

Clarke, Mod

COLOMBIA



No. 12-000715- -00011-0000

Fecha: 2015-10-08 13:54:55 Dep: 2020 DIR NUEVASCR  
Tra: 11 PATENTEIYII Lve: 378 FASLNACIONALI  
Act: 412 RLPOSPRLSRLECU Folios: 18

P-3197

J.V

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO  
SUPERINTENDENTE DE INDUSTRIA Y COMERCIO

E. S. D.

Re: Expediente No. 12-000.715

Solicitud de patente a nombre de LABORATORIOS LETI, S.L.

Yo, CAROLINA DAZA MONTALVO identificada como aparece al pie de mi firma, domiciliada en la Carrera 11 No. 86-53, piso 6, obrando como apoderada de la sociedad **LABORATORIOS LETI, S.L.**, domiciliada en Madrid, España, solicitante de la patente de la referencia, interpongo recurso de reposición contra la resolución No. 52594 del día 26 de agosto de 2015, expedida por el Superintendente de Industria y Comercio, por medio de la cual se niega el privilegio de patente para la solicitud contenida en el expediente de la referencia

## 1. FUNDAMENTOS DEL RECURSO

## 1.1 Actos administrativos previos

En primer lugar, mi mandante se permite manifestar a ese despacho que se reafirma en todos y cada uno de los argumentos que hacen parte integrante de la respuesta al oficio de fondo No. 2040 notificado por fijación en lista el 3 de marzo de 2015, presentada ante ese despacho el 27 de mayo de 2015.

1.2 La invención carece de claridad y concesión

Su Despacho ha informado que las reivindicaciones 1 a 7 no son claras de acuerdo con lo estipulado en el artículo 30 de la Decisión 486, por el hecho de que al referirse al ensayo ELISA, no define las etapas que lo constituyen y por lo contrario reporta las etapas de purificación previas a dicho ensayo. Adicionalmente, no se define estructuralmente a la proteína ribosomal, ni el tipo de protozario. La reivindicación 2 en específico, no es clara por definir a la proteína en términos de un fragmento que comprende un número de aminoácidos. La reivindicación 4, no es clara porque intenta definir al extracto de proteína ribosomal, por su origen, al igual que lo hacen las reivindicaciones 5 a 7.

P-3197

11/18

1.2.1 La presente invención si es clara y concisa

El artículo 30 de la Dec. 486 de la Comunidad Andina establece:

*Artículo 30.- Las reivindicaciones definirán la materia que se desea proteger mediante la patente. Deben ser claras y concisas y estar enteramente sustentadas por la descripción.*

En este respecto, primero que todo se informa que de acuerdo con el fundamento que le confiere el artículo 34 de la Decisión 486 al solicitante para modificar la solicitud de patente en cualquier momento del trámite, se presenta junto con este recurso de reposición, un nuevo pliego reivindicatorio que comprende un total de 4 reivindicaciones, en donde se realizaron las siguientes modificaciones:

- Se eliminaron las reivindicaciones 3, 5 y 6.
- La nueva reivindicación 1, reporta las etapas que comprende el ensayo ELISA. Adicionalmente se especificó que el extracto de proteína ribosomal RPE, es inmovilizado en un soporte sólido; se indicó que la célula parasitaria protozoaria, corresponde a una célula de Leishmania y en consecuencia, la enfermedad parasitaria, se ha restringido a Leishmaniasis. Todo lo anterior, se encuentra debidamente soportado en el capítulo descriptivo de la presente solicitud;
- En la reivindicación 2, se restringió la longitud de los fragmentos de proteína; y
- En la reivindicación 4, ahora la reivindicación 3, se reemplazó "enfermedad parasitaria" por "*Leishmaniasis*".

Como se puede apreciar, la anterior modificación realizada al pliego reivindicatorio, no amplía la materia inicialmente presentada, por tanto, se le informa amablemente a este Despacho, que este nuevo pliego reivindicatorio, reemplaza pro completo al anteriormente presentado, para cual se adjunta el recibo de pago por concepto de modificación voluntaria.

Ahora bien y entrando a discutir las objeciones hechas por el señor Examinador en esta oportunidad, primero que todo se desea dejar claro que el objeto inventivo de la presente solicitud, se dirige a un ensayo ELISA que emplea un extracto de proteína ribosomal (RPE) y por tanto, el método o ensayo reclamado, NO tiene como fin reproducir dicho RPE. Sin embargo, se aclara que en esta solicitud se reporta el proceso de obtención de dicho extracto, para que así cualquier persona del estado previo de la técnica, esté en la capacidad de reproducir la presente invención, siendo ésta, el ensayo ELISA.

De este modo, mi mandante se encuentra en completo desacuerdo con el cambio de título de la presente solicitud, dado que dicho nuevo título, no corresponde a la materia que realmente se desea proteger. Es así, como se le solicita amablemente a este Despacho, mantener el título de la presente solicitud de la siguiente manera:

“DIAGNOSTICO DE UNA PARASITOSIS TAL COMO LA LEISHMANIASIS  
USANDO UN EXTRACTO DE PROTEINAS RIBOSOMICAS (RPE)”

En lo que respecta con la falta de claridad de la reivindicación 1, por el hecho de no reportar las etapas que conforman al ensayo ELISA, mi mandante aclara respetuosamente, que este ensayo es ampliamente conocido por cualquier persona del oficio versada en la materia, quien solo con saber que se trata del ensayo ELISA, sabría con claridad como ejecutarlo. Pese a ello, adicionalmente se le informa al señor Examinador, que en el capítulo descriptivo de esta solicitud, existe una sección que se denomina “El Ensayo”, en donde se describe cada una de las etapas que lo conforman, las especies que interactúan y las condiciones de operación bajo las cuales deben ser ejecutadas dichas etapas. Por tanto y con el único fin de acelerar el trámite, se ha introducido esta información en la nueva reivindicación 1.

Con respecto a la afectación hecha a esta misma reivindicación, porque el protozoario no ha sido definido, se le informa al señor Examinador, que al haber especificado que éste corresponde a una célula de Leishmania, que produce Leishmaniasis, como la enfermedad parasitaria, esta objeción se debe ver superada.

Por último y en referencia a que la reivindicación 1, no define la estructura de la proteína ribosomal, mi mandante nuevamente se encuentra en completo desacuerdo, dado que aquí no se reporta una proteína sino un extracto de proteínas, lo que indica que dicho extracto contiene una multiplicidad de proteínas ribosomales, tal y como se puede apreciar en la figura 1b del capítulo descriptivo de la presente solicitud. En este sentido, mi mandante desea resaltar, que en este campo existen al menos 70 especies diferentes de proteínas ribosomales, razón por la cual el extracto de proteína ribosomal que se reporta en esta solicitud, no puede ser definido estructuralmente, ya sea por moléculas individuales o secuencias de aminoácidos determinadas.

Lo anterior, es la razón por la cual se provee en la reivindicación 1, los pasos necesarios para obtener el RPE empleado. En nuestra respuesta anterior, presentada el pasado 27 de mayo de 2015, se adjuntó un ensayo experimental, en el que se demostraba la obtención de este producto, en donde algunos de sus constituyentes, fueron caracterizados, como por ejemplo lo fueron las proteínas ribosomales P0, L3, L5, S4 y S6 y adicionalmente se informó, que dicho extracto no contenía proteínas nucleares como H2 o proteínas citosolicas, como la beta-tubulina. Pasa su conveniencia, este ensayo se adjunta nuevamente a este recurso de reposición.

## Clarke, Modet & C<sup>o</sup>

COLOMBIA

De esta manera, se espera que al señor Examinador le quede claro, el por qué no se reportan el ID de las secuencias de aminoácidos que contienen las múltiples proteínas ribosómicas que comprende el extracto mencionado.

En lo que respecta con la objeción hecha a las reivindicaciones 4 a 7, mi mandante manifiesta nuevamente su completo desacuerdo, dado que en la medida en la que esta invención se dirige a un ensayo ELISA que emplea un RPE bien definido, para detectar una respuesta inmune, se tiene que **es importante tener presente, que el RPE es derivado de un organismo, por tanto y por el hecho de que cada organismo es diferente, se hace necesario mencionar la procedencia del RPE.** Siendo así las cosas, se tiene que un ensayo ELISA que emplea un RPE que proviene de una *Leishmania major*, presentará características técnicas diferentes, que si empleara un RPE que proviene de una *Leishmania chagasi*. En consecuencia, se considera que reportar la procedencia del RPE, como característica técnica esencial de la invención, es necesario para determinar su alcance.

De esta manera, se espera se haya aclarado el concepto del objeto inventivo de la presente solicitud y con ello se entienda ahora con plenitud, cada una de las características técnicas esenciales que se plasman en las nuevas reivindicaciones 1 a 4.

Es así como se considera que se ha dado respuesta a cada una de las objeciones hechas por falta de claridad y concisión, por tanto, el nuevo pliego reivindicatorio que se presenta en esta oportunidad, cumple a cabalidad con los lineamientos establecidos en el artículo arriba citado.

### 1.3 La invención no posee nivel inventivo

El examinador establece en su concepto técnico la falta de nivel inventivo de las antiguas reivindicaciones 1 a 7 a la luz de la combinación de las enseñanzas descritas en los documentos WO9633414 (D1) y US6613337 (D2)

A este respecto, me permito indicar que el artículo 18 de la Decisión 486 establece que *“Se considerará que una invención tiene nivel inventivo, si para una persona del oficio normalmente versada en la materia técnica correspondiente, esa invención no hubiese resultado obvia ni se hubiese derivado de manera evidente del estado de la técnica”.*

Lo anterior significa que el análisis de nivel inventivo **NO** es una comparación de los objetos de las anterioridades y la solicitud en estudio. El análisis de nivel inventivo **debe demostrar** la obviedad de la invención y establecer cómo ésta no contiene un salto cualitativo, que demuestre su altura inventiva, teniendo en cuenta que se hace **necesario demostrar** que la invención analizada carece de nivel inventivo y hubiese

sido obvia para una persona versada en la materia.

Considerando las anteriores definiciones, es deseo del solicitante que se tengan en cuentas los siguientes argumentos que demuestran la patentabilidad de la presente invención.

### 1.3.1 Nivel inventivo a la luz de los documentos D1 y D2

En este respecto y revisando el análisis hecho por el señor Examinador en este sentido, es evidente que este es una réplica del análisis hecho previamente en la acción oficial 2040, por ende se concluye, que el señor Examinador aún no comprende la esencia de la invención.

De este modo, mi mandante desea resaltar la importancia de utilizar un extracto de proteínas ribosomales en el ensayo ELISA en vez de una única proteína, dado que en un método de diagnóstico, el RPE resulta más atractivo por el hecho de comprender una multiplicidad de antígenos diferentes, los cuales pueden diagnosticar potencialmente, la presencia de una respuesta inmune en un sujeto, con mayor facilidad y eficiencia, que lo que lo podría hacer una sola proteína. Lo anterior sucede porque un sujeto puede responder a un antígeno A y no a un antígeno B, por tanto, un extracto de proteínas como el que se emplea en la presente solicitud, aplica para una amplia muestra de sujetos, por el hecho de comprender una multiplicidad diferente de antígenos.

La figura 2 de la presente solicitud, pone en evidencia esta situación ventajosa, al demostrar como el RPE puede incluso detectar respuestas inmunes en muestras provenientes de sujetos oligosintomáticos o asintomáticos. En este sentido mi mandante desea citar un párrafo de la introducción del capítulo descriptivo de la presente solicitud:

*“un ensayo ELISA basado en un antígeno Leishmania soluble (SLA) por sus siglas en inglés, ha sido desarrollado (27, 31). Sin embargo, este ensayo basado en SLA, no es lo suficientemente específico para diagnosticar Leishmaniasis asintomática. En adición, el suero de los sujetos que padecen enfermedades parasitarias diferentes de la leishmaniasis, presentarán una reacción positiva engañosa, en dicho ensayo basado en SLA. Es así como lo anterior es evidencia, de que aun existe la necesidad de proveer un método de diagnóstico mejorado, que detecte enfermedades parasitarias como la leishmaniasis, el cual supere todos los inconvenientes que ya presentan los métodos hasta ahora existentes”*

Con base en lo anterior, se podría afirmar que el verdadero problema técnico objetivo que pretende resolver la presente solicitud, consiste en: “como proporcionar un ensayo

más robusto y específico que esté en la capacidad de determinar una respuesta inmune contra la parasitosis, así sea en sujetos asintomáticos?”. Dicha problemática es evidentemente resuelta, mediante el uso de un extracto de proteínas ribosomales en un ensayo ELISA.

De esta manera se tiene que ni las enseñanzas de D1 o D2, mencionan o sugieren esta solución, en vista de que D1 hace referencia a compuestos y métodos para diagnosticar infección por *Leishmania*, divulga un polipéptido antigénico homogenizado que comprende un epítipo de un homólogo de *Leishmania chagasi* de la familia P-proteína ribosomal ácida eucariota (LcPO). Sin embargo sólo una única proteína ribosómica (LcPO). Pese a ello, D1 no menciona ni sugiere el extracto de proteína ribosomal (RPE) tal y como se define en la reivindicación 1 de la solicitud, tal y como se muestra en la Figura 1b, ni mucho menos su aplicación en el ensayo ELISA. D2 por su parte, divulga métodos y composiciones para el tratamiento, prevención y detección de Leishmaniasis y para la estimulación de respuestas inmunes en pacientes, utilizando polipéptidos homogenizados e individuales que contienen porción(es) inmunogénica(s) de antígenos de *Leishmania*. Sin embargo, esta anterioridad no menciona ni sugiere el RPE reclamado en esta solicitud, tal y como se muestra en la Figura 1b e igualmente, su aplicación en el ensayo ELISA.

De este modo se tiene que ni la combinación de las enseñanzas de D1 y D2, no deducen ni sugieren la presencia de un extracto de proteínas ribosomales a ser empleado en un ensayo ELISA, lo cual corresponde a la característica técnica esencial inventiva que define a la presente invención, por tanto es de concluir, que dicha hipotética combinación de enseñanzas, jamás llegaría a dar solución al problema técnico objetivo que abordaron los inventores de esta solicitud y por tanto, jamás se llegaría a un ensayo tan robusto y específico, en la determinación de enfermedades parasitarias como la Leishmaniasis, has en un sujeto asintomático.

Siendo así las cosas, se le solicita amablemente a este Despacho, tener en consideración estos argumentos en conjunto con el nuevo capítulo reivindicatorio que se presenta en esta oportunidad, para así confirmar por sí mismo, la presencia de nivel inventivo y el cumplimiento del requisito de claridad, para así proceder con la revocatoria de la presente decisión de negación y en consecuencia, proceder con la concesión de patente de esta solicitud.

## Clarke, Modet & Cº

COLOMBIA

7

### 2. PETICION

Teniendo en cuenta lo dicho anteriormente, solicito a usted lo siguiente:

- a) Que de conformidad con lo previsto por los artículos 3, 42 y 80 del Código de Procedimiento Administrativo y de lo Contencioso Administrativo se consideren y se resuelvan TODOS los argumentos y TODAS las cuestiones planteadas así como las que aparezcan con motivo de este recurso.
- b) Que se revoque la resolución No. 52594 emitida el 26 de agosto de 2015 por el Superintendente de Industria y Comercio, y se proceda a conceder el privilegio de patente de invención a la solicitud de mi mandante.

Señor Superintendente,



CAROLINA DAZA MONTALVO  
C.C. 66.783.790 de Palmira Valle  
TP-141563 CSJ  
[notificaciones@clarkemodet.com.co](mailto:notificaciones@clarkemodet.com.co)

7

# Clarke, Modet & C<sup>o</sup>

---

COLOMBIA

8

## ANEXOS

- Nuevo capítulo reivindicatorio que comprende 4 reivindicaciones
- Copia del recibo de pago por concepto de modificación voluntaria, por un valor de \$ 132.000
- Ensayo Experimental

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES  
MODIFICACIONES Y/O CORRECCIONES

1. Identificación del Trámite

☐ Error material

☒ Modificación a una Solicitud en trámite

☒ Patente de Invención

☐ Patente de Modelo de Utilidad

☐ Registro de Diseño Industrial

☐ Esquema de Trazado de Circuitos Integrados

2. Datos del solicitante

Persona Natural ☐

Persona Jurídica ☒

**LABORATORIOS LETI, S.L.**

Nombre o denominación / Nombre o razón social completa

Nombre representante legal

Tipo de empresa

Micro ☐

Pequeña ☐

Mediana ☐

Otra ☐

Documento de identificación:

☐ C.C.

☐ C.E.

☐ NIT

☐ Otro

Número

|                                                                             |                                                                                               |                                              |
|-----------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------|
| Nacionalidad/País de constitución<br><b>ESPAÑA</b><br>Dirección electrónica | Dirección y domicilio del titular<br><b>Calle del Sol, 5 E-28760, Tres Cantos,</b><br>No. Fax | Ciudad<br><b>Madrid</b><br>Número telefónico |
|-----------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------|

☐ Autorizo expresamente a la Superintendencia de Industria y Comercio para que todas las comunicaciones sean enviadas a través de la dirección de correo electrónico

3. Datos del apoderado:

**CAROLINA DAZA MONTALVO**

**C.C. 66.783.790**

**141563 CSJ**

Apellidos y Nombre

Documento de identificación

Tarjeta profesional

|                                                     |             |                   |
|-----------------------------------------------------|-------------|-------------------|
| Dirección y domicilio                               | Ciudad      |                   |
| Carrera 11 No. 86-53, Piso 6, Bogotá D.C., Colombia | Bogotá D.C. |                   |
| Dirección electrónica                               | No. Fax     | Número telefónico |
| <u>notificaciones@clarkemodet.com.co</u>            | 6350824     | 6181088           |

En caso de haber presentado poder general para asuntos que se adelanten ante la Delegatura de Propiedad Industrial, sírvase indicar el número de su radicación o protocolo de poder general

4. Datos del trámite

Corrección:

Expediente No. 12-000.715

Aparece \_\_\_\_\_

Debe ser \_\_\_\_\_

Modificación:

Presentación Solicitud Divisional.

Modificación al capítulo descriptivo.

☐ \_\_\_\_\_

☒ Modificación al capítulo Reivindicatorio: Presento junto con este recurso nuevo pliego reivindicatorio, que comprende un total de 4 reivindicaciones.

Modificación al resumen.

☐ \_\_\_\_\_

Modificación a los dibujos.

☐ \_\_\_\_\_

Modificación al solicitante.

5. Anexos

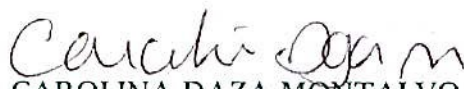
☒ Comprobante de pago de la tasa para la presentación de la corrección y/o modificación

☐ Poder, si fuere el caso.

☒ Documento que contiene las modificaciones o correcciones.

☐ Copia de la solicitud y sus anexos en formato magnético.

6. Firma

  
CAROLINA DAZA MONTALVO  
C.C. 66.783.790 de Palmira Valle  
TP-141563 CSJ  
[notificaciones@clarkemodet.com.co](mailto:notificaciones@clarkemodet.com.co)

## SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

- / -



## RECIBO DE CAJA

No. 15 - 0096713

Bogotá D.C., Septiembre 02 de 2015 - 16:53:17

RECIBIDO DE : CLARKE MODET

NI 830.008.643

## \*\*\* Soporte del Pago \*\*\*

| TIPO PAGO    | BANCO           | CUENTA    | No. PAGO  | FECHA PAGO | VR. PAGO     |
|--------------|-----------------|-----------|-----------|------------|--------------|
| CONSIGNACION | BANCO DE BOGOTA | 062754387 | 708114901 | 02/09/2015 | 9.721.000.00 |

## \*\*\* Conceptos Pagados \*\*\*

| CANT. RENTISTICO                                                                                            | CONCEPTO | Vr.UNDITARIO | Vr.CONCEPTO  |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------|--------------|--------------|
| 1 50005-01-03 CAMBIO DE MODALIDAD Y MODIFICACIONES EN CREACION CORRECCION A SOLICITUD EN TRAMITE / MODIFICA |          | 132.000.00   | 132.000.00   |
|                                                                                                             |          |              | \$132.000.00 |

SON: \*\*CIENTO TREINTA Y DOS MIL PESOS MONEDA CORRIENTE\*\*

Responsable: \_\_\_\_\_

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. \_\_\_\_\_

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 12-000715- -00011-0000

Fecha: 2015-10-08 13:54:55 Dep: 2020 DIR NUEVASCR  
Folios: 11 PATENTELIYI Lve: 378 FASLNACIONAL  
Act: 412 REPOSRESRLCU Folios: 18

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C. - Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Septiembre 2 de 2015 - 16:53:25

P-3197

## REIVINDICACIONES

1. Un ensayo ELISA que comprende un extracto de proteína ribosomal (RPE), que ha sido inmovilizado en un soporte sólido, en donde dicho ensayo ELISA comprende las siguientes etapas:

- 10 (i). Contactar dicho extracto de proteína ribosomal (RPE) inmovilizado, con una muestra derivada de un sujeto, de tal modo que anticuerpos específicos para el RPE que se encuentran dentro de dicha muestra, están permitidos para enlazarse a dicho RPE inmovilizado;
- (ii). Remover la muestra que no fue enlazada de dicho RPE inmovilizado  
15 para obtener un complejo RPE-anticuerpo inmovilizado;
- (iii). Adicionar un reactivo de detección capaz de enlazarse al completo RPE-anticuerpo inmovilizado que se obtuvo en la etapa (ii);
- (iv). Remover el reactivo de detección no enlazado;
- (v). Detectar anticuerpos inmovilizados que hacen parte de dicho complejo  
20 RPE-anticuerpo inmovilizado que se obtuvo en la etapa (iv),

En donde dicho ensayo comprende determinar si una respuesta inmune está presente en dicha muestra derivada de un sujeto, y en donde dicho RPE comprende al menos dos proteínas ribosomales y/o al menos dos antígenos de una proteína ribosomal y/o al menos dos fragmentos de proteína de una proteína  
25 ribosomal, y en donde el extracto de proteína ribosomal se obtiene al realizar los siguientes pasos, utilizando una célula *Leishmania* que causa *Leishmaniasis* en sujeto:

- (a). mezclar la célula de *Leishmania* una solución amortiguadora lisis;
- (b). centrifugar la mezcla obtenida para obtener un extracto citosólico;
- 30 (c). centrifugar el extracto citosólico para producir gránulos ribosomales;
- (d). resuspender los gránulos ribosomales; y

(e). centrifugar los gránulos ribosomales a través de un gradiente de sucrosa discontinuo.

2. Un ensayo de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el fragmento de  
5 proteína es un fragmento que comprende al menos 5, 7, 10, 15, 20, 25, 30 o más aminoácidos contiguos de una proteína ribosomal correspondiente.

3. Un ensayo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en  
donde el extracto de proteína ribosomal se obtiene de especies de Leishmania,  
10 preferiblemente Leishmania mayor.

4. Un ensayo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en  
donde la Leishmaniasis es causada por una especie diferente que la especie de  
que el extracto de proteína ribosomal se deriva.

P-3197

Ensayo Experimental

08/10/2015

## PREPARACIÓN DE EXTRACTOS DE PROTEÍNA RIBOSOMAL *LEISHMANIA*

Autores: Manuel Soto, Marta Román y Jerónimo Carnés

Barcelona Laboratorios Leti SL

(01.12.2011)

### Objetivo

El objetivo de este documento es desarrollar un protocolo detallado de la preparación de extractos de proteína ribosomal, en orden de entender la composición del extracto.

### Protocolo

Extractos de proteína ribosomal (RPE) fueron preparados a partir de cepas de *Leishmania mayor* (WHO/IR/-/173) o de un clon VI (MHOM/IL/80(Friedlin)) o de la cepa *Leishmania infantum* MCAN/ES/1996/BCN/150/MON-1).

Para la preparación de RPE de *L. mayor* o *L. infantum*, se recolectaron  $10^9$  promastigotes por centrifugación, se lavaron dos veces en PBS enfriados y resuspendidos en 1 ml de una solución amortiguadora lisis NP40 (10 mM Tris-HCl, pH 8, 150 mM NaCl, 1.5 mM  $MgCl_2$  y 0.5% Nonidet P 40 (NP40 – Roche Diagnostics, GmbH, Mannheim, Alemania)), suplementada con inhibidores de proteasa (1 mM de fenilmetilsulfonilfluoruro (PMSF), leupeptina 8  $\mu g/ml$ , aprotinina 4  $\mu g/ml$  y pepstatina 8  $\mu g/ml$ ) y pipetiado 10 veces hacia arriba y hacia abajo, con el fin de romper las membranas plasmáticas. Después de la lisis, las muestras son microfugadas a 3,000 veces por gramo, por 2 minutos a 4 °C, en orden de granular el núcleo. Una muestra del núcleo fue preparado por un análisis del tipo SDS PAGE (ver Figura 2). Supernadantes (fracciones citosólicas) fueron microfugadas dos veces a 13000 veces por gramo, durante 15 minutos a 4 °C, con el propósito de precipitar la fracción mitocondrial. El extracto ribosomal fue preparado tal y como se describe en [1], a partir de supernadante citosólico, sometiénolo a una centrifugación de alta velocidad a 90,000 rpm, durante 30 minutos a 4 °C en un rotor Beckman TL100.3. El supernadante que contiene proteínas ribosomales no solubles, fue preparado mediante un análisis SDS-PAGE (Figura 2). El gránulo crudo ribosomal fue resuspendido en una solución amortiguadora A (20 mM Tris-HCl, pH 7.4, 500 mM  $AcNH_4$ , 100 mM  $MgCl_2$ , 5 mM  $\beta$  mercaptoetanol) y centrifugado a través de un gradiente de sucrosa discontinuo (20/40%) en una solución amortiguadora A, a 90,000 rpm a 4 °C en un rotor Beckman TL100.3. El gránulo de ribosomas lavados fue resuspendido en PBS, sometido hasta que la degradación del ARN ribosomal se ha completado y almacenado a -70 °C. Antes de congelar, una muestra de ribosomas fue preparada por el análisis SDS-PAGE (Figura 2) y dos geles de poliacrilamida dimensional (2D PAGE) (Figura 3).

14

A

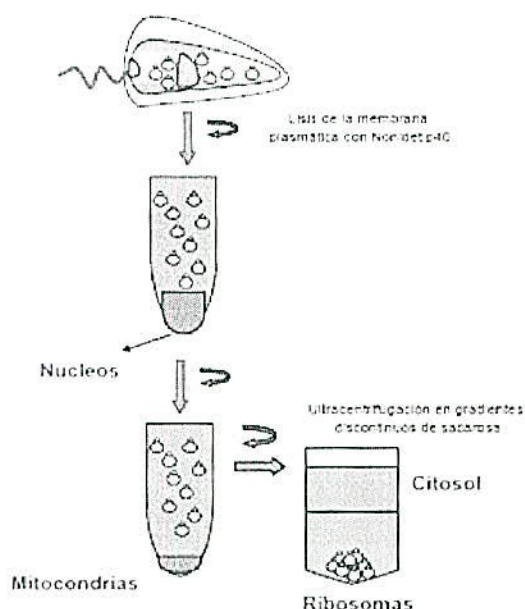


Figura 1. Esquema de la preparación de proteínas ribosomales *Leishmania*

Para SDS PAGE, el núcleo *L. mayor*, la fracción citosólica y extractos de proteína ribosomal (15 µg por cada muestra), fueron resuspendidos en una solución amortiguadora Laemmli (62.5 mM Tris HCl, pH 6.8, 7.5 mM EDTA, glicerol 10%, SDS 4%, 5 mM β-mercaptoetanol, 0.1% bromofenol azul) y redisolto en 10-14% de geles con un gradiente SDS-PAGE. Las proteínas fueron teñidas utilizando una solución coomassie azul (0.1% coomassie azul, 40% metanol, 10% ácido acético), figura 2.

A

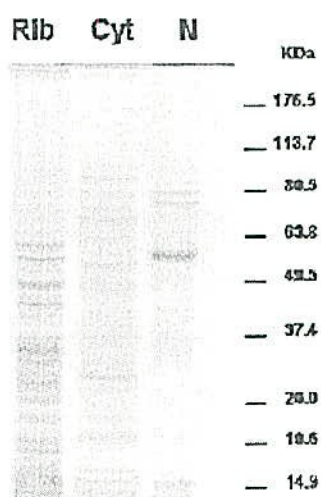


Figura 2. Extractos nucleares de *Leishmania mayor* (N), proteínas no-ribosomales citosólicas (Cyt) y proteínas ribosomales (Rib) fueron electroforisadas utilizando El gradiente SDS-PAGE 10-14% linear.

Para electrofóresis de gel de policramida bi-dimensional (2D-PAGE), extractos de proteína ribosomal *L. mayor*, fueron disueltos en 200 µl de una solución amortiguadora lisis (0.5% de Nonidet P40, 1 mM de EDTA, pH 8.0, 0.1 mM PMSF, 10 mM de Tris HCl, pH 7.4 y 1 mM DTT) y extraídos con un volumen igual de fenol. Las proteínas presentes en la fase orgánica fueron precipitadas con cinco volúmenes de una solución amortiguadora de acetato de amonio (0.1 M de acetato de amonio disuelto en metanol) y lavado tres veces

con 80% de acetona. El gránulo seco fue solubilizado en una solución amortiguadora de rehidratación (7 M urea, 2 M tiourea, 0.5% solución amortiguadora IPG (3-10), 4% CHAPS, 40 mM Tris HCl, pH 8.8 y 0.002% de bromofenol azul) y centrifugar para remover el material insoluble. Las proteínas fueron adsorbidas en Immobiline™ Drystrip, pH 3-10, 11 cm. El enfoque isoelectrico y de rehidratación (IEF), fue realizado utilizando un sistema IPGphor. Después del IEF, las tiras de IPG fueron equilibradas en uan solución amortiguadora equilibrada (6 M urea, 2% SDS, 0.375 M Tris HCl, pH 8.8, 20% glicerol, 0.002% bromofenol azul), más 20 mg/ml DTT por 15 minutos y después con una solución amortiguadora equilibrada más 25 mg/ml de yodoacetamida por otros 15 minutos. Las tiras de IPG equilibradas fueron colocadas en 12% de minigeles SDS-PAGE (BioRad). Los geles 2D fueron teñidos con nitrato de plata utilizando un kit de teñido con plata (GE Healthcare) (ver Figura 3).

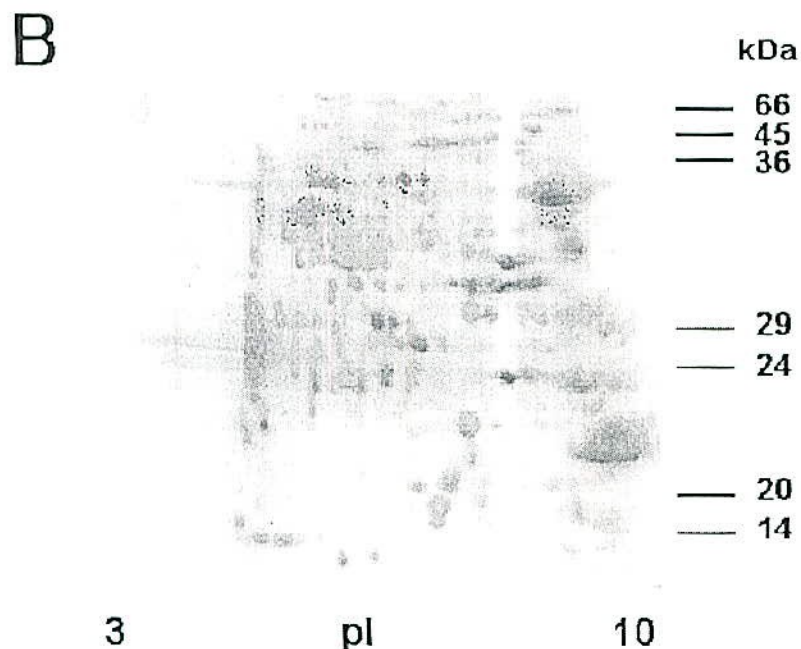


Figura 3. 2D PAGE de proteínas ribosomales L. mayor. Se muestra El gel teñido representativo com plata.

## Análisis

### 1. Análisis de pureza

Para analizar la pureza ribosomal, los extractos de proteína ribosomal (LRP) fueron analizados por Western Blot y su patrón de reconocimiento es comparado con el patrón del extracto de proteína total (SLA). Tubulina anit-beta ha sido utilizada como un marcador citosólico, anti-histona H2A como un marcador nuclear y anti-P0 como un marcador ribosomal (Figura 4).

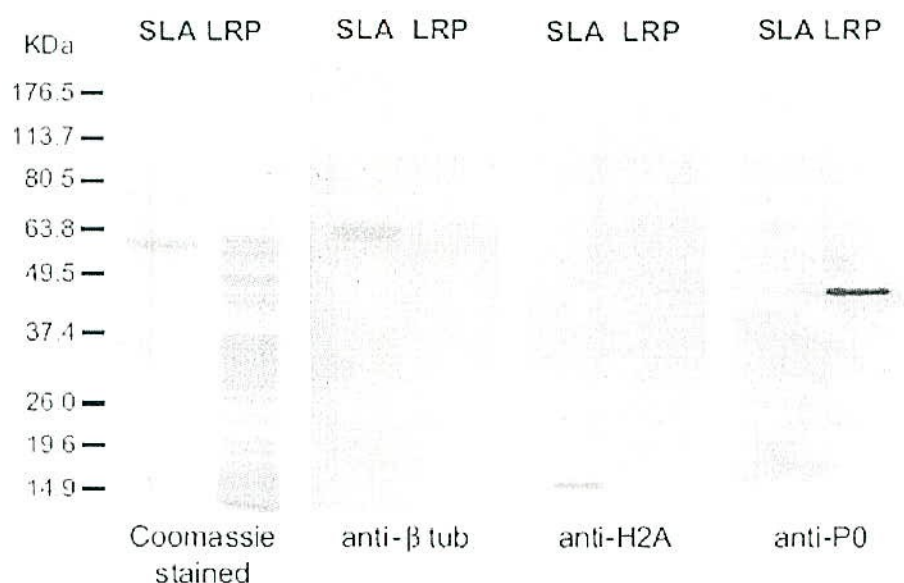


Figura 4. Pureza de la fracción ribosomal. L.mayor y LRP fueron electroforisadas en un gradiente SDS-PAGE linear 10-14%, transferido en manchas de nitrocelulosa y encubados con anti  $\beta$ -tubulina, anti L.infantum H2A y anti L. infantum anticuerpos específicos de proteína ribosomal P0.

Suero en contra de  $\beta$ -tubulina e histona H2A, no mostraron reactividad contra LRP, pero mostraron una banda contra SLA. Anticuerpos anti-P0 mostraron una reactividad incrementada en LRP relativa a SLA.

Adicionalmente, para analizar la pureza del extracto de proteínas ribosomales, estos extractos han sido cargados en SDS-PAGE junto con proteínas ribosomales recombinantes protectoras y el gel se ha teñido, siguiendo el método que se describió anteriormente. Ambos extractos de proteína ribosomal y proteínas recombinantes protectoras son analizadas por Western Blot, utilizando suero de ratones inmunizados con cada una de las proteínas recombinantes protectoras.

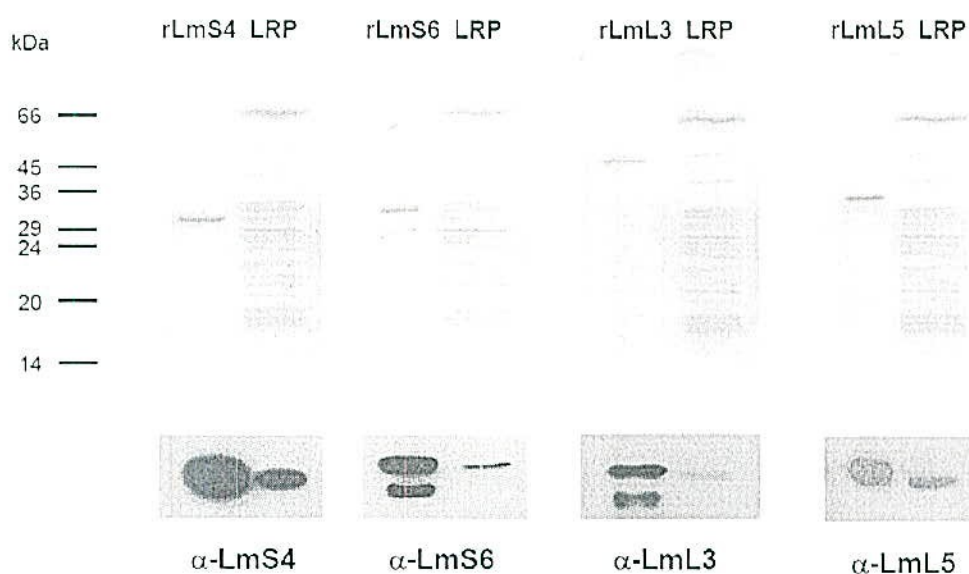


Figura 5. Extractos de proteína ribosomal (LRP) y proteínas recombinantes ribosomales protectoras (LmS4, LmS6, LmL3 y LmL5) han sido analizadas con SDS PAGE, transferidas a una membrana y analizadas por Western Blot contra suero de ratón inmunizado con cada una de las proteínas recombinantes protectoras.

17

Los 4 sueros diferentes contra proteínas ribosomales protectoras individuales son reconocidas por los extractos de proteína ribosomal (LRP).

### Conclusiones

El protocolo para la purificación de extractos de proteína ribosomal ha sido descrito.

Hasta ahora el extracto de proteína ribosomal ha sido reconocido por cinco proteínas ribosomales recombinantes (P0, L3, L5, S4 y S6) pero no se reconoce aun ya sea el marcador citosólico (anti  $\beta$ -tubulina) o un marcador nuclear (anti-H2A).

### Referencias

1. S Iborra, N Parody, D R Abánades, P. Bonay, D. Prates, F O Novais, M Barral-Netto, C Alonso y M Soto. Vaccination with the *Leishmania major* ribosomal proteins plus CpG oligodeoxynucleotides induces protection against experimental cutaneous leishmaniasis in mice. *Microbes and Infection*. 2008. 10:1133-1141