTAGCGCGTTGCACTCTTGACAACGG
 AATGACAGACGAGGCCAGGCAGGTTTTCCCTTGACAAGCACAACGAGTACCGACAACCTAGTTGCAAGAGGAGAAG
 CTAACAAACAAGACAGGATTGGCTCCGCCGGCAGCTAGAATGCTACAAATGAGGTACGATTGCGACCTTGAGGCAC
 ATGTTATGGAGCACGTTAAACAATGTAAGGGCGACATTCATCATTTGATGTGCTTAAAGGTAGGGGCGAGAAC
 ATATGGGCCATAAATGTCCCTAACTTGACAAGGCTGATGCTGCAAACCGGAGTGTCCATGACTGGTACATCGAA
 TTAACGAAATATGGTATAACTGCAGATAACAAGATATCAATGGACAATGCTGCAAACACTGGTCACTACTCGCA
 GGTAGTTTGGCAAAGTCAACAGACTTGGATGTGCAGCGGTGCTCCTGTCCAGAACAAGGAAAACCTTTTGTAG
 GTTGCGAATATTTACCAGGAGGGAACACACTTCACCATCTGATTTACGATATCGGAGAGCCATGCAAACGG (SEQ
 ID NO: 4)

C. Variante C de ASP de doble dominio

DEIRKVFLDKHNEYRSLVAKGQAPNPQFGGSTPKAARMLKARYDCDVEEDMTKWAQAQCTYAPFKSSKRYGRNT
 WGMGVPNYNKIAAAESSVDDWFFELRRYGVQDNVYTRDVEDYSAYHYAQMVMWQDSYKIGCVVAVWCPSTWVA
 CGYSPAGDNIGSLIYELGPECTKNEDCKCTDCTCSEGEALCIPPGEKPKATTASTTTKTTTTTEPTTTTTTEPSTTTAK
 PTTTTFDRAAWVESVSRPVARCTLDNGMTDEARQVFLDKHNEYRQLVARGEAKNKTGLAPPAARMLQMRDYCD
 LEAHVMEHVKQCKGGHSSFDVLRGRQNIWAITVPNLDKADAANRSVHDWYIELTKYGITADNKISMDNAANTG
 HYSQVVWQKSNRLGCAAVSCEPQKGLFVGCYLPGGNTLHHLIYDIGEPCKR (SEQ ID NO: 5)

GATGAGATCAGAAAAGTCTTCCTTGACAAGCACAATGAGTATCGGTCACTCGTTGCTAAAGGACAGGCTCCGAAT
 CCACAGTTTGGCGGATCTACTCAAAGGCCGCTAGAATGCTCAAAGCGAGGTACGATTGCGATGTTGAAGAAGAC
 ATGACGAAGTGGGCTCAAGCGCAGTGCACGTACGCACCATTCAAAGTAGCAAACGTTACGGCCGGAACACATGG
 GGAATGGGTGTCCTAACTACAACAAGATAGCAGCTGCAGAATCGAGTGTTCGACTGGTTCTTCGAACTACGG
 CGCTATGGTGTTCCTCAAGATAACGTGTATAACAAGAGATGTTGACTACAGTGCCTTATCATTACGCTCAGATGGTT
 TGGCAAGACAGTTACAAAATTGGATGTGTCTGGCATGGTGTCCAAGCATGACCTGGGTAGCGTGCGGATACAGT
 CCAGCAGGAGATAAATATCGGATCCCTAATTTACGAGCTTGGAGAACCGTGTACAAAGAATGAAGACTGTAAATG
 CACCGACTGCACATGTAGTGAAGGAGAAGCTCTTTGTATACCTCCTGGAGAACCGAAACCCGCTACCACTGCAAG
 CACCACGACCAAGACAACGACCACTACAGAGCCTACGACAACGACGACGGAACCGTCGACCACTACGGCGAAGCC
 AACGACGACCTTCGATAGAGCTGCGTGGGAGGAGTCCGTCAAGAGGCCAGTAGCGCGTTGCACTCTTGACAACGG
 AATGACAGACGAGGCCAGGCAGGTTTTCCCTCGACAAGCACAACGAGTACCGGCAACTAGTTGCAAGAGGAGAAGC
 TAAAAACAAGACAGGATTGGCTCCGCCGGCAGCTAGAATGCTACAAATGAGGTACGATTGCGACCTTGAGGCACA
 TGTTATGGAGCACGTTAAACAATGTAAGGGCGGACATTCATCATTTGATGTGCTTAAAGGTAGGGGCGAGAACA
 TATGGGCCATAAATGTCCCTAACTTGACAAGGCTGATGCTGCAAACCGGAGTGTCCATGACTGGTACATCGAAT
 TAACGAAATATGGTATAACTGCAGATAACAAGATATCAATGGACAATGCTGCAAACACTGGTCACTACTCGCAG
 GTAGTTTGGCAAAGTCAACAGACTTGGATGTGCAGCGGTGCTCCTGTCCAGAACAAGGAAAACCTTTTGTAGGT
 TGCGAATATTTACCAGGAGGGAACACACTTCACCATCTGATTTACGATATCGGAGAGCCATGCAAACGG (SEQ ID
 NO: 6)

Figura 1 (continúa)

D. Variantes de ASP de doble dominio incluyendo N- y C-terminales

Variante A

LCSLDNGMTDEIRKVFSLDKHNEYRSLVAKGQALNPQFGGSTPKAARMLKARYDCDVEEDMTKWAQAQCTYAPF
 KSSKRYGRNTWGMGVPNYNKTAEESSVYDWFELRRYGVQDNVYTRDVEDYSAYHYAQMWWQDSYKIGCVVA
 WCPSMTWVACGYSPAGDNIGSLIYELGEPCTKNEDCKCTDCTCSEGEALCIPPGGPKPATTASTTTKTTTTTKPTT
 TTTEPSTTTAKPTTTFDRAAWEESVKRPVARCTLDNGMTDEARQVFLDKHNEYRQLVARGEAKNKTGLAPPAA
 RMLQMRYDCLEAHVMEHVQCKGGHSSFDVLKGRGQNIWAITVPNLDKADAANRSVHDWYIELTKYGITADN
 KISMDNAANTGHYSQVWVQKSNRLGCAAVSCPEQGKLFVGCYLPGGNTLHHLIYDIGEPCR
 DEDCKSSRCSTQLSMCINPN (SEQ ID NO: 16)

CTTTGCTCGCTTGATAATGGAATGACAGATGAGATCAGAAAAGTCTTCTTGACAAGCACAAATGAGTACCGGTCA
 CTCGTTGCTAAAGGACAGGCTCTGAATCCACAGTTTGGCGGGTCTACTCAAAGGCCGCTAGAATGCTCAAAGCG
 AGGTACGATTGCGATGTTGAAGAAGACATGACGAAGTGGGCTCAAGCGCAGTGCACGTACGCACCATTCAAAAG
 TAGCAAACGTTACGGCCGGAACACATGGGGCATGGGTGTCCCTAACTACAACAAGACAGCAGCTGCAGAATCGAG
 TGTTTACGACTGGTTCTTGAAGTACGGCGCTATGGTGTTCCTCAAGATAACGTGTATACAAGAGATGTTGACTA
 CAGTGCTTATCATTACGCTCAGATGGTTTGGCAAGATAGTTACAAAATTGGATGTGTCTGTCGTCGGCATGGTGTCCAAG
 CATGACCTGGGTAGCATGCGGATACAGTCCAGCAGGAGATAATATCGGATCCCTAATTTACGAGCTTGGAGAACC
 GTGTACAAAGAATGAAGACTGTAAATGCACCGACTGCACATGTAGTGAAGGAGAAGCTCTTTGTATACCTCTG
 GAGGACCGAAACCGCTACCACTGCAAGCACCACGACCAAGACAACGACCACTACAAGCCTACGACGACGACGA
 CGGAACCTTCGACCACTACGGCGAAGCCAACGACGACCTTCGATAGAGCTGCGTGGGAGGAGTCGGTCAAGAGGC
 CAGTAGCGGTTGCACTCTTGACAACGGAATGACAGACGAGGCCAGGCAGGTTTTCTTGACAAGCACAAACGAGT
 ACCGGCAACTAGTTGCAAGAGGAGAAGCTAAAACAAGACAGGATTGGCTCCGCGGCAGCTAGAATGCTACAA
 ATGAGGTACGATTGCGACCTTGAGGCACATGTTATGGAGCAGCTTAAACAGTGTAAGGCGGACATTCATCATTT
 GATGTGCTTAAAGGTAGGGGGCAGAACATATGGGCCATAACTGTCCCTAACTTGACAAGGCTGATGCTGCAAAAC
 CGGAGTGTCCATGACTGGTACATCGAATTAACGAAATATGGTATAACCGCAGATAACAAGATATCAATGGACAA
 TGCTGCAAAACTGGTCATTAAGTTCGAGGTAGTTTGGCAAAGTTCGAACAGACTTGATGTGCAGCGGTGTCCTG
 TCCAGAACAAGGAAAACCTTTGTAGGTTGCGAATATTTACCAGGAGGGAACACACTTCACCATCTGATTTACGA
 TATCGGAGAGCCATGCAACCGGGATGAAGATTGTAAGTGCAGCTCTGCAGATGCAGCACACAATTATCCATGTG
 TATCAACCCTAAC (SEQ ID NO: 19)

Variante B

LCSLDNGMTDEIRKVFSLDKHNEYRSLVAKGQAPNPQFGGSTPKAARMLKAMYDCDVEEDMTKWAQAQCTYAPF
 KSSKHYGRNTWGMGVPNYNKTAEESSVYDWFSELRRYGVQDNVYTRDVEDYSAYQYAQMWWQDSYKIGCVVA
 WCPSVTWVACGYSPAGDNIGSLIYELGEPCTKNEDCKCTDCTCSEGEALCIPPGGPKPATTASTTTKTTTTTKPTT
 TTTKLSTTTAKPTTTFDRAAWEESVKRPVARCTLDNGMTDEARQVFLDKHNEYRQLVARGEAKNKTGLAPPAA
 RMLQMRYDCLEAHVMEHVQCKGGHSSFDVLKGRGQNIWAITVPNLDKADAANRSVHDWYIELTKYGITADN
 KISMDNAANTGHYSQVWVQKSNRLGCAAVSCPEQGKLFVGCYLPGGNTLHHLIYDIGEPCR
 DEDCKSSRCSTQLSMCINPN (SEQ ID NO: 17)

Figura 1 (continúa)

CTTTGCTCGCTGGATAATGGAATGACAGATGAGATCAGGAAAGTCTTCCTTGACAAGCACAAATGAGTATCGGTCA
 CTCGTTGCTAAAGGACAGGCTCCGAATCCACAGTTTGGCGGATCTACTCCAAAGGCCGCTAGAATGCTCAAAGCG
 ATGTACGATTGCGATGTTGAAGAAGACATGACGAAGTGGGCTCAAGCGCAGTGCACGTACGCACCATTCAAAAG
 TAGCAAACATTACGGCCGGAACACATGGGGCATGGGTGTCCCTAACTACAACAAGACAGCAGCTGCAGAATCGAG
 TGTTTACGACTGGTTCTCCGAACACTACGGCGCTATGGTGTTCCTCAAGATAACGTGTATAACAAGAGATGTTGACTA
 CAGTGCTTATCAATACGCTCAGATGGTTTGGCAAGACAGTTACAAAATTGGATGTGTCTGGCATGGTGTCCAAG
 CGTGACCTGGGTAGCGTGCGGATACAGTCCAGCAGGAGATAATATCGGATCCCTAATTTACGAGCTTGGAGAACC
 GTGTACGAAGAATGAAGACTGTAAATGCACCGACTGCACATGTAGTGAAGGAGAAGCTCTTTGTATACCTCCTGG
 AGGACAAAACCCGCTACCACTGCAAGCACCACAACCAAGACAACGACCACTACAAAGCCTACGACGACGACGAC
 GAACTTTTCGACCACTACGGCGAAGCCAACGACGACCTTCGATAGAGCTGCGTGGGAGGAGTCGGTCAAGAGGCC
 AGTAGCGCGTTGCACTCTTGACAACGGAATGACAGACGAGGCCAGGCAGGTTTTCTTGACAAGCACAAACGAGTA
 CCGACAACAGTTGCAAGAGGAGAAGCTAAAAACAAGACAGGATTGGCTCCGCCGCGCAGTAGAATGCTACAAA
 TGAGGTACGATTGCGACCTTGAGGCACATGTTATGGAGCACGTTAAACAATGTAAAGGCGGACATTATCATTTG
 ATGTGCTTAAAGGTAGGGGGCAGAACATATGGGCCATAACTGTCCCTAACTTGGACAAGGCTGATGCTGCAAACC
 GGAGTGTCCATGACTGGTACATCGAATTAACGAAATATGGTATAACTGCAGATAACAAGATATCAATGGACAAT
 GCTGCAAACACTGGTCATTACTCGCAGGTAGTTTGGCAAAAGTCGAACAGACTTGGATGTGCAGCGGTGTCCTGT
 CCAGAACAAGGAAAACCTTTGTAGGTTGCGAATATTTACCAGGAGGGAACACACTTCACCATCTGATTTACGAT
 ATCGGAGAGCCATGCAAACGGGATGAAGATTGTAAGTGCAGCTCCTGCAGATGCAGCACACAATTATCCATGTGT
 ATCAACCCTAAC (SEQ ID NO: 20)

Variante C

LCSLDNGMTDEIRKVFLLDKHNEYRSLVAKGQAPNPQFGGSTPKAARMLKARYDCDVEEDMTKWAQAQCTYAPF
KSSKRYGRNTWGMGVPNYNKIAAAESSVDDWFFELRRYGVPQDNVYTRDVDYSAYHYAQMVMWQDSYKIGCVVA
WCPSMTWVACGYSPAGDNIGSLIYELGEPCTKNEDCKCTDCTCSEGEALCIPPGEKPKATTASTTTKTTTTTEPTT
TTTEPSTTTAKPTTTFDRAAWEESVKRPVARCTLDNGMTDEARQVFLDKHNEYRQLVARGEAKNKTGLAPPAA
RMLQMRYDCDLEAHVMEHVKQCKGGHSSFDVLKGRGQNIWAITVPNLKADAANRSVHDWYIELTKYGITADN
KISMDNAANTGHYSQVWVQKSNRLGCAAVSCPEQKLFVVGCEYLPGGNTLHHLIYDIGEPCKR
DEDCKSSRCRSTQLSMCINPN (SEQ ID NO: 18)

CTTTGCTCGCTGGATAATGGAATGACAGATGAGATCAGAAAAGTCTTCCTTGACAAGCACAAATGAGTATCGGTCA
CTCGTTGCTAAAGGACAGGCTCCGAATCCACAGTTTGGCGGTCTACTCCAAAGGCCGCTAGAATGCTCAAAGCG
AGGTACGATTGCGATGTTGAAGAAGACATGACGAAGTGGGCTCAAGCGCAGTGACGTACGCACCATTCAAAG
TAGCAAACGTTACGGCCGGAACACATGGGGAATGGGTGTCCCTAACTACAACAAGATAGCAGCTGCAGAATCGAG
TGTTGACGACTGGTTCTTGAACACTACGGCGCTATGGTGTCTCAAGATAACGTGTATACAAGAGATGTTGACTA
CAGTGTATTATCATTACGCTCAGATGGTTTGGCAAGACAGTTACAAAATTGGATGTGTCTGGCATGGTGTCCAAG
CATGACCTGGGTAGCGTGGGATACAGTCCAGCAGGAGATAATATCGGATCCCTAATTTACGAGCTTGGAGAACC
GTGTACAAAGAATGAAGACTGTAAATGCACCGACTGCACATGTAGTGAAGGAGAAGCTCTTTGTATACCTCCTG
GAGAACCAGAAACCCGCTACCACTGCAAGCACCACGACCAAGACAACGACCACTACAGAGCCTACGACAACGACGA
CGGAACCGTGCACCACTACGGCGAAGCCAACGACGACCTTCGATAGAGCTGCGTGGGAGGAGTCCGGTCAAGAGGC
CAGTAGCGCGTTGCACTCTTGACAACGGAATGACAGACGAGGCCAGGCAGGTTTCCCTCGACAAGCACAACGAGT
ACCGGCAACTAGTTGCAAGAGGAGAAGCTAAAAACAAGACAGGATTGGCTCGGCCGCGCAGCTAGAATGCTACAA
ATGAGGTACGATTGCGACCTTGAGGCACATGTTATGGAGCACGTTAAACAATGTAAAGGCGGACATTCATCATT
TGATGTGCTTAAAGGTAGGGGGCAGAACATATGGGCCATAACTGTCCCTAACTTGGACAAGGCTGATGCTGCAAA
CCGGAGTGTCCATGACTGGTACATCGAATTAACGAAATATGGTATAACTGCAGATAACAAGATATCAATGGACA
ATGCTGCAAACTGGTCATTACTCGCAGGTAGTTTGGCAAAAGTCGAACAGACTTGGATGTGCAGCGGTGTCTCT
GTCCAGAACAAAGGAAAACCTTTTGTAGGTTGCGAATATTTACCAGGAGGGAACACACTTCACCATCTGATTTACG
ATATCGGAGAGCCATGCAAAACGGGATGAAGATTGTAAGTGCAGCTCCTGCAGATGCAGCACACAATTGTCCATGT
GTATCAACCCTAAC (SEQ ID NO: 21)

Figura 2

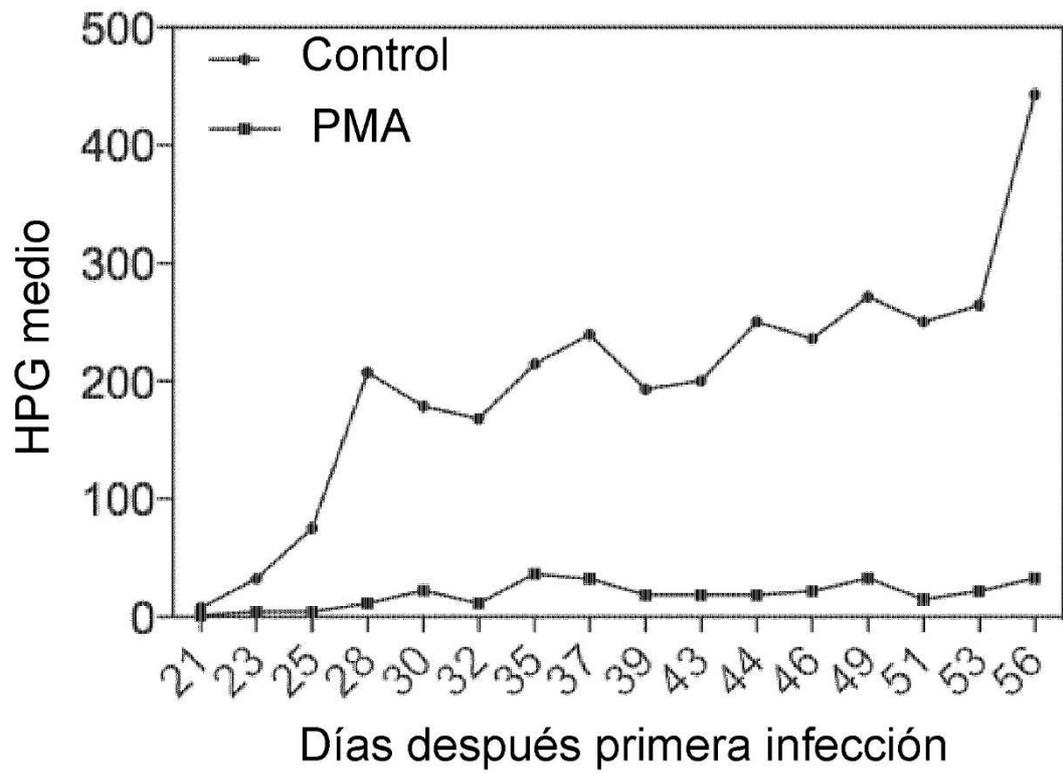


Figura 3

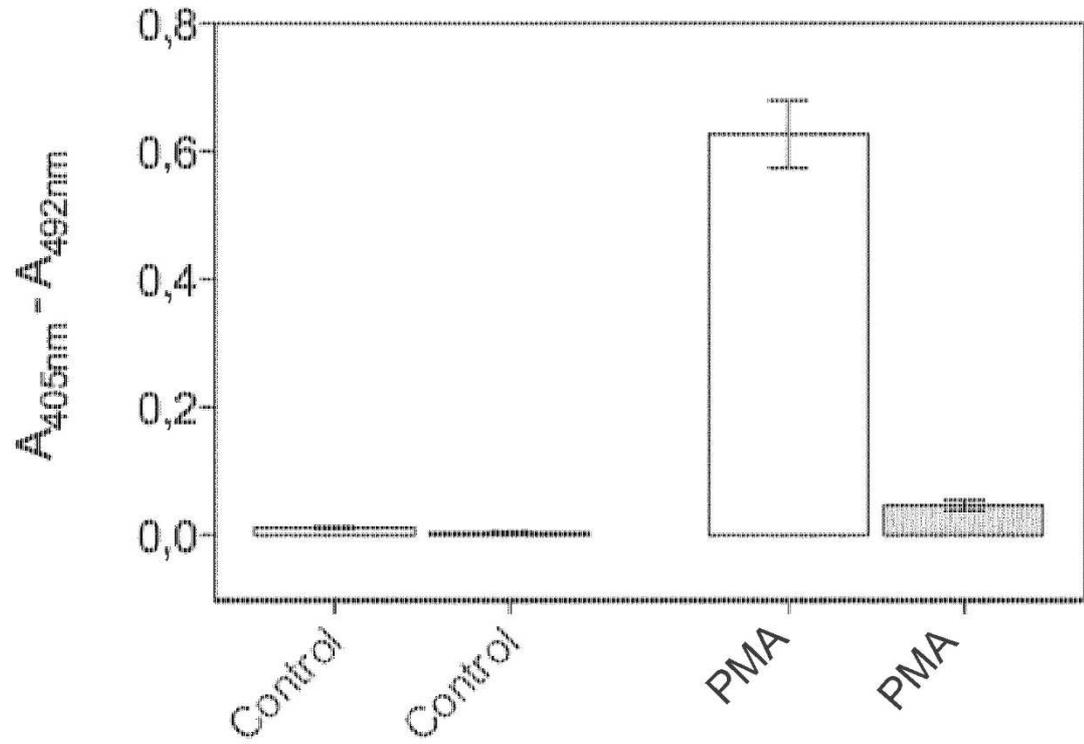


Figura 4

Producción de huevos acumulativa por parcela

