



No. 12-000715- -00008-0000

Fecha: 2015-05-27 14:58:47 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 444 RESPUESTAREQUE Folios: 17

Clarke, Modet & C^u

COLOMBIA

P-3197

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

E. S. D.

Re: Expediente No. **12-000.715**Solicitud de patente a nombre de **LABORATORIOS LETI- S.L.**

Yo, CAROLINA DAZA MONTALVO identificada como aparece al pie de mi firma, domiciliada en la Carrera 11 No. 86-53, piso 6, obrando como apoderada de conformidad con la sustitución de poder otorgada a mi favor por la apoderada principal y que se acompaña en el presente escrito, de la sociedad **LABORATORIOS LETI- S.L.**, domiciliada en Madrid, España, en respuesta al oficio No. **2040** notificado por fijación en lista el 3 de marzo de 2015, relacionado con concepto técnico de fondo, me permito manifestar lo siguiente:

1. Con fundamento en la facultad que confiere el artículo 34 de la Decisión 486 al solicitante para modificar la solicitud de patente en cualquier momento del trámite, presento junto con este memorial, un nuevo pliego reivindicatorio que consta de 7 reivindicaciones en total, en donde se introdujo la materia reportada en la reivindicación 2 en la nueva reivindicación 1, en un esfuerzo por acelerar el trámite.

Adicionalmente se informa, que el capítulo descriptivo fue modificado, en vista de que presentaba unas mínimas inconsistencias, con respecto a la distinción entre la solución amortiguadora A y B, en donde ésta última había sido erróneamente identificada, en la página 3, línea 10 y en la página 22, líneas 11 y 12, en donde se debe la corrección (ver anexo). De este modo, se desea dejar claro, que las dos soluciones amortiguadoras con las que trabaja la presente invención son:

Solución amortiguadora A: Solución amortiguadora lisis que comprende un detergente no-iónico, utilizada para lisis de células en el comienzo del proceso.

1 1/17

Clarke, Modet & C^o

COLOMBIA

Solución amortiguadora B: Es una solución amortiguadora resuspendida que no comprende un detergente no-iónico y que es utilizado para resuspender el gránulo ribosomal y llevar a cabo el gradiente de sucrosa discontinuo.

2. Claridad

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

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

2.1 Su Despacho ha objetado a la reivindicación 1, por el hecho de definir al ensayo reclamado en términos de las etapas de purificación previas al ensayo per sé, lo que no permite identificar al ensayo en cuestión. Adicionalmente se menciona una célula de parásito, pero no se identifica su estructura. En dicho respecto se informa que ésta reivindicación ha sido modificada respondiendo a cada una de dichas observaciones. De este modo, se ha especificado el tipo de ensayo que se desea reclamar, siendo éste el ensayo ELISA, que anteriormente lo reportaba la reivindicación 2, se indicó el tipo de célula parasitaria que se emplea en la obtención del extracto de proteína ribosomal, siendo ésta del tipo protozoaria. Por otro lado, se redefinieron las etapas que conforman al ensayo reivindicado, a partir de las cuales es posible ejecutar de principio a fin, el procedimiento mediante el cual se pueda determinar respuestas inmunes a la parasitosis.

Por último y en referencia a la objeción del señor Examinador que indica que se debe caracterizar a la proteína empleada por su número de secuencia de aminoácidos, se informa primero que todo que dicha observación carece de todo sustento y lógica, dado que la presente invención **no se dirige a una proteína ribosómica particular, sino que por lo contrario, se dirige a un extracto que comprende al menos dos componentes, los cuales a su vez pueden comprender una multitud de otros componentes.**

En este respecto cabe señalar que una persona del oficio versada en la materia, al seguir el procedimiento señalado en esta nueva reivindicación 1, sabría a priori que el método en cuestión trabaja con una mezcla que comprende múltiples proteínas ribosómicas o fragmentos de las mismas, (ver Figura 1b, del capítulo descriptivo de la presente solicitud). En este respecto se desea informarle

Clarke, Modet & C^o

COLOMBIA

al señor Examinador, que existen aproximadamente 70 tipos de proteínas ribosómicas, lo que implica que es casi imposible, que el extracto de proteína ribosomal que se reclama en esta solicitud, pueda ser definido por estructuras moleculares determinadas o secuencias de aminoácidos específicas. Lo anterior, igualmente aplica a las objeciones hechas a las reivindicaciones 3 y 4.

Con el ánimo de demostrar que en efecto a partir del método reclamado es posible obtener el producto deseado (RPE), se adjunta a esta respuesta, un ensayo experimental, en donde se especifican algunas de las proteínas ribosómicas empleadas, como lo son la PO, L3, L5, S4 y S6 y el extracto obtenido también ha sido especificado, al determinar que éste no comprende proteínas nucleares, tales como la H2 o proteínas citosólicas, como la beta-tubulina.

2.2 Su Despacho ha objetado a la reivindicación 5, por el hecho de indicar que el extracto de proteína ribosomal proviene de una *Leishmania mayor*, lo cual carece de completo sustento en el capítulo descriptivo de la presente solicitud. En dicho respecto manifestamos nuestro completo desacuerdo, ya que contrario a lo que el Examinador afirma, la *Leishmania mayor* es mencionada múltiples veces a lo largo de dicho capítulo descriptivo, como por ejemplo “*en una realización de preferencia, un RPE es obtenido a partir de especies de Leishmania, preferiblemente Leishmania mayor*” (ver página 6, capítulo descriptivo). De esta manera es evidente que en efecto sí hay soporte para la materia reportada en la reivindicación 5 y por consiguiente esta objeción se debe ver superada.

2.3 Por último, su Despacho ha objetado a las reivindicaciones 6 a 8, porque reportan a la enfermedad parasitaria y al agente causal, lo cual no corresponde a características técnicas esenciales del método reclamado. En dicho respecto, mi mandante manifiesta su completo desacuerdo, en vista de que se le recuerda al señor Examinador que en la reivindicación 1, claramente se indica que el extracto de proteína ribosomal (RPE) se deriva de una célula de parásito protozoario, cuando está presente en un sujeto. Es así, como una persona del oficio versada en la materia, conoce los tipos de parásitos que generan dichas enfermedades o cuáles enfermedades son generadas por determinados parásitos. En consecuencia, se considera necesario limitar la enfermedad o las células parasitarias, con el fin de limitar el alcance de la invención. Con base en lo anterior, se considera que esta objeción se ve superada.

De este modo se ha respondido a cada una de las observaciones hechas por falta de claridad, por tanto, las nuevas reivindicaciones 1 a 7 cumplen a cabalidad con este requisito.

3. Observaciones con respecto a la falta de Nivel Inventivo

El artículo 18 de la Decisión 486 señala lo siguiente:

Artículo 18.- Se considerará que una invención tiene nivel inventivo, si para una persona del oficio normalmente versada en la materia técnica correspondiente, esa invención no hubiese resultado obvia ni se hubiese derivado de manera evidente del estado de la técnica.

Una invención se considerará inventiva si la misma no hubiese resultado obvia a partir del arte previo para una persona del oficio normalmente versada en la materia. Esto a su vez implica que el Examinador a cargo de esta evaluación debe colocarse en el momento exacto en el que el inventor buscaba resolver el problema técnico contemplado en la solicitud y para el cual poseía la literatura y el conocimiento disponibles en dicho momento.

De acuerdo al análisis realizado por el señor Examinador en este respecto, se tiene que la reivindicación 1 y sus dependientes, carecen de nivel inventivo, en vista de la combinación de las enseñanzas de los documentos **D1: WO9633414** y **D2: US6613337**. En dicho respecto se presentan a continuación los siguientes argumentos que desvirtuarán dicha afirmación.

En primera medida se procede a analizar las enseñanzas de los documentos citados por el señor Examinador, con el fin de tener el suficiente sustento para demostrar que el estado previo de la técnica no consigue afectar la altura inventiva de la invención.

El documento D1, hace referencia a compuestos y métodos para diagnosticar infección por Leishmania, divulga un polipéptido antigénico homogenizado que comprende un epítipo de un homólogo de *Leishmania chagasi* de la familia P-proteína ribosomal ácida eucariota (LcPO). Sin embargo sólo se enseña una única proteína ribosómica (LcPO). Pese a ello, D1 no menciona ni sugiere el extracto de proteína ribosomal (RPE) tal y como se define en la reivindicación 1 de la solicitud, tal y como se muestra en la Figura 1b, ni mucho menos su aplicación en el ensayo ELISA.

Clarke, Modet & C^o

COLOMBIA

D2 por su parte, divulga métodos y composiciones para el tratamiento, prevención y detección de Leishmaniasis y para la estimulación de respuestas inmunes en pacientes, utilizando polipéptidos homogenizados e individuales que contienen porción(es) inmunogénica(s) de antígenos de Leishmania. Sin embargo, esta anterioridad no menciona ni sugiere el RPE reclamado en esta solicitud, tal y como se muestra en la Figura 1b e igualmente, su aplicación en el ensayo ELISA.

A pesar de lo anterior, el Examinador indica que la diferencia que separa a la invención de D1, es que la primera presenta una etapa adicional de centrifugación y por tanto, el problema técnico objetivo que la presente solicitud desea resolver es “Cómo proporcionar un ensayo alternativo que produzca RPE?”. No obstante, cabe recordar en este punto, que ni D1 ni D2 divulgan extractos de proteína ribosomal, ni mucho menos hacen referencia al ensayo que sí pretende reclamar la presente solicitud. Adicionalmente, el objetivo de dicho ensayo no es producir RPE, sino por lo contrario, determinar si una respuesta inmune está presente en una muestra de un sujeto. Es así como se desea dejar claro, que el RPE que se enuncia en el capítulo reivindicatorio de la presente solicitud, es simplemente un reactivo que participa en el método reclamado.

Con base en lo anterior, se deduce que las conclusiones a las que llega el señor Examinador, se basan en asumir que cualquier método que involucre moléculas antigénicas, purificadas, aisladas e individuales, son entonces relativos a la materia que se pretende proteger. Tal y como se discutió en la sección anterior, dicha conclusión a la que se llega no es posible, dado que la presente invención no emplea un único antígeno, por lo contrario, emplea un extracto de proteína ribosomal que se caracteriza por comprender múltiples antígenos, que en otras palabras significa, que es un extracto que comprende múltiples proteínas ribosómicas.

Es así como se afirma, que ni D1 ni D2 divulgan el uso de una mezcla de proteínas ribosómicas, tal y como se pueden encontrar en un extracto de proteína ribosomal. En este sentido, mi mandante desea resaltar las ventajas que presenta el uso de un RPE sobre el uso de una única proteína, las cuales se mencionan en el capítulo descriptivo de la presente solicitud, de la siguiente manera:

“el uso de RPE en un método de diagnóstico de la invención, en vez del uso de una sola proteína determinada, es bastante atractivo, dado que RPE contiene un gran número de

Clarke, Modet & C^o

COLOMBIA

antígenos distintos. Cada uno de estos antígenos, pueden diagnosticar potencialmente la presencia de una respuesta inmune en un sujeto. Adicionalmente, hay sujetos que responden al antígeno A y no a un antígeno B y viceversa. Por lo tanto, un RPE, tal y como es utilizado en la presente invención, se intenta utilizar en una gran muestra de la población de sujetos, desde que contiene un gran número de antígenos distintos”. (página 6, capítulo descriptivo de la presente solicitud).

La Figura 2, confirma esta ventaja al evidenciar que una respuesta inmune, puede ser detectada en muestras obtenidas de sujetos oligosintomáticos o asintomáticos. Más adelante se hace referencia a la aplicación de dicho RPE:

“..un ensayo ELISA, que se basa en antígenos de Leishmania solubles (SLA), ya han sido desarrollados (27,31). Sin embargo, este ensayo a base de SLA, no es lo suficientemente específico para diagnosticar Leishmaniasis asintomática. En adición, el suero de los sujetos que tienen otras enfermedades parasitarias, diferentes a Leishmaniasis, resultaría en una reacción falsa-positiva con este ensayo a base de SLA. De esta manera, aun existe la necesidad de mejorar el método de diagnóstico de una enfermedad parasitaria, tal y como lo es la Leishmaniasis, el cual no presenta dichos inconvenientes, como los otros métodos”.

Con base en lo anterior, se puede establecer, que el verdadero problema técnico objetivo a resolver por la presente solicitud es “cómo proporcionar un ensayo más robusto y específico, que permita determinar una respuesta inmune a la parasitosis, aún cuando los sujetos son asintomáticos?”. Como se puede apreciar, este problema de hecho sí es resuelto por esta solicitud, a partir del empleo de RPE, lo cual no sucede a partir de las enseñanzas de D1 o D2, ya que allí no existe alguna señal o motivación, que lleve a una persona del oficio versada en la materia, a emplear un extracto de proteína ribosomal, en vez de una sola proteína. De este modo, se tiene que los ensayos que se mencionan tanto en D1 como en D2, no son tan robustos y específicos, como sí lo es el reivindicado.

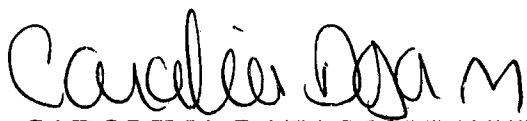
Siendo así las cosas, se considera que se ha demostrado, a partir de argumentos técnico-teóricos, la razón por la cual la combinación de las enseñanzas de D1 y D2, no consiguen derivar de manera obvia, la materia que pretende proteger la presente solicitud, por ende, ésta sí es inventiva sobre el estado previo de la técnica y en consecuencia, se le solicita amablemente a este Despacho, tener en consideración el nuevo pliego reivindicatorio que se presenta en esta oportunidad, en conjunto con los argumentos que se exponen en la misma, para así confirmar por sí mismo la patentabilidad de esta solicitud y proceder con su concesión.

4. Conclusiones

Habiendo atendido cabalmente las objeciones presentadas por ese despacho, atentamente solicitamos se conceda el privilegio de patente de invención a la solicitud en estudio o si el señor examinador considera que subsisten razones para objetar la presente invención, rogamos expedir otro examen de fondo con los debidos motivos y razones que sustenten su objeción con el fin de que nuestro mandante tenga la posibilidad de exponer sus argumentos con base en la interpretación de los artículos 45 de la Decisión 486 -el cual otorga la facultad al examinador para emitir los exámenes de fondo-, 35 y 59 del Código Contencioso Administrativo que señala que: *“habiéndose dado oportunidad a los interesados para expresar sus opiniones, y con base en las pruebas e informes disponibles, se tomará la decisión que será motivada al menos en forma sumaria si afecta a particulares”* y *“(.) deberá proferirse la decisión definitiva. Esta se motivará en sus aspectos de hecho y de derecho, y en los de conveniencia si es el caso”*, respectivamente (El subrayado es nuestro).

En consecuencia, solicitamos a ese despacho pronunciarse en relación con todos los argumentos presentados en este memorial dando estricta aplicación al principio del debido proceso consagrado en el artículo 29 de la Constitución Nacional

Señor Superintendente,


CAROLINA DAZA MONTALVO

C.C. 66.783.790 de Palmira Valle

T.P 141563 del CSJ

notificaciones@clarkemodet.com.co

Clarke, Modet & Cº

COLOMBIA

P-3197

Señores

SUPERINTENDENTE DE INDUSTRIA Y COMERCIO

E.

S.

D.

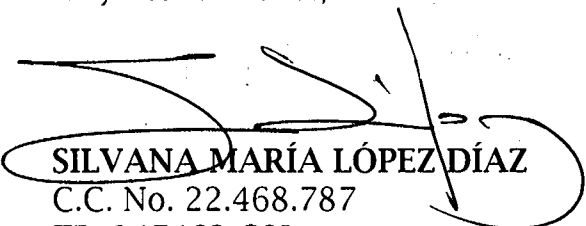
Re: Expediente No. 12.000.715

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

RESPUESTA ACCIÓN OFICIAL

Yo, **SILVANA MARÍA LÓPEZ DÍAZ**, identificada como aparece al pie de mi firma, domiciliada en Bogotá, atentamente informo a usted que sustituyo el poder con que obro, a la doctora **CAROLINA DAZA MONTALVO**, domiciliada en Bogotá, identificada con la Cédula de Ciudadanía No.66.783.790 de Palmira Valle y portadora de la tarjeta profesional No.TP-141563 del CSJ, con las mismas facultades que me fueron conferidas para este caso.

Muy atentamente,



SILVANA MARÍA LÓPEZ DÍAZ

C.C. No. 22.468.787

TP- 147463 CSJ

Acepto sustitución



CAROLINA DAZA MONTALVO

C.C. 66.783.790 de Palmira Valle

TP-141563 CSJ

PRESENTACION PERSONAL

NOTARIA
11

El anterior escrito fue presentado ante el Notario 11 del Círculo de Bogotá personalmente por SILVANA MARIA LOPEZ DIAZ quien exhibió CC N° 22.468.787 de BARRANQUILLA y Tarjeta Profesional de Abogado No.147463 del C.S.J.c y declaró que el contenido del mismo es cierto. Bogotá D.C. 30/04/2015



[Handwritten signature]

[Faint, illegible text]

[Faint, illegible text]

[Faint, illegible text]

ANEXO 1

- Nuevo capítulo reivindicatorio compuesto por 7 reivindicaciones.
- Capítulo Descriptivo modificado (ver versión digital, CD).
- Ensayo Experimental

P-3197
Reiv. Modificadas
27/05/2015

REIVINDICACIONES

1. Un ensayo ELISA que comprende un extracto de proteína ribosomal (RPE), en donde dicho RPE comprende al menos dos proteínas ribosomales y/o al menos dos antígenos de una proteína ribosomal y/o al menos dos fragmentos de proteína de una proteína ribosomal, y en donde el extracto de proteína ribosomal se obtiene al realizar los siguientes pasos, utilizando una célula de parásito protozoario que causa una enfermedad parasitaria cuando está presente en un sujeto:

- (a). mezclar dicha célula de parásito protozoario con una solución amortiguadora lisis;
- (b). centrifugar la mezcla obtenida para obtener un extracto citosólico;
- (c). centrifugar el extracto citosólico para producir gránulos ribosomales;
- (d). resuspender los gránulos ribosomales; y
- (e). centrifugar los gránulos ribosomales a través de un gradiente de sucrosa discontinuo; y

En donde dicho ensayo comprende determinar si una respuesta inmune está presente en una muestra que se deriva del sujeto.

2. Un ensayo de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el fragmento de proteína es un fragmento que comprende al menos 2, 3, 5, 7, 10, 15, 20, 25, 30 o más aminoácidos contiguos de una proteína ribosomal correspondiente.

3. Un ensayo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en donde el RPE no consiste de un epítipo originado del antígeno ribosomal ácido LcPo de *Leishmania chagasi* representado por SEQ ID NO: 1 y el RPE tampoco consiste de 17 aminoácidos situados en el terminal C de LcPo: aminoácidos 306-322 de LcPo representado por SEQ ID NO: 1.

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

5. Un ensayo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde dicha enfermedad parasitaria es leishmaniasis o malaria.

6. Un ensayo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde dicha enfermedad parasitaria es causada por especies de *Leishmania* o por especies *Plasmodium*.

7. Un ensayo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la enfermedad parasitaria es causada por diferentes especies a aquellas de donde se deriva el extracto de proteína ribosomal.

P-3197
Ensayo Experimental
27/05/2015

PREPARACIÓN DE EXTRACTOS DE PROTEÍNA RIBOSOMAL *LEISHMANIA*

Autores: Manuel Soto, Marta Román y Jerónimo Carnés
Barcelona_Laboratorios Leti SL
(01.12.2011)

Objetivo

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

Protocolo

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

Para la preparación de RPE de *L. mayor* o *L. infantum*, se recolectaron 10^9 promastigotes por centrifugación, se lavaron dos veces en PBS enfriados y resuspendidos en 1 ml de una solución amortiguadora lisis NP40 (10 mM Tris-HCl, pH 8, 150 mM NaCl, 1.5 mM MgCl₂ y 0.5% Nonidet P 40 (NP40 – Roche Diagnostics, GmbH, Mannheim, Alemania)), suplementada con inhibidores de proteasa (1 mM de fenilmetilsulfonilfluoruro (PMSF), leupeptina 8 µg/ml, aprotinina 4 µg/ml y pepstatina 8 µg/ml) y pipetado 10 veces hacia arriba y hacia abajo, con el fin de romper las membranas plasmáticas. Después de la lisis, las muestras son microfugadas a 3,000 veces por gramo, por 2 minutos a 4 °C, en orden de granular el núcleo. Una muestra del núcleo fue preparado por un análisis del tipo SDS PAGE (ver Figura 2). Supernadantes (fracciones citosólicas) fueron microfugadas dos veces a 13000 veces por gramo, durante 15 minutos a 4 °C, con el propósito de precipitar la fracción mitocondrial. El extracto ribosomal fue preparado tal y como se describe en [1], a partir de supernadante citosólico, sometiénolo a una centrifugación de alta velocidad a 90,000 rpm, durante 30 minutos a 4 °C en un rotor Beckman TL100.3. El supernadante que contiene proteínas ribosomales no solubles, fue preparado mediante un análisis SDS-PAGE (Figura 2). El gránulo crudo ribosomal fue resuspendido en una solución amortiguadora A (20 mM Tris-HCl, pH 7.4, 500 mM AcNH₄, 100 mM MgCl₂, 5 mM β mercaptoetanol) y centrifugado a través de un gradiente de sucrosa discontinuo (20/40%) en una solución amortiguadora A, a 90,000 rpm a 4 °C en un rotor Beckman TL100.3. El gránulo de ribosomas lavados fue resuspendido en PBS, sometido hasta que la degradación del ARN ribosomal se ha completado y almacenado a -70 °C. Antes de congelar, una muestra de ribosomas fue preparada por el análisis SDS-PAGE (Figura 2) y dos geles de poliacrilamida dimensional (2D PAGE) (Figura 3).

A

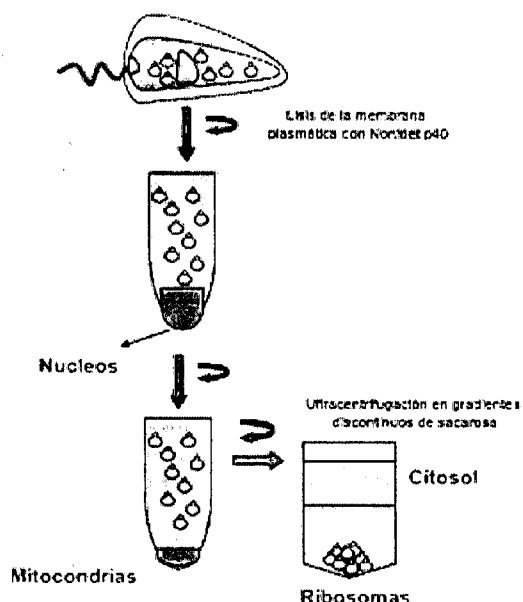


Figura 1. Esquema de la preparación de proteínas ribosomales *Leishmania*

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

A

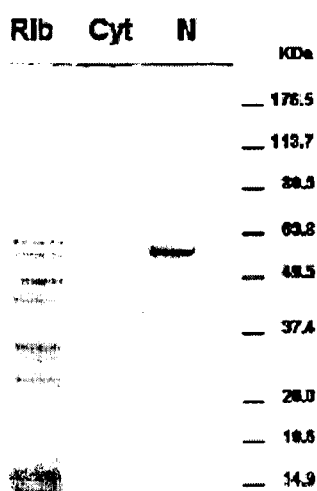


Figura 2. Extractos nucleares de *Leishmania mayor* (N), proteínas no-ribosomales citosólicas (Cyt) y proteínas ribosomales (Rib) fueron electroforadas utilizando el gradiente SDS-PAGE 10-14% lineal.

17

Para electrofóresis de gel de poliacrámida bi-dimensional (2D-PAGE), extractos de proteína ribosomal L. mayor, fueron disueltos en 200 µl de una solución amortiguadora lisis (0.5% de Nonidet P40, 1 mM de EDTA, pH 8.0, 0.1 mM PMSF, 10 mM de Tris HCl, pH 7.4 y 1 mM DTT) y extraídos con un volumen igual de fenol. Las proteínas presentes en la fase orgánica fueron precipitadas con cinco volúmenes de una solución amortiguadora de acetato de amonio (0.1 M de acetato de amonio disuelto en metanol) y lavado tres veces con 80% de acetona. El gránulo seco fue solubilizado en una solución amortiguadora de rehidratación (7 M urea, 2 M tiourea, 0.5% solución amortiguadora IPG (3-10), 4% CHAPS, 40 mM Tris HCl, pH 8.8 y 0.002% de bromofenol azul) y centrifugar para remover el material insoluble. Las proteínas fueron adsorbidas en Immobiline™ Drystrip, pH 3-10, 11 cm. El enfoque isoeléctrico y de rehidratación (IEF), fue realizado utilizando un sistema IPGphor. Después del IEF, las tiras de IPG fueron equilibradas en uan solución amortiguadora equilibrada (6 M urea, 2% SDS, 0.375 M Tris HCl, pH 8.8, 20% glicerol, 0.002% bromofenol azul), más 20 mg/ml DTT por 15 minutos y después con una solución amortiguadora equilibrada más 25 mg/ml de yodoacetamida por otros 15 minutos. Las tiras de IPG equilibradas fueron colocadas en 12% de minigeles SDS-PAGE (BioRad). Los geles 2D fueron teñidos con nitrato de plata utilizando un kit de teñido con plata (GE Healthcare) (ver Figura 3).

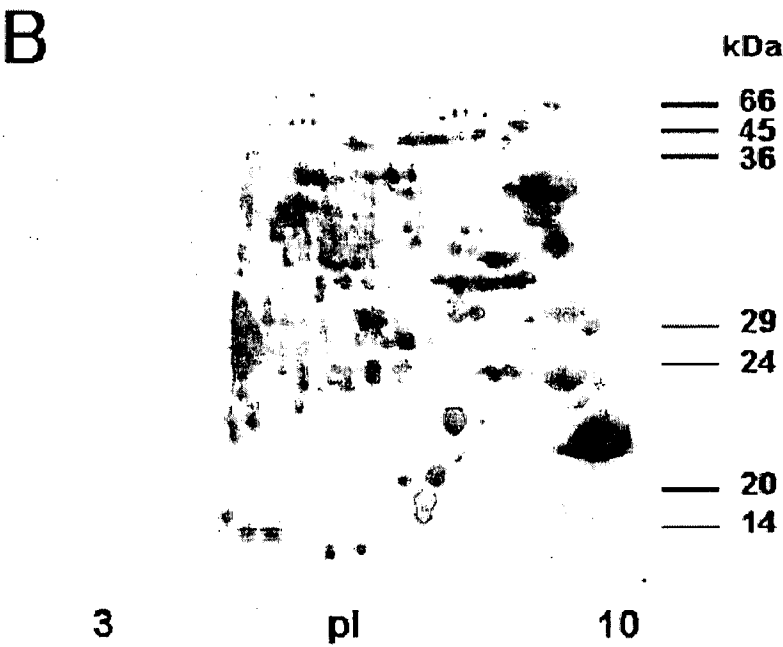


Figura 3. 2D PAGE de proteínas ribosomales L. mayor. Se muestra El gel teñido representativo com plata.

Análisis

1. Análisis de pureza

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

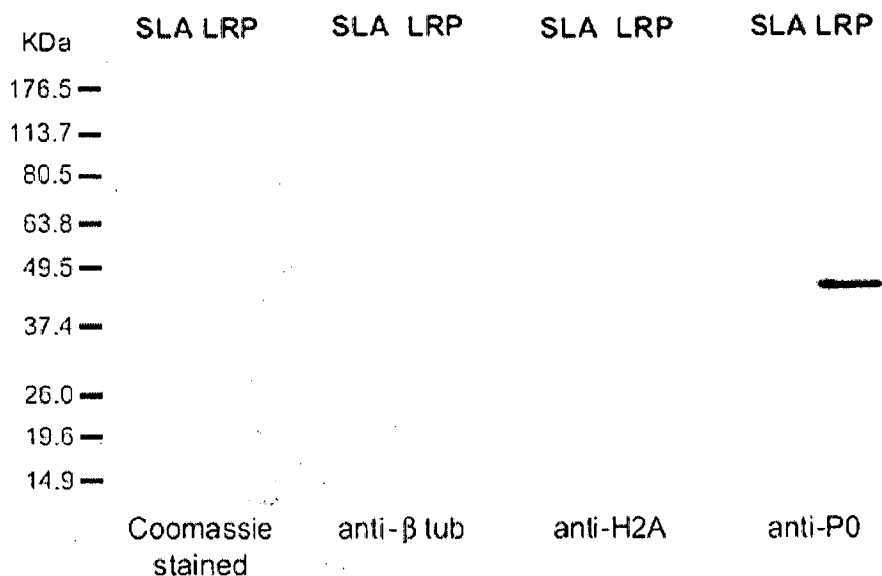


Figura 4. Pureza de la fracción ribosomal. L.mayor y LRP fueron electroforisadas en un gradiente SDS-PAGE lineal 10-14%, transferido en manchas de nitrocelulosa y encubados con anti β-tubulina, anti L.infantum H2A y anti L. infantum anticuerpos específicos de proteína ribosomal P0.

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

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

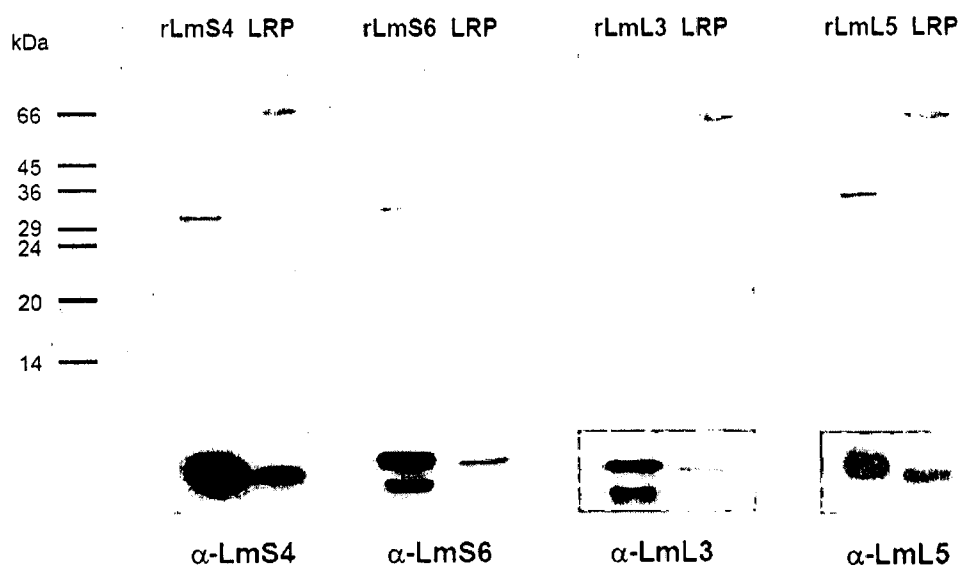


Figura 5. Extractos de proteína ribosomal (LRP) y proteínas recombinantes ribosomales protectoras (LmS4, LmS6, LmL3 y LmL5) han sido analizadas con SDS PAGE, transferidas a una membrana y analizadas por Western Blot contra suero de ratón inmunizado con cada una de las proteínas recombinantes protectoras.

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

Conclusiones

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

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

Referencias

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

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	TESTIGO DOCUMENTAL	Folio: <u>17</u>
--	---------------------------	------------------

Dependencia Jerárquica: DELG. PROPIEDAD INDUSTRIAL	Código 2020
Dependencia Productora: GRUPO DE NUEVAS CREACIONES	Código 2020
Tipo de Radicación: Entrada: ☒ Salida: ☐ Traslado: ☐ Convenio: ☐	
Radicator:	

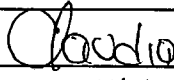
DESCRIPCIÓN DE LA PRUEBA	
Nombre de la Serie / Subserie:	Código:
Expediente: 12-715-8	Solicitante / Quejoso / Demandante / otros.
Prueba excluida: cd	
N°. de Pruebas excluidas: 1	
Fecha de emisión de la Prueba:	

UBICACIÓN DE LA PRUEBA EN LA SECCIÓN DE MATERIAL GRÁFICO	
N°. de bloque:	Otras especificaciones:
N°. de rodante:	
N°. de estante:	
N°. de archivador:	
N°. de entrepaño:	
N°. de gaveta:	
N°. de caja:	

IMPORTANTE:

- El material gráfico **o especial** que se encuentra **dentro o anexo a** las unidades documentales o expedientes, debe extraerse y llevarse a aquella sección del archivo que se haya dispuesto para conservar documentos en distintos formatos.
- Entiéndase por material gráfico todos aquellos dibujos, croquis, mapas, planos, fotografías, ilustraciones, pictografías, códigos, prensa, objetos tridimensionales, entre otros.

Observaciones: El cd contiene: 1 archivo en formato pdf, procesado y cargado al sistema.	Unidad de Conservación ☐ Bolsa ☐ Caja ☐ Libro ☐ Sobre ☐ Tomo ☐ Otro Soporte Documental ☒ CD ☐ Disquete ☐ DVD ☐ Folleto ☐ Periódico ☐ Plano ☐ Publicación Periódica ☐ USB ☐ Otro
---	--


 Claudio

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.

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.

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 a 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.

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 lizará 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.

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 B 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

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

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*.

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.

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

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

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

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

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

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

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

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 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 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 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 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 *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 ultrasonificación (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 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 $3.000 \times g$ durante 2 min a 4 °C para obtener gránulos de los núcleos. El sobrenadante se microcentrifugó dos veces a $13.000 \times g$ 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 B (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 B 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, onicogrifosis, 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, 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 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 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.

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 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 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 ($1/5$ 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 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 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 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:

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

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.**

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

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 leishmaniasis 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.**

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, C. 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*

Immunol **170**:1746-53.

31. **Porrozzi, 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. Ghashghaii, 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.

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

<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

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

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

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

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

305

310

315

320

Leu Phe