



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 12-000715- -00000-0000

Fecha: 2012-01-03 15:08:24 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 73

Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

21. EXPEDIENTE No.

54. TITULO: DIAGNÓSTICO DE UNA PARASITOSIS TAL
COMO LA LEISHMANIASIS USANDO UN EXTRACTO DE
PROTEINAS RIBOSÓMICAS (RPE)

51. CLASIFICACION INTERNACIONAL C07K 14/44
(2006.01)

71. SOLICITANTE: LABORATORIOS LETI, S.L.

DOMICILIO: MADRID, ESPAÑA

74. APODERADO DILIA RODRIGUEZ D'ALEMAN

22. BOGOTÁ, D.C. ENERO 3, 2012



No. 12-000715- -00000-0000

Fecha: 2012-01-03 15:08:24 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Trb. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 73

**FORMULARIO ÚNICO DE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL**

SOLICITUD DE REGISTRO DE:

1

☒

Patente de Invención

☐

Patente Modelo de Utilidad.

☒

Capítulo I

☐

Capítulo II

2

**SOLICITANTE
(71)**

Nombre: LABORATORIOS LETI, S.L.
Dirección: C/. DEL Sol 5, Polígono Industrial
Norte, ES-28760 Tres Cantos Madrid, España
Nacionalidad o domicilio: Tres Cantos,
Madrid, España
Lugar de Constitución: España

IDENTIFICACIÓN

C.C.

☒

NIT

☐

C.E.

☐

Otro

☐

Cual

Número

3

**REPRESENTANTE
O APODERADO
(74)**

Nombre: DILIA MARÍA RODRÍGUEZ
D'ALEMAN
Dirección: Carrera 11 No. 86-53, piso 6
Teléfono: 6 181088 Fax: 6350824
E-mail: clarkemodet@clarkemodet.com.co

IDENTIFICACIÓN

C.C.

☒

NIT

☐

C.E.

☐

Otro

☐

Cual

Número

41.654.882

TP 20824 CSJ

4

**INVENTOR(ES)
(72)**

Nombre **VER HOJA ANEXA**
Dirección:
Nacionalidad o domicilio:

5

PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/EP2010/060058 Fecha 13 de julio de 2010

Publicación Internacional No. WO 2011/006891 A1 Fecha 20 de enero de 2011

Título (54) DIAGNÓSTICO DE UNA PARASITOSIS TAL COMO LA LEISHMANIASIS USANDO UN EXTRACTO DE PROTEÍNAS RIBOSÓMICAS (RPE)

Clasificación Internacional (51) C07K 14/44 (2006.01)

(33) País de Origen		(32) Fecha	(31) Número de Solicitud
EP ESTADOS UNIDOS		JULIO 13, 2009 DIC. 7, 2009	09165282.6 61/267,214

8 Prioridad

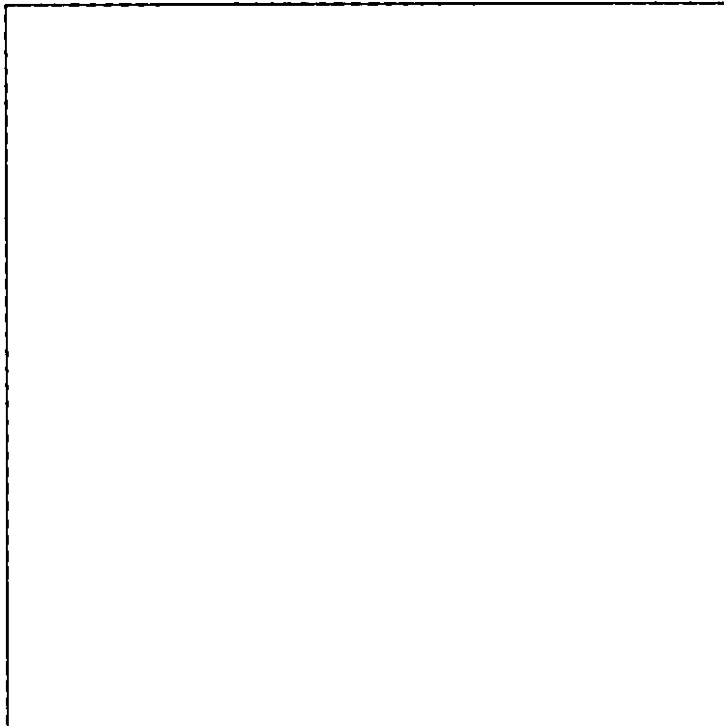
☒

SI

NO

Comprobante de pago No. 11-0072218, 11-119432, 11-119430, 11-119303, 11-119302, 11-0081218, 11-119331, 11-119330, 11-119329, 11-119324, 11-0081221, 11-0081219, 11-0081216, 11-0081217

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud
- ☒ Documento que acredite la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica
- ☒ Poderes si fuese el caso
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante
- ☐ Declaraciones
- ☒ Copia de la solicitud internacional (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☐ Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de examen preliminar (IPER)
- ☐ Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA
- ☐ De ser el caso copia de contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ De ser el caso certificado de depósito del material biológico
- ☐ Arte final 12x12.
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☐ De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional
- ☐ Otros

11 FIGURA CARACTERISTICA**12 Solicito la concesión de la patente,**NOMBRE : DILIA MARÍA RODRÍGUEZ D'ALEMAN

FIRMA:

C.C. 41.654.882T.P. 20824

INVENTORES

1. SOTO ALVAREZ, Manuel

Av/ Bélgica 85 2°-A, ES-28916, Madrid, España

2. RAMÍREZ GARCÍA, Laura

Carrero Juan Ramón 16 4°-B, ES-28025, Madrid, España

3. COELHO, Eduardo Antonio Ferraz

Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antonio Carlos,
6627- Pampulha, CEP, 31.270-901 Belo Horizonte, Brasil

4. ALONSO BEDATE, Carlos

Alberto Aguilera 21, ES-28015 Madrid, España

000000

P-3197

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

- / -

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 11 - 0072218

Bogotá D.C., Julio 27 de 2011 - 16:34:02

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	432287553	27/07/2011	39.655.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNIDITARIO	Vr. CONCEPTO
1	50005-01-09 OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD INDUSTRIAL	49 INSCRIPCION DE LICENCIAS Y DERECHOS REALES	515.000.00	515.000.00
				\$515.000.00

SON: **QUINIENTOSQUINCE MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 12-000715-00000-0000

Fecha: 2012-01-03 15:08:24 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 73

000002

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

Julio 27 de 2011 - 16:34:13

P-3197

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

- / -



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 11 - 119432

Bogotá D.C., Diciembre 09 de 2011 - 07:25:43

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	325090791	07/12/2011	48.105.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNIDITARIO	Vr. CONCEPTO
1	50005-01-09 OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD INDUSTRIAL	54 INFORMACION DETALLADA DE UN TRAMITE	27.000.00	27.000.00
				\$27.000.00

SON: **VEINTISIETE MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 12-000715- -00000-0000

Fecha: 2012-01-03 15:08:24 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eva: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 73

000303

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

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

, Diciembre 9 de 2011 - 07:26:09

P-319A

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	RECIBO DE CAJA	No. 11 - 119430
		Bogotá D.C., Diciembre 09 de 2011 - 07:25:43

RECIBIDO DE : CLARKE MODET NI 830.008.643

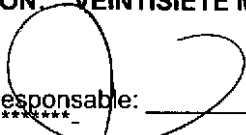
*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	325090791	07/12/2011	48.105.000.00

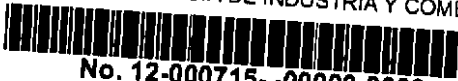
*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNIDITARIO	Vr. CONCEPTO
1	50005-01-09 OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD INDUSTRIAL	54 INFORMACION DETALLADA DE UN TRAMITE	27.000.00	27.000.00
				<u>\$27.000.00</u>
			=====	

SON: **VEINTISIETE MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: 

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 12-000715- -00000-0000
Fecha: 2012-01-03 15:08:24 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 73

000004

P-3197

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
-/-

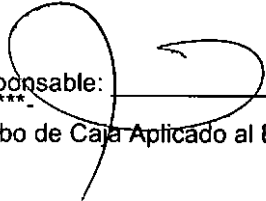
 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	RECIBO DE CAJA	No. 11 - 119303
		Bogotá D.C., Diciembre 09 de 2011 - 07:25:43

RECIBIDO DE : CLARKE MODET	NI 830.008.643
----------------------------	----------------

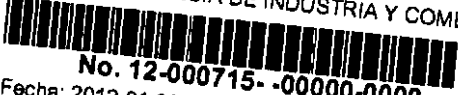
*** Soporte del Pago ***					
TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	325090791	07/12/2011	48.105.000.00

*** Conceptos Pagados ***				
CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1	50005-01-09 OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD INDUSTRIAL	99 OTROS SERVICIOS ADMINISTRATIVOS	10.000.00	10.000.00
				\$10.000.00
			=====	

SON: **DIEZ MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: 

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 12-000715-00000-0000
Fecha: 2012-01-03 15:08:24 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eje: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 73

000005

P-3197

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
-/-

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	RECIBO DE CAJA	No. 11 - 119302
		Bogotá D.C., Diciembre 09 de 2011 - 07:25:43

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	325090791	07/12/2011	48.105.000.00

*** Conceptos Pagados ***			
CANT	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNDITARIO Vr. CONCEPTO
1	50005-01-09 OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD INDUSTRIAL	99 OTROS SERVICIOS ADMINISTRATIVOS	10.000.00 10.000.00
			\$10.000.00
			=====

SON: **DIEZ MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: _____
Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 12-000715-00000-0000
Fecha: 2012-01-03 15:08:24 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 73

000006

P-3197.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

-/-



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 11 - 0081218

Bogotá D.C., Agosto 22 de 2011 - 16:50:40

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	411691980	22/08/2011	46.035.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1	50005-01-09 OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD INDUSTRIAL	99 OTROS SERVICIOS ADMINISTRATIVOS	1.000.00	1.000.00
				\$1.000.00

SON: **MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 12-000715- -00000-0000

Fecha: 2012-01-03 15:08:24 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 73

000007

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

Agosto 22 de 2011 - 16:51:13

P-3197

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

- / -



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 11 - 119331

Bogotá D.C., Diciembre 09 de 2011 - 07:25:43

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	325090791	07/12/2011	48.105.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNIDITARIO	Vr. CONCEPTO
1	50005-01-09 OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD INDUSTRIAL	21 CERTIFICACIONES	14.000.00	14.000.00
				\$14.000.00

SON: **CATORCE MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 12-000715- -00000-0000

Fecha: 2012-01-03 15:08:24 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 73

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

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

, Diciembre 9 de 2011 - 07:26:06

300000

P- 3197

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	RECIBO DE CAJA	No. 11 - 119330
		Bogotá D.C., Diciembre 09 de 2011 - 07:25:43

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	325090791	07/12/2011	48.105.000.00

*** Conceptos Pagados ***			
CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	
1	50005-01-09 OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD INDUSTRIAL	21 CERTIFICACIONES	
			Vr. UNDITARIO Vr. CONCEPTO
			14.000.00 14.000.00
			\$14.000.00
			=====

SON: **CATORCE MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 12-000715- -00000-0000
Fecha: 2012-01-03 15:08:24 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTE IYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 73

330341

000009

P-3197

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

-/-



RECIBO DE CAJA

No. 11 - 119329

Bogotá D.C., Diciembre 09 de 2011 - 07:25:43

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	325090791	07/12/2011	48.105.000.00

*** Conceptos Pagados ***

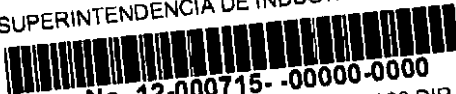
CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1	50005-01-09 OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD INDUSTRIAL	21 CERTIFICACIONES	14.000.00	14.000.00
				\$14.000.00

SON: **CATORCE MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 12-000715-00000-0000

Fecha: 2012-01-03 15:08:24 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 73

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

Diciembre 9 de 2011 - 07:26:08

000010

2-3197

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	RECIBO DE CAJA	No. 11 - 119324
		Bogotá D.C., Diciembre 09 de 2011 - 07:25:43

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	325090791	07/12/2011	48.105.000.00

*** Conceptos Pagados ***			
CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	VR UNDITARIO VR CONCEPTO
1 50005-01-09	OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD INDUSTRIAL	21 CERTIFICACIONES	14.000.00 14.000.00
			\$14.000.00
			=====

SON: **CATORCE MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: _____
Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 12-000715-00000-0000
Fecha: 2012-01-03 15:08:24 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 73

12345

000018

p-3197

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -



RECIBO DE CAJA

No. 11 - 0081221

Bogotá D.C., Agosto 22 de 2011 - 16:50:40

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	411691980	22/08/2011	46.035.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNDITARIO	Vr. CONCEPTO
1	50005-01-09 OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD INDUSTRIAL	99 OTROS SERVICIOS ADMINISTRATIVOS	1.000.00	1.000.00
				\$1.000.00
			=====	

SON: **MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 12-000715- -00000-0000

Fecha: 2012-01-03 15:08:24 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Evg: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 73

000019

000019

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

Agosto 22 de 2011 - 16:51:13

P-3197

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

- / -



RECIBO DE CAJA

No. 11 - 0081219

Bogotá D.C., Agosto 22 de 2011 - 16:50:40

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	411691980	22/08/2011	46.035.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNDITARIO	Vr. CONCEPTO
1	50005-01-09 OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD INDUSTRIAL	99 OTROS SERVICIOS ADMINISTRATIVOS	1.000.00	1.000.00
				\$1.000.00

SON: **MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable:

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 12-000715- -00000-0000
Fecha: 2012-01-03 15:08:24
Tra. 11 PATENTE IYII
Act. 411 PRESENTACION
Dep. 2020 DIR. NUEVAS CR
Eve: 378 FASE NACIONAL I
Folios: 73

000020

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

Agosto 22 de 2011 - 16:51:13

P-3197

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

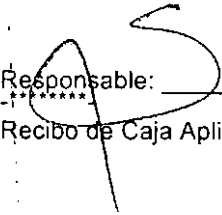
 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	RECIBO DE CAJA	No. 11 - 0081216
		Bogotá D.C., Agosto 22 de 2011 - 16:50:40

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	411691980	22/08/2011	46.035.000.00

*** Conceptos Pagados ***			
CANT	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. LINDITARIO Vr. CONCEPTO
1	50005-01-09 OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD INDUSTRIAL	99 OTROS SERVICIOS ADMINISTRATIVOS	1.000.00 1.000.00
			\$1.000.00
			=====

SON: **MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: 
Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 12-000715- -00000-0000
Fecha: 2012-01-03 15:08:24 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Follos: 73

00001

000021

P-3197

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

-/-



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 11 - 0081217

Bogotá D.C., Agosto 22 de 2011 - 16:50:40

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	411691980	22/08/2011	46.035.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. LINDITARIO	Vr. CONCEPTO
1	50005-01-09 OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD INDUSTRIAL	99 OTROS SERVICIOS ADMINISTRATIVOS	1.000.00	1.000.00
				\$1.000.00

SON: **MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 12-000715- -00000-0000

Fecha: 2012-01-03 15:08:24
Tra. 11 PATENTEIYII
Act. 411 PRESENTACION

Dep. 2020 DIR.NUEVASOR
Eve: 378 FASENACIONALI
Folios: 73

000022

000022

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

Agosto 22 de 2011 - 16:51:13

74

50

3Columba
5054-5055

LABOTARORIOS LETI, SL.

JOSÉ BAUZÁ CORCHS

NOTARIO

RAMBLA CATALUNYA, 99, prol.
08008 BARCELONA
TELS. 93 487 72 14 - 93 487 39 68
FAX 93 488 31 22

Año 2009

Núm. 143

90

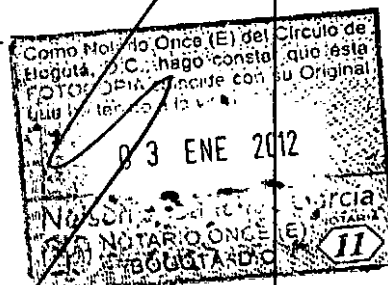
COPIA AUTENTICA DE LA ESCRITURA DE

PODER ESPECIAL

otorgada por

"LABORATORIOS LETI, S.L."

-Sociedad Unipersonal



000000

000016

En Barcelona, a 29 de Enero de 2009

05/2008



JOSE BAUZA CORCHS 887719059

NOTARIO

Rambla Catalunya, 99, Pral.

Tels. 93 4877214 - 93 4873968

Fax 93 4883122

08008 BARCELONA

NUMERO CIENTO CUARENTA Y TRES-----

=== PODER ESPECIAL ===

EN BARCELONA, mi residencia, a veintinueve de
enero del año dos mil nueve.-----

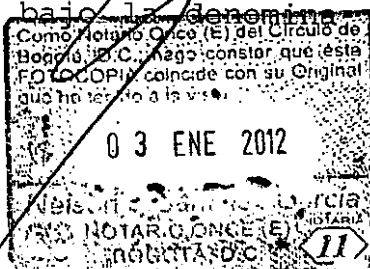
Ante mí, JOSE BAUZA CORCHS, Notario del Ilustre
Colegio de Cataluña,-----

=== COMPARECE: ===

DON JAIME GREGO SABATÉ, mayor de edad, casado,
Abogado, vecino de Barcelona, con domicilio en la ca-
lle Francesc Darder número 8-10, esc. B.; y provisto
de D.N.I. número 40.050.034-L.-----

Le identifico con su D.N.I. que me exhibe.-----

INTERVIENE en nombre y representación -como Apo-
derado- de la entidad mercantil, de nacionalidad es-
pañola, denominada "LABORATORIOS LETI, S.L." -
Sociedad Unipersonal- (antes denominada "C.B.F. LETI,
S.L." -SOCIEDAD UNIPERSONAL-", domiciliada en Tres
Cantos (Madrid), Polígono Industrial de Tres Cantos,
calle del Sol, parcelas 8-11; constituida por tiempo
indefinido, en forma de anónima y bajo la denomina-

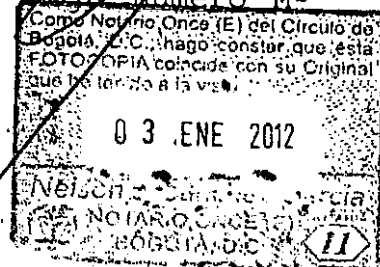


ción de "Corporación Biológica Farmacéutica, S.A.", en anagrama "C.B.F., S.A.", mediante escritura autorizada por el Notario de Madrid, Don Gonzalo Franco Vázquez, en fecha uno de octubre de mil novecientos ochenta y cinco, con el número 1971 de su Protocolo; habiendo adoptado su actual denominación mediante escritura autorizada por el que fue Notario de Barcelona, Don Baudilio Pagés Quer, el día 13 de Noviembre de 1989, número 2286 de su Protocolo; adaptados sus Estatutos Sociales al texto refundido de la Ley de Sociedades Anónimas, aprobado por Real Decreto Legislativo 1564/1989 de 22 de Diciembre, mediante escritura autorizada por el Notario que fue de esta residencia, Don Víctor Alonso-Cuevillas Sayrol, en fecha 21 de Noviembre de 1991, con el número 8277 de su Protocolo, subsanada por otra autorizada por Don José Bauzá Corchs, en Barcelona, el día 17 de Junio de 1992, con el número 2095 de Protocolo; reducido su capital social, en virtud de escritura autorizada también por el citado Notario de esta ciudad, Sr. Bauzá Corchs, el día 31 de marzo de 1995, con el número 1643 de Protocolo; modificado el artº 7º de sus Estatutos mediante otra escritura también autorizada por el Sr. Bauzá Corchs, en Barcelona, el día 29 de





Mayo de 1998, con el número 2286 de Protocolo; red denominado su capital social en euros, en virtud de escritura igualmente autorizada por el Sr. Bauzá Corchs, en esta ciudad, el día veintiuno de diciembre de dos mil uno, número 4884 de orden; transformada en Sociedad de Responsabilidad Limitada, mediante otra escritura asimismo autorizada por Don José Bauzá Corchs, Notario de Barcelona, el día veintitrés de septiembre del año dos mil tres, bajo el número 3399 de Protocolo; aumentado su capital social, en virtud de escritura asimismo autorizada por el citado fedatario Sr. Bauzá Corchs, en Barcelona, el día dos de octubre de dos mil tres, bajo el número 3500 de Protocolo; y adoptada su actual denominación en méritos de escritura fusión por absorción y cambio de denominación, autorizada por el citado Notario de esta capital, Sr. Bauzá Corchs, en fecha nueve de diciembre de dos mil tres, número 4514 de Protocolo, la cual fue INSCRITA en el Registro Mercantil de Madrid, en el tomo 4447, folio 186, sección 8, hoja número M-

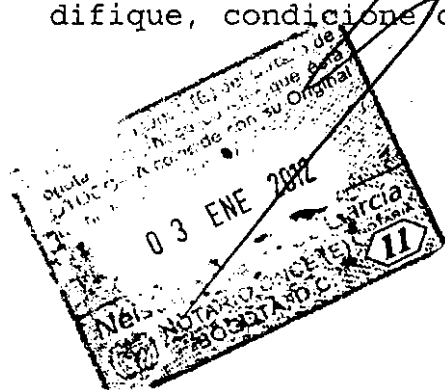


73.690, inscripción 44°. Dicha Compañía tiene el número B-78/152.725 de identificación fiscal. -----

De los Estatutos o pactos sociales vigentes porque se rige dicha Sociedad transcribo, por creerlo pertinente a este otorgamiento, lo siguiente: -----

"Artículo 2°.-La sociedad tiene por objeto el desarrollo, producción, envasado, importación, exportación y venta de toda clase de productos biológicos y químicos para diagnóstico y tratamiento en los campos farmacéutico dietético cosmético y veterinario. = Las actividades integrantes del objeto social podrán ser desarrolladas, total o parcialmente, de modo indirecto mediante la titularidad de acciones o participaciones en sociedades con objeto idéntico o análogo. = Si las disposiciones legales exigiesen para el ejercicio de algunas de las actividades comprendidas en el objeto social, algún título profesional o autorización administrativa, o la inscripción en Registro Público, dichas actividades solo podrán realizarse previo cumplimiento de dichos requisitos. " -----

CONCUERDA con la citada escritura de transformación de dicha Compañía, a la que me remito, sin que de la parte omitida de la misma resulte nada que modifique, condicione o restrinja la inserta. Doy fe. -





LEGITIMACIÓN: La representación y facultades para este acto, le resultan del poder a su favor conferido, en virtud de acuerdo adoptado en la reunión del Consejo de Administración de la Compañía, celebrada el día dos de enero de dos mil cuatro, el cual fue elevado a público mediante escritura autorizada por el Notario de Barcelona, Don José Bauzá Corchs, el día veintidós de enero del mismo año, bajo el número 188 de Protocolo, causante de la inscripción 45ª de la hoja que dicha Sociedad tiene abierta en el citado Registro Mercantil, al que me remito y que considero bastante a los fines de la presente.-----

Declara el señor compareciente que dichos poderes no le han sido revocados, suspendidos ni limitados en forma alguna; y que no ha sufrido alteración la personalidad jurídica de la Compañía a la cual representa.-----

Del referido apoderamiento y manifestaciones resulta, a mi juicio, y así lo declaro bajo mi responsabilidad, suficientemente facultado para otorgar la

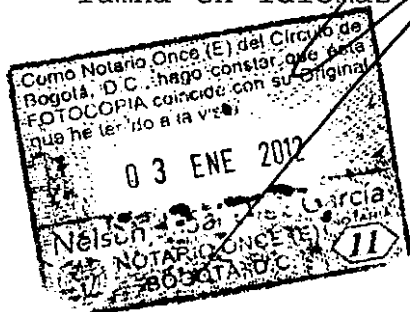


presente escritura de Poder Especial, todo ello con arreglo al artículo 98 de la Ley 24/2001 de 27 de diciembre, 34 de la Ley 24/2005, de 18 de noviembre y 166 del Reglamento Notarial. -----

Y teniendo, a mi juicio, tal como interviene, la capacidad legal necesaria para otorgar el presente poder especial, -----

=== D I C E: ===

Que, en nombre de la mercantil "LABORATORIOS LETI, S.L." -SOCIEDAD UNIPERSONAL-, CONFIERE PODER ESPECIAL, pero tan amplio y bastante como en Derecho se requiera y fuere menester, a favor de Doña Dilia María RODRÍGUEZ D'ALEMAN (de nacionalidad colombiana, titular de la cédula de ciudadanía número 41.654.882, de Bogotá y tp. 20824), y de Doña Claudia Lucía CARO RAMÍREZ (de nacionalidad colombiana, titular de la cédula de ciudadanía número 40.017.374, de Tunja y tp. 36448), para que, en nombre y representación de la Compañía poderdante, cada una de ellas por sí sola, pueda hacer uso de las facultades que resultan del documento que me entrega el compareciente Sr. Grego, para protocolizar junto a la presente, lo que así efectúo, el cual se halla extendido a doble columna en idiomas español e inglés, y firmado por el



05/2008



8Y7719062

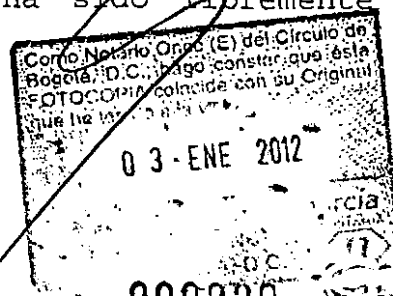
propio señor compareciente, cuya firma considero legítima por obrar en el Protocolo de esta Notaría, y que no se transcriben aquí en méritos a la brevedad.-

OTORGAMIENTO Y AUTORIZACIÓN:-----

Le leo, por su elección, esta escritura, y encontrándola conforme, presta su consentimiento y firma, manifestando estar conforme con el idioma en que ha sido redactada.-----

INFORMACIÓN DE DATOS: De acuerdo con lo establecido en la Ley Orgánica 15/1999, el señor compareciente queda informado y acepta la incorporación de sus datos a los ficheros automatizados existentes en la Notaría; datos que se conservarán en la misma, con carácter confidencial, al estar amparados por el secreto del Protocolo, sin perjuicio de las remisiones de obligado cumplimiento impuestas por la normativa vigente.-----

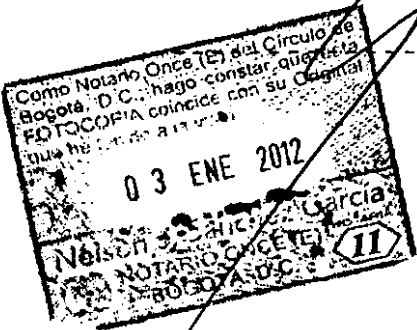
DOY FE: además de la identidad del compareciente y de que a mi juicio tiene capacidad y legitimación, de que el consentimiento ha sido libremente



prestado, de que el otorgamiento se adecua a la legalidad y a la voluntad debidamente informada del otorgante o interviniente, y de todo cuanto se contiene en este instrumento público extendido en cuatro folios del Timbre del Estado exclusivo para documentos notariales, números el del presente y los tres anteriores en orden numérico correlativo. Sigue la firma del compareciente. Signado y firmado El Notario autorizante. Rubricado y sellado -----

Aplicación Arancel, Disposición. Adicional 3ª Ley 8/1989
DOCUMENTO SIN BASE ARANCELARIA

SIGUEN DOCUMENTOS UNIDOS





Clarke, Modet & Co^{8Y/19063}
COLOMBIA

Carrera 11 n° 86-53, Piso 6 Bogotá Colombia Tel: (57 1) 618 1088 Fax: (57 1) 6350824 Email: clarkemodet@clarkemodet.com.co

PODER

Yo (nosotros), abajo firmante(s)

en mi (nuestro) carácter de representante(s) legales de
LABORATORIOS LETI SLU

una sociedad organizada y existente de acuerdo con las leyes de
ESPAÑA

y en actual cumplimiento de su objeto social, con domicilio en
**GRAN VIA DE LES CORTS CATALANES 184, 7 Planta. 08038
BARCELONA (ESPAÑA)**

por el presente instrumento confiero (conferimos) poder especial a favor
de **DILIA MARIA RODRIGUEZ D'ALEMAN**, con Cédula de
Ciudadanía No. 41.654.882 de Bogotá, y tp. 20824 y **CLAUDIA
LUCIA CARO RAMIREZ**, con Cédula de Ciudadanía No. 40.017.374
de Tunja, y tp. 36448, con domicilio en Bogotá, Colombia, para que
actuando en su orden en nombre del (de la) otorgante le (la) representen
ante cualquier entidad, autoridad y/o persona, especialmente ante las del
orden Administrativo, Contencioso Administrativo, Judicial, Tribunales
de Arbitramento y/o cualquier otro en lo referente a los siguientes
asuntos:

- 1) Solicitar, tramitar, obtener y/o registrar cualquiera de las modalidades
de Propiedad Industrial, tales como: patentes de invención, modelos de
utilidad; diseños industriales, variedades vegetales; marcas, lemas,
nombres y enseñanzas comerciales y denominaciones de origen; así como
sus renovaciones, prórrogas, transferencias, cambios de nombre y/o
domicilio, contratos y licencias.
- 2) Solicitar, tramitar, obtener y/o registrar derechos de autor, en
cualquiera de sus presentaciones así como la protección de secretos
industriales y know-how.
- 3) Solicitar, tramitar, obtener y/o registrar registros sanitarios, permisos
y/o licencias de funcionamiento; así como sus renovaciones o prórrogas,
transferencias, cambios de nombre y/o domicilio, contratos y licencias.
- 4) Ejercer acciones de oposición, observación, reclamos, reconsideración,
reposición, apelación, cancelación administrativa o judicial, nulidad,
protección al consumidor, concesión de licencias, protección de secretos
industriales y demás acciones y recursos relacionados con derechos
derivados de los asuntos arriba indicados y en contra de la competencia
desleal, acciones derivadas de la obtención o explotación de licencias,
acciones de indemnización de perjuicios. También podrá(n) intervenir en
juicios civiles, comerciales, penales, contencioso-administrativos, tutelas
y de policía; en acciones o juicios promovidos por el (la) mandante o en
contra el (ella).
- 5) Registrar nombres de dominio ante la entidad competente.
- 6) En el ejercicio de este mandato los mandatarios arriba mencionados
quedan facultados para: conciliar, cancelar, transigir, comprometer en
árbitros, desistir, recibir y tomar posesión de la cosa objeto de litigio y
renunciar o desistir a derechos concedidos o en curso de concesión,
admitir los hechos del proceso.
- 7) Ratificar o no la agencia oficiosa.
- 8) Así mismo faculto (facultamos) a los mencionados apoderados para
recibir notificaciones y designar apoderados judiciales o extrajudiciales,
sustituir el presente poder y revocar las sustituciones que hicieron.

Dado y firmado en

a los días de

POWER OF ATTORNEY

I (we), the undersigned

legal representative(s) of

an organization existing under the laws of

and in present execution of its business activity, domiciled at

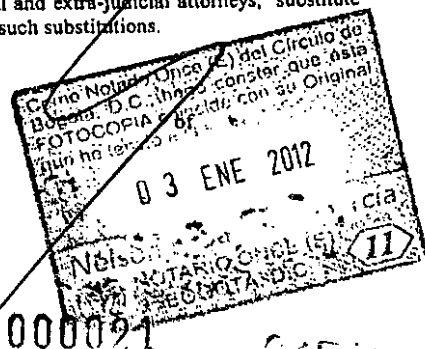
do hereby grant POWER OF ATTORNEY to **DILIA MARIA RODRIGUEZ
D'ALEMAN**, identification card No. 41.654.882 of Bogotá, and tp. 20824
and **CLAUDIA LUCIA CARO RAMIREZ**, tp. 36448, identification card No.
40.017.374 of Tunja, residing in Bogotá, Colombia, to act in the order of their
appointment in behalf of grantor before any entity, authority and/or natural or
juridical person, specially before those Administrative, Administrative-
Contentious, Judicial, arbitration courts, and/or any other, in all matters
concerning the following:

- 1) To apply, process, obtain and/or register any of the modalities of Industrial
Property, such as: Patents of Invention, Utility Models; Designs, plant
varieties; Marks, Slogans, Trade Names and emblems and appellations of
Origin; as well as their renewals, extensions, assignments, changes of name
and/or domicile, agreements and licenses.
- 2) To apply, process, obtain and/or register copyrights of any kind as well as
protection of industrial secrets or know-how.
- 3) To apply, process, obtain and/or register sanitary registrations, operating
authorizations and/or licenses; as well as their renewals or extensions,
assignments, changes of name and/or domicile, agreements and licenses.
- 4) To bring actions of opposition, observations, claims, reconsideration,
appeal or legal remedies, cancellations, nullity, protection to the consumer,
granting of licenses, protection of trade secrets and other actions related with
rights derived from the above-mentioned matters and against the unfair
competition, actions resulting from the obtaining or exploitation of licenses,
recovering damages actions. They can also intervene or participate in Civil,
Commercial, Criminal or Contentious-Administrative Trials; the actions for
writ mandamus, police actions; in actions, lawsuits or litigations instituted by
the grantor or against him.
- 5) To register domain names before the competent entity.
- 6) To the effect of this mandate the above-named proxy are empowered to:
conciliate, cancel, settle, submit to arbitration, withdraw and to receive and
take possession of the litigation related object and waive or renounce the rights
granted or in process of granting, admit the facts of the case.
- 7) To ratify or not the officious agency.
- 8) I (we) hereby appoint the afore mentioned attorneys with powers to receive
notifications and to designate judicial and extra-judicial attorneys, substitute
this Power of Attorney and to revoke such substitutions.

Granted and signed at

on this day of

Firma / signature

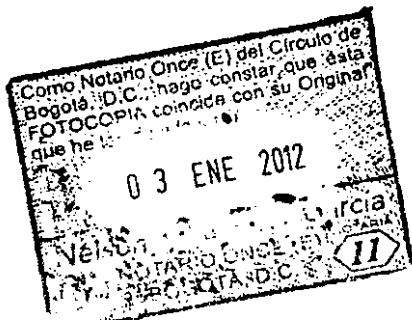
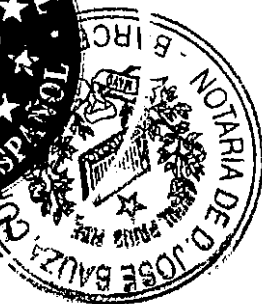


000021

CONCUERDA con su original, que bajo el expresado número obra en mi Protocolo general corriente. Y a utilidad de "LABORATORIOS LETI, S.L."-SOCIEDAD UNIPERSONAL-, expido la presente copia quedando extendida en cinco folios de papel timbrado del Estado, exclusivo para documentos notariales, números él del presente y los cuatro anteriores correlativos en orden que signo firmo y rubrico. En Barcelona a mismo día de autorización.Doy Fe.



[Handwritten signature]



01/2008



8S0997183

A P O S T I L L E

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. País **ESPAÑA**-----
- El presente documento público -----
2. ha sido firmado por **DON JOSE BAUZA CORCHS** -----
3. quien actúa en calidad de Notario, en copia de escritura de ---
Poder, número 143/2009, otorgado por **LABORATORIOS LETI, S.L.** --
Sociedad Unipersonal, cuya firma ha sido extendida en el folio
número 8Y7719063 de papel exclusivo para documentos notariales.
4. y está revestido del sello/timbre de su Notaría de -----
BARCELONA-----

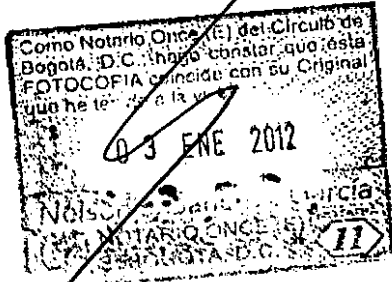
CERTIFICADO

5. en **BARCELONA**-----
6. el día 6 de febrero de 2009.-----
7. por **DON JOAN CARLES OLLÉ FAVARÓ**, Decano de la Junta Directiva -
del Ilustre Colegio Notarial de Cataluña. -----
8. bajo el número: -6510/2009-----
9. Sello/timbre: -----
10. Firma: -----



0138563141

Joan Carles Ollé Favaró,
Decano



0501

000022

**DIAGNÓSTICO DE UNA PARASITOSIS TAL COMO LA LEISHMANIASIS
USANDO UN EXTRACTO DE PROTEÍNAS RIBOSÓMICAS (RPE)**

Resumen

Un método de diagnóstico para Leishmaniasis en el cual se usa un RPE.

000023

DIAGNÓSTICO DE UNA PARASITOSIS TAL COMO LA LEISHMANIASIS
USANDO UN EXTRACTO DE PROTEÍNAS RIBOSÓMICAS (RPE)

Campo de la invención

La invención se refiere a un método de diagnóstico para una parasitosis tal como la Leishmaniasis usando un RPE.

Antecedentes de la invención

La Leishmaniasis visceral canina (CVL) es una zoonosis emergente importante en los países que rodean la cuenca mediterránea, en Medio Oriente, y en Latinoamérica (20). Esta grave enfermedad es causada por [el organismo] *Leishmania infantum* en el área mediterránea, en Medio Oriente y en los países asiáticos y *L. chagasi* en Latinoamérica (20, 21). Debido a sus relaciones genotípicas, ambas especies que causan la CVL en diferentes continentes se pueden considerar idénticas (26).

Al ser infectados, los perros pueden desarrollar diferentes formas de la enfermedad; asintomática, oligosintomática o sintomática (4). La infección sintomática da como resultado la muerte y sus manifestaciones clínicas incluyen alteraciones cutáneas como alopecia, dermatitis, onicogripos (3, 11), y también manifestaciones en vísceras con alteraciones renales, hepáticas y cerebrales (18, 28). Algunos de los perros infectados permanecen asintomáticos o desarrollan unos pocos síntomas suaves y se los clasifica como oligosintomáticos (4). La CVL puede no ser considerada solo como una enfermedad veterinaria porque los perros infectados (aún los asintomáticos) son el principal reservorio doméstico del parásito para la infección humana (1). Por lo tanto, para reducir la transmisión de *Leishmania* de perros a humanos es necesario diagnosticar la Leishmaniasis canina lo antes posible.

000024

PC L X L Error
Subsystem:
Error:
Operator:
Position:
1 / 0
InputReadError
EndPage
6569

La presencia de anticuerpos específicos anti-*Leishmania* en perros infectados asintomáticos, oligosintomáticos y sintomáticos (4, 9, 34) ha permitido el desarrollo de pruebas serológicas que incluyen pruebas con anticuerpos inmunofluorescentes (IFAT), transferencia Western, pruebas inmunocromatográficas, y ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) (revisado en (23)). El diagnóstico de la CVL usando ensayos ELISA en base a antígenos de *Leishmania* solubles en bruto (SLA) ha demostrado poseer una alta sensibilidad pero baja especificidad debido al parentesco antigénico entre *Leishmania* y otros protozoarios patogénicos (16). Como estrategia para desarrollar una prueba serodiagnóstica específica para CVL, se obtuvieron diferentes antígenos de parásitos como proteínas recombinantes (5, 10, 24). Sin embargo, debido a la alta variabilidad observada en la respuesta humoral de los perros individuales infectados contra los diferentes antígenos de parásitos (19, 31), un diagnóstico eficiente en base una proteína recombinantes puede requerir una mezcla de proteínas recombinantes o el uso de proteínas quiméricas que contienen varios antígenos del parásito no relacionados (6, 31, 36). El diagnóstico específico de la CVL también se puede desarrollar usando fracciones de parásitos en bruto analizadas por transferencia Western o preparados del parásito purificados (8, 17). Por ejemplo, ya ha sido desarrollado un ensayo ELISA en base a un antígeno de *Leishmania* soluble (SLA) (27, 31). Sin embargo, este ensayo basado en SLA no es suficientemente específico para diagnosticar la Leishmaniasis asintomática. Además, los sueros de sujetos con otras parasitosis diferentes de la Leishmaniasis darán una reacción falsamente positiva con un ensayo basado en SLA.

000025

Por lo tanto, aún existe la necesidad de un método de diagnóstico mejorado para una parasitosis tal como la Leishmaniasis, que no tenga todas las desventajas de los métodos existentes.

Descripción de la invención

En este trabajo, los inventores muestran que un RPE, especialmente un RPE de *Leishmania* (LRPE) se puede utilizar con ventaja para diagnosticar una parasitosis tal como la Leishmaniasis: este nuevo método de diagnóstico es más específico que los métodos de diagnóstico conocidos tales como un método basado en SLA tal como se demuestra en el ejemplo. Este nuevo método permite un diagnóstico presintomático de la Leishmaniasis que es crucial para prevenir o reducir la transmisión de *Leishmania* de perros un humanos.

La invención se describe más ampliamente a continuación.

Uso

En un primer aspecto, se provee el uso de un extracto de proteínas ribosómicas (RPE) para diagnosticar una parasitosis en un sujeto.

Tal como se lo define aquí, un extracto de proteínas ribosómicas se puede obtener llevando a cabo los siguientes pasos, usando una célula del parásito que causa una parasitosis cuando está presente en un sujeto:

- a. mezclar una célula del parásito con una solución amortiguadora de pH de lisis,
- b. centrifugar la mezcla que se obtuvo para obtener un extracto citosólico,
- c. preparar el extracto de proteínas ribosómicas a partir del extracto citosólico que se obtuvo.

000026

En el paso a, un parásito preferiblemente significa un protozoario. Los parásitos preferidos se definen aquí más adelante. Más preferiblemente, un protozoario está en la etapa de promastigote. Las personas con experiencia sabrán la cantidad aproximada de células de parásitos que son necesarias para preparar una cantidad deseada de RPE. Típicamente, para preparar 500 microgramos de RPE, se deberían utilizar 3×10^9 células del parásito. Una solución amortiguadora de pH de lisis es una solución amortiguadora de pH, que lisará por lo menos a algunas de las células del parásito. Por lo *menos algunas* significa preferiblemente por lo menos 50% de las células, o por lo menos 60%, 70%, 80%, 90% o 100%. Una solución amortiguadora de pH de lisis preferida comprende un tensioactivo no iónico. Se obtuvieron buenos resultados con Nonidet P 40 (NP40) como tensioactivo no iónico. Sin embargo, se puede usar otro tensioactivo no iónico. Una solución amortiguadora de pH de lisis preferida que se utiliza es la siguiente (Solución amortiguadora de pH A): Tris HCl 10mM, pH 8,0, NaCl 150 mM, $MgCl_2$ 1,5 mM y NP40 al 0,5% (Roche) y preferiblemente suplementada con inhibidores de proteasa tales como PMSF 1mM, Leupeptina 8 $\mu g/ml$, Aprotinina 4 $\mu g/ml$ y Pentatin 8 $\mu g/ml$). Típicamente, una cantidad apropiada de células de parásitos (10^9 células/ml de solución amortiguadora de pH A) se mezcla suavemente con esta solución amortiguadora de pH de lisis usando una pipeta Eppendorf.

En el paso b, sobre la mezcla que se obtuvo del paso a se aplica por lo menos un paso de centrifugación a 4°C. Usualmente, se lleva a cabo un primer paso de centrifugación a 3.000g durante 2 minutos. El sobrenadante que se obtiene preferiblemente se vuelve a centrifugar a 13.000g durante 15 minutos a 4°C una vez o dos veces.

000027

En el paso c, el sobrenadante que se obtiene se utiliza para preparar un RPE según se describe en (45). En resumen, el sobrenadante que se obtiene se somete a una centrifugación a alta velocidad a 90.000 rpm durante 30 min a 4 °C. Preferiblemente se utiliza un rotor Beckman TL100.3. El gránulo que se obtiene es un gránulo ribosómico en bruto, que se resuspende en una solución amortiguadora de pH apropiada tal como la solución amortiguadora de pH B (Tris-HCl 20 mM, pH 7,4, AcNH₄ 500 mM, MgCL₂ 100 mM, β-mercaptoetanol 5mM) y se centrifuga a través de un gradiente de sacarosa discontinuo (20/40%) en una solución amortiguadora de pH apropiada tal como la solución amortiguadora de pH A a 90.000 rpm a 4 °C. Aquí, nuevamente, el rotor preferido es un rotor TL100.3. El gránulo que se obtiene comprende ribosomas. Este gránulo preferiblemente se disuelve en PBS (solución salina amortiguadora de pH al fosfato), se sonica y se almacena a -70 °C.

Las proteínas ribosómicas son proteínas citosólicas bien conservadas. Por lo tanto, se puede preparar el RPE que se define aquí a partir de cualquier organismo eucariótico, tanto vegetales como animales, ya sean estos mamíferos, reptiles, peces, insectos, o cualquier otro organismo con cromosomas, como por ejemplo protozoarios. Preferiblemente el RPE se obtiene de un organismo cercano al organismo causante de la enfermedad, (preferiblemente una parasitosis) en el árbol evolutivo. Por lo tanto, para utilizar en el tratamiento de una parasitosis son particularmente interesantes como fuentes de RPE los protozoarios como los plasmodios y en particular los miembros de la familia de los tripanosomas, más en particular diferentes especies de los protozoarios tripanosómicos *Leishmania* o *Trypanosoma*. Hay más de 20 especies conocidas de *Leishmania*, que incluyen especies del

000028

subgénero *Leishmania*, que comprenden al complejo *L. major*, que incluyen *L. major*, el complejo *L. donovani*, que incluye a *L. chagasi*, *L. donovani* y *L. infantum*, el complejo *L. mexicana*, que incluye a *L. amazonensis* y *L. mexicana*, así como las subespecies *Viannia*, que comprenden al complejo *L. braziliensis*, que incluye a *L. braziliensis* y *L. peruviana* y el complejo *L. guyanensis*, que incluye a *L. guyanensis* y *L. panamensis*. Las especies de plasmodios particularmente interesantes son *Plasmodio falciparum* y *Plasmodio vivax*. En una forma de realización preferida, se obtiene un RPE de una especie de *Leishmania*, preferiblemente *Leishmania major* y/o *Leishmania infantum*. En otra forma de realización preferida, se obtiene un RPE de una especie de *Plasmodium*. Las personas con experiencia comprenderán que también se puede preparar un RPE mezclando un RPE proveniente de varios organismos diferentes según se los identifica aquí. El uso de un RPE en un método de diagnóstico de la invención en vez de usar una determinada proteína es bastante atractivo porque un RPE contiene una gran cantidad de antígenos diferentes. Cada uno de dichos antígenos potencialmente puede diagnosticar la presencia de una respuesta inmune en un sujeto. Además, hay sujetos que responden al antígeno A y no al B y viceversa. Por lo tanto, un RPE según se usa aquí es útil para utilizar en una amplia población de sujetos porque contiene una gran cantidad de antígenos diferentes. En una forma de realización preferida, el RPE comprende por lo menos una proteína ribosómica y/o por lo menos un antígeno de una proteína ribosómica y/o por lo menos un fragmento de proteína de una proteína ribosómica. En una forma de realización más preferida, el RPE comprende por lo menos dos proteínas ribosómicas y/o por lo menos dos antígenos de una proteína ribosómica y/o por lo menos dos

000029

fragmentos de proteína de una proteína ribosómica. Tal como se lo define aquí, un fragmento de proteína es preferiblemente un fragmento que comprende por lo menos 2, 3, 5, 7, 10, 15, 20, 25, 30 o más aminoácidos contiguos de una proteína ribosómica correspondiente. En una forma de realización, el RPE que se define aquí no comprende o no consiste en las proteínas ribosómicas ácidas P0 de *Leishmania infantum* ni/o el antígeno ribosómico LbeF4A de *Leishmania braziliensis*. En otra forma de realización, el RPE que se define aquí no comprende un epítopo originado en el antígeno ribosómico ácido LcPo de *Leishmania chagasi* según se divulga en EP 824 699 o no consiste en este. Más preferiblemente, el RPE no comprende los 17 aminoácidos situados en el C terminal de LcPo o no consiste en estos: los aminoácidos 306-322 de LcPo representados por SEQ ID NO:2 en EP 824 699, que también se identifica como SEQ ID NO:1 en la lista de secuencias.

Una ventaja de la presente invención es que permite alcanzar un diagnóstico específico y temprano de un espectro más amplio de parasitosis. Un ejemplo de una parasitosis en la cual se da esto es la Leishmaniasis. En una forma de realización preferida, una parasitosis es la Leishmaniasis o malaria. Más preferiblemente, una parasitosis es causada por una *Leishmania* o por una especie de *Plasmodium*. En una forma de realización preferida adicional, una parasitosis es causada por una especie diferente de las especies de las cuales deriva el RPE. En particular, la Leishmaniasis causada por una especie del género *Leishmania* se puede diagnosticar usando una composición basada en un RPE proveniente de otras especies de *Leishmania*. En una forma de realización, la Leishmaniasis causada por *L. major* se diagnostica con éxito con una composición que comprende un RPE proveniente de *L. infantum*.

000030

Como alternativa, otras parasitosis, como por ejemplo malaria, se puede diagnosticar con éxito con una composición basada en un RPE de otra especie, por ejemplo basada en un RPE de *L. infantum*.

En el contexto de la invención, un sujeto significa un humano o un animal. Los animales abarcados por el alcance de la invención incluyen a los mamíferos, preferiblemente a un humano o un perro. En principio, usando la invención el diagnóstico se puede realizar en cualquier sujeto. El método de diagnóstico se puede aplicar tan frecuentemente como sea necesario en un sujeto. Preferiblemente, un sujeto al que se le realiza el diagnóstico es un sujeto de quien se sospecha que está en riesgo de haber sido infectado con dicho parásito causándole dicha parasitosis. Un sujeto de quien se sospecha que está en riesgo de haber sido infectado con dicho parásito puede vivir en un área endémica o puede haber visitado un área endémica. Las áreas endémicas incluyen el norte de África de Argelia a Arabia Saudita, Kenya, Sudán, Etiopía. También incluyen el sur de Europa: países mediterráneos España, Francia, Grecia, etc. También incluyen a América Central (todos los países) y Sudamérica: Brasil, Venezuela, Perú, Bolivia, Colombia, norte de Argentina, Paraguay, Uruguay; así como Asia Central al sudoeste de Asia: India, Irán, Irak, Mongolia, Nepal, Bangladesh.

En el contexto de la invención, el uso que se define aquí es preferiblemente un uso *in vitro* o *ex vivo*. Esto preferiblemente significa que dicho uso se lleva a cabo sobre una muestra proveniente de dicho sujeto. Las muestras preferidas incluyen sangre, suero, plasma, saliva, fluido cerebroespinal u orina. Más preferiblemente, la muestra es una muestra de sangre o suero que se obtuvo de un sujeto.

000031

En una forma de realización preferida, el diagnóstico se obtiene antes de la aparición de un síntoma de dicha parasitosis, denominado diagnóstico presintomático o diagnóstico de un sujeto asintomático. En este contexto, "presintomático" preferiblemente significa por lo menos un día, por lo menos dos días, por lo menos tres días, por lo menos cuatro días, por lo menos cinco días, por lo menos seis días, por lo menos siete días, por lo menos ocho días, por lo menos nueve días, por lo menos diez días por lo menos 15 días, por lo menos 20 días, por lo menos 25 días, por lo menos 30 días o más antes de la aparición de un primer síntoma. Un primer síntoma o un primer signo clínico asociado con parasitosis tales como la Leishmaniasis se puede seleccionar entre la siguiente lista: fiebre, esplenomegalia, hepatomegalia, linfadenopatía, conjuntivitis, dermatitis onicogripos, queratoconjuntivitis, apatía y caquexia. La mayoría de estos se puede detectar simplemente mediante un examen físico externo. La conjuntivitis, dermatitis, onicogripos, queratoconjuntivitis son formas de alteración cutánea.

Un primer síntoma preferido relacionado con la Leishmaniasis es la linfadenopatía. Esta se puede detectar mediante un examen físico externo tal como una palpación.

En otra forma de realización preferida, se obtiene un diagnóstico antes de la aparición de algunos de los síntomas de dicha parasitosis, denominado diagnóstico de un sujeto oligosintomático. En este contexto, "oligosintomático" preferiblemente significa un sujeto con un máximo de tres de los síntomas que se definieron anteriormente.

En otra forma de realización preferida, se obtiene un diagnóstico antes de la aparición de todos los síntomas de dicha parasitosis, denominado

000032

diagnóstico de un sujeto sintomático. En este contexto, "sintomático" preferiblemente significa un sujeto con por lo menos cuatro de los síntomas que se definieron anteriormente que incluyen una forma de alteración cutánea tal como se la definió anteriormente.

Las personas con experiencia comprenderán que el tipo de diagnóstico más importante es el diagnóstico de sujetos asintomáticos, ya que contribuirá a prevenir la dispersión adicional de la enfermedad y a los sujetos asintomáticos se les puede ayudar y curar más eficientemente si son diagnosticados en dicha etapa.

Método

En un segundo aspecto se provee un método para diagnosticar una parasitosis en un sujeto usando RPE, donde el método comprende determinar si un anticuerpo que reconoce al RPE está presente en una muestra que se obtuvo del sujeto. Un método preferido de la invención consiste en llevar a cabo un uso preferido de la invención preferiblemente *in vitro* o *ex vivo*. Anteriormente se ha dado una definición.

En un método preferido, el RPE está presente en una composición. El RPE ha sido definido antes aquí. En una forma de realización preferida, en dicha composición hay presente otro compuesto. Como alternativa, ningún otro compuesto está presente en dicha composición.

En una forma de realización preferida, se utilizan otros compuestos en forma consecutiva con el RPE o simultáneamente para mejorar la especificidad del método. Por ejemplo, es ventajoso usar otros compuestos que serán capaces de discriminar entre sujetos asintomáticos, oligosintomáticos o sintomáticos y sujetos vacunados. Más preferiblemente, dichos compuestos no

000033

están presentes en una única composición junto con el RPE. Por ejemplo, se puede usar otro antígeno no relacionado de un parásito que causa dicha parasitosis (31) tal como la Leishmaniasis. Otro ejemplo es el uso de poliproteínas que contienen varios antígenos del parásito (6, 36). Los antígenos preferidos incluyen una proteína histona o un fragmento de la misma o una molécula de ácido nucleico que codifica a dicha histona. Más preferiblemente, una proteína histona es H2A, H2B, H3 y/o H4 según se las identifica en EP 1 687 023. Las histonas H2A, H2B, H3 y H4 son proteínas nucleares bien conservadas y su secuencia es bien conocida en el arte, véase por ejemplo Requena et al., Trends in Parasitol. (2000) 16:246. Preferiblemente las histonas se obtienen de un organismo que es cercano en el árbol evolutivo al organismo que causa la enfermedad. Por lo tanto, una fuente de histonas particularmente interesante para utilizar en el tratamiento de parasitosis tales como la Leishmaniasis son los protozoarios y en particular los miembros de la familia de los tripanosomas, por ejemplo los plasmodios, más en particular las diferentes especies de protozoarios tripanosómicos *Leishmania*.

En un método de diagnóstico más preferido, se diagnostica una parasitosis cuando hay presente una cantidad detectable de un anticuerpo que reconoce al RPE y/o cuando hay presente un aumento de la cantidad de dicho anticuerpo. En un sujeto de control o saludable, generalmente dicho anticuerpo es indetectable.

La detección de la presencia de dicho anticuerpo se lleva a cabo usando métodos conocidos por las personas con experiencia tales como ELISA. Las formas de detección preferidas se describen en la sección titulada Ensayo.

Un anticuerpo que reconoce al RPE preferiblemente significa que hay

000034

presente por lo menos un anticuerpo que es capaz de reconocer a por lo menos un compuesto presente en el RPE. Dicho compuesto puede ser una proteína ribosómica o un fragmento de proteína ribosómica o un antígeno ribosómico de una proteína ribosómica.

Ensayo

En un tercer aspecto, se provee un dispositivo de ensayo o un ensayo para diagnosticar una parasitosis en un sujeto, donde el dispositivo o el ensayo comprenden RPE. La presencia de un anticuerpo que reconoce específicamente al RPE se puede detectar por cualquiera de los métodos estándar conocidos por aquellos con experiencia en el arte (véase, por ejemplo, Harlow y Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988, que se incorpora aquí como referencia). Los métodos apropiados incluyen ensayos de cromatografía de afinidad con electroforesis (ACE) y (ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas) ELISA. Preferiblemente, el ensayo comprende un ELISA. A continuación se describen más extensivamente varios ensayos.

En una forma de realización preferida, un ensayo incluye el uso de RPE inmovilizado sobre un soporte sólido para unirse a un anticuerpo de la muestra y eliminarlo de la misma. Luego, dicho anticuerpo unido se puede detectar usando un reactivo de detección que se une al complejo anticuerpo/RPE y contiene un grupo informante detectable. Los reactivos de detección apropiados incluyen anticuerpos que se unen al complejo anticuerpo/RPE y polipéptido libre marcado con un grupo informante (por ejemplo, en un ensayo de semi-competencia). Como alternativa, se puede utilizar un ensayo de

000035

competencia, en el cual un anticuerpo que se une a RPE se marca con un grupo informante y se le permite unirse al RPE inmovilizado luego de la incubación del RPE con la muestra. La extensión hasta la cual los componentes de la muestra inhiben la unión del anticuerpo marcado al RPE es indicativa de la reactividad de la muestra con el RPE inmovilizado.

Un soporte sólido puede ser cualquier material conocido por aquellos con una experiencia normal en el arte al cual puede unir el RPE. Por ejemplo, un soporte puede ser una cavidad de prueba en una placa de microtítulo o una membrana de nitrocelulosa u otra membrana apropiada. Como alternativa, un soporte puede ser una cuenta o disco, como por ejemplo de vidrio, fibra de vidrio, látex o un material plástico tal como poliestireno o poli(cloruro de vinilo). El soporte también puede ser una partícula magnética o un sensor de fibra óptica, como por ejemplo aquellos que se divulgan, por ejemplo, en la Patente de los EE.UU. No. 5.359.681.

El RPE se puede unir al soporte sólido usando una variedad de técnicas conocidas por los expertos en la técnica. En el contexto de la presente invención, el término "unido" se refiere tanto a una asociación no covalente, como por ejemplo adsorción, como a una unión covalente (que puede ser una unión directa entre el antígeno y los grupos funcionales sobre el soporte o puede ser una conexión a través de un agente reticulante). Se prefiere la unión por adsorción a una cavidad en una placa de microtítulo o a una membrana. En dichos casos, la adsorción se puede conseguir poniendo en contacto al RPE, en una solución amortiguadora de pH apropiada, con el soporte sólido durante un lapso de tiempo apropiado. El tiempo de contacto varía con la temperatura, pero típicamente es de entre 1 hora y 1 día. En general, el contacto entre una

000036

cavidad de una placa de microtítulo de plástico (tal como poliestireno o poli(cloruro de vinilo)) con una cantidad de RPE dentro del rango entre 10 ng y 1 g, y preferiblemente 100 ng, es suficiente para unirse a una cantidad adecuada de RPE.

La unión covalente de RPE a un soporte sólido generalmente se puede conseguir haciendo reaccionar primero el soporte con un reactivo bifuncional que reaccionará tanto con el soporte como con un grupo funcional, como por ejemplo un grupo hidroxilo o amino, sobre el polipéptido. Por ejemplo, el RPE se puede unir a un soporte con un recubrimiento de un polímero apropiado usando benzoquinona o por condensación de un grupo aldehído sobre el soporte con una amina y un hidrógeno activo sobre el polipéptido (véase, por ejemplo, Pierce Immunotechnology Catalog and Handbook (1991) at A12-A13).

En ciertas formas de realización, el ensayo es un ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA). Este ensayo se puede llevar a cabo poniendo en contacto primero un RPE que ha sido inmovilizado sobre un soporte sólido, comúnmente la cavidad de una placa de microtítulo, con la muestra, de tal manera de permitir que los anticuerpos específicos para RPE dentro de la muestra se unan al RPE inmovilizado. Luego, la muestra no unida se separa del RPE inmovilizado y se agrega un reactivo de detección capaz de unirse al complejo anticuerpo-RPE inmovilizado. Luego se determina la cantidad de reactivo de detección que permanece unido al soporte sólido usando un método apropiado para el reactivo de detección específico.

Una vez que el RPE está inmovilizado sobre el soporte, los restantes sitios de unión a la proteína sobre el soporte típicamente quedan bloqueados. Se puede emplear cualquier agente bloqueante apropiado conocido por

000037

aquellos con una experiencia normal en el arte, como por ejemplo albúmina de suero bovino (BSA) o Tween 20 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO). Luego, el RPE inmovilizado se incuba con la muestra, y se permite que el anticuerpo (si está presente en la muestra) se una al RPE. Se puede diluir una muestra con un diluyente apropiado, como por ejemplo solución salina amortiguadora de pH al fosfato (PBS) antes de la incubación. En general, un tiempo de contacto apropiado (es decir, tiempo de incubación) es el período de tiempo suficiente para permitir detectar la presencia de anticuerpo dentro de una muestra. Preferiblemente, el tiempo de contacto es suficiente para conseguir un nivel de unión de por lo menos 95% del que se consigue en el equilibrio entre el anticuerpo unido y el anticuerpo no unido. Aquellos con una experiencia normal en el arte reconocerán que el tiempo necesario para conseguir el equilibrio se determinar puede fácilmente analizando el nivel de unión que se da durante un período de tiempo. A la temperatura ambiente, generalmente es suficiente un tiempo de incubación de aproximadamente 30 minutos.

Luego se puede retirar la muestra no unida lavando el soporte sólido con una solución amortiguadora de pH apropiada, como por ejemplo PBS que contiene Tween 20 Tom al 0,1%. Luego se puede agregar el reactivo de detección a un soporte sólido. Un reactivo de detección apropiado es cualquier compuesto que se una al complejo anticuerpo-RPE inmovilizado y que pueda ser detectado por cualquiera de una variedad de medios conocidos por los expertos en la técnica. Preferiblemente, el reactivo de detección contiene un agente de unión (tal como, por ejemplo, Proteína A, Proteína G, inmunoglobulina, lectina o antígeno libre) conjugado a un grupo informante. Los grupos informantes preferidos incluyen enzimas (tales como la peroxidasa de

000038

rábano picante), sustratos, cofactores, inhibidores, tinturas, radionúclidos, grupos luminiscentes, grupos fluorescentes y biotina. La conjugación del agente de unión al grupo informante se puede conseguir usando métodos estándar conocido por aquellos con una experiencia normal en el arte. Los agentes de unión comunes también se pueden adquirir conjugados a una variedad de grupos informantes de muchas fuentes (por ejemplo, Zymed Laboratories, San Francisco, CA y Pierce, Rockford, IL).

Luego, el reactivo de detección se incuba con el complejo de anticuerpo-RPE inmovilizado durante un lapso de tiempo suficiente para detectar el anticuerpo unido. Un lapso de tiempo apropiado generalmente se puede determinar viendo las instrucciones del fabricante o analizando el nivel de unión que se da durante un período de tiempo. Luego se elimina el reactivo de detección no unido y se detecta el reactivo de detección unido usando el grupo informante.

El método que se emplee para detectar el grupo informante depende de la naturaleza del grupo informante. Par los grupos radioactivos, generalmente son apropiados los conteos de centelleo o métodos auto radiográficos. Para detectar tinturas, grupos luminiscentes y grupos fluorescentes se pueden utilizar métodos espectroscópicos. La biotina se puede detectar usando avidina, acoplada a un grupo informante diferente (comúnmente un grupo radioactivo o fluorescente o una enzima). Los grupos informantes en la enzima generalmente se pueden detectar por agregado de un sustrato (generalmente durante un período de tiempo específico), seguido de análisis espectroscópico u otro tipo de análisis de los productos de reacción.

Para determinar la presencia o ausencia de un anticuerpo específico

000039

para una parasitosis tal como la Leishmaniasis en una muestra, generalmente se compara la señal detectada del grupo informante que permanece unido al soporte sólido con una señal que corresponde a un valor de corte predeterminado. En una forma de realización preferida, el valor de corte es preferiblemente la media aritmética de la señal que se obtiene cuando se incuba el RPE inmovilizado con una muestra proveniente de un sujeto no infectado. En general, una muestra que genera una señal que es tres desviaciones estándar mayor que el valor de corte predeterminado se considera positiva (es decir, reactiva con el RPE). En una forma de realización preferida alternativa, el valor de corte se determina usando una Curva de Recepción por el Operador, de acuerdo con el método de Sackett et al., *Clinical Epidemiology: A Basic Science for Clinical Medicine*, p. 106-7 (Little Brown & Co., 1985). En resumen, en esta forma de realización, el valor de corte se puede determinar en base a una gráfica de pares de tasas positivas verdaderas (es decir, sensibilidad) y tasa de falsos positivos (100%-especificidad) que corresponde a cada valor de corte posible para el resultado de la prueba de diagnóstico.

El valor de corte que en la gráfica es más cercano a la esquina superior izquierda (es decir, el valor que encierra la mayor área) es el valor de corte más exacto, y una muestra que genera una señal que es mayor que el valor de corte determinado por este método se puede considerar positivo. Como alternativa, el valor de corte se puede desplazar hacia la izquierda a lo largo de la gráfica, para minimizar la tasa de falsos positivos, o hacia la derecha, para minimizar la tasa de falsos negativos.

En una forma de realización relacionada, se lleva a cabo un ensayo de

000040

flujo pasante o en un formato de tiras de prueba, donde el RPE se inmoviliza sobre una membrana tal como nitrocelulosa. En la prueba de flujo pasante, los anticuerpos dentro de la muestra se unen al RPE inmovilizado a medida que la muestra pasa a través de la membrana. Luego, un reactivo de detección (por ejemplo, proteína A-oro coloidal) se une al complejo anticuerpo-RPE a medida que la solución que contiene el reactivo de detección fluye a través de la membrana. Luego se puede llevar a cabo la detección de reactivo de detección unido según se describió anteriormente. En el formato en tiras de prueba, un extremo de la membrana al cual está unido el RPE se sumerge en una solución que contiene la muestra. La muestra migra a lo largo de la membrana a través de la región que contiene el reactivo de detección y hacia el área de polipéptido inmovilizado. La concentración del reactivo de detección en el RPE indica la presencia en la muestra de un anticuerpo específico para un antígeno de un parásito que causa una parasitosis tal como la Leishmaniasis. Típicamente, la concentración del reactivo de detección en dicho sitio genera un patrón, como por ejemplo una línea, que se puede leer visualmente. La ausencia de dicho patrón indica un resultado negativo. En general, la cantidad de RPE inmovilizado sobre la membrana se selecciona de manera de generar un patrón discernible visualmente cuando una muestra contiene un nivel de anticuerpo que podría ser suficiente para generar una señal positiva en un ELISA, según se expuso anteriormente. Preferiblemente, la cantidad de RPE inmovilizado sobre la membrana varía dentro del rango entre 25 ng y 500 ng. Dichas pruebas típicamente se pueden llevar a cabo con una cantidad muy pequeña (por ejemplo, una gota) de suero o sangre del sujeto.

Cualquier sujeto o médico puede usar este dispositivo en la

000041

oficina/hogar, y repetir el uso de dicho dispositivo o ensayo tan frecuentemente como sea necesario.

Usualmente, en un ensayo se utilizan moléculas adicionales como control positivo o negativo. Un control positivo típico puede ser un anticuerpo que reconoce a moléculas que se sabe que están presentes en una muestra que se va a analizar. Un control negativo típico puede ser un anticuerpo que reconoce a moléculas que se sabe que están ausentes en una muestra que se va a analizar.

En este documento y en sus reivindicaciones, el verbo "comprender" y sus conjugaciones se utilizan en su sentido no limitante para significar que los artículos que siguen a la palabra se encuentran incluidos, pero que no se excluyen los artículos que no se mencionan específicamente. Además el verbo "consistir" puede ser reemplazado por "consistir esencialmente en" significando que respectivamente un producto, un dispositivo de ensayo, un método o un uso tal como se los define aquí puede comprender componente(s) adicional(es), respectivamente paso(s) adicional(es) además de aquellos que se han identificado específicamente, donde respectivamente dicho(s) componente(s) adicional(es), paso(s) no alteran las características únicas de la invención.

Además, la referencia a un elemento por el artículo indefinido "un" o "una" no excluye la posibilidad de la presencia de más de uno de los elementos, a no ser que el contexto claramente requiera que haya uno y solo uno de los elementos. De esta manera, el artículo indefinido "un" o "una" usualmente significa "por lo menos un(a)".

Todas las referencias a patentes y literatura citadas en la presente

000042

memoria descriptiva se incorporan aquí por referencia en su totalidad.

La invención se ilustra adicionalmente mediante el siguiente ejemplo, que no se debe considerar como limitante del alcance de la presente invención.

Descripción de las figuras

FIGURA 1. (A) se sometieron a electroforesis proteínas ribosómicas de *L. infantum* en un gradiente lineal de gel SDS-PAGE 10-14%, se transfirieron sobre una membrana de nitrocelulosa y se incubaron con los sueros de perros sanos (calles 1-3), y sueros de perros infectados naturalmente con *L. infantum* con CVL sintomática (calles 4-13). Los sueros individuales se emplearon a una dilución 1:200. (B) 2D-PAGE de proteínas ribosómicas de *L. infantum*. El panel izquierdo muestra un gel teñido con plata representativo. Se transfirió un gel similar sobre una membrana de nitrocelulosa y se incubó con una combinación de los sueros de animales con CVL (1:200) que se utilizaron en (A). Como reactivo secundario se utilizó un conjugado de peroxidasa de rábano picante y anticuerpo anti-IgG de perro.

FIGURA 2. Evaluación comparativa de la sensibilidad de diagnóstico de LRP y SLA. (A) Reactividad ante ELISA de sueros de perros con CVL sintomática y sueros de control con LRP y SLA. (B) Reactividad ante ELISA de sueros de perros con CVL oligosintomática y asintomática con LRP y SLA. Se muestra el valor medio de los sueros de animales con CVL. Las barras cortadas muestran el valor de corte definido como la densidad óptica media más tres desviaciones estándar de los valores que se obtuvieron con sueros de controles saludables.

FIGURA 3. Evaluación comparativa de la especificidad del diagnóstico de LRP y SLA. (A) Reactividad ante ELISA de sueros de perros infectados con

000043

T. gondii o *T. cruzi* con LRP y SLA. (B) Reactividad ante ELISA de sueros de perros vacunados con Leishmune® o Leishtec® con LRP y SLA. Se muestra el valor medio de los sueros de animales con CVL. Las barras cortadas muestran el valor de corte definido como la densidad óptica media más tres desviaciones estándar de los valores que se obtuvieron con sueros de controles saludables.

Ejemplos

MATERIALES y MÉTODOS

Parásitos. Se cultivaron *Leishmania chagasi* (MOM/BR/1970/BH46) y *L. infantum* (MCAN/ES/1996/BCN/150, MON-1) a 24 °C en medio de Schneider (Sigma, St. Louis, MO, EE.UU.) suplementado con 20% de suero fetal bovino desactivado con calor (Sigma, St. Louis, MO, EE.UU.), L-glutamina 20 mM, 200 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina y 50 µg/ml de gentamicina a pH 7,4.

Preparación del antígeno. Se preparó SLA de promastigotes en fase estacionaria de *L. chagasi* y *L. infantum* luego de unos pocos pasajes en cultivo líquido, como se describió anteriormente (12). En resumen, 2×10^8 promastigotes por ml, en un volumen de 5 ml, se lavaron 3 veces en solución salina amortiguadora de pH al fosfato fría estéril (PBS). Luego de seis ciclos de congelación y descongelado seguidos de ultrasonicación (Procesador ultrasónico, GEX600), con cinco ciclos de 30 seg a 38 MHz, la suspensión se centrifugó a 8.000 g durante 30 min a 4°C y se recolectó el sobrenadante que contenía SLA. Se estimó la concentración de proteína por el método de Bradford (7) y se almacenaron alícuotas de 500 µL a -70 °C.

El LRP se preparó de promastigotes de *L. infantum* en fase logarítmica como se describió anteriormente (22). En resumen, se cosecharon 1×10^9

000044

promastigotes, se lavaron dos veces en PBS pre-enfriado, se resuspendieron en 1 ml de solución amortiguadora de pH de lisis NP40 (Tris HCl 10 mM, pH 8,0, NaCl 150 mM, MgCl₂ 1,5 mM y NP40 al 0,5%) y se pipetearon hacia arriba y abajo 10 veces. Luego de la lisis, las muestras se microcentrifugaron a 3.000 × g durante 2 min a 4 °C para obtener gránulos de los núcleos. El sobrenadante se microcentrifugó dos veces a 13.000 × g durante 15 min a 4 °C. El sobrenadante citosólico purificado se sometió a centrifugación a alta velocidad a 90.000 rpm durante 30 min a 4 °C con un rotor Beckman TL100.3. El gránulo ribosómico en bruto se resuspendió en solución amortiguadora de pH A (Tris-HCl 20 mM, pH 7,4, AcNH₄ 500 mM, MgCl₂ 100 mM, β-mercaptoetanol 5mM) y se centrifugó a través de un gradiente de sacarosa discontinuo (20/40%) en solución amortiguadora de pH A a 90.000 rpm a 4 °C en un rotor TL100.3.

Muestras de suero. Se recolectaron muestras de suero en España y Brasil. Las muestras de suero con CVL provenientes de España se recolectaron de 28 perros con síntomas clínicos en la región de Extremadura. Los animales infectados con *L. infantum* se evaluaron clínica y analíticamente en el Departamento de Parasitología de la Escuela de Veterinaria, Universidad de Extremadura, Cáceres, España. Los animales se consideraron sintomáticos cuando estuvieron presentes tres o más de los siguientes síntomas: pérdida de peso, alopecia, adenopatía, onicogriphosis, hepatomegalia, conjuntivitis y dermatitis exfoliativa en la nariz, cola y puntas de las orejas. Todos los sueros fueron positivos cuando se probaron por inmunofluorescencia indirecta, y la presencia de formas amastigote del parásito fue confirmada por observación directa en nódulos linfáticos poplíteos y prescapulares. Los sueros de control se obtuvieron de 8 animales sanos (Departamento de Parasitología,

000045

Universidad de Extremadura).

Se utilizaron muestras de suero de 58 perros infectados con *L. chagasi* (44 clínicamente sintomáticos, 7 oligosintomáticos y 7 asintomáticos) del área de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. Según se describió anteriormente, los animales se consideraron sintomáticos cuando presentaron tres o más de los síntomas clínicos, oligosintomáticos cuando estuvieron presentes solo uno o dos síntomas y asintomáticos cuando los perros estuvieron libres de síntomas clínicos. Igual que antes, el diagnóstico de VL se definió cuando se vieron amastigotes en frotis teñidos con tinte de Giemsa de aspirados de médula ósea o cuando se identificaron promastigotes en cultivos de sangre periférica o aspirados de médula ósea. Los sueros provenientes de perros brasileiros fueron provistos por Evaldo Nascimento y Maria Norma Melo (Departamento de Parasitología, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil). El grupo de control estuvo constituido por suero de 47 perros que vivían en áreas endémicas de VL pero sin signos clínicos ni sospecha de Leishmaniasis canina y negativos luego de las pruebas parasitológicas y serológicas. Se utilizaron catorce muestras de suero de perros infectados con otros parásitos para analizar la reacción cruzada, según sigue: *Toxoplasma gondii* (n= 5) y *Trypanosoma cruzi* (n= 9). En los experimentos se utilizaron muestras de suero de perros sanos y vacunados con las vacunas Leishmune® (n= 18) o Leishtec® (n= 23).

ELISA. Se recubrieron placas de microtítulo para inmunoensayo (Falcon) con SLA de *L. infantum* o *L. chagasi*, o con LRP de *L. infantum* (0,5 µg/cavidad, cada una), en 100 µL de solución amortiguadora de pH de recubrimiento pH 9,6, 18 h a 4°C. Se llevó a cabo una curva de titulación para

000046

determinar la mejor concentración de proteína y dilución de anticuerpo a utilizar. Los sitios de unión libres se bloquearon con una solución de PBS-Tween 20 al 0,05% (PBST) y caseína al 3% durante 2 h a 37°C. Luego de tres lavados con PBST, las placas se incubaron con 100 µL de sueros caninos durante 1 h a 37°C. Las muestras de suero se diluyeron 1:200 en PBST y caseína al 0,3%. Las placas se lavaron siete veces y se incubaron con anticuerpo anti-IgG de perro 1:10.000 (Sigma, St. Louis, EE.UU.) en peroxidasa de rábano picante conjugado. La reacción se reveló por incubación con H₂O₂, orto-fenilendiamina y solución amortiguadora de pH al citrato-fosfato pH 5,0, durante 30 min en la oscuridad y se detuvo por agregado de 20 µL de 2 N H₂O₂. Se leyeron las densidades ópticas a 492 nm en un espectrofotómetro para microplacas de ELISA (Molecular Devices, Spectra Max Plus. Concord, ON, Canadá).

Transferencia Western. Para SDS-PAGE se resuspendieron LRPs de *L. infantum* (15 µg) en solución amortiguadora de pH de Laemmli y se resolvieron en gradientes 10-14% de gel SDS-PAGE con un peine preparativo usando el sistema Minigel para electroforesis BioRad Protein (Hercules, CA, EE.UU.). Para 2D-PAGE, las LRPs de *L. infantum* se disolvieron en 200 µl de solución amortiguadora de pH de lisis (P40 Nonidet al 0,5%, EDTA 1mM, pH 8,0, PMSF 0,1 mM, Tris HCl 10 mM, pH 7,4, y DTT 1mM) y se extrajeron con un volumen igual de fenol. Las proteínas presentes en la fase orgánica se precipitaron con cinco volúmenes de solución amortiguadora de pH al acetato de amonio (acetato de amonio 0,1 M disuelto en metanol) y se lavaron tres veces con acetona al 80%. El gránulo seco se resuspendió en solución amortiguadora de pH de rehidratación (urea 7 M, tiourea 2M, solución

000047

amortiguadora de pH IPG al 0,5% (3-10), CHAPS al 4%, Tris HCl 40 mM, pH 8,8, y azul bromofenol al 0,002%) y se centrifugaron para eliminar el material insoluble. Las proteínas se adsorbieron sobre un DryStrip Immobiline™, pH3-10, 11 cm (GE Healthcare, Uppsala, Suecia). La rehidratación y el enfoque isoeléctrico (IEF) se llevaron a cabo usando el sistema IPGfor (GE Healthcare) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Luego del IEF, las tiras de IPG se equilibraron en solución amortiguadora de pH de equilibrio (urea 6 M, SDS al 2%, Tris HCl 0,375 M, pH 8,8, glicerol al 20%, azul bromofenol al 0,002%) más de 20 mg/ml de DTT durante 15 min, y luego con solución amortiguadora de pH de equilibrio más 25 mg/ml de yodoacetamida durante otros 15 min. Las tiras de IPG equilibradas se colocaron sobre minigeles de SDS-PAGE al 12% (BioRad). El gel 2D-PAGE se tiñó con nitrato de plata usando el conjunto de elementos de tinción con plata (GE Healthcare).

En ambos casos, y luego de la electroforesis, los geles se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (GE Healthcare). Las transferencias se sondearon con los sueros (1:200) de perros infectados con *L. infantum* individualmente (SDS-PAGE) o como una combinación (2D-PAGE). Como anticuerpo secundario, se utilizó anti-perro-IgG conjugado con peroxidasa de rábano picante (1:2.000) que se adquirió de Nordic Immunological Laboratories (Tilburg, Países Bajos).

Análisis estadístico. En todas las comparaciones de datos se probó la significancia usando la prueba *t* de Student no apareada; los valores $P < 0,05$ se consideraron estadísticamente significativos.

RESULTADOS

Antigenicidad del LRP de *L. infantum* durante la infección canina.

000048

Para analizar la antigenicidad del LRP durante la infección canina, los sueros de 10 perros infectados naturalmente con *L. infantum* se incubaron con una membrana de nitrocelulosa que contenía los extractos de LRP de dicho parásito. Los sueros de todos los animales infectados reconocieron dicha fracción de proteína purificada de parásitos (Figura 1A, calles 4-13). Los sueros de perros sanos fueron negativos o algunos polipéptidos resultaron teñidos débilmente en el preparado ribosómico en bruto (Figura 1A, calles 1-3). La mayoría de los sueros de animales con CVL reconocieron una gran cantidad de bandas de proteínas aunque la complejidad e intensidad del patrón de reconocimiento fue diferente entre los sueros de perros individuales. A pesar de la variabilidad observada, se observaron dos regiones inmunodominantes en la transferencia Western: polipéptidos de 45-36 kDa y 25-22 kDa, respectivamente.

Para analizar con mayor detalle el patrón de proteínas que se reconocieron, el extracto de LRP se separó por 2D-PAGE de alta resolución. Como se muestra en la Figura 1B, el panel derecho los geles preparados con cargas preparativas de proteína (20 µg) mostró buena resolución con solo una mínima aparición de bandas para las proteínas más básicas (Figura 1, panel izquierdo). Cuando se incubó un gel 2D-PAGE con una combinación de los mismos sueros que se emplearon antes se detectó la presencia de 20 manchas antigénicas (Figura 1B, panel derecho).

Comparación de LRP y SLA para el serodiagnóstico de la CVL. Para determinar si el extracto de LRP se puede considerar una herramienta valiosa para el serodiagnóstico de la CVL, los inventores analizaron la reactividad contra LRP y SLA de 127 muestras de suero canino. El primer grupo de sueros

000049

estuvo compuesto por 72 muestras de suero que se obtuvo de perros sintomáticos infectados con *L. infantum* (n= 28) o *L. chagasi* (n= 44). El segundo grupo estuvo formado por los sueros de 55 perros sanos. La Figura 2A muestra los valores de absorbancia de sueros con CVL sintomática y de control. Para ambos preparados de proteínas, las diferencias entre los sueros con CVL y de control fueron estadísticamente significativas ($P < 0,001$). Los espectros de los valores de absorbancia de LRP y SLA fueron diferentes, donde la reactividad de los sueros de animales con CVL contra SLA fue mayor (media = $1,79 \pm 0,64$) que la que se obtuvo para LRP (media = $0,90 \pm 0,63$). Como lo indica la desviación estándar (SD), se observó una alta variabilidad del valor de absorbancia de las muestras de suero individuales para ambos preparados antigénicos, aunque la SD fue mayor cuando se empleó SLA como antígeno. La reactividad de los sueros de animales sanos también fue mayor contra SLA (media = $0,38 \pm 0,13$) que contra LRP (media = $0,0954 \pm 0,047$). En las condiciones de ELISA indicadas en la sección de Materiales y Métodos, el valor de corte para ambos antígenos (definido como la media del valor de reactividad de los sueros de animales sanos más 3 SD) fue de 0,237 para LRP y 0,774 para SLA. Dichos valores de corte les permitieron a los inventores identificar sueros positivos y negativos y por lo tanto permitieron estimar los parámetros de rendimiento del ELISA (Tabla 1). Como LRP mostró un rendimiento similar (altos valores de sensibilidad y de especificidad) que SLA en ensayos ELISA se puede concluir que las proteínas ribosómicas de *Leishmania* son antígenos apropiados para el diagnóstico de la CVL sintomática.

Luego, se probaron los sueros de perros oligosintomáticos (n= 7) y

000050

asintomáticos ($n= 7$) (Figura 2B). De encontró que la reactividad contra LRP y SLA de los sueros de ambos grupos y el control sano fue estadísticamente significativa ($P < 0,001$). Aunque se empleó un número limitado de sueros, los datos que se obtuvieron indican que mientras que los sueros de perros oligosintomáticos reconocieron los preparados de LRP y SLA (100% sensibilidad), los sueros del 30 % de los perros asintomáticos (3/7) mostraron valores de absorbancia contra SLA mayores que el valor de corte (Figura 2B). Por otro lado, los sueros de todos los perros asintomáticos que se probaron mostraron valores de absorbancia contra LRP mayores que el valor de corte. Por lo tanto, los resultados de los inventores indican que se puede considerar que el uso de LRP es una buena herramienta para el serodiagnóstico de la CVL.

Reactividad cruzada de LRP y SLA. Como el LRP está compuesto de proteínas conservadas evolutivamente, los inventores analizaron las potenciales reacciones cruzadas de los extractos de LRP con los sueros de perros infectados con otros protozoarios unicelulares: *Toxoplasma gondii* ($n= 5$) y *Trypanosoma cruzi* ($n= 9$). En la Figura 3, se muestran los valores de reactividad de los sueros individuales para cada grupo contra LRP. Ninguno de los sueros de perros infectados con *T. gondii* (media = $0,1012 \pm 0,056$) ni *T. cruzi* (media = $0,101 \pm 0,06$) mostró una reactividad mayor que el corte definido por los sueros de animales sanos (véase lo anterior). Como control, se analizó la reactividad de los mismos sueros contra SLA. La reactividad media de dichos sueros contra SLA ($0,629 \pm 0,21$ para perros infectados con *T. gondii* y $0,99 \pm 0,29$ para perros infectados con *T. cruzi*) fue mayor que la observada contra LRP. La reactividad de algunos de ellos fue mayor que el valor de corte (1/5

000051

para perros infectados con *T. gondii* y 7/9 para perros infectados con *T. cruzi*).

También se estudió la reactividad de los sueros de perros vacunados con dos vacunas profilácticas contra *Leishmania* autorizadas en Brasil: Leishmune® (29) y Leishtec® (15) contra extractos de LRP y SLA. Los inventores descubrieron que el 22,2% (4/18) de los sueros de perros sanos vacunados con Leishmune® mostró valores de densidad óptica (O.D.) mayores que el corte cuando se utilizaron los extractos de LRP en los ensayos ELISA (Figura 3B). Cuando los mismos sueros se analizaron en ensayos ELISA basados en SLA, el 16,6% (3/18) de los sueros también estuvo sobre el corte (Figura 3B). Ninguno de los 23 sueros que se obtuvieron de perros vacunados con la vacuna Leishtec® mostró reactividad contra SLA. Solo uno de dichos sueros mostró reactividad contra LRP con un valor de O.D. cercano al corte definido por los sueros negativos de animales sanos de control analizados en la Figura 2A.

EXPOSICIÓN

Muchas proteínas intracelulares citoplasmáticas o nucleares de *Leishmania* como histonas, cisteína proteinasas o kinesina, han sido identificadas como antigénicas en Leishmaniasis visceral humana o canina (VL) (2, 13, 14, 30, 32, 35). En este trabajo los inventores muestran que las proteínas ribosómicas del parásito también son antigénicas durante la enfermedad CVL. Aunque se observó cierta variabilidad individual entre perros individuales, todos los sueros de perros sintomáticos mostraron reactividad contra algunos de constituyentes ribosómicos del parásito. Como la antigenicidad de las proteínas ribosómicas del parásito también se demostró en dos diferentes modelos en ratones de Leishmaniasis cutánea (22) los

000052

resultados de los inventores indican que los ribosomas del parásito interactúan con el sistema inmunitario de los huéspedes vertebrados durante las infecciones naturales y experimentales con *Leishmania*.

Las pruebas basadas en técnicas serológicas son los métodos más frecuentes para el diagnóstico de la Leishmaniasis visceral canina y humana (VL) debido a la fuerte respuesta humoral que acompaña la infección con especies viscerotrópicas de *Leishmania*. Al tomar en consideración la alta reactividad que se observó contra un extracto de proteínas de los ribosomas del parásito de los sueros de perros afectados por CVL, los inventores analizaron las propiedades para el diagnóstico de los extractos de LRP. Se emplearon proteínas ribosómicas del parásito como fuente de antígeno en los ensayos ELISA, porque esta técnica se considera una técnica precisa y sensible para la detección sistemática realizada sobre gran cantidad de muestras para el diagnóstico de la enfermedad VL (16, 33). Se realizó un análisis comparativo de los extractos de LRP con proteínas completas del parásito que se obtuvieron de lisados de promastigote porque el uso de ensayos ELISA basados en SLA en bruto usualmente mostró una alta sensibilidad para el diagnóstico de VL (5, 25, 33). Los valores de sensibilidad y especificidad de los extractos de LRP fueron similares a los que mostraron los SLA cuando se analizaron los sueros de animales sintomáticos y oligosintomáticos. Con LRP se obtuvo un leve aumento de la sensibilidad en comparación con SLA (100% y 96%, respectivamente) y solo uno de los sueros que se obtuvieron de perros sanos mostró un valor de absorbancia contra LRP mayor que el corte definido como la reactividad de los sueros de control. Por lo tanto, se puede concluir que el rendimiento para el diagnóstico de las pruebas

000053

ELISA basadas en LRP fue similar al que se obtuvo con el preparado de SLA en el diagnóstico de CVL sintomática u oligosintomática. Sin embargo, la detección de la enfermedad en perros asintomáticos puede ser crítica en estudios epidemiológicos para controlar la dispersión de la enfermedad entre los perros y también entre perros y humanos (3, 20). Como los ELISA basados en SLA no fueron capaces de detectar un gran porcentaje de casos asintomáticos de CVL (27, 31) los inventores analizaron la sensibilidad de los extractos de LRP en el diagnóstico de la CVL asintomática. Mientras que la mezcla de antígenos para LRP detectó a todos los casos asintomáticos (100%) el ensayo usando el preparado de SLA solo detectó aproximadamente un 30% de los casos. Aunque es necesaria una confirmación adicional de la reactividad contra LRP usando un número mayor de muestras oligosintomáticas y asintomáticas, los datos de los inventores indican que el LRP se puede emplear como un antígeno más sensible que SLA en el diagnóstico de todas las formas de la enfermedad CVL.

La especificidad de las pruebas ELISA usando SLA depende mayormente de la preparación del antígeno y se obtuvieron algunos resultados falsos positivos con los sueros que se obtuvieron de pacientes o perros con enfermedades co-endémicas tales como la enfermedad de Chagas, malaria, lepra o toxoplasmosis (16, 23, 31). Debido a dicha razón se emplearon individualmente como antígenos en ensayos ELISA las proteínas recombinantes de varios parásitos para desarrollar una prueba de diagnóstico más específica (24). Los ensayos ELISA comparativos generalmente revelaron mayor especificidad pero menor sensibilidad cuando se emplearon antígenos recombinantes individuales en vez de SLA en el diagnóstico de las

000054

enfermedades de Leishmaniasis visceral humana (25) o canina (31). Los menores valores de sensibilidad pueden estar relacionados con la variabilidad observada en la respuesta humoral heterogénea suscitada contra las proteínas del parásito en cada paciente o perro infectado. La combinación de antígenos no relacionados (31) o la producción de poli-proteínas que contienen varios antígenos del parásito (6, 36) puede mejorar adicionalmente el rendimiento de las pruebas ELISA. Como alternativa, se pueden emplear fracciones purificadas de parásitos que contienen diferentes antígenos de parásitos. Los resultados de los inventores demuestran que los extractos de LRP no son reconocidos por los sueros de perros infectados con *T. cruzi* ni con *T. gondii* mientras que algunos de dichos sueros mostraron una alta reactividad contra SLA.

También se debería mantener la especificidad del diagnóstico de la prueba cuando los sueros se obtengan de perros vacunados. Debido a la existencia de vacunas comerciales autorizadas (15, 29) sería deseable diferenciar a los perros infectados de los animales vacunados. Los resultados de los inventores muestran que aunque algunos de los animales vacunados con Leishmune® mostraron cierta reactividad contra LRP y ninguno de los animales vacunados con Leishtec® lo hizo, tomados en conjunto los resultados que se presentan aquí demuestran que los extractos de LRP se pueden considerar una interesante alternativa para utilizar en el diagnóstico por ELISA de la CVL y principalmente de los animales asintomáticos para estudios epidemiológicos en áreas endémicas.

TABLA 1. Sensibilidad y especificidad de ensayos ELISA usando LRP y SLA para el serodiagnóstico de CVL sintomática

	LRP	SLA
Sensibilidad ^a	100% (0/72)	96% (3/72)
Especificidad ^b	98,2% (1/56)	100% (0/56)
PVP ^c	98,6%	100%
PVN ^d	100%	94,9%

^a La sensibilidad se calculó con la ecuación:

$$[(\text{positivos verdaderos}/(\text{positivos verdaderos} + \text{negativos falsos}) \times 100].$$

Se indica el número de negativos falsos.

^b La especificidad se calculó de la ecuación:

$$[(\text{negativos verdaderos}/(\text{negativos verdaderos} + \text{positivos falsos}) \times 100].$$

Se indica el número de positivos falsos.

^c PVP. Valor predictivo de los positivos calculados con la ecuación:

$$[(\text{positivos verdaderos}/(\text{positivos verdaderos} + \text{positivos falsos}) \times 100].$$

^d La sensibilidad se calculó con la ecuación:

$$[(\text{negativos verdaderos}/(\text{negativos verdaderos} + \text{negativos verdaderos}) \times 100].$$

000056

REFERENCIAS

1. **Alvar, J., C. Canavate, R. Molina, J. Moreno, y J. Nieto.** 2004. Canine leishmaniasis. *Adv Parasitol* **57**:1-88.
2. **Badaro, R., D. Benson, M. C. Eulalio, M. Freire, S. Cunha, E. M. Netto, D. Pedral-Sampaio, C. Madureira, J. M. Burns, R. L. Houghton, J. R. David, y S. G. Reed.** 1996. rK39: a cloned antigen of *Leishmania chagasi* that predicts active visceral leishmaniasis. *J Infect Dis* **173**:758-61.
3. **Baneth, G., A. F. Koutinas, L. Solano-Gallego, P. Bourdeau, y L. Ferrer.** 2008. Canine leishmaniosis - new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. *Trends Parasitol* **24**:324-30.
4. **Barbiéri, C. L.** 2006. Immunology of canine leishmaniasis. *Parasite Immunol* **28**:329-37.
5. **Barbosa-De-Deus, R., M. L. Dos Mares-Guia, A. Z. Nunes, K. M. Costa, R. G. Junqueira, W. Mayrink, O. Genaro, y C. A. Tavares.** 2002. *Leishmania* major-like antigen for specific and sensitive serodiagnosis of human and canine visceral leishmaniasis. *Clin Diagn Lab Immunol* **9**:1361-6.
6. **Boarino, A., A. Scalone, L. Gradoni, E. Ferroglio, F. Vitale, R. Zanatta, M. G. Giuffrida, y S. Rosati.** 2005. Development of recombinant chimeric antigen expressing immunodominant B epitopes of *Leishmania infantum* for serodiagnosis of visceral leishmaniasis. *Clin Diagn Lab Immunol* **12**:647-53.
7. **Bradford, M. M.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**:248-54.
8. **Cabrera, G. P., V. O. Da Silva, R. T. Da Costa, A. B. Reis, W.**

000057

Mayrink, O. Genaro, y C. B. Palatnik-de-Sousa. 1999. The fucose-mannose ligand-ELISA in the diagnosis and prognosis of canine visceral leishmaniasis in Brazil. *Am J Trop Med Hyg* **61**:296-301.

9. **Cardoso, L., H. D. Schallig, F. Neto, N. Kroon, y M. Rodrigues.** 2004. Serological survey of *Leishmania* infection in dogs from the municipality of Peso da Regua (Alto Douro, Portugal) using the direct agglutination test (DAT) and fast agglutination screening test (FAST). *Acta Trop* **91**:95-100.

10. **Carvalho, F. A., H. Charest, C. A. Tavares, G. Matlashewski, E. P. Valente, A. Rabello, R. T. Gazzinelli, y A. P. Fernandes.** 2002. Diagnosis of American visceral leishmaniasis in humans and dogs using the recombinant *Leishmania donovani* A2 antigen. *Diagn Microbiol Infect Dis* **43**:289-95.

11. **Ciaramella, P., G. Oliva, R. D. Luna, L. Gradoni, R. Ambrosio, L. Cortese, A. Scalone, y A. Persechino.** 1997. A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. *Vet Rec* **141**:539-43.

12. **Coelho, E. A., C. A. Tavares, F. A. Carvalho, K. F. Chaves, K. N. Teixeira, R. C. Rodrigues, H. Charest, G. Matlashewski, R. T. Gazzinelli, y A. P. Fernandes.** 2003. Immune responses induced by the *Leishmania* (*Leishmania*) *donovani* A2 antigen, but not by the LACK antigen, are protective against experimental *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* infection. *Infect Immun* **71**:3988-94.

13. **Chang, K. P., y B. S. McGwire.** 2002. Molecular determinants and regulation of *Leishmania* virulence. *Kinetoplastid Biol Dis* **1**:1.

14. **Chang, K. P., S. G. Reed, B. S. McGwire, y L. Soong.** 2003. *Leishmania* model for microbial virulence: the relevance of parasite

000058

multiplication and pathoantigenicity. *Acta Trop* **85**:375-90.

15. **Fernandes, A. P., M. M. Costa, E. A. Coelho, M. S. Michalick, E. de Freitas, M. N. Melo, W. Luiz Tafuri, M. Resende Dde, V. Hermont, F. Abrantes Cde, y R. T. Gazzinelli.** 2008. Protective immunity against challenge with *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi* in beagle dogs vaccinated with recombinant A2 protein. *Vaccine* **26**:5888-95.

16. **Ferreira Ede, C., M. de Lana, M. Carneiro, A. B. Reis, D. V. Paes, E. S. da Silva, H. Schallig, y C. M. Gontijo.** 2007. Comparison of serological assays for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in animals presenting different clinical manifestations. *Vet Parasitol* **146**:235-41.

17. **Ferreira, W. A., W. Mayrink, M. L. dos Mares-Guia, y C. A. Tavares.** 2003. Detection and characterization of leishmania antigens from an American cutaneous leishmaniasis vaccine for diagnosis of visceral leishmaniasis. *Diagn Microbiol Infect Dis* **45**:35-43.

18. **Garcia-Alonso, M., C. G. Nieto, A. Blanco, J. M. Requena, C. Alonso, y I. Navarrete.** 1996. Presence of antibodies in the aqueous humour and cerebrospinal fluid during *Leishmania* infections in dogs. Pathological features at the central nervous system. *Parasite Immunol* **18**:539-46.

19. **Goto, Y., R. F. Howard, A. Bhatia, J. Trigo, M. Nakatani, E. M. Netto, y S. G. Reed.** 2009. Distinct antigen recognition pattern during zoonotic visceral leishmaniasis in humans and dogs. *Vet Parasitol* **160**:215-20.

20. **Gramiccia, M., y L. Gradoni.** 2005. The current status of zoonotic leishmaniases and approaches to disease control. *Int J Parasitol* **35**:1169-80.

21. **Herwaldt, B. L.** 1999. Leishmaniasis. *Lancet* **354**:1191-9.

22. **Iborra, S., N. Parody, D. R. Abanades, P. Bonay, D. Prates, F. O.**

000059

Novais, M. Barral-Netto, C. Alonso, y M. Soto. 2008. Vaccination with the *Leishmania* major ribosomal proteins plus CpG oligodeoxynucleotides induces protection against experimental cutaneous leishmaniasis in mice. *Microbes Infect* **10**:1133-41.

23. **Kar, K.** 1995. Serodiagnosis of leishmaniasis. *Crit Rev Microbiol* **21**:123-52.

24. **Kubar, J., y K. Fragaki.** 2005. Recombinant DNA-derived *leishmania* proteins: from the laboratory to the field. *Lancet Infect Dis* **5**:107-14.

25. **Maalej, I. A., M. Chenik, H. Louzir, A. Ben Salah, C. Bahloul, F. Amri, y K. Dellagi.** 2003. Comparative evaluation of ELISAs based on ten recombinant or purified *Leishmania* antigens for the serodiagnosis of Mediterranean visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* **68**:312-20.

26. **Mauricio, I. L., J. R. Stothard, y M. A. Miles.** 2000. The strange case of *Leishmania chagasi*. *Parasitol Today* **16**:188-9.

27. **Miro, G., L. Cardoso, M. G. Pennisi, G. Oliva, y G. Baneth.** 2008. Canine leishmaniosis--new concepts and insights on an expanding zoonosis: part two. *Trends Parasitol* **24**:371-7.

28. **Nieto, G. G., I. Navarrete, M. A. Habela, F. Serrano, y E. Redondo.** 1992. Pathological changes in kidneys of dogs with natural *Leishmania* infection. *Vet Parasitol* **45**:33-47.

29. **Palatnik-de-Sousa, C. B.** 2008. Vaccines for leishmaniasis in the fore coming 25 years. *Vaccine* **26**:1709-24.

30. **Pollock, K. G., K. S. McNeil, J. C. Mottram, R. E. Lyons, J. M. Brewer, P. Scott, G. H. Coombs, y J. Alexander.** 2003. The *Leishmania mexicana* cysteine protease, CPB2.8, induces potent Th2 responses. *J*

000060

Immunol 170:1746-53.

31. Porrozzì, R., M. V. Santos da Costa, A. Teva, A. Falqueto, A. L. Ferreira, C. D. dos Santos, A. P. Fernandes, R. T. Gazzinelli, A. Campos-Neto, y G. Grimaldi, Jr. 2007. Comparative evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays based on crude and recombinant leishmanial antigens for serodiagnosis of symptomatic and asymptomatic *Leishmania infantum* visceral infections in dogs. Clin Vaccine Immunol 14:544-8.

32. Rafati, S., A. Nakhaee, T. Taheri, A. Ghashghaie, A. H. Salmanian, M. Jimenez, M. Mohebbi, S. Masina, y N. Fasel. 2003. Expression of cysteine proteinase type I and II of *Leishmania infantum* and their recognition by sera during canine and human visceral leishmaniasis. Exp Parasitol 103:143-51.

33. Reed, S. G., W. G. Shreffler, J. M. Burns, Jr., J. M. Scott, G. Orge Mda, H. W. Ghalib, M. Siddig, y R. Badaro. 1990. An improved serodiagnostic procedure for visceral leishmaniasis. Am J Trop Med Hyg 43:632-9.

34. Reis, A. B., A. Teixeira-Carvalho, A. M. Vale, M. J. Marques, R. C. Giunchetti, W. Mayrink, L. L. Guerra, R. A. Andrade, R. Correa-Oliveira, y O. A. Martins-Filho. 2006. Isotype patterns of immunoglobulins: hallmarks for clinical status and tissue parasite density in Brazilian dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi*. Vet Immunol Immunopathol 112:102-16.

35. Requena, J. M., C. Alonso, y M. Soto. 2000. Evolutionarily conserved proteins as prominent immunogens during *Leishmania* infections. Parasitol Today 16:246-50.

36. Soto, M., J. M. Requena, L. Quijada, y C. Alonso. 1998. Multicomponent chimeric antigen for serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. J Clin Microbiol 36:58-63.

000061

REIVINDICACIONES

1. Uso de un extracto de proteínas ribosómicas (RPE) CARACTERIZADO PORQUE es para diagnosticar una parasitosis en un sujeto.

2. Uso de acuerdo con la reivindicación 1, CARACTERIZADO PORQUE el RPE comprende por lo menos dos proteínas ribosómicas y/o por lo menos dos antígenos de una proteína ribosómica y/o por lo menos dos fragmentos de proteína de una proteína ribosómica.

3. Uso de acuerdo con la reivindicación 2, CARACTERIZADO PORQUE el fragmento de proteína es un fragmento que comprende por lo menos 2, 3, 5, 7, 10, 15, 20, 25, 30 o más aminoácidos contiguos de una proteína ribosómica correspondiente.

4. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, CARACTERIZADO PORQUE el RPE no comprende o no consiste en un epítopo originado en el antígeno ribosómico ácido LcPo de *Leishmania chagasi* según se divulga en EP 824 699, representado por SEQ ID NO:1, donde más preferiblemente, el RPE no comprende o no consiste en los 17 aminoácidos situados en el C terminal de LcPo: aminoácidos 306-322 de LcPo representados por SEQ ID NO:1.

5. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, CARACTERIZADO PORQUE el extracto de proteínas ribosómicas se puede obtener llevando a cabo los siguientes pasos usando una célula del parásito que causa una parasitosis cuando está presente en un sujeto:

a. mezclar una célula del parásito con una solución amortiguadora de pH de lisis,

000062

b. centrifugar la mezcla que se obtuvo para obtener un extracto citosólico,

c. preparar el extracto de proteínas ribosómicas a partir del extracto citosólico que se obtuvo.

6. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, CARACTERIZADO PORQUE el extracto de proteínas ribosómicas se obtiene de una especie de *Leishmania*, preferiblemente *Leishmania major*.

7. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, CARACTERIZADO PORQUE la parasitosis es Leishmaniasis o malaria.

8. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, CARACTERIZADO PORQUE la parasitosis es causada por una *Leishmania* o por una especie de *Plasmodium*.

9. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, CARACTERIZADO PORQUE la parasitosis es causada por una especie diferente de las especies de las cuales se deriva el extracto de proteínas ribosómicas.

10. Un método para diagnosticar una parasitosis en un sujeto usando RPE según se lo identifica en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, CARACTERIZADO PORQUE el método comprende determinar en una muestra que se obtuvo del sujeto si está presente un anticuerpo que reconoce al RPE.

11. Un ensayo para diagnosticar una parasitosis en un sujeto, CARACTERIZADO PORQUE el ensayo comprende RPE.

12. Un ensayo de acuerdo con la reivindicación 11, CARACTERIZADO PORQUE el ensayo es un ELISA.

000063

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Laboratorios LETI S.L.

<120> Diagnóstico de una parasitosis tal como la
Leishmaniasis

usando un extracto de proteínas ribosómicas (RPE)

<130> P6026586PCT

<150> EP 09165282.6

<151> 2009-07-13

<150> US 61/267,214

<151> 2009-12-09

<160> 1

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 322

<212> PRT

<213> Leishmaniasis chagasi

000064

<400> 1

Met Pro Ser Ile Thr Thr Ala Lys Arg Glu Tyr Glu Glu Arg Leu
Val

1 5 10 15

Asp Cys Leu Thr Lys Tyr Ser Cys Val Leu Phe Val Gly Met Asp
Asn

 20 25 30

Val Arg Ser Gln Gln Val His Asp Val Arg Arg Gly Cys Arg Gly
Lys

 35 40 45

Ala Glu Phe Ile Met Gly Lys Lys Thr Leu Gln Ala Lys Ile Val
Glu

 50 55 60

Lys Arg Ala Gln Ala Lys Asp Ala Ser Pro Glu Ala Lys Pro Phe
Asn

65 70 75

000065

80

Asp Gln Cys Glu Glu Tyr Asn Leu Leu Ser Gly Asn Thr Gly Leu
Ile

85

90

95

Phe Thr Asn Asn Ala Val Gln Glu Ile Thr Ser Val Leu Asp Gly
His

100

105

110

Arg Val Lys Ala Pro Ala Arg Val Gly Ala Ile Pro Cys Asp Val
Val

115

120

125

Val Pro Ala Gly Ser Thr Gly Met Glu Pro Thr Gln Thr Ser Phe
Phe

130

135

140

Gln Ala Leu Asn Ile Ala Thr Lys Ile Ala Lys Gly Met Val Glu
Ile

000066

145	150	155
160		

Val Thr Glu Lys Lys Val Leu Ser Val Gly Asp Lys Val Asp Asn
Ser

165 170 175

Thr Ala Thr Leu Leu Gln Lys Leu Asn Ile Ser Pro Phe Tyr Tyr
Gln

180 185 190

Val Asn Val Leu Ser Val Trp Asp Arg Gly Val Leu Phe Thr Arg
Glu

195 ; 200 205

Asp Leu Met Met Thr Glu Asp Met Val Glu Lys Met Leu Met Glu
Gly

210 215 220

Leu Ser Asn Val Ala Ala Met Ala Leu Gly Ala Gly Ile Pro Thr

000067

Ser

225

230

235

240

Ser Thr Ile Gly Pro Met Leu Val Asp Ala Phe Lys Asn Leu Leu
Ala

245

250

255

Val Ser Val Ala Thr Ser Tyr Glu Phe Glu Glu His Asn Gly Lys
Glu

260

265

270

Leu Arg Glu Ala Ala Ile Asn Gly Leu Leu Ala Gly Ser Gly Ser
Ala

275

280

285

Ala Ala Glu Pro Ala Ala Ala Ala Pro Ala Ala Pro Ser Ala Ala
Ala

290

295

300

000068

Lys Glu Glu Pro Glu Glu Ser Asp Glu Asp Asp Phe Gly Met Gly

Gly

305

310

315

320

Leu Phe

000069

Fig 1a

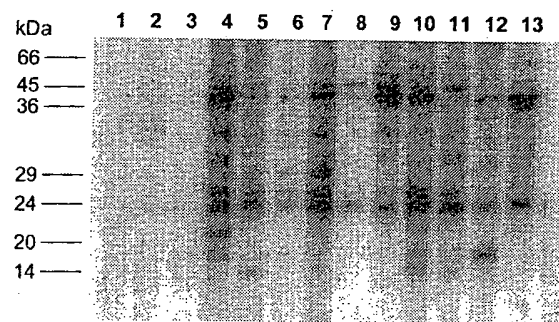


Fig 1b

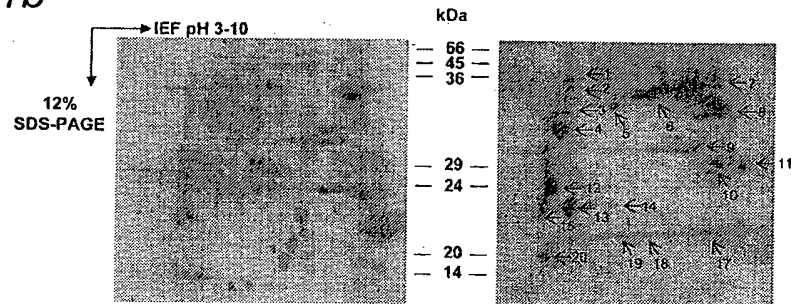


Fig 2a

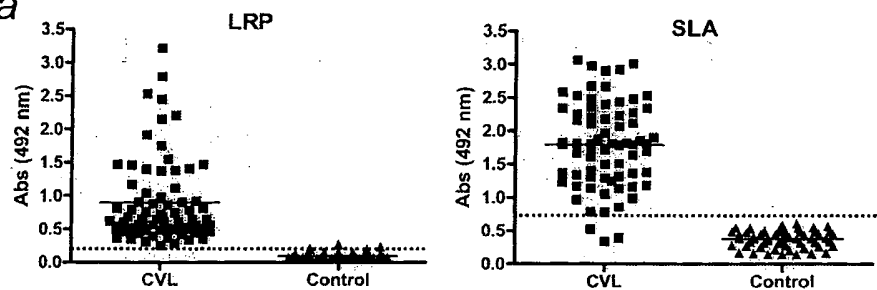
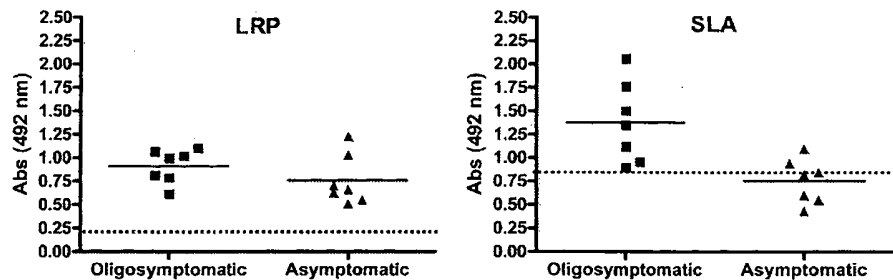


Fig 2b



000071

Fig 3a

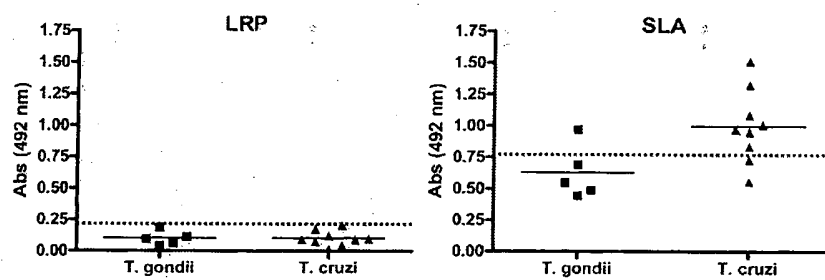
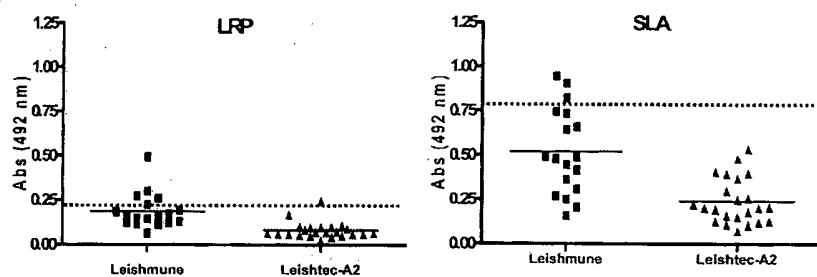


Fig 3b



000072



(43) International Publication Date
20 January 2011 (20.01.2011)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2011/006891 A1

(51) International Patent Classification:
G01N 33/569 (2006.01) C07K 14/44 (2006.01)

(74) Agent: VAN WESTENBRUGGE, Andre; J.W. Friso-
laan 13, NL-2517 JS The Hague (NL).

(21) International Application Number:
PCT/EP2010/060058

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of national protection available): AE, AG, AL, AM,
AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ,
CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO,
DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT,
HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP,
KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD,
ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI,
NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD,
SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR,
TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(22) International Filing Date:
13 July 2010 (13.07.2010)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
09165282.6 13 July 2009 (13.07.2009) EP
61/267,214 7 December 2009 (07.12.2009) US

(71) Applicant (for all designated States except US): LABO-
RATORIOS LETI, S.L. [ES/ES]; c/ del Sol 5, Poligono
Industrial Norte, ES-28760 Tres Cantos Madrid (ES).

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH,
GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG,
ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,
TM), European (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK,
EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU,
LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK,
SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,
GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): ÁLVAREZ,
Manuel Soto [ES/ES]; Av/ Bélgica 85 2º-A., ES-28916
Madrid (ES). RAMÍREZ GARCÍA, Laura [ES/ES];
Carrero Juan Ramón 16 4º-B, ES-28025 Madrid (ES).
COELHO, Eduardo Antonio Ferraz [BR/BR]; Univer-
sidade Federal de Minas Gerais., Av Antonio Carlos, 6627-
Pampulha, CEP:31.270-901 Belo Horizonte (BR). BE-
DATE, Carlos Alonso [ES/ES]; Alberto Aguilera 21,
ES-28015 Madrid (ES).

Published:

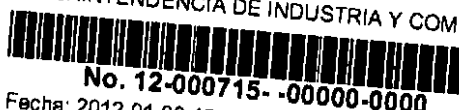
- with international search report (Art. 21(3))
- with sequence listing part of description (Rule 5.2(a))

WO 2011/006891 A1

(54) Title: DIAGNOSIS OF A PARASITIC DISEASE SUCH AS LEISHMANIASIS USING RIBOSOMAL PROTEIN EX-
TRACT (RPE)

(57) Abstract: The invention relates to a diagnosis method for Leishmaniasis using a RPE.

000073



No. 12-000715-00000-0000

Fecha: 2012-01-03 15:08:24
Tra. 11 PATENTE IYII
Act. 411 PRESENTACION

Dep. 2020 DIR. NUEVAS CR
Eve: 378 FASE NACIONAL I
Folios: 73

PATENTE DE INVENCION ☐

MODELO DE

☐
☐
☐
☐
☐

Indicación que se solicita una patente.

Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud

Descripción de la invención

Dibujos de ser estos pertinentes

Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)

Completa ☐

Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCION PCT ☒

MODELO DE UTILIDAD PCT ☐

Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

☒
☒
☒
☒

Indicación que se solicita una PCT

Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)

Dibujos de ser estos pertinentes

Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)

Completa ☒

Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(Art. 119 Decisión 486/00)

☐
☐
☐
☐

Indicación que se solicita Diseño industrial

Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud

Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño

Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa ☐

Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

(Art. 92 Decisión 486/00)

☐
☐
☐
☐

Indicación que se solicita un esquema de trazado

Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud

Representación gráfica de un esquema de trazado

Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa ☐

Incompleta ☐