



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 356 394**

51 Int. Cl.:
G01N 33/53 (2006.01)
C07K 14/435 (2006.01)
C12N 9/64 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07730937 .5**
96 Fecha de presentación : **07.02.2007**
97 Número de publicación de la solicitud: **1987357**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **05.11.2008**

54 Título: **Polipéptidos reconocidos por anticuerpos anti-*Trichinella* y sus aplicaciones.**

30 Prioridad: **07.02.2006 FR 06 01058**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
07.04.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
07.04.2011

73 Titular/es:
Institute National de la Recherche Agronomique
147, rue de l'Université
75007 Paris, FR
Agence Française de Sécurité Sanitaire des
Aliments,
Jilin University y
Agence Nationale Chargée de la Sécurité Sanitaire
de l'Alimentation, de l'Environnement et du Travail

72 Inventor/es: **Liu, Mingyuan;**
Bahuon, Celine;
Le Guerhier, Franck;
Vallee, Isabelle;
Fu, Baoquan;
Le Rhun, Danielle;
Hernandez Bello, Romel;
Wu, Xiuping y
Boireau, Pascal

74 Agente: **Martín Santos, Victoria Sofía**

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

DESCRIPCIÓN

Polipéptidos reconocidos por anticuerpos anti-*Trichinella* y sus aplicaciones.

5 La presente invención se refiere a la utilización de nuevos antígenos identificados en el parásito *Trichinella* en el marco del diagnóstico y de la prevención de la triquinelosis.

La triquinelosis es una zoonosis asociada al consumo de carne infestada por el parásito *Trichinella* (MURRELL *et al.*, 2000).

10 Este nematodo de la clase *Adenophorea* pertenece a la familia *Trichinellidae* la cual comprende 8 especies y 3 genotipos emparentados en 2 grupos filogenéticamente distintos: por un lado las triquinas encapsuladas (*T. spiralis*; *T. nativa*; *T. britovi*; *T. murrelli*; *T. nelsoni*) que infestan a mamíferos, y por otro lado las triquinas no encapsuladas (*T. pseudospiralis*; *T. papuae*; *T. zimbabwensis*) que infestan a mamíferos, aves y reptiles (GASSER *et al.*, 2004). Todas estas especies pueden infestar al ser humano.

El ciclo biológico del parásito es auto-heteroxeno: se desarrolla completamente en un mismo huésped que es sucesivamente huésped definitivo (portador de parásitos adultos) y huésped intermedio (portador de larvas infestantes) (BOIREAU *et al.*, 2002). El paso de las larvas infestantes de un huésped a otro es necesario para la realización de un nuevo ciclo. Este paso se realiza mediante ingestión de carne cruda o poco cocida contaminada por las larvas. Durante la digestión, éstas son liberadas, y penetran en el epitelio intestinal donde mudarán a gusanos adultos (Ad) sexuados. Las hembras fecundadas expulsan a continuación las larvas L1 NeoNatas (L1NN) que alcanzan los músculos estriados a través de la circulación linfática y sanguínea. Estas larvas L1NN penetran en las células musculares (estadio de desarrollo infestante L1M: Larva L1 Muscular) a las que provocan la desdiferenciación en células nutricias rodeadas por una gruesa cápsula de colágeno protectora, en el caso de triquinas encapsuladas, y muy fina en el caso de las triquinas llamadas no encapsuladas.

Mientras que la triquinelosis es asintomática en el animal, la infestación humana se traduce, durante la fase intestinal inicial, en diarreas asociadas a náuseas, vómitos y violentos dolores abdominales, mientras que los síntomas vinculados a la fase de invasión muscular se caracterizan por la asociación de fiebre, edema facial y mialgias (CAPO & DESPOMMIER, 1996). Ataques oculares, pulmonares, gastrointestinales, cardíacos y neurológicos pueden completar este cuadro clínico de la triquinelosis cuya evolución puede ser mortal. El carácter crónico de la infestación, marcado por la persistencia de dolores musculares en los pacientes, está asociado a la supervivencia del parásito dentro de la célula nutricia.

El tratamiento específico de las triquinelosis humanas con antihelmínticos es tanto más eficaz en cuanto el diagnóstico de la infestación se realiza precozmente para permitir una acción contra todos los estadios parasitarios y sobre todo antes de la formación de la cápsula protectora de colágeno alrededor de las larvas L1M (FOURESTIE *et al.*, 1988).

Los datos epidemiológicos han demostrado una distribución geográfica del parásito en todas las latitudes asociada a un modo de transmisión que implica muchas especies de la fauna salvaje que mantienen también un ciclo de infestación doméstica representado principalmente por el cerdo (DUPOUY-CAMET, 2000).

Las epidemias de triquinelosis humana, zoonosis emergente o re-emergente, constituyen un auténtico problema de salud pública en el mundo debido a los hábitos alimentarios y a controles sanitarios no siempre eficaces (MURRELL & POZIO, 2000). Estas epidemias implican esencialmente carne de cerdo y de jabalí, así como de caballo (BOIREAU *et al.*, 2000).

La prevención de la contaminación humana pasa, por lo tanto, por una cocción en el centro de la carne y la mejora de las condiciones de cría y/o de control de las triquinelosis animales (cerdo, caballo, jabalí y otras especies animales salvajes sensibles a *Trichinella*) (BOIREAU *et al.*, 2002).

Las técnicas de cribado de la triquinelosis se dividen en dos categorías: 1) la detección directa de las larvas L1M, mediante triquinoscopia (observación microscópica de un fragmento de carne), o después de la digestión artificial de muestras de músculos, y 2) la detección indirecta mediante diferentes métodos inmunológicos, que permiten detectar anticuerpos dirigidos contra los antígenos de *Trichinella*.

A cada uno de los estadios de desarrollo del parásito: adulto (Ad), larva neonatal (L1NN), y larva muscular (L1M), le corresponde un perfil antigénico particular.

Son las preparaciones antigénicas obtenidas de larvas del estadio L1M las que se utilizan actualmente para el inmunodiagnóstico. En efecto, las fracciones antigénicas de los dos estadios precoces Ad y L1NN son difíciles de purificar, y hasta ahora no se habían podido identificar antígenos inmunodominantes asociados a uno y/o a otro de estos dos estadios.

Se utilizan principalmente preparaciones de antígeno total soluble, obtenidas mediante lisis de las larvas, centrifugado del lisado, y recuperación del sobrenadante o, más frecuentemente, antígenos de excreción/secreción (antígenos E/S).

ES 2 356 394 T3

Los antígenos de excreción-secreción son producidos durante la puesta de las larvas L1M en condiciones de supervivencia en un medio de cultivo; éstos proceden de un órgano particular, denominado el esticosoma, que está constituido por una cincuentena de células discoidales, los esticocitos. Los esticocitos contienen gránulos cuyo contenido es evacuado por un canalículo en la luz del esófago del parásito. Este contenido es muy antigénico, constituye una parte de los antígenos de excreción secreción. Estos antígenos forman una mezcla compleja de proteínas, que contiene particularmente un grupo de glucoproteínas (denominadas antígenos TSL1) que portan una molécula glucídica particular, conocida únicamente en *Trichinella* y presente en todas las especies de este parásito, la beta-tivelosa.

Las preparaciones de antígenos de excreción-secreción que se utilizan actualmente como referencia en materia de inmunodiagnóstico de la triquinosis se obtienen a partir de medio de cultivo de larvas L1M de *Trichinella spiralis*. Después de 18 a 20 horas de cultivo, el medio se recupera por filtración, y a continuación se concentra (GAMBLE *et al.*, 1983; GAMBLE *et al.*, 1988).

Las preparaciones de antígeno total soluble tienen, como principal inconveniente, su falta de especificidad. Frecuentemente se observan reacciones antigénicas cruzadas con otras parasitosis. Los antígenos de excreción-secreción permiten obtener una mejor especificidad. Sin embargo, en los dos casos, resulta difícil producir en gran cantidad lotes estandarizados de antígeno.

Las secuencias de ADN que codifican el antígeno E/S, y sus utilizaciones para producir antígenos útiles para el diagnóstico o la vacunación contra la infección por *T. spiralis*, se divulgan en la patente US5422263.

Los antígenos de *Trichinella* y sus epítomos inmunodominantes son revisados por Boireau *et al.*, MULTIDISCIPLINARITY FOR PARASITES, VECTORS AND PARASITIC DISEASES, VOL 1 MEDIMOND PUBLISHING CO, VIA RUBBIANI 6/2, 40124 BOLONIA, ITALIA, páginas 181-188; 2004.

La estructura sacarídica que contiene beta-tivelosa, que representa un epítomo inmunodominante de las preparaciones de antígeno E/S (REASON *et al.*, 1994; Patentes US 5541075 y 5707817) se sintetizó químicamente, y se ha propuesto su utilización para el inmunodiagnóstico de *Trichinella*.

Este reactivo presenta una buena especificidad, pero su sensibilidad parece más reducida que la de las preparaciones de antígeno E/S. Además, la síntesis de esta estructura por vía química sigue siendo costosa y pesada de realizar.

Otro problema que se plantea en el marco del diagnóstico serológico de *Trichinella* es la existencia de una “ventana ciega” de detección que corresponde a los estadios precoces de la infestación, lo que se traduce en resultados falsos negativos. Además, en el caballo, se ha observado una desaparición progresiva de los anticuerpos 25 semanas después de la infestación.

Los inventores intentaron identificar antígenos inmunodominantes asociados a los estadios precoces de la infestación por *Trichinella*, y utilizables para el diagnóstico serológico de la triquinosis, para proporcionar medios de obtención de una detección precoz, específica, y sensible de las infestaciones con *Trichinella*, tanto en el ser humano como en animales. Con este fin, los inventores investigaron si existía, entre los productos de los genes expresados por *Trichinella* en el estadio L1NN y/o en el estadio Ad, proteínas que poseyeran las propiedades antigénicas deseadas.

En este marco, descubrieron que una proteína de *Trichinella spiralis*, que forma parte de las proteínas expresadas específicamente en el estadio L1NN en este organismo, constituía un antígeno inmunodominante, que permite una detección precoz de la respuesta humoral dirigida contra *Trichinella* y que se conservaba además entre diferentes especies de *Trichinella*.

Esta proteína se denominará en lo sucesivo en este documento NBL1. La secuencia completa de ADNc que codifica esta proteína, así como la secuencia polipeptídica que se deduce de ella son accesibles respectivamente en el Genbank con los números AF331160 y AAK16520 (alias Swissprot Q9BJL7); estas secuencias están anotadas como “serina proteasa SS2, específica de las larvas neonatas”. Estas secuencias también son reproducidas respectivamente en el listado de secuencias en el anexo con los números SEC ID N° 1 y SEC ID N° 2. Una secuencia parcial de ADNc que codifica esta proteína, así como la secuencia polipeptídica que de ella se deduce son accesibles respectivamente en el Genbank con los números EY491941 y AAR36900 (alias Swissprot Q6RUJ3).

Los inventores han demostrado además que la inmunorreactividad asociada a la respuesta humoral dirigida contra NBL1 estaba localizada en la parte C-terminal de esta proteína, e identificaron un epítomo inmunodominante responsable de esta reactividad.

Por otro lado, los inventores identificaron, a partir de un banco de ADNc de los estadios precoces mezclados Ad+L1NN de *T. spiralis* un nuevo gen, denominado en lo sucesivo en este documento 411.

La secuencia de este gen se representa en el listado de secuencias en el anexo con el número SEC ID N° 3, y la de su producto de traducción con el número SEC ID N° 4. Este producto de traducción de este gen está emparentado (78,7% de identidad) con un antígeno E/S, denominado proteína Tp21-3, identificado en *T. pseudospiralis* (AAF79206; NAGANO *et al.*, 2001), así como con el producto de traducción del ORF 17.20 hipotético de *T. spiralis* (AAB48489), con el que presenta el 86,6% de identidad.

ES 2 356 394 T3

Los polipéptidos b) definidos anteriormente, a excepción de los identificados con los números de entrada al Gen-Bank AAF79206 y AAB48489 forman parte, como tales, del objeto de la presente invención. Los polipéptidos preferidos son, particularmente, el polipéptido de secuencia SEC ID N° 4, o el polipéptido correspondiente a los aminoácidos 25-175 de la secuencia SEC ID N° 4, así como los polipéptidos que presentan al menos el 90%, o preferiblemente al menos el 95% de identidad con la secuencia SEC ID N° 4, o con la secuencia de los aminoácidos 25-175 de la secuencia SEC ID N° 4. La presente invención engloba particularmente a los polipéptidos quiméricos que comprenden una o más copias de la secuencia PSSGSRPTYP (SEC ID N° 5), o de un fragmento del antígeno NBL1 que contiene esta secuencia y/o una o más copias de un polipéptido b) tal como se han definido anteriormente, eventualmente fusionados a una o más secuencias heterólogas diferentes.

La presente invención también tiene por objeto los polinucleótidos que codifican los polipéptidos de acuerdo con la invención, así como vectores recombinantes que comprenden dichos polinucleótidos, y células huésped transformadas por dichos vectores.

La presente invención también tiene por objeto una composición que comprende uno o más polipéptidos a) y uno o más polipéptidos b), tal como se han definido anteriormente, así como una composición que comprende uno o más polinucleótidos que codifican dichos polipéptidos.

Los polipéptidos a) y b) definidos anteriormente pueden utilizarse en el marco de diferentes métodos de detección de anticuerpos, que se conocen en sí mismos. Como ejemplos, se mencionarán particularmente los métodos de tipo ELISA (directo, indirecto o "sándwich"), los métodos de microaglutinación en perlas, así como los métodos de transferencia electroforética acoplada a un inmunomarcado.

La presente invención también tiene por objeto un kit para la detección de la presencia de anticuerpos anti-*Trichinella* en una muestra biológica, caracterizado por que comprende uno o más polipéptidos a) y/o uno o más polipéptidos b) tal como se han definido anteriormente, y, llegado el caso, tampones y reactivos apropiados para la constitución de un medio de reacción que permite la formación de un complejo antígeno/anticuerpo y, opcionalmente, medios de detección de dicho complejo antígeno/anticuerpo.

Ventajosamente, dicho kit comprende un polipéptido a) y/o un polipéptido b) tal como se han definido anteriormente, inmovilizados sobre un soporte sólido. Como ejemplos no limitantes de soportes sólidos utilizables, se mencionarán placas de microvaloración, perlas, micropérlas o micropartículas, bandas, etc....

Dicho kit también puede comprender muestras de referencia, tales como uno o más sueros negativos y uno o más sueros positivos.

La presente invención también tiene por objeto la utilización de un polipéptido a) o de un polipéptido b), tal como se han definido anteriormente, para la preparación de anticuerpos dirigidos específicamente contra dicho polipéptido.

Estos polipéptidos pueden utilizarse en el marco de diferentes métodos, conocidos en sí mismos, de preparación de anticuerpos. Éstos pueden utilizarse, por ejemplo, (eventualmente después de la adición de un adyuvante apropiado) para la inmunización de un animal. También pueden injertarse sobre un soporte de cromatografía de afinidad, para permitir purificar, a partir de un líquido biológico, los anticuerpos dirigidos específicamente contra el polipéptido en cuestión. El líquido biológico puede ser, por ejemplo, suero de un animal previamente inmunizado con el polipéptido en cuestión, o un sobrenadante de hibridoma; también puede tratarse del suero de un animal infestado por *Trichinella* a partir del que se desea aislar una sub-población de anticuerpos dirigidos específicamente contra el polipéptido en cuestión.

La presente invención también engloba cualquier anticuerpo dirigido específicamente contra un polipéptido a) o un polipéptido b) tal como se han definido anteriormente. Puede tratarse de anticuerpos policlonales o monoclonales. Los anticuerpos preferidos son aquellos que reconocen el epítipo PSSGSRPTYP (SEC ID N° 5).

Los anticuerpos dirigidos específicamente contra un polipéptido pueden obtenerse mediante diversas técnicas conocidas en sí mismas, y particularmente mediante los métodos convencionales que comprenden la inmunización de un animal con el polipéptido en cuestión (eventualmente con la adición de un adyuvante apropiado), y la recuperación de su suero (para la producción de anticuerpos policlonales), o de sus células linfocitarias (para la producción de anticuerpos monoclonales).

Los polipéptidos a) y b) definidos anteriormente, así como los polinucleótidos que codifican estos polipéptidos, pueden utilizarse para la preparación de composiciones inmunógenas, y particularmente de vacunas anti-*Trichinella*.

La presente invención también tiene por objeto una composición inmunógena, que comprende uno o más polipéptidos a) y/o uno o más polipéptidos b) tal como se han definido anteriormente, o uno o más polinucleótidos que codifican dichos polipéptidos, asociados a uno o más adyuvantes que permiten mejorar la respuesta inmunitaria.

De acuerdo con una realización preferida de una composición inmunógena de acuerdo con la invención, se trata de una vacuna.

ES 2 356 394 T3

Una gran variedad de adyuvantes que permiten aumentar la inmunogenicidad de los péptidos son conocidas en sí mismos por el especialista en la técnica: se mencionarán, como ejemplos de adyuvantes, la alúmina (hidróxido de aluminio), el adyuvante completo o incompleto de Freund (AIF), los liposomas, así como los virosomas (envueltas virales reconstituidas), los derivados peptídicos del ácido murámico, etc. En el caso de una vacuna, se seleccionará, por supuesto, un adyuvante farmacológicamente aceptable; como ejemplos de adyuvantes preferidos se mencionarán los adyuvantes de tipo emulsión “de agua en aceite”, por ejemplo los adyuvantes comercializados por la compañía SEPPIC con las denominaciones MONTANIDE ISA 70 y MONTANIDE ISA 775, y que también se describen en las Patentes EP 480 982, EP 825 875, US 5422109, US 6251407 y US 6610309.

Llegado el caso, particularmente en el caso de péptidos cortos (≤ 30 aminoácidos), dichos polipéptidos pueden acoplarse a una proteína portadora.

Como ejemplos de proteínas portadoras, se mencionará particularmente la KLH (*keyhole limpet hemocyanin* [hemocianina de lapa californiana]), la albúmina de suero bovino (BSA), ovoalbúmina, anatoxina tetánica o diftérica. También puede formarse una composición multiepitópica, asociando varias copias de un mismo péptido entre sí, y eventualmente con otros epítomos peptídicos, en forma de polipéptidos quiméricos, o por medio de una cadena polimérica, por ejemplo una polilisina.

Si se utiliza como inmunógeno un polinucleótido, la composición inmunógena puede presentarse en forma de un vector recombinante en el que se inserta(n) el(los) polinucleótido(s) a administrar. Pueden utilizarse, por ejemplo, vectores virales tales como poxvirus, adenovirus, retrovirus, lentivirus, herpesvirus, y AAV (*adeno-associated virus* [virus adenoasociado]), etc... También puede presentarse en forma de una bacteria no patógena, transformada por uno o más vectores de expresión que contienen dicho(s) polinucleótido(s). También se puede administrar directamente el(los) polinucleótido(s), en forma de ADN desnudo, o incorporarlo en liposomas. En el caso de una vacuna, se utilizará preferiblemente una bacteria no patógena (por ejemplo un lactobacilo, o una cepa no patógena de *Escherichia coli* o de *Salmonella suis*), o un vector derivado de una cepa viral de vacuna; por ejemplo un vector derivado de una cepa de vacuna del virus de la pseudorabia (enfermedad de Aujeszky).

La presente invención se entenderá mejor con ayuda de la siguiente descripción, que se refiere a ejemplos que ilustran la utilización de los antígenos NBL1 y 411, para el inmunodiagnóstico precoz de la triquinosis.

Leyenda de las figuras

Figura 1: Secuencia de la proteína THX-NBL1(Cterm).

La secuencia procedente de NBL1 se indica en negrita y las secuencias procedentes del plásmido pET102 se indican en cursiva.

Figura 2: Inmunorreactividad de la proteína THX-NBL1(Cterm). M: Marcador de pesos moleculares; 1: suero de cerdo negativo; 2: suero de cerdo infestado experimentalmente por 20000 L1M de *T. spiralis*.

Figura 3: Comparación de las cinéticas de aparición de los anticuerpos anti-*Trichinella* detectados mediante ELISA THX-NBL1(Cterm) o mediante ELISA Ag E/S en sueros de cerdos infestados por *T. spiralis*.

A: Detección mediante ELISA THX-NBL1(Cterm); B: Detección mediante ELISA Ag E/S.

En abscisas: número de días después de la infestación; en ordenadas: porcentaje de reactividad. El umbral de detección de los ELISA está marcado con una raya negra (44% para ELISA THX- NBL1(Cterm) y 14% para ELISA Ag E/S). La media y las desviaciones típicas de la proporción muestra/control positivo son idénticas para cada grupo de cerdos infestados.

Figura 4: Especificidad del ELISA NBL1(Cterm).

En abscisas: cohorte de 230 muestras negativas procedente de cerdos industriales o de cerdos criados al aire libre. Las 5 muestras positivas proceden de sueros de cerdos infestados experimentalmente. El umbral es igual a 2 veces el valor medio de las muestras negativas. En ordenadas: porcentaje de reactividad.

Figura 5: Secuencia de la proteína THX-411.

La secuencia procedente de 411 se indica en negrita. Las secuencias procedentes del plásmido se indican en cursiva.

Figura 6: Inmunorreactividad de la proteína THX-411.

1: suero positivo 50 días pi; 2: suero positivo 30 días pi; 3: suero negativo -5 días; 4: control conjugado. M: Marcador de pesos moleculares.

ES 2 356 394 T3

Figura 7: Comparación de las cinéticas de aparición de los anticuerpos anti-*Trichinella* detectados mediante ELISA THX-411 o mediante ELISA Ag E/S en sueros de cerdos infestados por *T. spiralis*.

A: Detección mediante ELISA THX-411; B: Detección mediante ELISA Ag E/S.

En abscisas: número de días después de la infestación; en ordenadas: porcentaje de reactividad. El umbral de detección de los ELISA está marcado con una raya negra (52% para el ELISA THX-411 y 14% para el ELISA Ag E/S). La media y las desviaciones típicas de la proporción muestra/control positivo se indican para cada grupo de cerdos infestados.

Ejemplo 1

Producción de la proteína recombinante thx-nbl1(cterm), que contiene una porción c-terminal de NBL1

Se realizó un inmunocribado de un banco de ADNc de L1NN de *Trichinella spiralis* con un suero de cerdo obtenido 35 días después de la infestación exponencial con 10000 LIM de *T. spiralis*. La secuenciación de los clones reconocidos por este suero permitió determinar que la mayor parte de estos codificaban una misma proteína.

Esta proteína es una supuesta proteasa de serina, cuya secuencia de ADNc y la secuencia de aminoácidos deducida, están disponibles respectivamente en el Genbank con los números AF331160 y AAK16520, y se reproducen también en este documento con los números SEC ID N° 1 y SEC ID N° 2. Se denomina en este documento NBL1.

Una porción de la parte C terminal de la proteína se amplificó con ayuda de los oligonucleótidos NBL1CtermF (5'-CACCGAAAATTCTCCTGAAGGA-3') (SEC ID N° 12) y NBL1CtermR (5'-TGTTGTTGTAGTAACTCC-3') (SEC ID N° 13), y de la ADN polimerasa AccuPrime Pfx DNA polymerase (Invitrogen), y se clonó en el plásmido pET102D/topo utilizando el kit de expresión Champion pET102 Directional TOPO de acuerdo con las recomendaciones del fabricante (Invitrogen).

El plásmido recombinante obtenido, denominado pET102-NBL1(Cterm) codifica una proteína de fusión tiorredoxina-NBL1(Cterm) (THX-NBL1(Cterm)), de 291 aminoácidos, que porta en posición C-terminal una etiqueta de polihistidina. La secuencia de esta proteína de fusión se representa en la Figura 1.

La proteína de fusión THX-NBL1(Cterm) se expresó en bacterias *E. coli* BL21 Star (DE3), BL21 (DE3) pLys (Invitrogen) transformadas con el plásmido pET102-NBL1(Cterm), y se purificó por cromatografía de afinidad en condiciones desnaturizantes en columna Ni-NTA (Ni-NTA spin columns kit; Ni-NTA beads), utilizando el protocolo recomendado por el proveedor (Qiagen).

La proteína de fusión THX-NBL1(Cterm) purificada aparece, después de la electroforesis en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) en forma de una banda con el tamaño esperado de 31,1 kDa.

La inmunorreactividad de la proteína THX-NBL1(Cterm) frente a un suero de cerdo libre de triquinosis y a un suero de cerdo infestado por 20000 larvas LIM de *T. spiralis* extraído 60 días después de la infestación, se analizó mediante transferencias de Western.

Después de la electroforesis en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE), la proteína se electrotransfirió a una membrana Hybond P (PVDF) siguiendo las instrucciones del proveedor (Amersham). Las membranas se prehibridaron durante 1 h en TBS-T (Tris-HCl 20 mM pH 7,5, NaCl 150 mM, Tween 20 al 0,1%) y un 5% de leche desnatada. Después de 2 lavados en TBS-T durante 1 minuto, y a continuación 3 lavados en TBS-T durante 5 minutos, las membranas se incubaron durante 1 h con el suero de cerdo diluido a 1/200 en TBS. Después del lavado, las membranas se incubaron durante 20 minutos con el anticuerpo secundario de conejo anti-IgG de cerdo marcado con fosfatasa alcalina (A1192, Sigma) diluido a 1/30000, y a continuación el sustrato NBT/BCIP (E116, Interchim) puro durante 30 minutos para la revelación del marcado.

Los resultados se ilustran mediante la Figura 2.

Se observa una inmunorreactividad muy fuerte de de THX-NBL1(Cterm) con el suero del cerdo infestado por *T. spiralis*.

Ejemplo 2

Utilización de THX-NBL1(Cterm) para detectar la respuesta humoral dirigida contra Trichinella

La proteína THX-NBL1(Cterm), preparada como se ha descrito en el ejemplo 1 anteriormente, se evaluó mediante ELISA indirecto frente a sueros obtenidos de cerdos infestados por *Trichinella*, en comparación con el antígeno de excreción/secreción (E/S) de *T. spiralis*.

ES 2 356 394 T3

El antígeno E/S de referencia se prepara de acuerdo con el protocolo descrito por GAMBLE *et al.*, (1988). Se ha obtenido a partir del sobrenadante de cultivo de las larvas LIM mantenidas en condiciones de supervivencia durante 24 h en RPMI 1640 que contiene el 1% de piruvato, el 15% de suero fetal bovino (SVF), el 1% de L-glutamina, 100 U/ml de penicilina 100 U/ml y 100 µg/ml de estreptomycin.

Para los ensayos de ELISA, el antígeno diluido en tampón PBS 1X, a razón de 1,25 µg/ml para el antígeno E/S y de 2 µg/ml para THX-NBL1(Cterm), se incuba durante 1 noche a 4°C en placas de 96 pocillos (placas MediSorp, NUNC). Después de 3 lavados (PBS 1X, Tween 20 al 0,05%), las placas se saturan a temperatura ambiente durante 1 h con una solución de leche desnatada diluida al 2% en la solución de lavado.

Se depositan en cada pocillo 100 µl de suero de cerdo diluido a 1/20 en tampón PBS 1X, con la adición de Tween 20 al 0,05%. Después de la incubación durante 30 minutos a 37°C, seguida de 3 lavados (PBS 1X, Tween 20 al 0,05%), se depositan en cada pocillo 100 µl de la solución de conjugado (proteína G-peroxidasa (P-8170, Sigma) diluida al 1/32000 en tampón PBS 1X, con la adición de Tween 20 al 0,05%). Después de una nueva incubación durante 30 minutos a 37°C, seguida de 3 lavados (PBS 1X, Tween 20 al 0,05%), se depositan en cada pocillo 100 µl de una solución de sustrato (3,3',5,5' tetrametilbenzidina-peróxido de hidrógeno: TMB3). Después de 20 minutos de incubación a temperatura ambiente en la oscuridad, la reacción se interrumpe mediante la adición de 100 µl/pocillo de H₂SO₄ 0,5 M. La lectura de las placas se realiza mediante medición de la absorbancia a 450 nm.

El resultado de las lecturas de las placas de ELISA se presenta en forma del porcentaje de reactividad de un suero de muestra con respecto a un suero de control positivo.

$$\% \text{ de } \frac{E}{P} = (\text{DO muestra} - \text{DO control negativo} / \text{DO control positivo} - \text{DO control negativo}) \times 100$$

El umbral de positividad (igual a 2 veces el valor medio de las muestras negativas de referencia) es del 14% para el ELISA Ag E/S, y del 44% para el ELISA THX-NBL1 (Cterm).

Se comparó la cinética de aparición de los anticuerpos anti-*Trichinella* detectados mediante ELISA THX-NBL1 (Cterm) o mediante ELISA Ag E/S en sueros de cerdos convencionales infestados experimentalmente por 200, 1000 ó 20000 larvas LIM de *T. spiralis*.

Los resultados se ilustran mediante la Figura 3.

El antígeno THX-NBL1(Cterm) permite la detección dependiente de la dosis de las respuestas humorales dirigidas contra *T. spiralis*. La detección de epítomos conformacionales mediante este ensayo ELISA asociada a la detección de epítomos lineales mediante transferencia de Western demuestran, por otro lado, el carácter inmunodominante de la proteína NBL1 de *Trichinella*. El ELISA THX-NBL1(Cterm) detecta la seroconversión a partir del 25° día pi, mientras que el ELISA Ag E/S solamente detecta la seroconversión 10 días más tarde.

La detección mediante ELISA Ag E/S, y ELISA THX-NBL1(Cterm) de las respuestas humorales inducidas por *T. spiralis* y las otras tres especies de *Trichinella* identificadas en Europa, *T. nativa*, *T. britovi* y *T. pseudospiralis*, también se comparó.

Los resultados se resumen en la Tabla I a continuación.

(Tabla pasa a página siguiente)

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

<i>T. pseudospiralis</i>	200	0,058	0/3	6/9	0/3	5/9	-	-	5/5	5/5	5-45
	1000	2,1	3/3		2/3						
	20000	98,9	3/3		3/3						
<p>(a) inoculo infeccioso en número de L1M de <i>Trichinella</i> por cerdo</p> <p>(b) carga parasitaria muscular media por animal (en larvas por gramo de músculo)</p> <p>(c) aumento de precocidad expresado en días obtenido mediante el ensayo ELISA-NBL1(Cterm) en comparación con el ensayo ELISA-Ag-E/S en los animales co-detectados mediante estos 2 ensayos.</p>											

ES 2 356 394 T3

El conjunto de estos resultados muestra que el ELISA THX-NBL1(Cterm) permite una detección particularmente precoz de las respuestas humorales, a partir del 15° día pi, para los animales fuertemente infestados y una detección ligeramente retardada para los animales infestados con una carga media de 1000 L1M (25° día pi). Se obtuvieron resultados similares con cerdos holoxénicos infestados de acuerdo con el mismo protocolo. La seroconversión más precoz detectada mediante el ELISA Ag E/S era el 25° día pi. La comparación de los resultados obtenidos con los 2 ensayos de ELISA demostró un aumento de 5 a 20 días en términos de precocidad para el diagnóstico de *T. spiralis* mediante la utilización del ELISA THX-NBL1(Cterm) (Tabla I). Además, los animales infestados por *T. spiralis* que fueron diagnosticados a la vez mediante el ELISA Ag E/S y el ELISA THX-NBL1(Cterm) vieron como, para todos, su ventana de detección serológica se reducía con el ELISA THX-NBL1(Cterm). La sensibilidad del ELISA THX-NBL1(Cterm) se demostró con el cribado efectivo de 7/9 cerdos convencionales durante este experimento con animales, es decir 3/3 cerdos infestados por 20000 L1M, 3/3 cerdos infestados por 1000 L1M y 1/3 cerdo infestado por solamente 200 L1M de *T. spiralis*. Las detecciones estaban asociadas a la carga parasitaria muscular de *T. spiralis* en estos animales que variaba de media de 3 larvas por gramo (LpG) para los cerdos infestados experimentalmente por 200 L1M, 43 LpG para los cerdos infestados experimentalmente por 1000 L1M, y 538 LpG para los cerdos infestados experimentalmente por 20000 L1M.

Las respuestas humorales inducidas por las otras tres especies de *Trichinella* identificadas en Europa, *T. nativa*, *T. britovi* y *T. pseudospiralis*, también se detectaron, a su vez, de forma dependiente de la dosis mediante el ELISA THX-NBL1(Cterm), demostrando la conservación genética y antigénica de NBL1 en el género *Trichinella* (immunodominancia), y por consiguiente todo su interés para el diagnóstico de amplio espectro de las triquinosis. La sensibilidad y la precocidad del diagnóstico (15° día pi) se confirmaron. La ventana de seroconversión se redujo de 5 a 45 días con el ELISA THX-NBL1(Cterm), y a semejanza de la infestación por *T. spiralis*, el conjunto de los animales que fueron diagnosticados a la vez mediante ELISA Ag E/S y ELISA THX-NBL1(Cterm) vieron como su ventana de detección serológica se redujo con el ELISA THX-NBL1(Cterm). Además, el análisis de la infestación por la especie *T. nativa* demuestra la gran sensibilidad del ELISA THX-NBL1(Cterm) que diagnosticó 6/9 animales (contra 5/9 animales mediante el ELISA Ag E/S) de los cuales 2 eran cerdos no cribados mediante el ELISA Ag E/S mientras que la carga parasitaria muscular era de media de solamente 7×10^{-4} a 0,1 LpG.

La especificidad del ELISA THX-NBL1(Cterm) se demostró con ayuda de los sueros extraídos en el conjunto de los animales antes de cada infestación experimental y hasta 10 días pi. Más de 200 sueros de cerdos criados al aire libre se utilizaron para mostrar la especificidad de la molécula. Ningún cerdo negativo para *Trichinella* reaccionó con el ELISA THX-NBL1(Cterm).

Estos resultados se ilustran mediante la Figura 4.

Ejemplo 3

Identificación de un epítipo inmunodominante de NBL1

Se realizó un análisis *in silico* (por ordenador) de la secuencia de aminoácidos deducida de la parte C terminal de NBL1, para predecir las regiones más antigénicas.

Los resultados del análisis *in silico* condujeron a la selección de 11 péptidos solapantes que abarcan 113 aminoácidos de la parte C terminal de NBL1 (del aminoácido 327 al aminoácido 440). Las secuencias de estos péptidos se indican a continuación

- N5EM1: NH2-NSPEGTVKWASKEDS-CONH2 (SEC ID N° 14)
- N5EM2: NH2-ASKEDSPVDLSTASR-CONH2 (SEC ID N° 15)
- N5EM3: NH2-LSTASRPTNPYTGSR-CONH2 (SEC ID N° 16)
- N5EM4: NH2-PYTGSRPTSPSSGSR-CONH2 (SEC ID N° 17)
- N5EM5: NH2-PSSGSRPTYPSGSR-CONH2 (SEC ID N° 6)
- N5EM6: NH2-PSSGSRPTSPSSGSR-CONH2 (SEC ID N° 18)
- N5EM7: NH2-PSSGSRPTYPYTGSR-CONH2 (SEC ID N° 7)
- N5EM8: NH2-PYTGSRPTPQKPVFP-CONH2 (SEC ID N° 19)
- N5EM9: NH2-QKPVFPSYQKYPPAV-CONH2 (SEC ID N° 20)
- N5EM10: NH2-KYPPAVQKYIDSLPS-CONH2 (SEC ID N° 21)
- N5EM11: NH2-RPTSPSSGSRPTYPS-CONH2 (SEC ID N° 8).

ES 2 356 394 T3

La antigenicidad de los péptidos N5EM frente a un suero de cerdo infestado por 20000 larvas L1M de *T. spiralis* y recogido 60 días después de la infestación se evaluó mediante ELISA indirecto, utilizando un protocolo idéntico al descrito en el Ejemplo 2, excepto que los péptidos, previamente biotinilados se incuban (2 µg/ml en PBS 1X; 100 µl/pocillo) en placas pretratadas con estreptavidina.

5 Se detectaron tres péptidos inmunorreactivos (N5EM5, 7 y 11). El análisis de la secuencia primaria de los péptidos inmunorreactivos reveló la presencia de un motivo común de 10 aminoácidos (PSSGSRPTYYP) (SEC ID N° 5). Este motivo está presente, por otro lado, 4 veces en toda la secuencia de la proteína NBL1. Por otro lado, la cartografía de epítomos mediante péptidos solapantes de 6 aminoácidos permitió demostrar la importancia primordial de un solo aminoácido, una tirosina, para la inmunorreactividad del epítopo lineal en los péptidos.

10 Experimentos complementarios demostraron finalmente que N5EM11 era el péptido más reactivo comparado con N5EM5 y N5EM7 en términos de sensibilidad y de precocidad.

15 Este péptido se comparó con el antígeno E/S de *T. spiralis*, como se describe en el Ejemplo 2 para THX-NBL1 (Cterm).

Los resultados se resumen en la Tabla II a continuación:

20

(Tabla pasa a página siguiente)

25

30

35

40

45

50

55

60

65

TABLA II

Especie de <i>Trichinella</i>	Inóculo (a)	Infectividad (b.)	Índice de cribado mediante el ELISA Ag E/S	Índice de cribado total mediante el ELISA Ag E/S	Índice de cribado mediante el ELISA N5EM11	Índice de cribado total mediante el ELISA N5EM11	Número de animales detectados de forma más tardía mediante el ELISA N5EM11	Número de animales detectados en el momento mediante los 2 ensayos ELISA	Número de animales detectados de manera precoz mediante el ELISA N5EM11	Número de animales detectados en el momento mediante los 2 ensayos ELISA o de manera más precoz mediante el ELISA N5EM11	Número de animales detectados en el mismo momento mediante los 2 ensayos ELISA N5EM11 (c)	Aumento de precocidad inducido mediante el ELISA N5EM11 (c)
<i>T. spiralis</i>	200	3	3/3	0/3	2/3	3/3	-	2/5	3/5	5/5	5-10	
	1000	43.1	3/3	9/9	5/9	5/9	-	1/5	4/5	5/5	5-30	
	20000	538.1	3/3	3/3	3/3	3/3	-	-	-	-	-	
<i>T. britovi</i>	200	1.8	1/3	1/3	1/3	1/3	-	1/5	4/5	5/5	5-30	
	1000	1	3/3	7/9	1/3	5/9	-	-	-	-	-	
	20000	123.1	3/3	3/3	3/3	3/3	-	-	-	-	-	
<i>T. nativa</i>	200	0,0007	1/3	0/3	0/3	0/3	-	-	4/4	4/4	15-25	
	1000	0,0015	1/3	5/9	1/3	4/9	-	-	-	-	-	
	20000	0,1022	3/3	3/3	3/3	3/3	-	-	-	-	-	

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

T. <i>pseudospiralis</i>	200	0,058	0/3	6/9	0/3	4/9	2/4	2/4	2/4	30
	1000	2,1	3/3		2/3					
	20000	98,9	3/3		2/3					
(a) inóculo infeccioso en número de LIM de <i>Trichinella</i> por cerdo (b) carga parasitaria muscular media por animal (en larvas por gramo de músculo) (c) aumento de precocidad expresado en días obtenido mediante el ensayo ELISA NBLI(Cterm) en comparación con el ensayo ELISA Ag E/S en los animales co-detectados mediante estos 2 ensayos.										

ES 2 356 394 T3

Estos resultados muestran que el ELISA N5EM11 permite la detección de las infestaciones moderadas con *T. spiralis*. Además, se obtuvo una detección precoz a partir del 20ésimo día después de la infestación, es decir de 5 a 10 días antes de lo permitido por el ELISA Ag E/S.

- 5 Se observa también una disminución del índice de anticuerpos anti-N5EM11 después del pico de detección, lo que confirma este carácter precoz, y que es útil para poner fecha a una infestación reciente. El conjunto de los cerdos infestados por *T. spiralis* y diagnosticados mediante el ELISA N5EM11 peptídico presenta una ventana de seroconversión en parte similar, pero en la mayoría de los casos más reducida que la observada con el ELISA Ag E/S.
- 10 Por otro lado, N5EM11 presenta reacciones antigénicas cruzadas con el suero de cerdos infestados por *T. nativa*, *T. britovi* y *T. pseudospiralis* demostrando la inmunodominancia de este péptido del estadio L1NN de *Trichinella*. Estas reacciones antigénicas cruzadas conducen a una detección que puede obtenerse de 5 a 30 días antes que con el ELISA Ag E/S.
- 15 Sin embargo, se ha observado una erosión de la sensibilidad en comparación con el ELISA Ag E/S, en términos de detección retardada para animales infestados por *T. pseudospiralis* y co-detectados mediante los dos ensayos. A contrario, el ELISA N5EM11 también permitió diagnosticar un animal infestado por *T. nativa* y no cribado mediante el ELISA Ag E/S mientras que la carga parasitaria muscular era residual.
- 20 La especificidad del ELISA N5EM11 se evaluó con ayuda de sueros extraídos de 300 animales antes de la infestación experimental y hasta 10 días pi. Esta especificidad es superior al 99% (no se ilustran los resultados).

Ejemplo 4

25 Identificación y aislamiento del antígeno 411

El clon de ADNc 411 se seleccionó a partir de un banco de ADNc de los estadios invasivos precoces Ad+L1NN de *T. spiralis*.

- 30 La secuencia nucleica de este clon de ADNc, así como la secuencia polipeptídica deducida, se determinaron, y se representan respectivamente en la lista de secuencias con los números SEC ID N° 3 y SEC ID N° 4. El marco abierto de lectura de 411 codifica una supuesta proteína de 20 kDa. A excepción de un péptido señal, no se identificó ningún dominio proteico.

- 35 La comparación del marco abierto de lectura completo de 411 con las secuencias disponibles en el Genbank muestra que éste presenta el 78,7% de identidad con la proteína Tp21-3 de excreción/secreción identificada en *T. pseudospiralis* (AAF79206; NAGANO *et al.*, 2001), y el 86,6% de identidad con la secuencia del ORF 17.20 hipotético de *T. spiralis* presentada por Polvere y Despommier (AAB48489). Estas comparaciones de secuencias identifican a 40 411 como un nuevo miembro de esta familia de genes común al género *Trichinella*.

- El marco abierto de lectura completo de 411 se amplificó con ayuda de los oligonucleótidos 411F (5'-CACCC GAGAAAACATGCAT-3') (SEC ID N° 22) y 411R (5'-TCCATTCAATTTGCGTCAC-3') (SEC ID N° 23), y la ADN polimerasa AccuPrime Pfx DNA polymerase (Invitrogen), y se clonó en el plásmido pET102D/topo, utilizando el kit de expresión Champion pET102 Directional TOPO de acuerdo con las recomendaciones del fabricante (Invitrogen).

- 50 El plásmido recombinante obtenido, denominado pET102-411 codifica una proteína de fusión tiorredoxina-411 (THX-411) de 330 aminoácidos, para una masa molecular predicha de 36,7 kDa, y que porta en posición C-terminal una etiqueta de polihistidina. La secuencia de esta proteína de fusión se representa en la Figura 5.

- 55 La proteína de fusión THX-411 se expresó en bacterias *E. coli* BL21 Star (DE3), BL21 (DE3)pLys (Invitrogen) transformadas con el plásmido pET102-411, y se purificó mediante cromatografía de afinidad en condiciones desnaturalizantes en columna Ni-NTA (Ni-NTA spin columns kit; Ni-NTA beads), utilizando el protocolo recomendado por el proveedor (Qiagen).

La proteína de fusión THX-411 purificada aparece, después de la electroforesis en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) en forma da una banda con el tamaño esperado de 36,7 kDa.

- 60 La inmunorreactividad de la proteína THX-411 frente a un suero de cerdo libre de triquinelosis, y del suero del mismo cerdo, 30 días y 50 días después de la infestación por 20000 larvas L1M de *T. spiralis* se comparó con la del antígeno de referencia E/S (preparado como se ha descrito en el ejemplo 2 anteriormente). El análisis se realizó mediante transferencia de Western, utilizando el mismo protocolo que el descrito en el ejemplo 1 anteriormente.

- 65 Los resultados se ilustran mediante la Figura 6.

ES 2 356 394 T3

Se observa una inmunorreactividad muy fuerte de THX-411 con los sueros del cerdo infestado por *T. spiralis* y la detección precoz de anticuerpos anti-411 (30 días pi). Se observa un ligero ruido de fondo debido a las reacciones cruzadas entre las proteínas bacterianas residuales de alta masa molecular que subsisten en la preparación de THX-411 y los anticuerpos anti *E. coli* presentes en los sueros.

5

Ejemplo 5

Utilización de THX-411 para detectar la respuesta humoral dirigida contra Trichinella

10

La proteína, preparada como se ha descrito en el ejemplo 4 anteriormente, se evaluó mediante ELISA indirecto frente a sueros obtenidos de cerdos infestados por *Trichinella*, en comparación con el antígeno de excreción/secreción (E/S) de *T. spiralis*.

15

Se comparó la cinética de aparición de los anticuerpos anti-*Trichinella* detectados mediante ELISA THX-411 o mediante ELISA Ag E/S en sueros de cerdos convencionales infestados experimentalmente con 200, 1000 ó 20000 larvas L1M de *T. spiralis*. La detección mediante ELISA Ag E/S, y ELISA THX-411 de las respuestas humorales inducidas por *T. spiralis* y las otras tres especies de *Trichinella* identificadas en Europa, *T. nativa*, *T. britovi* y *T. pseudospiralis*, también se comparó.

20

El protocolo utilizado es idéntico al descrito en el Ejemplo 2. El antígeno THX-411 se utilizó a 2 µg/ml, y el antígeno E/S a 1,25 µg/ml.

25

El umbral de positividad es del 14% para el ELISA Ag E/S, y del 52% para el ELISA THX-411.

Los resultados se ilustran mediante la Figura 7, así como mediante la Tabla III a continuación.

30

(Tabla pasa a página siguiente)

35

40

45

50

55

60

65

TABLA III

Especie de <i>Trichinella</i>	Inóculo (a)	Infectividad (b.)	Índice de cribado mediante el ELISA Ag E/S	Índice de cribado total mediante el ELISA Ag E/S	Índice de cribado mediante el ELISA THX-411	Índice de cribado total mediante el ELISA THX-411	Número de animales co-detectados de forma más tardía mediante el ELISA THX-411	Número de animales detectados en el momento mediante los 2 ensayos ELISA o de manera más precoz mediante el ELISA THX-411	Número de animales detectados de manera más precoz mediante el ELISA THX-411	Número de animales detectados en el momento mediante los 2 ensayos ELISA o de manera más precoz mediante el ELISA THX-411	Aumento de precocidad inducido mediante el ELISA THX-411 (c)
<i>T. spiralis</i>	200	3	3/3		1/3						
	1000	43,1	3/3	9/9	1/3	5/9	2/5	1/5	2/5	3/5	5-10
	20000	538,1	3/3		3/3						
<i>T. britovi</i>	200	1,8	1/3		0/3						
	1000	1	3/3	7/9	2/3	4/9	-	-	4/4	4/4	5-20
	20000	123,1	3/3		2/3						
<i>T. nativa</i>	200	0,0007	1/3		1/3						
	1000	0,0015	1/3	5/9	2/3	6/9	-	1/6	5/6	6/6	10-20
	20000	0,1022	3/3		3/3						

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

<i>T. pseudospiralis</i>	200	0,058	0/3	6/9	0/3	2/9	1/2	-	1/2	1/2	20
	1000	2,1	3/3		0/3						
	20000	98,9	3/3		2/3						
<p>(a) inoculo infeccioso en número de L1M de <i>Trichinella</i> por cerdo</p> <p>(b) carga parasitaria muscular media por animal (en larvas por gramo de músculo)</p> <p>(c) aumento de precocidad expresado en días obtenido mediante el ensayo ELISA-NBL1(Cterm) en comparación con el ensayo ELISA-Ag-E/S en los animales co-detectados mediante estos 2 ensayos.</p>											

ES 2 356 394 T3

El conjunto de estos resultados muestra que el antígeno 411 permite la detección dependiente de la dosis de las respuestas humorales dirigidas contra *T. spiralis*. La detección de epítomos conformacionales mediante este ensayo ELISA asociada a la detección de epítomos lineales mediante transferencia de Western demuestran, por otro lado, el carácter inmunodominante de la proteína 411 de *Trichinella*.

La proteína recombinante THX-411 permite una detección particularmente precoz de los anticuerpos dirigidos contra *T. spiralis* (a partir del 20° día pi para los animales fuertemente infestados por 20000 L1M). La seroconversión viene acompañada por un perfil de respuestas humorales que tienen valores elevados y mantenidos hasta el 60 día pi. La seroconversión de los animales infestados con una carga moderada y reducida del parásito se detectó de forma más tardía al 30° día pi y 60° día pi, respectivamente. La seroconversión más precoz detectada mediante el ELISA Ag E/S es el 25° día pi.

Los animales infestados por *T. spiralis* que fueron diagnosticados a la vez mediante el ELISA Ag E/S y el ELISA THX-411 vieron como, para 2/5 de ellos, su ventana de detección serológica se reducía con el ELISA THX-411, con una ganancia de 5 a 10 días en términos de precocidad. La sensibilidad del ELISA THX-411 se demostró con el cribado efectivo de 5/9 cerdos convencionales durante esta experimentación animal, es decir 3/3 cerdos infestados por 20000 L1M, 1/3 cerdos infestados por 1000 L1M y 1/3 cerdo infestado por solamente 200 L1M de *T. spiralis*. Las detecciones estaban asociadas a la carga parasitaria muscular de *T. spiralis* en estos animales, que variaba de media de 3 larvas por gramo (LpG) para los 30 cerdos infestados experimentalmente por 200 L1M, 43 LpG para los cerdos infestados por 1000 L1M, y 538 LpG para los cerdos infestados por 20000 L1M.

Las respuestas humorales inducidas por *T. nativa*, *T. britovi* y *T. pseudospiralis* también se detectaron, a su vez, mediante el ELISA THX-411 (10/12 animales infestados por 20000 L1M), que demuestran la conservación genética y antigénica de 411 en el género *Trichinella* y, por consiguiente, todo su interés para el diagnóstico de amplio espectro de las triquinelosis. La precocidad del diagnóstico se confirmó a partir del 20° día pi. La ventana de seroconversión se redujo de 5 a 20 días con el ELISA 411, y a semejanza de la infestación por *T. spiralis*, del 50% al 100 de los animales que fueron diagnosticados a la vez con ELISA Ag E/S y ELISA THX-411 vieron como su ventana de detección serológica se reducía con el ELISA THX-411. El análisis de la infestación por la especie *T. nativa* demostró una mayor sensibilidad del ELISA THX-411 que diagnosticó 6/9 animales (contra 5/9 animales mediante el ELISA Ag E/S) mientras que la carga parasitaria muscular era solamente de media de 7×10^{-4} a 0,1 LpG. Además, se obtuvieron perfiles de respuestas humorales similares para los animales infestados por *T. spiralis* y *T. nativa*, mientras que la intensidad de la infestación generada por esta última especie era significativamente menor, lo que sugiere un carácter inmunógeno muy importante de la proteína 411 de *T. nativa* y su utilización para la detección de esta especie resistente a la congelación.

La especificidad del ELISA THX-411 se evaluó con ayuda de sueros extraídos de 150 animales antes de la infestación experimental y hasta 10 días pi. Esta especificidad es superior al 99% (no se ilustran los resultados).

Conclusión

Los antígenos NBL1 y 411 constituyen antígenos inmunodominantes y conservados en el género *Trichinella*. Los ensayos ELISA que utilizan estos antígenos (NBL1 parte C terminal; epítomo peptídico N5EM11 de NBL1; antígeno 411) tienen una especificidad frente a *Trichinella* superior al 99%, y permiten el diagnóstico precoz (15-60 días después de infestación) de las triquinelosis porcinas producidas por las 4 especies de *Trichinella* identificadas en Europa.

El ensayo ELISA que utiliza la proteína recombinante purificada THX-NBL1(Cterm), que contiene el epítomo inmunodominante de NBL1 localizado en la parte C terminal de la proteína, es específico de *Trichinella*, sensible, y permite el diagnóstico de las triquinelosis porcinas con una precocidad aumentada en de 5 a 45 días con respecto al ELISA Ag E/S. Además, este ensayo permitió obtener una ventana de detección serológica reducida con respecto al ELISA Ag E/S en el 100% de los animales que fueron diagnosticados a la vez mediante el ELISA Ag E/S y mediante el ELISA THX-NBL1(Cterm).

El ensayo ELISA que utiliza la proteína recombinante purificada THX-411 reproduce con una sensibilidad actualmente un poco más reducida (17/36 animales diagnosticados) las cinéticas de las respuestas humorales detectadas mediante el ELISA Ag E/S. Sin embargo, la sensibilidad de este nuevo ELISA permitió diagnosticar un cerdo no cribado mediante el ELISA Ag E/S. El ELISA THX-411 puede permitir el diagnóstico de las triquinelosis porcinas con una precocidad aumentada en de 5 a 20 días con respecto al ELISA Ag E/S. Además, del 50% al 100% de los animales que fueron diagnosticados a la vez mediante ELISA Ag E/S y ELISA THX-411 vieron como su ventana de detección serológica se reducía con el ELISA THX-411.

El conjunto de estos resultados muestra que los antígenos NBL1 y 411 pueden utilizarse, como alternativa al antígeno E/S, o como complemento a éste, para el diagnóstico serológico precoz de las triquinelosis. Además, la asociación de estos dos nuevos antígenos de *Trichinella* permite la mejora de la sensibilidad del ELISA mediante el diagnóstico de un animal suplementario.

La asociación de NBL1 (Cterm) con un péptido inmunodominante de tipo N5EM11, y 411 permite mejorar la sensibilidad del diagnóstico de *Trichinella* (24/36 animales detectados).

ES 2 356 394 T3

El efecto aditivo de NBL1 con 411 se traduce en el aumento de detección de un animal, inducido por 411, así como en la detección más precoz de un animal, inducida por 411. El tríptico (NBL1, 411, N5EM11) estabiliza en el tiempo los ensayos ELISA mediante la co-detección simultánea de anticuerpos mediante 2 ó 3 antígenos, sin aumento suplementario, sin embargo, en términos de número de animales.

5 Por el contrario, el diagnóstico precoz < 30 días pi se obtiene gracias a los dos antígenos NBL1 y 411.

Referencias

10 **MURRELL et al.**, The systematics of the genus *Trichinella* with a key to species, *Vet Parasitol*, 93, 293-307, (2000).

15 **GASSER et al.**, Nonisotopic single-strand conformation polymorphism analysis of sequence variability in ribosomal DNA expansion segments within the genus *Trichinella* (Nematoda: Adenophorea), *Electrophoresis*, 25, 3357-3364, (2004).

BOIREAU et al., Risques parasitaires liés aux aliments d'origine animale, *Revue française des laboratoires*, 71-89, (2002).

20 **CAPO & DESPOMMIER**, Clinical aspects of infection with *Trichinella* spp, *Clin Microbiol Rev*, 9, 47-54, (1996).

FOURESTIE et al., Randomized trial of albendazole versus 15 tiabendazole plus flubendazole during an outbreak of human trichinellosis, *Parasitol Res*, 75, 36-41, (1988).

25 **DUPOUY-CAMET**, Trichinellosis: a worldwide zoonosis, *Vet Parasitol*, 93, 191-200, (2000).

MURRELL & POZIO, Trichinellosis: the zoonosis that won't go quietly, *Int J Parasitol*, 30, 1339-1349, (2000).

30 **BOIREAU et al.**, *Trichinella* in horses: a low frequency infection with high human risk, *Vet Parasitol*, 93, 309-320, (2000).

GAMBLE et al., Diagnosis of swine trichinosis by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using an excretory-secretory antigen, *Vet Parasitol*, 13, 349-361, (1983).

35 **GAMBLE et al.**, Evaluation of excretory-secretory antigens for the serodiagnosis of swine trichinellosis, *Vet Parasitol*, 30, 131-137, (1988).

40 **REASON et al.**, Novel tyvelose-containing tri- and tetraantennary N-glycans in the immunodominant antigens of the intracellular parasite *Trichinella spiralis*, *Glycobiology*, 4, 593-603, (1994).

NAGANO et al., Molecular cloning and characterization of a 21 kDa protein secreted from *Trichinella pseudospiralis*, *J Helminthol*, 75, 273-278, (2001).

45

50

55

60

65

ES 2 356 394 T3

REIVINDICACIONES

5 1. Utilización de un polipéptido antigénico reconocido por anticuerpos anti-*Trichinella* como reactivo para la detección de anticuerpos anti-*Trichinella* en una muestra biológica, **caracterizada** por que dicho polipéptido comprende un epítipo inmunodominante del antígeno NBL1, epítipo que está definido por la secuencia PSSGSRPTYP (SEC ID N° 5).

10 2. Utilización de acuerdo con la Reivindicación 1, **caracterizada** por que se utiliza una mezcla que comprende uno o más polipéptidos tal como se definen en la Reivindicación 1, opcionalmente en combinación con uno o más polipéptidos que comprenden los aminoácidos 25-175 de la secuencia SEC ID N° 4, o que comprenden una secuencia que presenta al menos el 70% de identidad con la secuencia de los aminoácidos 25-175 de la secuencia SEC ID N° 4.

15 3. Polipéptido antigénico reconocido por anticuerpos anti-*Trichinella*, tal como se define en la Reivindicación 1, con la exclusión del polipéptido identificado por el número de entrada del GenBank AAK16520.1 y del polipéptido identificado por el número de entrada del GenBank AAR36900.1.

20 4. Polipéptido antigénico de acuerdo con la Reivindicación 3, que contiene una o más de las siguientes secuencias: la secuencia: PSSGSRPTYPSSGSR (SEC ID N° 6); la secuencia PSSGSRPTYPYTGSR (SEC ID N° 7); y la secuencia RPTSPSSGSRPTYPS (SEC ID N° 8).

25 5. Polipéptido antigénico de acuerdo con la Reivindicación 4, que contiene los aminoácidos 363-409 de la secuencia SEC ID N° 2.

30 6. Polipéptido antigénico de acuerdo con la Reivindicación 3, **caracterizado** por que está constituido por un polipéptido quimérico que comprende una o más copias de un polipéptido tal como se define en la Reivindicación 1, opcionalmente con una o más copias de un polipéptido tal como se define en la Reivindicación 2, eventualmente fusionados con una o varias secuencias heterólogas.

35 7. Polinucleótido que codifica un polipéptido antigénico de acuerdo con una cualquiera de las Reivindicaciones 3 a 6.

40 8. Vector recombinante que contiene uno o más polinucleótidos de acuerdo con la Reivindicación 7.

45 9. Célula huésped transformada por un vector recombinante de acuerdo con la Reivindicación 8.

50 10. Utilización de un polipéptido tal como se define en la Reivindicación 1, para la obtención de una composición utilizable para la producción de anticuerpos.

55 11. Anticuerpo que reconoce específicamente a un polipéptido tal como se define en la Reivindicación 1.

60 12. Anticuerpo de acuerdo con la Reivindicación 11, **caracterizado** por que reconoce al epítipo PSSGSRPTYP (SEC ID N° 5).

65 13. Procedimiento de detección de la presencia de anticuerpos anti-*Trichinella* en una muestra biológica, procedimiento que se **caracteriza** por que comprende:

- la puesta en contacto de dicha muestra biológica con uno o más polipéptidos tal como se definen en la Reivindicación 1, opcionalmente en combinación con uno o más polipéptidos tal como se definen en la Reivindicación 2, en condiciones que permiten la formación de un complejo antígeno/anticuerpo con los anticuerpos anti-*Trichinella* eventualmente presentes en dicha muestra;
- la detección, mediante cualquier medio apropiado, del complejo antígeno/anticuerpo eventualmente formado.

70 14. Kit para la detección de la presencia de anticuerpos anti-*Trichinella* en una muestra biológica, **caracterizado** por que comprende uno o más polipéptidos tal como se definen en la Reivindicación 1, opcionalmente en combinación con uno o más polipéptidos tal como se definen en la Reivindicación 2 y, llegado el caso, tampones y reactivos apropiados para la constitución de un medio de reacción que permita la formación de un complejo antígeno/anticuerpo y, opcionalmente, medios de detección de dicho complejo antígeno/anticuerpo.

75 15. Kit de acuerdo con la Reivindicación 14, **caracterizado** por que dicho(s) polipéptido(s) está(n) inmovilizado(s) sobre un soporte sólido.

80 16. Composición inmunógena, que comprende uno o más polipéptidos tal como se definen en la Reivindicación 1, opcionalmente en combinación con uno o más polipéptidos tal como se definen en la Reivindicación 2, o uno o

ES 2 356 394 T3

más polinucleótidos que codifican dichos polipéptidos tal como se definen en la Reivindicación 1, opcionalmente en combinación con uno o más polinucleótidos que codifican dichos polipéptidos tal como se definen en la Reivindicación 2, asociados a uno o más adyuvantes que permiten mejorar la respuesta inmunitaria.

5 17. Composición inmunógena de acuerdo con la Reivindicación 16, **caracterizada** por que se trata de una vacuna.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

MGSDKIIHLTDDSFDTDVLKADGAILVDFWAHWC GPCCKMIAPILDEIADEYQGKLTVAKLNI
DHNPGTAPKYGIRGIPTLLLEFKNGEVAATKVGALSKGQLKEFLDANLAGSGSGDDDDKLGID
PFTENSPEGTVKWASKEDSPVDLSTASRETNPYTGSRPTSPSSGSRPTYPSGSRPTSPS
SGSRPTYPSGSRPTYPSGSRPTYPYTGSRPTPQKPVFPSYQKYPPAVQKYIDSLPSGTQG
TLEYTVTQNGVTTTTK GELKLEGKPIPNPLLGLDSTRTGHHHHH

Figura 1

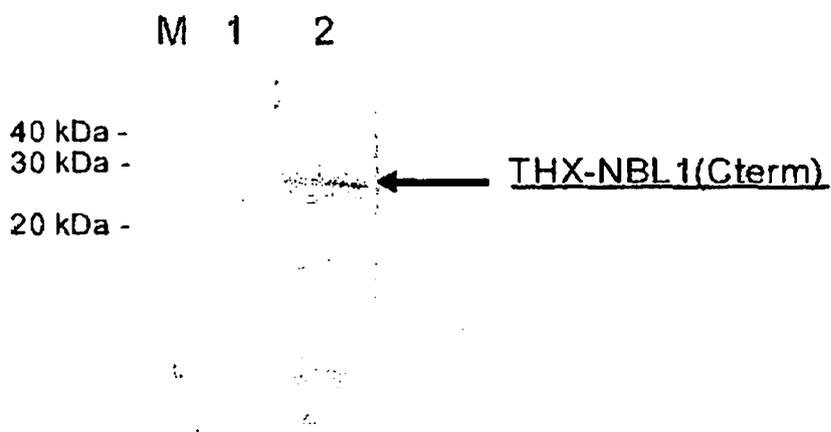


Figura 2

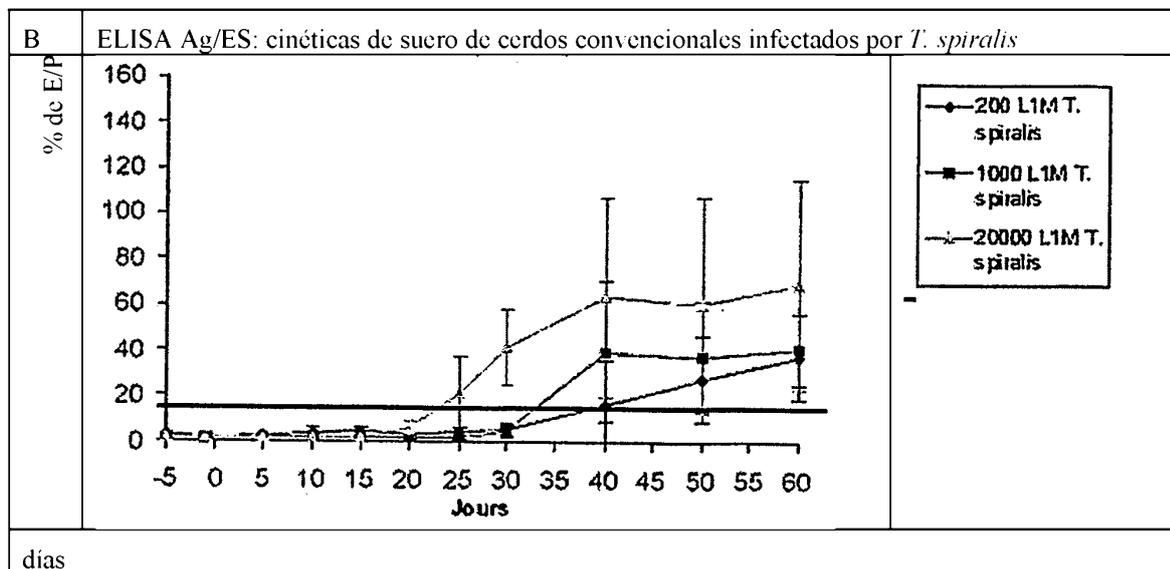
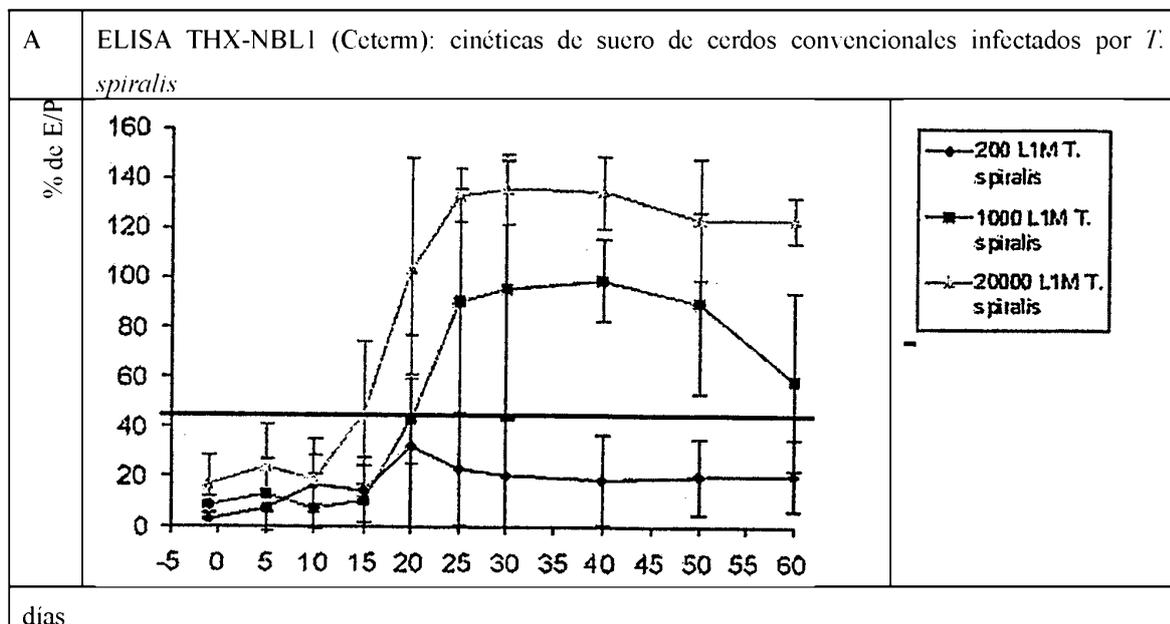


Figura 3

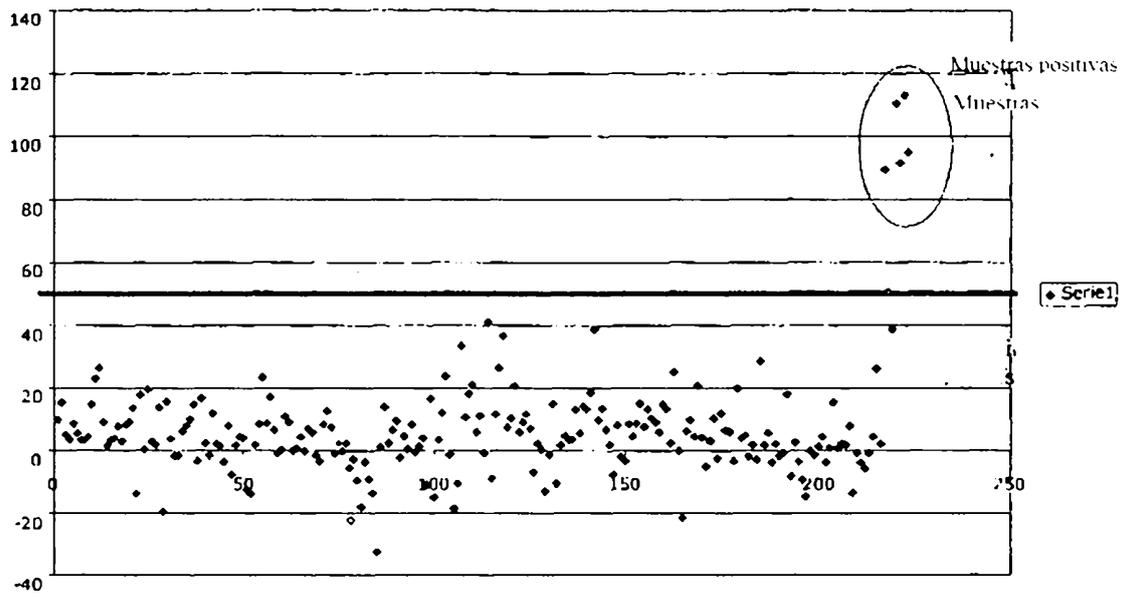


Figura 4

MGSDKIIHLTDDSFDTDVLKADGAILVDFWAHWC GPCCKMIAPILDEIADEYQGKLTVAKLNI
DHNPGTAPKYGIRGIPTLLL FKNGEVAATKVGALSKGQLKEFLDANLAGSGSGDDDDKLGID
PFTRENMHCQFILSLLL FSLNVVFFEA AKSLDAVDDELKRC TEKQTEICAQTECKAEDAIMT
DLLLEGESDITDHPDFLLYATCMQRCCARLNGAQVAPLKEEEKRRGPSKLPFQSI FEVADQK
TVERCDETMCKSYRKKYENLVALTSSYKLRSSQELKDYKQCIERCDAKLNGKGELKLEGKP
IPNPLLGLDSTRTGHHHHH

Figura 5

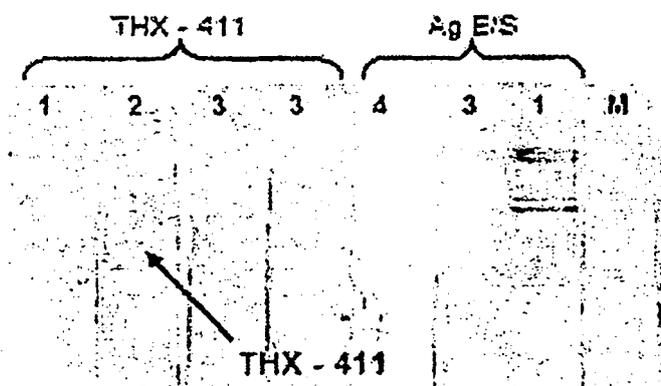


Figura 6

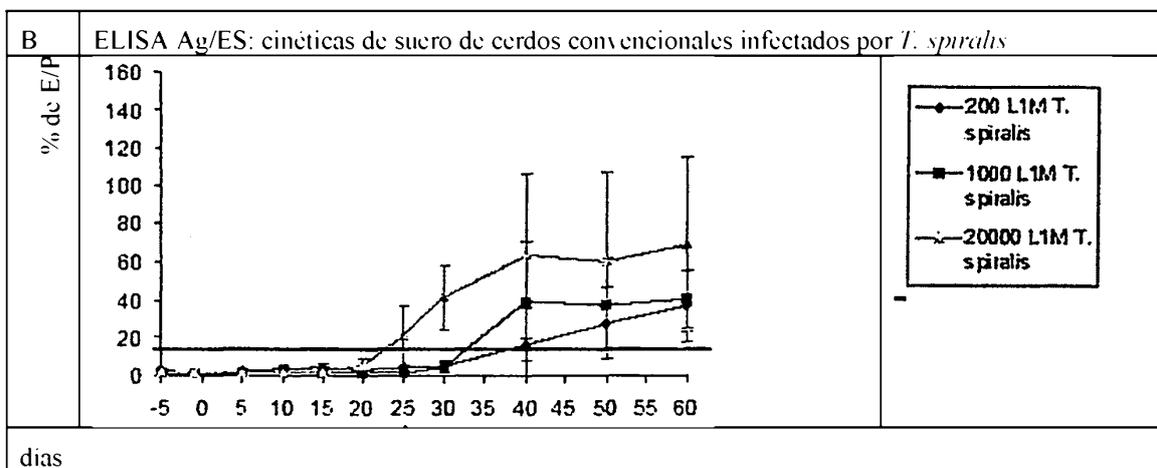
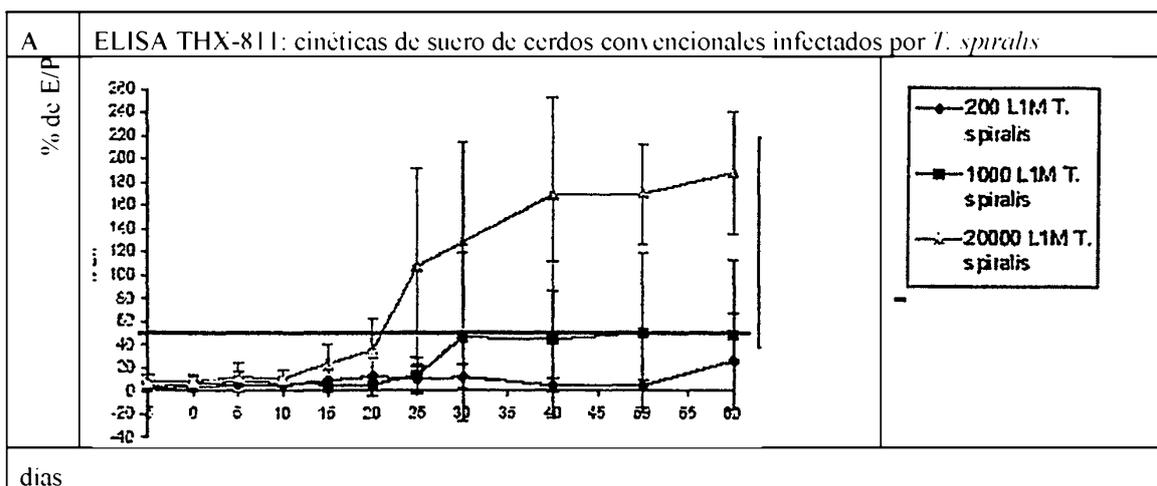


Figura 7

ES 2 356 394 T3

LISTA DE SECUENCIAS

5 <110> INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE AGENCE FRANCAISE DE SECURITE
 SANITAIRE DES ALIMENTS JILIN UNIVERSITY
 BOIREAU, Pascal
 LIU, Mingyuan
 FU, Baoquan
 LE RHUN Danielle
 10 BAHUON, Céline
 VALLEE, Isabelle
 LE GUERHIER, Franck
 HERNANDEZ BELLO, Romel

15 <120> POLIPÉPTIDOS RECONOCIDOS POR ANTICUERPOS ANTI-*TRICHINELLA*, Y SUS APLICACIONES

<130> MJP/mad-F539/130-PCT

20 <150> FR 06/01058

<151> 02-02-2006

<160> 23

25 <170> PatentIn version 3.3

<210> 1

30 <211> 1609

<212> ADN

<213> *Trichinella spiralis*

35 <220>

<221> CDS

<222> (90)..(1487)

40 <400> 1

gaaaagtgcc gctttgtttc aaagacaaat agaaatgaaa caaaggatat tccatagcaa 60

cagtagccat taaaagggtgt gctgcatgc atg cat aaa att aca cac aaa agt 113
 Met His Lys Ile Thr His Lys Ser
 1 5

att gta tca cgt cat aca ttt gct gtt tat ttg tta gtt agt ggt cag 161
 Ile Val Ser Arg His Thr Phe Ala Val Tyr Leu Leu Val Ser Gly Gln
 10 15 20

aaa ctg caa tat ata tat ata ttt att tgc aaa atg att aga cgt ctt 209
 Lys Leu Gln Tyr Ile Tyr Ile Phe Ile Cys Lys Met Ile Arg Arg Leu
 25 30 35 40

ttt caa tat acc tca atg act ttt gct tgg att ctt ctc ttc tta tcc 257
 Phe Gln Tyr Thr Ser Met Thr Phe Ala Trp Ile Leu Leu Phe Leu Ser
 45 50 55

gca get tct cca tca cta ggg gcg ttt gaa tgc ggt gtg cca cat ttt 305
 Ala Ala Ser Pro Ser Leu Gly Ala Phe Glu Cys Gly Val Pro His Phe
 60 65 70

65 aaa ccc tat ata tgg aaa tct ggt cga att gtt ggt gga act gac gta 353
 Lys Pro Tyr Ile Trp Lys Ser Gly Arg Ile Val Gly Gly Thr Asp Val

ES 2 356 394 T3

	75	80	85	
5	cga cca cac tca cat cca tgg cag att caa ttg tta aag tca gaa acg Arg Pro His Ser His Pro Trp Gln Ile Gln Leu Lys Ser Glu Thr 90 95 100			401
10	gga ggc tac agc agc ttg tgc ggt ggt agt ctt gtt cat ttc ggt aaa Gly Gly Tyr Ser Ser Leu Cys Gly Gly Ser Leu Val His Phe Gly Lys 105 110 115 120			449
15	ccc tca aat ggt act cga ttt gta ctt acc gcc gcg cac tgt ata act Pro Ser Asn Gly Thr Arg Phe Val Leu Thr Ala Ala His Cys Ile Thr 125 130 135			497
20	act agc aat atg tat cca aga acg tca aga ttt aca gtt gtg acc ggt Thr Ser Asn Met Tyr Pro Arg Thr Ser Arg Phe Thr Val Val Thr Gly 140 145 150			545
25	gcc cac aac atc aaa atg cat gaa aaa gaa aaa aag cgc ata cca att Ala His Asn Ile Lys Met His Glu Lys Glu Lys Lys Arg Ile Pro Ile 155 160 165			593
30	act tcc tat tat gtt cag cac tgg aac cct gtg atg aca aca aac gac Thr Ser Tyr Tyr Val Gln His Trp Asn Pro Val Met Thr Thr Asn Asp 170 175 180			641
35	att gcg ttg ctt cgc ctg gca gaa act gtt tat tat aat gaa tat acc Ile Ala Leu Leu Arg Leu Ala Glu Thr Val Tyr Tyr Asn Glu Tyr Thr 185 190 195 200			689
40	agg cct gtc tgt ttg cca gaa cca aat gaa gaa ttg act cct gga gat Arg Pro Val Cys Leu Pro Glu Pro Asn Glu Glu Leu Thr Pro Gly Asp 205 210 215			737
45	att tgc gtt gtc acc gga tgg ggt gat acg act gaa aat gga act act Ile Cys Val Val Thr Gly Trp Gly Asp Thr Thr Glu Asn Gly Thr Thr 220 225 230			785
50	tct aat act ttg aag caa gtt ggt gtc aaa att atg aag aaa gga act Ser Asn Thr Leu Lys Gln Val Gly Val Lys Ile Met Lys Lys Gly Thr 235 240 245			833
55	tgt gca aat gtg aga agt gaa gtt att act ttt tgc gct gga gct atg Cys Ala Asn Val Arg Ser Glu Val Ile Thr Phe Cys Ala Gly Ala Met 250 255 260			881
60	gag ggt ggt aaa gac agt tgt caa ggt gat tct ggt ggc cca ctg ata Glu Gly Gly Lys Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Ile 265 270 275 280			929
65	tgc aag aaa aat ggg aaa agt gtt caa ttc ggt gtc gtt agt tat ggt Cys Lys Lys Asn Gly Lys Ser Val Gln Phe Gly Val Val Ser Tyr Gly 285 290 295			977
70	act gga tgc gcc aga aaa ggt tat ccc gga gtg tat gcc aaa gtt cca Thr Gly Cys Ala Arg Lys Gly Tyr Pro Gly Val Tyr Ala Lys Val Pro 300 305 310			1025
75	tca tat gtc aca tgg tta aat aaa gct gca aaa gaa ctt gaa aat tct Ser Tyr Val Thr Trp Leu Asn Lys Ala Ala Lys Glu Leu Glu Asn Ser 315 320 325			1073

ES 2 356 394 T3

cct gaa gga act gta aaa tgg gct tca aaa gaa gat tcg cca gtc gat 1121
 Pro Glu Gly Thr Val Lys Trp Ala Ser Lys Glu Asp Ser Pro Val Asp
 330 335 340

5

tta tct act gca tca aga cca act aac cca tat act ggg tca aga ccg 1169
 Leu Ser Thr Ala Ser Arg Pro Thr Asn Pro Tyr Thr Gly Ser Arg Pro
 345 350 355 360

10

aca tct cca tct agt gga tca aga ccc aca tat cca tct agt gga tca 1217
 Thr Ser Pro Ser Ser Gly Ser Arg Pro Thr Tyr Pro Ser Ser Gly Ser
 365 370 375

15

aga cca aca tct cca tct agt gga tca aga ccc aca tat cca tct agt 1265
 Arg Pro Thr Ser Pro Ser Ser Gly Ser Arg Pro Thr Tyr Pro Ser Ser
 380 385 390

20

gga tca aga ccc aca tat cca tct agt gga tca aga cca aca tat cca 1313
 Gly Ser Arg Pro Thr Tyr Pro Ser Ser Gly Ser Arg Pro Thr Tyr Pro
 395 400 405

25

tat act gga tca aga cct act cct caa aag cca gta ttt cca tca tac 1361
 Tyr Thr Gly Ser Arg Pro Thr Pro Gln Lys Pro Val Phe Pro Ser Tyr
 410 415 420

30

caa aaa tat ccg cca gca gtt caa aaa tac att gat agt tta cca agc 1409
 Gln Lys Tyr Pro Pro Ala Val Gln Lys Tyr Ile Asp Ser Leu Pro Ser
 425 430 435 440

35

gga acg caa gga acg ctc gaa tac aca gtc aca cag aat gga gtt act 1457
 Gly Thr Gln Gly Thr Leu Glu Tyr Thr Val Thr Gln Asn Gly Val Thr
 445 450 455

40

aca aca aca tat tat cac ttt tct aag taa aaatattatg attaattcac 1507
 Thr Thr Thr Tyr Tyr His Phe Ser Lys
 460 465

tactgctctg aacgtaatta aaaaaggaat atttattaag cattttaata tgacacatta 1567
 1609
 tatatatataa aacagtcaaa tttgaaaaaa aaaaaaaaaa aa

45

<210> 2
 <211> 465
 <212> PRT
 <213> *Trichinella spiralis*

50

<400> 2

55

Met His Lys Ile Thr His Lys Ser Ile Val Ser Arg His Thr Phe Ala
 1 5 10 15

60

Val Tyr Leu Leu Val Ser Gly Gln Lys Leu Gln Tyr Ile Tyr Ile Phe
 20 25 30

65

Ala Trp Ile Leu Leu Phe Leu Ser Ala Ala Ser Pro Ser Leu Gly Ala
 50 55 60

ES 2 356 394 T3

Phe Glu Cys Gly Val Pro His Phe Lys Pro Tyr Ile Trp Lys Ser Gly
 65 70 75 80
 5 Arg Ile Val Gly Gly Thr Asp Val Arg Pro His Ser His Pro Trp Gln
 85 90 95
 Ile Gln Leu Leu Lys Ser Glu Thr Gly Gly Tyr Ser Ser Leu Cys Gly
 100 105 110
 10 Gly Ser Leu Val His Phe Gly Lys Pro Ser Asn Gly Thr Arg Phe Val
 115 120 125
 15 Leu Thr Ala Ala His Cys Ile Thr Thr Ser Asn Met Tyr Pro Arg Thr
 130 135 140
 Ser Arg Phe Thr Val Val Thr Gly Ala His Asn Ile Lys Met His Glu
 145 150 155 160
 20 Lys Glu Lys Lys Arg Ile Pro Ile Thr Ser Tyr Tyr Val Gln His Trp
 165 170 175
 25 Asn Pro Val Met Thr Thr Asn Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu Ala Glu
 180 185 190
 Thr Val Tyr Tyr Asn Glu Tyr Thr Arg Pro Val Cys Leu Pro Glu Pro
 195 200 205
 30 Asn Glu Glu Leu Thr Pro Gly Asp Ile Cys Val Val Thr Gly Trp Gly
 210 215 220
 35 Asp Thr Thr Glu Asn Gly Thr Thr Ser Asn Thr Leu Lys Gln Val Gly
 225 230 235 240
 Val Lys Ile Met Lys Lys Gly Thr Cys Ala Asn Val Arg Ser Glu Val
 245 250 255
 40 Ile Thr Phe Cys Ala Gly Ala Met Glu Gly Gly Lys Asp Ser Cys Gln
 260 265 270
 Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Ile Cys Lys Lys Asn Gly Lys Ser Val
 275 280 285
 45 Gln Phe Gly Val Val Ser Tyr Gly Thr Gly Cys Ala Arg Lys Gly Tyr
 290 295 300
 50 Pro Gly Val Tyr Ala Lys Val Pro Ser Tyr Val Thr Trp Leu Asn Lys
 305 310 315 320
 Ala Ala Lys Glu Leu Glu Asn Ser Pro Glu Gly Thr Val Lys Trp Ala
 325 330 335
 55 Ser Lys Glu Asp Ser Pro Val Asp Leu Ser Thr Ala Ser Arg Pro Thr
 340 345 350
 60 Asn Pro Tyr Thr Gly Ser Arg Pro Thr Ser Pro Ser Ser Gly Ser Arg
 355 360 365
 Pro Thr Tyr Pro Ser Ser Gly Ser Arg Pro Thr Ser Pro Ser Ser Gly
 370 375 380

65

ES 2 356 394 T3

5 Ser Arg Pro Thr Tyr Pro Ser Ser Gly Ser Arg Pro Thr Tyr Pro Ser
385 390 395 400

5 Ser Gly Ser Arg Pro Thr Tyr Pro Tyr Thr Gly Ser Arg Pro Thr Pro
405 410 415

10 Gln Lys Pro Val Phe Pro Ser Tyr Gln Lys Tyr Pro Pro Ala Val Gln
420 425 430

10 Lys Tyr Ile Asp Ser Leu Pro Ser Gly Thr Gln Gly Thr Leu Glu Tyr
435 440 445

15 Thr Val Thr Gln Asn Gly Val Thr Thr Thr Tyr Tyr His Phe Ser
450 455 460

20 Lys
465

25 <210> 3
<211> 700
<212> ADN
<213> *Trichinella spiralis*

30 <220>
<221> CDS
<222> (1)..(528)

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 356 394 T3

<400> 3

5 cga gaa aac atg cat tgc caa ttc att ctc tct ttg ctc ctt ttc tct 48
 Arg Glu Asn Met His Cys Gln Phe Ile Leu Ser Leu Leu Leu Phe Ser
 1 5 10 15

10 ttg aac gtc gta ttc ttc gaa gcc gcg aaa tca ctg gat gcc gta gac 96
 Leu Asn Val Val Phe Phe Glu Ala Ala Lys Ser Leu Asp Ala Val Asp
 20 25 30

15 gat gaa tta aaa aga tgt act gag aag caa act gaa att tgt gct caa 144
 Asp Glu Leu Lys Arg Cys Thr Glu Lys Gln Thr Glu Ile Cys Ala Gln
 35 40 45

20 aca gaa tgc aaa gca gaa gat gca att atg aca gat ctg ctt ctc gag 192
 Thr Glu Cys Lys Ala Glu Asp Ala Ile Met Thr Asp Leu Leu Leu Glu
 50 55 60

25 gga gaa agc gac att act gat cat cct gac ttc ctt tta tac gca act 240
 Gly Glu Ser Asp Ile Thr Asp His Pro Asp Phe Leu Leu Tyr Ala Thr
 65 70 75 80

30 tgc atg caa cgt tgc tgt gca aga ctg aac ggc gct caa gta gct cca 288
 Cys Met Gln Arg Cys Cys Ala Arg Leu Asn Gly Ala Gln Val Ala Pro
 85 90 95

35 ttg aaa gaa gaa gaa aaa cga aga gga cct tca aaa tta ccg ttc caa 336
 Leu Lys Glu Glu Glu Lys Arg Arg Gly Pro Ser Lys Leu Pro Phe Gln
 100 105 110

40 agc att ttt gaa gtt gct gat caa aaa aca gtt gaa aga tgt gat gaa 384
 Ser Ile Phe Glu Val Ala Asp Gln Lys Thr Val Glu Arg Cys Asp Glu

45 115 120 125

50 aca atg tgc aag agt tat aga aag aaa tat gaa aat ttg gta gca ttg 432
 Thr Met Cys Lys Ser Tyr Arg Lys Lys Tyr Glu Asn Leu Val Ala Leu
 130 135 140

55 act tca agc tac aaa aag cta cga tca agc caa gaa ttg aaa gac tac 480
 Thr Ser Ser Tyr Lys Lys Leu Arg Ser Ser Gln Glu Leu Lys Asp Tyr
 145 150 155 160

60 aaa caa tgc atc gaa aga tgt gac gca aaa ttg aat gga tta cag taa 528
 Lys Gln Cys Ile Glu Arg Cys Asp Ala Lys Leu Asn Gly Leu Gln
 165 170 175

65 agccagatat gaagaatgga gatatgcatt acaaagaaaa attttaactg aaataat ttt 588

70 tgttttataa aatctataaa tatcatttct aactgcatta gaattttttt gaagaaaaat 648

75 aaaataaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa actcgagggg gggcccggtc cc 700

<210> 4

<211> 175

65 <212> PRT

<213> *Trichinella spiralis*

ES 2 356 394 T3

<400> 4

Arg Glu Asn Met His Cys Gln Phe Ile Leu Ser Leu Leu Leu Phe Ser
 1 5 10 15
 Leu Asn Val Val Phe Phe Glu Ala Ala Lys Ser Leu Asp Ala Val Asp
 20 25 30
 Asp Glu Leu Lys Arg Cys Thr Glu Lys Gln Thr Glu Ile Cys Ala Gln
 35 40 45
 Thr Glu Cys Lys Ala Glu Asp Ala Ile Met Thr Asp Leu Leu Leu Glu
 50 55 60
 Gly Glu Ser Asp Ile Thr Asp His Pro Asp Phe Leu Leu Tyr Ala Thr
 65 70 75 80
 Cys Met Gln Arg Cys Cys Ala Arg Leu Asn Gly Ala Gln Val Ala Pro
 85 90 95
 Leu Lys Glu Glu Glu Lys Arg Arg Gly Pro Ser Lys Leu Pro Phe Gln
 100 105 110
 Ser Ile Phe Glu Val Ala Asp Gln Lys Thr Val Glu Arg Cys Asp Glu
 115 120 125
 Thr Met Cys Lys Ser Tyr Arg Lys Lys Tyr Glu Asn Leu Val Ala Leu
 130 135 140
 Thr Ser Ser Tyr Lys Lys Leu Arg Ser Ser Gln Glu Leu Lys Asp Tyr
 145 150 155 160
 Lys Gln Cys Ile Glu Arg Cys Asp Ala Lys Leu Asn Gly Leu Gln
 165 170 175

40 <210> 5

<211> 10

<212> PRT

<213> *Trichinella spiralis*

45

<400> 5

Pro Ser Ser Gly Ser Arg Pro Thr Tyr Pro
 1 5 10

50

<210> 6

<211> 15

<212> PRT

55

<213> *Trichinella spiralis*

<400> 6

Pro Ser Ser Gly Ser Arg Pro Thr Tyr Pro Ser Ser Gly Ser Arg
 1 5 10 15

60

<210> 7

<211> 15

65

<212> PRT

<213> *Trichinella spiralis*

ES 2 356 394 T3

<400> 7

Pro Ser Ser Gly Ser Arg Pro Thr Tyr Pro Tyr Thr Gly Ser Arg
 1 5 10 15

5

<210> 8

<211> 15

<212> PRT

10

<213> *Trichinella spiralis*

<400> 8

Arg Pro Thr Ser Pro Ser Ser Gly Ser Arg Pro Thr Tyr Pro Ser
 1 5 10 15

15

<210> 9

<211> 46

20

<212> PRT

<213> *Trichinella spiralis*

<400> 9

Pro Ser Ser Gly Ser Arg Pro Thr Tyr Pro Ser Ser Gly Ser Arg Pro
 1 5 10 15

25

Thr Ser Pro Ser Ser Gly Ser Arg Pro Thr Tyr Pro Ser Ser Gly Ser
 20 25 30

30

Arg Pro Thr Tyr Pro Ser Ser Gly Ser Arg Pro Thr Tyr Pro
 35 40 45

35

<210> 10

<211> 67

<212> PRT

40

<213> *Trichinella spiralis*

<400> 10

Ser Arg Pro Thr Asn Pro Tyr Thr Gly Ser Arg Pro Thr Ser Pro Ser
 1 5 10 15

45

Ser Gly Ser Arg Pro Thr Tyr Pro Ser Ser Gly Ser Arg Pro Thr Ser
 20 25 30

50

Pro Ser Ser Gly Ser Arg Pro Thr Tyr Pro Ser Ser Gly Ser Arg Pro
 35 40 45

55

Thr Tyr Pro Ser Ser Gly Ser Arg Pro Thr Tyr Pro Tyr Thr Gly Ser
 50 55 60

60

Arg Pro Thr
 65

<210> 11

<211> 134

65

<212> PRT

<213> *Trichinella spiralis*

ES 2 356 394 T3

<400> 11

1 Glu Asn Ser Pro Glu Gly Thr Val Lys Trp Ala Ser Lys Glu Asp Ser
 5 Pro Val Asp Leu Ser Thr Ala Ser Arg Pro Thr Asn Pro Tyr Thr Gly
 10 Ser Arg Pro Thr Ser Pro Ser Ser Gly Ser Arg Pro Thr Tyr Pro Ser
 15 Ser Gly Ser Arg Pro Thr Ser Pro Ser Ser Gly Ser Arg Pro Thr Tyr
 20 Pro Ser Ser Gly Ser Arg Pro Thr Tyr Pro Ser Ser Gly Ser Arg Pro
 25 Thr Tyr Pro Tyr Thr Gly Ser Arg Pro Thr Pro Gln Lys Pro Val Phe
 30 Pro Ser Tyr Gln Lys Tyr Pro Pro Ala Val Gln Lys Tyr Ile Asp Ser
 35 Leu Pro Ser Gly Thr Gln Gly Thr Leu Glu Tyr Thr Val Thr Gln Asn
 40 Gly Val Thr Thr Thr Thr
 45

<210> 12

<211> 22

35 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

40 <223> NBL1CtermF

<400> 12

45 caccgaaaat tctcctgaag ga

22

<210> 13

<211> 18

50 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

55 <223> NBL1CtermR

<400> 13

60 tgttggtgta gtaactcc

18

<210> 14

<211> 15

65 <212> PRT

<213> *Trichinella spiralis*

ES 2 356 394 T3

<400> 14
 Asn Ser Pro Glu Gly Thr Val Lys Trp Ala Ser Lys Glu Asp Ser
 1 5 10 15
 5 <210> 15
 <211> 15
 <212> PRT
 10 <213> *Trichinella spiralis*

 <400> 15
 Ala Ser Lys Glu Asp Ser Pro Val Asp Leu Ser Thr Ala Ser Arg
 1 5 10 15
 15 <210> 16
 <211> 15
 <212> PRT
 20 <213> *Trichinella spiralis*

 <400> 16
 Leu Ser Thr Ala Ser Arg Pro Thr Asn Pro Tyr Thr Gly Ser Arg
 1 5 10 15
 25 <210> 17
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Trichinella spiralis*
 30 <400> 17
 Pro Tyr Thr Gly Ser Arg Pro Thr Ser Pro Ser Ser Gly Ser Arg
 1 5 10 15
 35 <210> 18
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Trichinella spiralis*
 40 <400> 18
 Pro Ser Ser Gly Ser Arg Pro Thr Ser Pro Ser Ser Gly Ser Arg
 1 5 10 15
 45 <210> 19
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Trichinella spiralis*
 50 <400> 19
 Pro Tyr Thr Gly Ser Arg Pro Thr Pro Gln Lys Pro Val Phe Pro
 1 5 10 15
 55 <210> 20
 <211> 15

ES 2 356 394 T3

<212> PRT
<213> *Trichinella spiralis*

5 <400> 20
Gln Lys Pro Val Phe Pro Ser Tyr Gln Lys Tyr Pro Pro Ala Val
1 5 10 15

10 <210> 21
<211> 15
<212> PRT
<213> *Trichinella spiralis*

15 <400> 21
Lys Tyr Pro Pro Ala Val Gln Lys Tyr Ile Asp Ser Leu Pro Ser
1 5 10 15

20 <210> 22
<211> 19
<212> ADN
25 <213> Artificial

<220>
<223> 411F

30 <400> 22
cacccgagaa aacatgcat 19

35 <210> 23
<211> 20
<212> ADN
40 <213> Artificial

<220>
<223> 411R

45 <400> 23
tcattcaat tttgcgtcac 20

50

55

60

65