

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 552 356**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

A01K 67/033 (2006.01)

C12Q 1/66 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.05.2009 E 09769081 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.08.2015 EP 2279264**

54 Título: **Procedimiento para la caracterización de la actividad biológica de huevos de Trichuris**

30 Prioridad:

21.05.2008 EP 08009344

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

27.11.2015

73 Titular/es:

**DR. FALK PHARMA GMBH (100.0%)
Leinenweberstrasse 5
79108 Freiburg, DE**

72 Inventor/es:

**TEWES, BERNHARD y
WILHELM, RUDOLF**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 552 356 T3

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

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para la caracterización de la actividad biológica de huevos de *Trichuris*

La presente invención se refiere a un procedimiento para la determinación de la actividad biológica de huevos de helmintos, concretamente de huevos de *Trichuris*, preferentemente huevos de *Trichuris suis*, en distintos estadios de su ciclo de vida. El procedimiento permite preparar de manera controlada preparaciones de huevos de helmintos, como partes constituyentes eficaces de fármacos terapéuticos y garantizar un uso seguro y terapéuticamente eficaz en el ser humano.

Se conoce la influencia de infecciones por parásitos sobre la activación del sistema inmunitario de sus huéspedes animales (Review, D M McKay, Parasitology 2006, 132: 1-12). Una activación de este tipo influye también sobre la aparición y el desarrollo de enfermedades autoinmunitarias. Los estudios epidemiológicos muestran que en regiones con altas tasas de infecciones por lombrices son las enfermedades autoinmunitarias más raras que en regiones en las que estas tasas de infección son más bajas debido a mejores circunstancias higiénicas. Los perfiles de citocina de pacientes con enfermedad de Crohn, una enfermedad intestinal inflamatoria de manera crónica, han mostrado que las células inmunitarias Th2 pueden estimularse mediante infecciones por helmintos. La enfermedad de Crohn, una enfermedad autoinmunitaria dominada por Th1 puede impedirse o verse influida por una infección por helmintos (Summers *et al.*, Am J Gastroenterol 2003, 98: 2034-2041).

Ya en 1971 informó Beer (Br. Med. J., 1971, 3: 41) que *Trichuris suis* podría ser un nematodo adecuado para conseguir una infección dirigida, moderada del ser humano, sin producir los efectos patógenos, que por ejemplo van acompañados de una infección por el agente patógeno para humanos *Trichuris trichiura*. Según estudios más nuevos parece que la infección del ser humano con *Trichuris suis* es sólo transitoria y las lombrices aparentemente se expulsan, antes de que puedan reproducirse. No obstante, los estudios clínicos positivos con respecto al uso de *Trichuris suis* en enfermedades intestinales inflamatorias crónicas indican que esta infección transitoria del ser humano puede desencadenar una modulación terapéuticamente eficaz del sistema inmunitario (Summers *et al.*, Am. J. Gastroenterol. 2003, 98: 2034-2041).

El ciclo de vida de *Trichuris suis* comienza con la deposición de los huevos no embrionados (estadio LO) que se eliminan con las heces por el animal infectado. En el suelo tiene lugar durante un espacio de tiempo de 3-6 meses el desarrollo embrionario para dar el primer estadio de larvas L1. En los primeros días tras alcanzar el estadio L1 pueden observarse en los huevos movimientos de las larvas, después caen los huevos en un estado de reposo en el que pueden permanecer durante años, sin embargo sin perder su infectividad. Tras la ingesta oral mediante un huésped apropiado eclosionan las larvas L1 del huevo en el lumen intestinal y penetran en el transcurso de pocas horas en la mucosa de *Caecum* y colon. En la mucosa intestinal, las larvas recorren durante las siguientes semanas otros estadios del desarrollo larval (L2-L4), hasta que finalmente como larvas adultas L5 salen de nuevo hacia el lumen intestinal (Beer, Parasitol. 1973, 67: 253-262).

Para la preparación farmacéutica de huevos de *Trichuris suis* (*Trichuris suis ova* = TSO), se aíslan TSO no embrionados (LO), que se depositaron o bien *in vitro* o *in situ*, y se purifican con procedimientos adecuados (documentos WO 1999 33479, WO 2007 076868, WO 2007 134761). Después tiene lugar el desarrollo embrionario en condiciones de laboratorio controladas para dar TSO biológicamente activos (L1) que representan la parte constituyente farmacéuticamente activa del fármaco.

Kringel *et al.* (Veterinary Parasitology (2006), páginas 132-139)) describen la dinámica de una población de *Trichuris suis* tras una primera infección experimental de cerdos, sin embargo no describen procedimientos para la determinación de la viabilidad de huevos embrionados de *Trichuris suis*.

Johnson *et al.* (Int. J. for Parasitology (1998), páginas 627-633)) describen un procedimiento de ensayo *in vitro* para la determinación de la viabilidad de huevos de *Ascaris suum* (ascáride de cerdo), no sin embargo de huevos de *Trichuris suis*. Se describe cómo de resistentes son los huevos de *Ascaris suum* durante el tratamiento de agua residual.

Pecson *et al.* (Applied and Environmental Microbiology (2006), páginas 7864-7872)) describen una PCR a tiempo real para la determinación de huevos viables de *Ascaris*. El principio de este procedimiento es la cuantificación del número de copias de los genes del ADN ribosómico. El número de las copias de genes es proporcional al número de las células de *Ascaris* en el huevo de lombriz. Cuando se desarrollan los huevos desde una célula individual hasta obtener una larva madura, aumenta el número de las copias de genes con cada división celular, hasta que se consigue un nivel constante por huevo. El procedimiento se basa, por tanto, en la suposición de que se desarrollan sólo huevos viables de *Ascaris* desde el estadio de célula individual hasta obtener larvas. Una distinción entre huevos viables y ya desarrollados, sin embargo muertos no es posible.

Los huevos de helmintos que están previstos para usos terapéuticos pueden clasificarse como fármacos biológicos. Un parámetro central que debe someterse a ensayo en la preparación y el uso de fármacos biológicos es la actividad biológica que finalmente es una medida de la actividad terapéutica del fármaco. Sin análisis de la actividad biológica ni puede desarrollarse ni monitorizarse el proceso de preparación de manera racional, ni puede establecerse, en caso del uso planeado en el ser humano, la dosificación del fármaco necesaria para el efecto

terapéutico y fiable para los pacientes. Por este motivo pueden usarse sólo preparaciones de huevos de helmintos de este tipo de manera segura y eficaz como fármacos cuya actividad biológica esté cualificada de manera suficiente.

5 Hasta ahora están a disposición para *Trichuris suis* tres procedimientos analíticos que sin embargo caracterizan sólo de manera insuficiente la actividad biológica:

10 1. La determinación de la tasa de desarrollo embrionario (Kringel *et al.*, Vet. Parasitol. 2006, 139: 132-139, párrafo 2.2 (*Trichuris suis*); también Johnson *et al.* Intl. J. Parasitol. 1998, 28, 627-633 (*Ascaris suum*)): el estudio se realiza microscópicamente. Por medio de criterios morfológicos se evalúa si los huevos contienen una larva intacta, completamente formada L1. A partir de la evaluación morfológica únicamente no puede deducirse sin embargo, a diferencia del procedimiento de biología molecular descrito en esta solicitud, indudablemente si realmente las larvas están completamente embrionadas. Otra limitación se encuentra en que la tasa de desarrollo embrionario no ofrece ninguna declaración sobre la viabilidad y actividad biológica de los L1-TSO embrionados. Además, la evaluación morfológica requiere la experiencia del observador y la inclusión subjetiva de casos límite morfológicos limita la exactitud y precisión de este procedimiento.

15 2. La determinación de la tasa de infección: para *Trichuris suis* se realiza el estudio en cerdo. En un determinado momento tras la infección se determina el número de las larvas establecidas en la mucosa intestinal y se relaciona con la dosis administrada de TSO (Kringel *et al.*, Vet. Parasitol., 2006, 139: 1,32-139, también Summers *et al.*, 2005, Gastroenterology, 128: 825-832 o Johnson *et al.* Intl. J. Parasitol. 1998, 28, 627-633 (*Ascaris suum*)). Es problemático en la determinación de la tasa de infección que ésta no depende únicamente de la funcionalidad de los huevos de helmintos, sino igualmente también de factores individuales del huésped, tales como por ejemplo el sistema inmunitario, la flora intestinal y la función intestinal de los animales de experimentación. La determinación de la tasa de infección en el animal de experimentación está unida por tanto intrínsecamente con una alta variabilidad y no puede normalizarse debido al sistema de ensayo natural, que limita fuertemente la idoneidad como ensayo de actividad biológica. Para *Trichuris suis*, el ensayo de la infectividad en cerdo está asociado con un largo tiempo de incubación de al menos tres semanas y debido a la alta variabilidad está asociado con un alto número de animales, lo que puede parecer discutible un uso rutinario de este ensayo tanto éticamente como también económicamente. Además describe Kringel *et al.* la recuperación de huevos del excremento de los animales como detección de la actividad biológica de los huevos de helmintos, con los que se infectaron los animales. Para ello se espera 7-8 semanas tras la infección de los animales hasta que las larvas eclosionadas maduran para obtener el estadio L5, se aparean y depositan por su parte huevos. No existe ninguna relación cuantitativa directa, a partir de la cual pudiera concluirse por el número de huevos en el excremento sobre la tasa de infección o la actividad biológica de las larvas adultas. El procedimiento de Kringel *et al.* puede diferenciarse claramente de la determinación de la tasa de eclosión *in vivo* descrita en esta solicitud, dado que en Kringel *et al.* se someten a estudio los huevos de la siguiente generación.

35 3. El documento WO 2007/134761 describe un procedimiento para la detección de la viabilidad de huevos de *Trichuris suis*, en el que se simula *in vitro* el paso de los huevos por el tracto gastrointestinal de un cerdo y debido a ello se lleva las larvas a la eclosión.

Los procedimientos descritos no son sin embargo suficientes para determinar la actividad biológica de preparaciones de huevos de helmintos con la exactitud necesaria para especialidades farmacéuticas.

40 Uno de los problemas principales de un fármaco biológico, cuya actividad biológica se somete a ensayo en el animal, es por tanto la normalización del preparado. El uso de modelos animales, tal como la infección mencionada anteriormente de cerdos, es sumamente costoso y ocupa un tiempo considerable. En el contexto de la presente invención se describe por tanto un procedimiento, en el que se realizan distintos tipos de ensayos que se refieren a diferentes aspectos del desarrollo de los huevos de helmintos y su actividad biológica. Para llegar a una declaración fiable debe realizarse en la carga que va a someterse a estudio al menos uno de los ensayos de acuerdo con la invención, preferentemente se realizan sin embargo al menos tres, aún más preferentemente al menos cuatro o incluso cinco de los ensayos descritos en cuestión, determinándose los parámetros respectivamente relevantes. Los resultados de los ensayos individuales se consideran en total, debiendo cumplir una preparación de helmintos adecuada los valores límite predeterminados en cada ensayo, para que a partir de esto pueda deducirse que la preparación de huevos de helmintos es adecuada para el uso farmacéutico.

Existe por tanto una gran necesidad de un procedimiento que pueda usarse industrialmente, que analice de manera extensa y fiable la actividad biológica de TSO y otros huevos de helmintos en diversos estadios de desarrollo y que caracterice a este respecto distintas funciones biológicas de los huevos de helmintos. Sólo mediante un procedimiento de este tipo puede prepararse de manera controlada una especialidad farmacéutica competitiva.

55 Es un objetivo de la presente invención analizar de manera extensa, mediante el procedimiento explicado a continuación en más detalle, la actividad biológica de huevos de helmintos y así permitir por un lado un control estrecho del procedimiento de preparación, por otro lado un uso seguro y terapéuticamente eficaz en el paciente.

Por el planteamiento del problema complejo y los déficits de los procedimientos conocidos hasta ahora se vuelve

obvio que una determinación fiable de la actividad biológica por regla general no puede conseguirse mediante una etapa de procedimiento individual.

Por tanto es objeto de la invención un procedimiento para la determinación de la actividad biológica de huevos de *Trichuris* que contienen larvas completamente embrionadas y en el que se realizan al menos tres de las siguientes determinaciones:

determinación de la actividad inducida por la temperatura de huevos de *Trichuris* con procedimientos bioquímicos y/o de biología molecular, en particular la medición del contenido de ATP, determinación de la capacidad de inducción de la expresión génica en huevos embrionados de *Trichuris*, determinación microscópica de la motilidad de larvas de *Trichuris* que se encuentran en el huevo durante largos espacios de tiempo de observación tras activación mediante incubación previa a temperaturas elevadas y/o determinación de la tasa de eclosión de larvas de *Trichuris* en el animal de experimentación, cuantificándose los huevos embrionados intactos recuperados del contenido intestinal en comparación con un patrón interno.

Por tanto se desarrolló un sistema que estaba constituido por cinco determinaciones, que someten a estudio respectivamente distintas funciones biológicas de los helmintos en una fase determinada de su ciclo de vida. Si bien durante la etapa de preparación individual de una preparación farmacéutica puede ser suficiente usar sólo un procedimiento de determinación, sin embargo para la determinación de la actividad biológica del producto final deben realizarse al menos 3 de las siguientes determinaciones descritas a continuación en la tabla 1:

Tabla 1

Etapa de procedimiento	Parámetros a modo de ejemplo de la actividad biológica
1. determinación del número de copias de ADN genómico	<ul style="list-style-type: none"> • estadio del desarrollo de larvas entre L0 y L1 • identidad del organismo
2. determinación de la actividad metabólica	<ul style="list-style-type: none"> • viabilidad de la larva L1 en el huevo
3. estudio de la expresión génica inducible	<ul style="list-style-type: none"> • capacidad de activación de la larva L1 en reposo
4. determinación del índice de motilidad	<ul style="list-style-type: none"> • capacidad de movimiento de la larva L1 en el huevo (condición previa para la eclosión)
5. determinación de la tasa de eclosión <i>in vivo</i>	<ul style="list-style-type: none"> • eclosión de la larva L1 del huevo (condición previa para la colonización del huésped)

Para una caracterización segura de la actividad biológica de huevos de helmintos que pueden usarse farmacéuticamente se realiza el procedimiento completo con al menos tres, preferentemente 4 y aún más preferentemente todas las 5 etapas. Dado el caso para la caracterización de determinados aspectos de la actividad biológica o para la monitorización de etapas parciales de la preparación puede ser suficiente realizar sólo etapas individuales del procedimiento.

Las cinco etapas de procedimiento individuales recurren a principios de ensayo que se han descrito ya en otro contexto. La adaptación a huevos embrionados de helmintos, en particular huevos embrionados de *Trichuris suis*, es nueva y necesitó de una serie de nuevas etapas parciales hasta ahora aún no descritas. También es novedoso todo el procedimiento, que somete a prueba cinco aspectos distintos de la actividad biológica y así permite una extensa caracterización, y aún no se ha descrito anteriormente para huevos de helmintos, en particular huevos de *Trichuris suis*. La característica común preferente de tres de los cinco procedimientos descritos es la activación de larvas de *Trichuris* en reposo mediante incubación previa a temperatura elevada. Otra particularidad de este procedimiento se encuentra en que éste puede realizarse con huevos de helmintos intactos, viables y, que los parámetros medidos dependen sólo de la actividad de los huevos de helmintos y no de factores del huésped o de las capacidades especiales de la persona que realiza el ensayo, por consiguiente son por tanto más objetivos que los procedimientos usados hasta ahora. Mediante esto es posible una normalización que es necesaria para el uso farmacéutico.

Mediante el procedimiento es posible determinar de manera fiable la actividad biológica de preparaciones de huevos de helmintos con la exactitud necesaria para un producto farmacéutico. La determinación exacta de la actividad biológica de huevos de helmintos, tal como se describe en esta invención, es una etapa esencial en la preparación de un producto farmacéutico que puede usarse.

A continuación se explican en más detalle los 5 procedimientos de determinación, que son parte constituyente del procedimiento:

a) Determinación del número de copias de ADN genómico

En cada división celular durante el desarrollo embrionario se duplica el juego de cromosomas y se reparten entre las dos células hijas. Por tanto, el número de copias del ADN genómico en el huevo puede considerarse como correlato del número de las células del organismo de la larva en desarrollo. La determinación del número de copias de ADN genómico puede usarse por tanto para reproducir en un estadio cualquiera el estado del desarrollo embrionario de las larvas en desarrollo. Esto es una clara ventaja en comparación con el procedimiento descrito hasta ahora (determinación microscópica de la tasa de desarrollo embrionario, véase anteriormente), con el que puede someterse a estudio sólo el resultado final del desarrollo embrionario que dura aproximadamente 13 semanas y no proporciona ninguna información sobre si el desarrollo embrionario realmente ha finalizado completamente (es decir si el número de células corresponde a una larva L1 completamente formada). El desarrollo embrionario es parte del procedimiento de preparación farmacéutico de los huevos de helmintos. Con la determinación del número de copias de ADN genómico es posible por primera vez una analítica que acompaña al proceso. Ésta permite por un lado un desarrollo racional del procedimiento de preparación y el estudio de la influencia de modificaciones del procedimiento y por otro lado la monitorización rutinaria de la preparación durante la fase de desarrollo embrionario.

Con ayuda de la tecnología de PCR cuantitativa puede realizarse una determinación del número de copias de una determinada secuencia de ácido nucleico en una muestra. Cuantas más copias estén presentes en una determinada secuencia de ácido nucleico en la muestra, más rápidamente se consigue la meseta de amplificación. Mediante curvas de calibración puede determinarse de manera relativamente exacta el número de copias. Uno de los procedimientos usados habitualmente en este caso es la PCR a tiempo real o también la denominada PCR TaqMan. El experto conoce procedimientos de amplificación de ácido nucleico alternativos y pueden usarse igualmente para la determinación del número de copias del ADN genómico. Los números de copias exactos se determinan por regla general con curvas de calibración adecuadas.

Como marcador preferente para el ADN genómico de helmintos es adecuada preferentemente la región ITS1-5.8S-ITS2, que codifica para una parte del ARN ribosómico. Para *Trichuris suis* (Cutillas *et al.*, Parasitol Res 2001, 100:383-389) así como para otros tipos de *Trichuris* y otros helmintos se ha descrito ya la secuencia de la región ITS1-5.8S-ITS2. También se ha descrito ya un ensayo de viabilidad, en el que el desarrollo embrionario de *Ascaris suum* se sigue por medio de PCR cuantitativa de la región IST-1 (Pecson *et al.*, Appl.Envir.Microbiol., 2006, 72, 7864-7872).

Sin embargo, este ensayo sigue otro objetivo, concretamente la examinación de procedimientos para la inactivación de helmintos.

Una PCR cuantitativa (q-PCR), en la que se amplifica una secuencia parcial de la región ITS1-5.8S-ITS2, es adecuada especialmente para determinar el número de copias de la región de marcador y con ello el número de copias del ADN genómico. Dado los elementos ITS1 y ITS2 son específicos de especie, es adecuado el procedimiento además de la examinación del estadio del desarrollo embrionario también como detección de la identidad cualitativa para el organismo. Un ensayo de este tipo no se ha descrito en el estado de la técnica, en particular dado que no se había descrito hasta ahora que el estadio L1 de *T. suis* comprende de acuerdo con el número de copias del genoma aproximadamente 1000 células (véase ejemplo 1)).

En la figura 1 está representada la secuencia génica relevante de *Trichuris suis*, que pueden usarse a modo de ejemplo para la determinación del número de copias de ADN genómico. La SEC ID N.º:1 muestra la secuencia génica relevante. El cebador directo está reproducido como SEC ID N.º:2, el cebador inverso está reproducido como SEC ID N.º:3 y la secuencia de la sonda TaqMan está reproducida como SEC ID N.º:4. Para el experto es evidente que también pueden usarse otras partes del genoma de *Trichuris suis* para la determinación del número de copias. La condición previa para la idoneidad de la secuencia es que en este caso se trata de una secuencia de nucleótidos que existe específicamente en *Trichuris suis* y que no hay secuencias similares en otros organismos, que podrían llegar posiblemente como contaminación a la muestra que va a someterse a estudio.

La determinación del número de copias del ADN genómico tiene también un efecto secundario. Puede afirmarse debido a esto que el organismo deseado está presente en la preparación y con el uso de otras secuencias adecuadas puede comprobarse también si existen contaminaciones con otros organismos.

Otro aspecto esencial que no debe pasarse por alto en la determinación del número de copias de ADN genómico es que los huevos de helmintos deben disgregarse antes de la medición. Tal como se ha mostrado en los ejemplos, resulta en este caso especialmente adecuado un "homogeneizador Potter", usándose en una forma de realización preferente un volumen de 2 ml y ajustándose una anchura de rendija entre 0,01 y 0,03 mm. La homogeneización se realizó preferentemente durante un espacio de tiempo de 5 a 15 minutos, preferentemente de aproximadamente 10 minutos. La disgregación celular se realiza siempre cuando para la respectiva etapa de estudio deben encontrarse las partes constituyentes celulares en forma accesible.

55 b) Determinación de la actividad metabólica

Muchos procedimientos para la determinación de la viabilidad de células se basan en el estudio de la actividad metabólica. Como almacenador y transmisor de energía, el adenosintrifosfato desempeña un papel central en el metabolismo celular y puede usarse con ello como marcador para la determinación de la actividad metabólica

intracelular. La presente invención muestra que la detección de este nucleótido puede usarse también para la determinación de la viabilidad de organismos diferenciados tales como larvas L1 de *Trichuris suis*.

La cuantificación de adenosintrifosfato en sistemas biológicos se posibilita mediante la medición de la luminiscencia con ayuda de la reacción de la luciferasa. La luminiscencia es de acuerdo con la definición la emisión de luz "fría".

5 Los sistemas luminiscentes se basan en la activación química, bioquímica o electroquímica de sustratos que durante el regreso a su estado básico emiten una parte de la energía de excitación en forma de luz. En la detección de adenosintrifosfato se usan luciferasas que se aislaron de luciérnagas (*Photinus pyralis*; firefly). La célula eucariota cataliza la oxidación de luciferina en presencia de adenosintrifosfato, oxígeno e iones magnesio con emisión de luz para dar oxiluciferina. La ecuación de reacción está representada en la figura 2.

10 Las condiciones previas para un establecimiento exitoso de la determinación de adenosintrifosfato en huevos embrionados viables de *Trichuris suis* son la estimulación de una síntesis de adenosintrifosfato suficiente para la medición de la luminiscencia en las larvas L1, una disociación completa de los huevos mediante un procedimiento adecuado de homogeneización para la liberación del nucleótido formado intracelularmente así como la detección cuantitativa y con ello sin alteraciones de adenosintrifosfato de la matriz compleja. Sorprendentemente y hasta ahora no descrito se encontró que el contenido de ATP de larvas L1 antes de terminar el desarrollo embrionario es bajo y sólo tras activación adecuada mediante incubación durante un espacio de tiempo más largo en una determinada temperatura se eleva hasta un nivel constantemente alto. Además para la diferenciación de larvas L1 vivas y muertas es necesario un procedimiento de inactivación eficaz, de modo que el valor base de adenosintrifosfato en organismos muertos puede determinarse de manera reproducible.

20 La determinación del contenido de ATP para someter a estudio la actividad metabólica de poblaciones de huevos de helmintos se prefiere de acuerdo con la invención.

Para someter a estudio la actividad metabólica de huevos de helmintos individuales son adecuados también procedimientos de color con compuestos de tetrazolio que se desarrollaron originariamente para células animales libremente accesibles en cultivos celulares o cortes histológicos. Los compuestos de tetrazolio se reducen en células metabólicamente activas mediante la acción de enzimas mitocondriales para dar formazanos de color, que se depositan en las células. Para la transferencia de los procedimientos de color desde células animales libremente accesibles hasta las larvas L1 de helmintos de múltiples células que se encuentran en huevos es decisivo un pretratamiento de los huevos, que permita una permeación del sustrato sin alterar la viabilidad de las larvas que se encuentran en el huevo. Las larvas L1 de *Trichuris suis* están rodeadas por una cubierta rígida que limita mucho el intercambio de sustancias con el entorno e impide la permeación de las sustancias necesarias para los estudios.

30 Para la degradación suave de la envoltura del huevo ha resultado ventajoso el tratamiento de los huevos con ácido hipocloroso, que se ha descrito ya anteriormente (Beer, Parasitol., 1973., 67: 263-278) y que puede fomentarse dado el caso mediante una digestión enzimática posterior con quitinasa y proteasa.

35 Para poder determinar la actividad metabólica, debe determinarse un "valor cero". En este caso se trata de un valor de comparación a partir del cual se determina la respectiva actividad metabólica. En una forma de realización preferente se determina el "valor cero" con huevos de helmintos inactivos.

40 Como procedimiento adecuado para la inactivación de los huevos ha resultado la crioinactivación (congelación rápida y almacenamiento a -80 °C durante 24 horas). La señal de adenosintrifosfato de muestras inactivadas de esta manera pudo reducirse casi hasta el ruido de fondo. La preparación de muestras de huevo crioinactivadas se realiza en solución fisiológica de cloruro de sodio tamponada con fosfato. La crioinactivación puede usarse lógicamente también en los otros procedimientos de determinación.

45 La figura 3 muestra a modo de ejemplo la acción de la crioinactivación en la detección cuantitativa de adenosintrifosfato con ayuda de la reacción de la luciferasa. Mediante la crioinactivación puede medirse específicamente la acción de la incubación previa. En huevos de helmintos inactivados (muertos) puede distinguirse también tras la incubación previa un aumento de adenosintrifosfato. Por el contrario, huevos de helmintos biológicamente activos presentan una actividad que se consigue mediante el aumento del adenosintrifosfato tras un pretratamiento a 37 °C durante un tiempo de 19 horas.

50 En una forma de realización preferente se usan para cada mezcla de reacción 5500 huevos en 550 µl de solución. Tras la incubación previa se separan los huevos mediante centrifugación (5 min a 500 rpm) y se resuspenden en 225 µl de tampón de lisis. Para la liberación del contenido celular con el adenosintrifosfato formado mediante incubación se homogeneizan los huevos con un homogeneizador Potter (volumen de 2 ml; anchura de rendija de 0,01-0,03 mm) durante 10 min. Sólo este procedimiento conduce a una disgregación completa de los huevos y con ello a una liberación cuantitativa del nucleótido. Para inactivar hidrolasas que disocian adenosintrifosfato, se realiza la degradación de los huevos con un tampón de lisis (parte constituyente: ácido fosfórico, pH 2). De las mezclas de reacción individuales se pipetea respectivamente 50 µl en placas de microtitulación de 96 pocillos y cada mezcla de reacción se diluye con otros 100 µl de tampón fosfato. Mediante adición de 100 µl del kit de adenosintrifosfato que puede obtenerse comercialmente se inicia la reacción de la luciferasa. Tras una incubación de 2 minutos se lee la placa de microtitulación en un luminómetro y se determina la luminiscencia (figura 3). La cuantificación se realiza

frente a una curva patrón de adenosintrifosfato en tampón fosfato (1,0 μ M, 0,1 μ M, 10 nM, 1 nM, 0,1 nM, 10 pM, 1,0 pM, 0,1 pM). Una curva de calibración de ATP típica está representada en la figura 4.

5 Mediante adición dirigida de adenosintrifosfato a muestras homogeneizadas crioinactivadas de huevos embrionados pudo conseguirse dentro de la zona lineal de la curva estándar (de 1 a 1000 nM) una recuperación del 84 %. Una interacción relevante de la matriz compleja del homogeneizado de huevos con la reacción de la luciferasa y la luminiscencia no puede distinguirse con esto.

10 El ejemplo muestra de manera unívoca que la medición de la luminiscencia puede usarse para diferenciar huevos viables embrionados de *Trichuris suis* de huevos inactivados y con ello no viables. La realización exitosa del ensayo da buen resultado sin embargo sólo con una combinación de parámetros de procedimiento optimizados, que está constituida por activación de muestras, homogeneización de muestras y la preparación de controles adecuados mediante un procedimiento de inactivación optimizado. El contenido de ATP adecuado de huevos de helmintos biológicamente activos se encuentra en un intervalo de al menos 0,01 pmol de ATP por huevo.

c) Estudio de la expresión génica que puede inducirse

15 El principio de este procedimiento se encuentra en la inducción de la expresión génica que puede tener lugar sólo en células vivas y con cuya ayuda puede diferenciarse entre larvas vivas y muertas. Además, la capacidad de inducción de la expresión génica es probablemente condición previa para que la larva L1 en reposo pueda recorrer distintos estados de activación que son necesarios para inducir los siguientes estadios del ciclo de vida (eclosión, establecimiento en la mucosa etc.).

20 Como especialmente ventajoso aparece el estudio de la expresión de proteínas de choque térmico, dado que éstas pueden inducirse de manera sencilla mediante elevación de la temperatura y el ARN mensajero (ARNm) formado es generalmente estable contra una degradación rápida. En el contexto de la presente invención se logra en *Trichuris suis* por primera vez la detección de una secuencia génica que es en gran parte homóloga a la proteína de choque térmico hsp70 del helminto *Caenorabhditis elegans*.

25 En una forma de realización preferente de la presente invención se analiza la expresión génica de la proteína de choque térmico por *T. suis*. En la figura 5 está representada la secuencia de proteínas de *Trichuris suis* (SEC ID N.º:5), en comparación con la secuencia de aminoácidos de la proteína homóloga de *Caenorabhditis elegans* (SEC ID N.º:6).

30 La expresión génica que puede inducirse puede realizarse mediante determinación del contenido de ARN mensajero que codifica para una determinada proteína que puede inducirse. De la secuencia de aminoácidos puede derivarse la secuencia de nucleótidos del ARN mensajero. Para el experto no representa ningún problema establecer cebadores directos e inversos adecuados y entremedio fijar la secuencia de una sonda TaqMan. Con ayuda de una PCR en tiempo real puede determinarse entonces la inducción del gen. La condición previa para una determinación de valor informativo es que también se mide una muestra control que contiene los huevos de lombriz muertos. Además puede tratarse de una proteína que puede inducirse de manera sencilla y fiable. Uno de los ejemplos es la proteína de choque térmico, sin embargo puede recurrirse para la determinación de manera igualmente buena también a otros genes que pueden inducirse mediante determinados estímulos.

35 La detección del ARN mensajero expresado a nivel de huevos individuales se logra también mediante hibridación fluorescente *in situ* (FISH) con una sonda génica adecuada. Con especial ventaja puede someterse a estudio la población de huevos a continuación con ayuda de citometría de flujo de manera rápida y eficaz.

40 La secuencia de una sonda adecuada para la hibridación *in situ* está representada en la figura 6 (SEC ID N.º:7).

d) Determinación de la motilidad de larvas en huevos de helmintos intactos

45 El principio del procedimiento se basa en la detección de movimientos corporales como parámetro para la funcionalidad de la larva L1 en el huevo. La motilidad de la larva es condición previa para que ésta pueda eclosionar en condiciones de entorno apropiadas. En larvas y lombrices que viven libremente, tal como *C. elegans* se aplica el estudio de la motilidad como detección de viabilidad y función eficaces.

50 En el contexto de la presente invención se encontró sorprendentemente y por primera vez en el ejemplo de *Trichuris suis* que pueden inducirse movimientos sutiles también en larvas de helmintos que no viven libremente, que se encuentran en el huevo mediante ajuste exacto de la temperatura del entorno. Se ha descrito hasta ahora que las larvas tras terminar el desarrollo embrionario caen en un estado de reposo y sólo tras la absorción por el huésped apropiado se activan y eclosionan. Los movimientos de las larvas en el huevo pueden detectarse muy lentamente y sólo cuando los huevos se observan en microscopio, tal como se da a conocer en la presente invención, a cámara rápida durante un largo espacio de tiempo. En combinación con un software de análisis de imágenes puede automatizarse el ensayo de motilidad microscópico. El índice de motilidad como parámetro para la actividad biológica de los huevos se calcula tal como sigue:

$$\text{Índice de motilidad} = \frac{\text{Número de larvas motiles en el campo de observación}}{\text{Número de huevos sometidos a estudio en el campo de observación}}$$

5 En la determinación de la motilidad de larvas es decisivo un calentamiento exacto para el éxito del procedimiento. En primer lugar se incuban previamente los huevos durante un espacio de tiempo de 2 a 30 horas, preferentemente de 4 a 20 horas a una temperatura ajustada de manera exacta que se encuentra entre 36 °C y 42 °C, preferentemente de 37 °C a 41 °C y de manera especialmente preferente a 39,5 °C. Tras esta incubación previa se pasan las larvas a un microscopio adecuado, pudiéndose mantener la temperatura ajustada al menos de manera aproximada. La

10 La observación se realiza entonces con un registro a cámara rápida durante un espacio de tiempo de 2 minutos a 4 horas, preferentemente de 30 minutos a 2 horas a una temperatura entre 36 °C y 42 °C, preferentemente de 38 °C a 40 °C.

10 La figura 7 muestra los resultados de un índice de motilidad determinado de acuerdo con la invención, no pudiéndose observar motilidad de ningún tipo en caso de huevos de lombriz inactivados, por el contrario en caso de los huevos de lombriz activados aumenta el índice de motilidad con el tiempo.

La figura 8 muestra el índice de motilidad en relación con distintos espacios de tiempo de observación.

e) Determinación de la tasa de eclosión en el intestino

15 El principio de esta etapa de procedimiento consiste en la determinación de la tasa de eclosión de larvas de helmintos en el intestino de animales de experimentación o como alternativa en el contenido intestinal que se tomó previamente de los animales de experimentación.

20 La tasa de eclosión puede determinarse en una forma de realización en el contenido intestinal que se toma de los animales de experimentación, y concretamente de manera preferente al inicio del colon o al final del duodeno. Entonces, la tasa de eclosión puede determinarse en el contenido intestinal, sin que la tasa de eclosión deba determinarse directamente en un animal de experimentación. Además puede realizarse el procedimiento también mediante estudio de los huevos que han pasado el intestino y se recuperan de las heces. Esto tiene la ventaja de que no ha de sacrificarse el animal de experimentación y puede usarse múltiples veces para la determinación de la tasa de eclosión.

25 En la etapa de procedimiento recién desarrollada se analiza en un intervalo relativamente corto tras inoculación del contenido intestinal y se recuentan los huevos intactos así como las envolturas de huevos dejadas atrás tras la eclosión. Es esencialmente ventajoso en comparación con la determinación de la infectividad descrita en el estado de la técnica que con la eclosión se someta a estudio sólo la primera fase del ciclo de vida, que se ve influido sólo poco por los factores individuales del huésped.

30 Sorprendentemente pudo mostrarse por primera vez para *Trichuris suis* que las larvas eclosionan de manera cuantitativa no sólo en el huésped apropiado, el cerdo, sino también en el conejo. Con ello está a disposición por ejemplo para *Trichuris suis* un animal de experimentación con dimensiones intestinales más pequeñas, lo que facilita claramente la búsqueda de los huevos microscópicamente pequeños y la envolturas de los huevos.

35 Sorprendentemente se encontró que puede teñirse la cáscara del huevo con colorantes fluorescentes comerciales desarrollados para la marcación de proteínas. El acoplamiento de colorantes fluorescentes a la envoltura del huevo facilita esencialmente la búsqueda de los huevos, dado que el contenido intestinal puede someterse a estudio mediante microscopía de fluorescencia.

40 Otra novedad esencial es el uso de huevos de helmintos no embrionados o inactivados como patrón interno, invariable. Éstos tienen el mismo tiempo de tránsito o de permanencia en el intestino, sin embargo a diferencia de los huevos embrionados y biológicamente activos permanecen intactos en el tracto intestinal. Mediante la marcación de los huevos previstos como patrón interno con un segundo colorante fluorescente (distinto) puede diferenciarse fácilmente entre el patrón interno y los huevos que van a someterse a estudio.

45 Para el análisis se someten a estudio en el contenido intestinal, en un momento adecuado tras la inoculación, el número de los huevos intactos marcados con el colorante fluorescente 1 y las envolturas de los huevos vacías de la muestra que va a someterse a estudio así como los huevos marcados con colorante fluorescente 2 del patrón interno. La tasa de eclosión en el intestino puede calcularse tal como sigue basándose en los huevos intactos (no eclosionados).

Fórmula para el cálculo de la tasa de eclosión:

$$Tasa\ de\ eclosi3n = 1 - \frac{\frac{[IE]_i}{[IS]_i}}{\frac{[IE]_0}{[IS]_0}}$$

En la siguiente tabla 2 est1n resumidas la reacci3n de PCR as1 como las determinaciones preferentes y los valores que pueden obtenerse preferentemente con ello, los valores l1mites preferentes describen si la preparaci3n sometida a estudio presenta la actividad biol3gica necesaria.

5

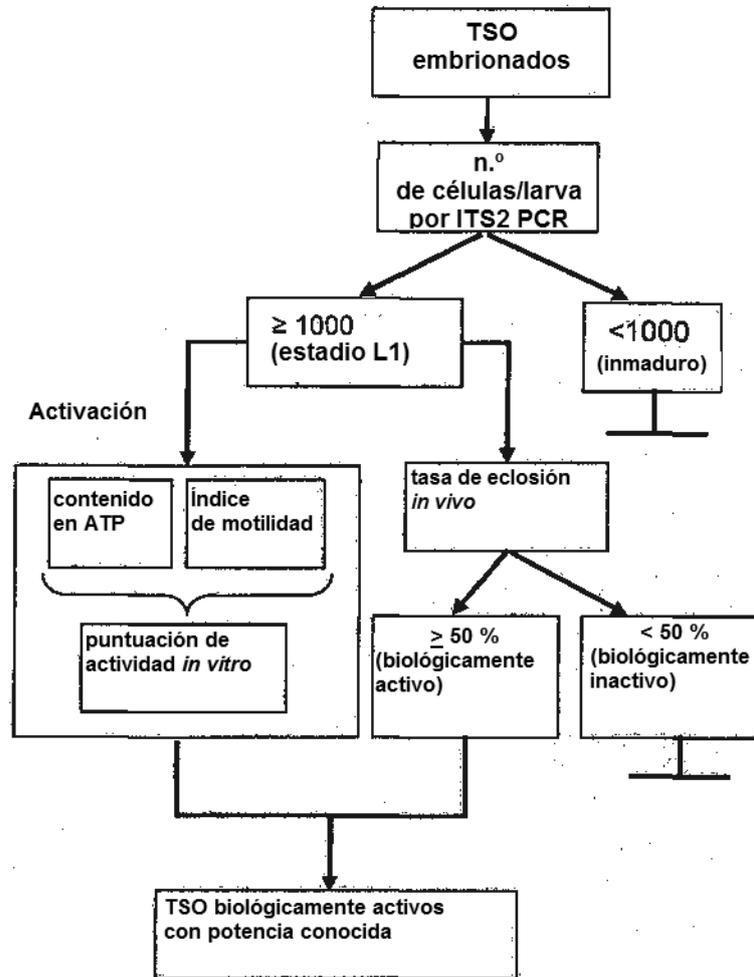
Tabla 2

Determinaci3n preferente	Par1metro	Objetivo
a) PCR, ADN gen3mico	n1mero de copias de ADN gen3mico/huevo	intervalo: 50-1200 copias/huevo en d28 (al inicio del desarrollo embrionario se encuentra el n1mero de copias en 1 copia/huevo; tras el desarrollo embrionario de 28 d1as deb1a conseguirse al menos un n1mero de copias de 50/huevo.)
b1) actividad metab3lica variante 1: contenido de ATP	contenido promedio de ATP/huevo	intervalo: > 1 pmol de ATP/huevo embrionado
b2) actividad metab3lica variante 2: coloraci3n de la actividad	proporci3n de huevos con coloraci3n de actividad positiva	intervalo: ≥ 50 % (como m1nimo el 50 % de los huevos deb1an presentar una coloraci3n de la actividad metab3lica positiva)
c) expresi3n g3nica que puede inducirse	proporci3n de huevos que muestran una expresi3n g3nica que puede inducirse	intervalo: ≥ 50 % (en como m1nimo el 50 % de los huevos debe poder inducirse la expresi3n g3nica)
d) 1ndice de motilidad	proporci3n de huevos que contienen una larva motil	intervalo: ≥ 50 % (como m1nimo el 50 % de los huevos deb1an contener una larva motil)
e) tasa de eclosi3n	proporci3n de huevos que eclosionan en el intestino	intervalo ≥ 40 % (de c3mo m1nimo el 40 % de los huevos embrionados administrados deb1a eclosionar una larva)

10

En una forma de realizaci3n preferente, el nuevo procedimiento de ensayo comprende la determinaci3n de la capacidad de activaci3n inducida por la temperatura de huevos embrionados de helmintos *in vitro*. Se miden dos par1metros complementarios (1ndice de motilidad y contenido promedio de ATP), que juntos forman la puntuaci3n de la actividad *in vitro*. La puntuaci3n de la actividad *in vitro* muestra una buena correlaci3n con la actividad biol3gica *in vivo*. Sin embargo, 3sta es s3lo predictiva para la actividad biol3gica cuando las larvas usadas est1n completamente embrionadas. Para ello se usa un procedimiento de PCR cuantitativa que mide el n1mero de copias del genoma de *T. suis* en el huevo. Mediante un ensayo de eclosi3n *in vivo* novedoso realizado en paralelo se asegura que los huevos sometidos a prueba en condiciones fisiol3gicas est1n realmente activos. Esquem1ticamente se representa el procedimiento preferente tal como sigue:

15



Un aspecto importante de la presente invención es la determinación de la capacidad de activación inducida por la temperatura *in vitro*.

5 L1-TSO se transfieren tras el término del desarrollo embrionario a un estado de reposo, en el que pueden perdurar años hasta que se activan tras la absorción por el huésped y eclosionan. De manera inesperada y hasta ahora no descrita se encontró que los huevos pueden activarse también *in vitro* únicamente mediante una incubación durante un determinado espacio de tiempo en un intervalo de temperatura determinado sin la adición de otros factores. El estado activado de los huevos se cuantifica mediante determinación de dos parámetros complementarios: la motilidad de las larvas dentro de los huevos intactos así como la determinación del contenido de ATP de lisados de huevos previamente activados. De manera inesperada y a diferencia del comportamiento descrito en la bibliografía, 10 la incubación previa descrita en el presente documento induce movimientos sutiles de las larvas en el huevo. El movimiento de las larvas persiste durante horas, sin que las larvas se mueran o salgan del huevo. Por tanto, una forma de realización preferente del procedimiento descrito en el presente documento es una incubación previa adecuada de los huevos que conduce a la activación. Por medio de una observación microscópica de un número 15 suficientemente grande de huevos a cámara rápida se logra determinar de manera fiable la proporción de huevos en la población que contienen una larva activa, motil (índice de motilidad). Dado que este procedimiento, sin embargo, no distingue entre distintos estados de actividad de las larvas individuales, o sea gradaciones en la motilidad/actividad, se combina con la determinación de ATP que proporciona una medida cuantitativa de la actividad total de la población de huevos sometidos a estudio. Ambos parámetros de estudio, el índice de motilidad como magnitud directa, sin embargo discontinua y el contenido de ATP como magnitud indirecta, sin embargo 20 continua se complementan para dar una determinación fiable de la actividad *in vitro*, que se correlaciona bien con la actividad *in vivo*. A partir de los dos parámetros puede calcularse una puntuación de actividad *in vitro*, que se correlaciona bien con la actividad *in vivo* de los huevos.

25 El procedimiento *in vitro* de acuerdo con la invención se diferencia claramente de los procedimientos conocidos hasta ahora. La determinación de la tasa del desarrollo embrionario, en la que se someten a estudio huevos únicamente de manera óptica para determinar la presencia de larvas formadas completamente (Kringel *et al.*), no admite ninguna declaración, a diferencia del procedimiento descrito en el presente documento, sobre la viabilidad o

actividad de las larvas. La determinación de la tasa de eclosión *in vitro* mediante simulación del tracto gastrointestinal parece en comparación con el procedimiento descrito en el presente documento esencialmente más compleja y propensa a fallar. Además, la correlación con la actividad *in vivo* no está probada para el ensayo de eclosión *in vitro*.

- 5 En la forma de realización preferente de la invención se determina el estado de desarrollo embrionario. La puntuación de actividad *in vitro* proporciona resultados convenientes, predictivos para la situación *in vivo* sólo cuando las larvas han recorrido completamente el desarrollo embrionario. Las larvas no desarrolladas completamente reaccionan en el ensayo para determinar la capacidad de activación inducida por la temperatura posiblemente de manera positiva, sin embargo no son funcionales y no podrían eclosionar en el huésped y no podrían seguir el ciclo de vida normal de la larva. Un desarrollo embrionario completo se evalúa en los procedimientos conocidos hasta ahora microscópicamente por medio de criterios morfológicos. Esta evaluación requiere gran experiencia, es insegura y puede realizarse naturalmente sólo en huevos individuales. Por el contrario, el procedimiento de acuerdo con la invención mide objetivamente el número de copias del genoma en una gran población de huevos, a partir del cual puede calcularse el número promedio de células somáticas por larva.
- 10
- 15 Los resultados del ensayo para determinar la capacidad de activación inducida por la temperatura se aseguran preferentemente mediante un ensayo *in-vivo* novedoso que determina de manera sencilla y rápida con fiabilidad la tasa de eclosión en condiciones fisiológicas. Sorprendentemente se encontró que las larvas eclosionan de huevos biológicamente activos de manera cuantitativa en el tracto intestinal, mientras que los huevos previamente inactivados salen inalterados del tracto intestinal. En el procedimiento recién desarrollado se determina indirectamente la proporción de los TSO activos en una preparación, contándose sólo los huevos inactivos que recorren de manera inalterada el tracto intestinal de un animal de experimentación. La cuantificación da buen resultado sin embargo sólo mediante un patrón interno recién desarrollado que está constituido por huevos inactivos marcados con fluorescencia, que recorren igualmente de manera inalterada el tracto intestinal. Sorprendentemente y de manera inesperada se encontró además que los TSO biológicamente activos también eclosionan en el intestino del conejo de manera cuantitativa. Por consiguiente está a disposición como sustituto para el cerdo un modelo animal que es fácil y económico de mantener y tiene la ventaja de un volumen intestinal esencialmente más pequeño, lo que facilita la búsqueda de los huevos microscópicamente pequeños.
- 20
- 25

El ensayo *in vivo* de acuerdo con la invención se diferencia del ensayo de infectividad conocido en el cerdo. La determinación de la tasa de eclosión requiere sólo 1-3 días, mientras que el ensayo de infectividad dura varias semanas. Además, durante la determinación de la tasa de eclosión se analiza sólo la primera etapa del ciclo de vida de *T. suis* en el huésped, que apenas depende de factores individuales del huésped. Por el contrario se determina la tasa de infección en el cerdo preferentemente 3-4 semanas tras la infección y está sujeta a una variabilidad natural biológica que se manifiesta sobre todo mediante el sistema inmunitario del huésped marcado individualmente de manera distinta.

30

35 Otra ventaja del ensayo descrito en el presente documento consiste en que los huevos pueden recuperarse de las heces de los animales y por tanto no han de sacrificarse los animales para el ensayo.

Ejemplos

Ejemplo 1:

40 Basándose en la secuencia de ITS2 de *Trichuris suis* se desarrolló con ayuda del sistema TaqMan un procedimiento de PCR cuantitativa. La secuencia objetivo, los cebadores y la sonda TaqMan se describen a continuación. La secuencia objetivo se seleccionó de modo que ésta permitiera una diferenciación entre *Trichuris suis* y otras especies de *Trichuris*, cuya secuencia fuera igualmente conocida. Así, el ensayo proporciona además de la información sobre el número de copias de ITS2 también la detección cualitativa de que en el caso del organismo sometido a estudio se trate realmente de *Trichuris suis*.

45 Para la preparación de muestras se homogeneizaron los huevos (1000 huevos en 500 µl de solución) con un homogeneizador Potter (volumen 2 ml; anchura de hendidura 0,01-0,03 mm) durante 10 min. El control microscópico demuestra que sorprendentemente con este procedimiento pueden romperse completamente las envolturas de los huevos, mientras que otros procedimientos de disgregación habituales en el aislamiento de genes permanecen ineficaces en caso de huevos de *Trichuris suis*. Tras adición de 1,54 µg de ADN de esperma de pescado se hace reaccionar el homogeneizado de huevos con un kit comercial para el aislamiento de genes (DNeasy-Blood and Tissue-Kit; Qiagen) según las instrucciones del fabricante. Con el material aislado de ADN (volumen total de 50 µl) se realiza según el protocolo descrito en la siguiente tabla una reacción de PCR.

50

Tabla 3: protocolo de la reacción de PCR para el fragmento diana de la región ITS2 de *T. suis*

Instrumento:	AB7900HT (Applied Biosystems)
enzimas:	TaqMan Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems)
cebador, sonda TaqMan:	Véase la figura 1
concentración final de cebador:	900 nM

(continuación)

Instrumento:	AB7900HT (Applied Biosystems)
concentración final de sonda TaqMan:	200 nM
volumen de muestras:	5 µl
volumen total de la reacción de PCR:	25 µl
programa de temperatura:	50 °C / 2 min 95 °C / 10 min 40 ciclos [95 °C / 9 s; 60 °C / min]

La eficacia de la amplificación del procedimiento se encuentra entre el 92 % y el 98 % y la sensibilidad es suficientemente grande para poder determinar el número de copias de los genes ITS2 en un huevo individual.

- 5 Con el procedimiento de PCR se sometió a estudio el número de copias de ITS2 de huevos no embrionados y completamente embrionados de *Trichuris suis*. Los resultados están representados en la siguiente tabla.

Tabla 4: PCR cuantitativa para la región ITS2 en huevos no embrionados y embrionados de *Trichuris suis*

Muestra (respectivamente 1000 huevos)	Valor Ct	Número copias relativo de ITS2
TSO no embrionado (L0)	25,5	1
TSO embrionado (L1)	15,5	1024

(valor Ct (*cicle treshold*, umbral de ciclo): número de ciclos de PCR que son necesarios para obtener una señal de fluorescencia que se diferencia significativamente de la fluorescencia de fondo)

- 10 El análisis por PCR muestra que el número de copias de ITS2 en TSO embrionados se encuentra más alto aproximadamente en un factor 1000 que el número de copias de ITS2 en TSO no embrionados. Dado que el huevo no embrionado (L0) puede considerarse como célula individual, esto significa que la larva L1 de *T. suis* tiene aproximadamente 1000 células somáticas. Para *T. suis* no se ha conocido hasta ahora el número de células somáticas en la larva L1; para el organismo relacionado *C. elegans* se encontró un tamaño de 959 células somáticas, lo que coincide bien con las aproximadamente 1000 células encontradas en este caso.

- 15 Para comprobar si con el procedimiento de ensayo pueden someterse a estudio distintos estadios del desarrollo larval, se embrionaron TSO durante 4 semanas y se sometieron a estudio regularmente con la ITS2-PCR (tabla 5).

Tabla 5: número copias relativo de ITS-2 dependiendo de la duración del desarrollo embrionario

Duración del desarrollo embrionario	Ct (T) - Ct (0)	Número de copias relativo de ITS2
0 días (estado L0)	0	1
7 días	2,52	6
14 días	6,04	66
21 días	7,37	165
28 días	7,76	216
90 días (estado L1)	10,0	1024

- 20 El ejemplo muestra de manera unívoca que el procedimiento puede usarse para caracterizar distintos estadios del desarrollo larval entre L0 y L1 por medio del número de las células somáticas. Por consiguiente es adecuado este procedimiento especialmente para analizar, de manera concomitante con el procedimiento, el transcurso del desarrollo embrionario. Como especificación especialmente preferente en la producción de una preparación de huevos de helmintos aparece la obtención de un número de copias relativo de 50 - 1200 en el intervalo de los primeros 28 días del desarrollo embrionario.

Ejemplo 2:

Para la detección de adenosintrifosfato están a disposición kits que pueden obtenerse comercialmente, que entre otras cosas contienen las enzimas luciferasa necesarias para la reacción así como el sustrato luciferina y sales de magnesio. La estimulación de la formación de adenosintrifosfato mediante incubación previa de los huevos embrionados es forzosamente necesaria. El contenido de adenosintrifosfato de huevos embrionados viables en el estado de reposo no permite ninguna diferenciación suficiente con respecto a huevos muertos (figura 3). A este respecto ha resultado adecuado un procedimiento, en el que los huevos se incuban durante un espacio de tiempo de 19 horas a 37 °C. Una ventaja esencial del procedimiento de análisis desarrollado consiste en que para esta incubación no se requiere ningún pretratamiento de las muestras. Las presentes suspensiones de huevos pueden usarse directamente independientemente de la composición cualitativa y cuantitativa del medio. Pueden usarse incluso medios muy ácidos con valores de pH <2 sin preparación de muestras y no tienen ninguna acción negativa sobre la estimulación de adenosintrifosfato en los huevos. Mediante la incubación se posibilita una diferencia unívoca entre larvas F1 vivas y muertas F1 (figura 3).

Ejemplo 3:

Con ayuda de cebadores que se derivaron de la secuencia de la proteína de choque térmico hsp70 encontrada en *Caenorhabditis elegans* y secuencias homólogas de *Trichuris muris* y *Trichuris vulpis*, pudo amplificarse una secuencia génica en un material aislado de ARN de *Trichuris suis*. La nueva secuencia de *Trichuris suis* presenta traducida en la secuencia de proteína, un coincidencia del 65 % con la secuencia de proteína de la proteína hsp70 de *C. elegans* (figura 5).

Para la supuesta proteína de choque térmico de *T. suis* se desarrolló un procedimiento de RT-PCR cuantitativa. La cuantificación se realizó en comparación con ARNr 18S expresado constitutivamente. Los huevos embrionados activos de *T. suis* se sometieron a un choque térmico (20 min a 45 °C) y la expresión de la proteína de choque térmico se comparó con aquella en *T. suis* activo no tratado.

Tabla 6: expresión relativa de la proteína de choque térmico en huevos embrionados activos de *T. suis* (larvas L1) (2 experimentos independientes con respectivamente 3 muestras; fallo: desviación estándar):

	Experimento n.º 1	Experimento n.º 2
Control	1,075 ± 0,072	1,040 ± 0,029
<i>T. suis</i> 45 °C, 20 min	1,690 ± 0,212	1,467 ± 0,049

El análisis de expresión relativa muestra de manera unívoca que puede inducirse la expresión de ARNm similar a hsp-70 en *T. suis* mediante choque térmico (tabla 6). Por consiguiente, para el ensayo de la actividad está a disposición un gen cuya expresión puede inducirse activamente mediante elección de condiciones de ensayo adecuadas.

La detección de la expresión génica activa en el huevo individual da buen resultado con ayuda de la técnica de hibridación fluorescente *in situ* (FISH). Para poder detectar la supuesta proteína de choque térmico se desarrolló por ejemplo la sonda de ADN marcada con fluorescencia representada en la figura 6 (SEC ID N.º:7).

Tras la marcación con fluorescencia de los huevos activos puede someterse a estudio el análisis de la población de huevos también por medio de la citometría de flujo. En comparación con el análisis microscópico consiste la ventaja en que el análisis se realiza de manera más rápida y más objetiva.

El ejemplo muestra de manera unívoca que puede someterse a estudio con el procedimiento descrito en el presente documento la inducción de la expresión génica en huevos de helmintos (individuales). Con ello está a disposición por primera vez un procedimiento, con el que puede someterse a estudio la capacidad de activación de larvas de helmintos L1 en reposo.

Si la inducción de la expresión génica se usa como detección de la actividad biológica en la producción de preparaciones de huevos de helmintos, entonces un criterio de aceptación adecuado es en del 25 %-100 % de huevos positivos, preferentemente del 50 - 100 % de huevos de helmintos positivos.

Ejemplo 4:

4.1 Dependencia del índice de motilidad de las condiciones de estudio

Se incubaron durante 11 horas a 39 °C huevos de *Trichuris suis* activos así como inactivados mediante incubación a 48 °C durante 72 horas. Cada hora se observaron los huevos durante respectivamente 5 min y se determinó el índice de motilidad. La figura 7 muestra el desarrollo del índice de motilidad con el tiempo.

El ejemplo aclara que una incubación previa relativamente larga a temperaturas elevadas (en este caso: 7 horas a 39 °C) es necesaria para activar las larvas del estado de reposo y medir un índice de motilidad constantemente alto.

Esta observación era inesperada, dado que las larvas L1 recién embrionadas que se encuentran en el huevo estaban consideradas hasta ahora como inmóviles (Parasitology 1973, 67: 253-262). Probablemente no se observó la motilidad de las larvas en el huevo hasta ahora ya que es necesaria una incubación previa larga y los movimientos lentos pueden observarse sólo a cámara rápida.

- 5 La comparación de huevos activos e inactivados muestra de manera unívoca que mediante el estudio de la motilidad puede diferenciarse de manera sencilla entre huevos de *Trichuris suis* biológicamente activos e inactivos.

Además de la fase de activación, la longitud del intervalo de observación influye sobre el índice de motilidad medido, dado que las larvas no se mueven de manera sincrónica y por consiguiente un intervalo de observación más largo eleva la probabilidad de detectar en un huevo vital los movimientos esporádicos. Esto muestra el estudio (figura 7), en el que se observó una preparación de *Trichuris suis* tras la fase de activación (8 horas a 37 °C) durante espacios de tiempo de distinta duración a de 39,5 °C a 40 °C. El estudio muestra también que la motilidad permanece estable durante todo el periodo de observación de 8 horas.

Una característica representativa y novedosa de este procedimiento son por tanto la fase de activación con control de temperatura exacto así como el largo intervalo de observación. El ejemplo 4 muestra que pueden inducirse y medirse movimientos en larvas L1 en reposo, que se encuentran aún en el huevo, mediante condiciones adecuadas de temperatura y observación. Con el procedimiento puede determinarse de manera sencilla la motilidad como condición previa para la eclosión y con ello como parámetro para la actividad biológica de los huevos y puede diferenciarse de manera unívoca entre larvas L1 activas e inactivas.

4.2 Condiciones de ensayo ventajosas

20 Han resultado ventajosas las siguientes condiciones de ensayo: una muestra con 15.000 huevos de helmintos en 300 µl de tampón fosfato, pH 7,4 se transfiere a la cámara de una placa de 96 pocillos (superficie de la base: 0,31 cm²). Con esta densidad de sembrado se encuentran con ampliación de 200 veces aproximadamente 80-150 huevos en el campo de visión del microscopio. Tras una incubación de 8 horas a 37 °C (fase de activación) se eleva la temperatura hasta 39,5 °C y se seleccionan 4 campos de observación sucesivos y se observan durante respectivamente 2 horas. A este respecto se registra una película con 3 imágenes por minuto. A continuación se determina el número de huevos así como el número de larvas que se mueven y se calcula el índice de motilidad. El índice de motilidad de la muestra resulta del valor medio de las 4 mediciones individuales.

4.3 Reproducibilidad y precisión - comparación con el ensayo de infectividad

30 Para la comprobación de la reproducibilidad del ensayo de motilidad en las condiciones descritas anteriormente se sometieron a ensayo 4 muestras análogas de una carga de *Trichuris suis* en 4 días distintos. Los resultados de medición están expuestos en las siguientes tablas. Como comparación están expuestos los resultados de 4 series de medición con el ensayo de infectividad, que se obtuvieron con la misma carga de *Trichuris suis*.

Los índices de motilidad de 4 series de medición independientes se desvían uno de otro en como máximo el 4,2 %, por el contrario la desviación máxima de la tasa de infectividad de 4 series de medición independientes se encuentra en el 35,5 %. La precisión de las mediciones individuales se encuentra en el ensayo de motilidad entre el 1,9 % y el 6,3 %, por el contrario en el ensayo de infectividad entre el 9,6 % y el 58,4 %. Por tanto, el ensayo de motilidad es ampliamente superior al ensayo de infectividad tanto en la reproducibilidad como en la precisión.

4.4 Correlación entre motilidad y actividad biológica (exactitud) - comparación con el ensayo de infectividad

Para comprobar la correlación entre la motilidad y la actividad biológica se prepararon mezclas de TSO activos y TSO térmicamente inactivados y se sometieron a estudio con el ensayo de motilidad según las condiciones descritas en 4.2. La inactivación térmica se realizó mediante calentamiento de los huevos a 48 °C durante 72 horas. Para obtener resultados de recuento objetivos se ocultaron las muestras antes de la medición.

La actividad biológica relativa se calculó como cociente del índice de motilidad medido de la muestra y el índice de motilidad previamente determinado de los TSO activos. La exactitud de la medición resulta de la comparación de la actividad biológica relativa y la proporción real de los huevos activos en la muestra.

Una serie de medición análoga con TSO de la misma carga se realizó con el ensayo de infectividad. Los animales de experimentación se infectaron con cantidades distintas de TSO activos con tasa de infectividad conocida. Se prescindió de una mezcla de huevos inactivados. Los resultados están representados en las siguiente tablas.

Tabla 8: exactitud y precisión del ensayo de motilidad

Muestra	1	2.	3	4	5	6
proporción de TSO activos en la muestra = valor esperado de la actividad biológica relativa	0 %	30,0 %	50 %	70 %	90,0 %	100 %
índice de motilidad, medición n.º 1	0 %	25,2 %	39,6 %	56,1 %	72,7 %	89,8 %
índice de motilidad, medición n.º 2	0 %	26,5 %	39,8 %	56,5 %	78,3 %	86,3 %
índice de motilidad, medición n.º 3	0 %	20,6 %	42,7 %	55,3 %	79,1 %	87,3 %
índice de motilidad, medición n.º 4	0 %	20,0 %	43,5 %	58,9 %	76,9 %	87,0 %
índice de motilidad, valor medio	0 %	23,1 %	41,4 %	56,7 %	76,8 %	87,6 %
índice de motilidad, 100 % de TSO activos	80,2 %	80,2 %	80,2 %	80,2 %	80,2 %	80,2 %
actividad biológica relativa	0 %	28,8 %	51,6 %	70,7 %	95,7 %	109,2 %
exactitud (desviación del valor esperado)	± 0 %	- 4,1 %	+ 3,3 %	+ 1,0 %	+ 6,4 %	+ 9,2 %
precisión (dispersión de los valores de medición)	n.a.	± 14,2 %	± 4,8 %	± 2,8 %	± 3,7 %	± 1,7 %

Tabla 9: exactitud y precisión del ensayo de infectividad

Muestra	1	2	3	4
proporción de TSO activos en la muestra = valor esperado de la actividad biológica relativa	0 %	25,0 %	50,0 %	100,0 %
tasa de infectividad, animal de experimentación n.º 1	0 %	4,1 %	12,4 %	52,2 %
tasa de infectividad, animal de experimentación n.º 2	0 %	6,2 %	17,2 %	6,3 %
tasa de infectividad, animal de experimentación n.º 3	0 %	0,4 %	20,4 %	31,1 %
tasa de infectividad, animal de experimentación n.º 4	0 %	9,5 %	22,6 %	36,0 %
tasa de infectividad, animal de experimentación n.º 5		2,3 %	11,8 %	37,9 %
tasa de infectividad, valor medio	0 %	4,5 %	16,9 %	32,7 %
tasa de infectividad, 100 % de TSO activos	26,1 %	26,1 %	26,1 %	26,1 %
actividad biológica relativa	0 %	17,0 %	64,6 %	125,2 %
exactitud (desviación del valor esperado)	± 0 %	- 31,8 %	+ 29,1 %	+ 25,2 %
precisión (dispersión de los valores de medición)	n.a.	± 79,2 %	± 28,4 %	± 51,1 %

Con el ensayo de motilidad descrito en el presente documento puede determinarse de manera exacta la actividad

biológica relativa de una muestra de TSO por todo el intervalo entre el 0 % y el 100 % con una desviación de < 10 % del valor esperado. La precisión de la medición (dispersión de los valores de medición) en el intervalo entre el 50 % y el 100 % de la actividad biológica relativa es inferior al 5 %. En determinaciones de actividades biológicas relativas más bajas se encuentra la precisión por debajo del 15 %.

- 5 Los resultados del ensayo de infectividad se desvían en el intervalo entre el 0 % y el 100 % de actividad biológica relativa en aproximadamente el 25-32 % del valor esperado. La dispersión de los valores de medición se encuentra entre el 28 % y el 80 %.

10 El ejemplo muestra de manera unívoca que el índice de motilidad se correlaciona linealmente con la actividad biológica relativa. Con respecto a la exactitud y la precisión es el ensayo de motilidad ampliamente superior al ensayo de infectividad.

Un intervalo adecuado para el índice de motilidad como medida de la actividad biológica de preparaciones de huevos de helmintos se encuentra en el 30 % - 100 %, preferentemente el 60 - 100 %.

Ejemplo 5:

15 A modo de ejemplo se administraron por vía oral a conejos distintas mezclas de huevos embrionados, no embrionados e inactivados embrionados. Tras 8 horas se sometió a estudio microscópicamente el contenido intestinal de los animales de experimentación y se contaron los huevos intactos así como las envolturas de huevos vacías. Dado que los huevos en este ensayo no estaban marcados con fluorescencia se calculó la tasa de eclosión a partir de la proporción de los huevos intactos embrionados y no embrionados (según la fórmula anteriormente con [IE] = número de huevos embrionados y [IS] = número de huevos no embrionados). La siguiente tabla reproduce los resultados del estudio así como la tasa de eclosión calculada a partir de los mismos:

Tabla 10: número de huevos de *Trichuris suis* intactos no embrionados y embrionados, así como de envolturas de los huevos vacías en el contenido intestinal de conejos 8 h tras administración oral de mezclas de huevos embrionados, no embrionados e inactivados

Grupo	Dosis de inoculación			Huevos/envoltura de los huevos en el contenido intestinal			
	EE	IEE	NEE	EE	NEE	ES	tasa de eclosión
n.º 1	36.000		44.000	538	2050	2681	67,9 %
n.º 2		36.000	44.000	7525	8166	65	-12,6 %
n.º 3			80.000		3860	15	n.a.

(EE: huevos embrionados intactos; IEE: huevos embrionados inactivados con calor intactos; NEE: huevos no embrionados intactos; ES: envolturas de los huevos vacías; n.a.: no aplicable)

25 La comparación de los datos de los grupos 1-3 muestra que sólo los huevos embrionados activos pueden eclosionar en el conejo (puede distinguirse mediante la clara reducción del número de huevos embrionados intactos y la presencia de un gran número de envolturas de huevos vacías). Por el contrario, los huevos embrionados inactivados permanecen de manera inalterada en el intestino (grupo 2). Esto demuestra de manera unívoca que puede diferenciarse con el procedimiento entre huevos biológicamente activos e inactivados. Además, también los huevos no embrionados permanecen intactos en el tracto intestinal (grupo 3). Esto permite un uso de huevos no embrionados como patrón interno, que recorren el intestino de los animales de experimentación sin que se degraden. Este patrón interno es necesario, dado que la recuperación de los huevos en el contenido intestinal es sólo incompleta y por consiguiente el número absoluto de los huevos intactos encontrados no es de valor informativo. Para el cálculo de la tasa de eclosión considerando el patrón interno sirve la fórmula indicada anteriormente. Según esta fórmula, los huevos de *Trichuris suis* sometidos a estudio en este caso muestran una tasa de eclosión del 67,9 %, mientras que los huevos de *Trichuris suis* inactivados muestran una tasa de eclosión del 0 % (calculada: -12,6 %).

40 Para conseguir una mejor recuperación y una diferenciación más clara entre los huevos de la muestra y los huevos del patrón interno se marcaron los huevos de *Trichuris suis* con una sonda de fluorescencia. A modo de ejemplo se usó como sonda de fluorescencia éster de succinimidilo de rodamina X, que puede reaccionar según indicaciones del fabricante con grupos amino primarios en proteínas. Una suspensión de 1000 huevos de *Trichuris suis* en 200 µl de tampón fosfato, pH 7,4, se mezcló con 20 µl de una solución de bicarbonato de sodio 1 M y a continuación se hizo reaccionar con 5 µl de una solución al 0,5 % de éster de succinimidilo de rodamina X en DMSO. La solución se incubó con agitación durante 1 h a temperatura ambiente. A continuación se purificaron los huevos en total 8 veces mediante centrifugación (10 min a 500 rpm) e intercambio del tampón sobrenadante. La microscopía de fluorescencia muestra de manera unívoca la coloración de rojo de la envoltura de los huevos (figura 9).

La marcación con fluorescencia puede usarse ventajosamente para la evaluación microscópica de la tasa de eclosión. Ésta ofrece además también la posibilidad para el análisis objetivo y rápido por medio citometría de flujo activada por fluorescencia.

- 5 En total muestra el ejemplo de manera unívoca que con el procedimiento descrito en el presente documento puede someterse a estudio la fase de la eclosión de manera cuantitativa y puede usarse para la determinación de la actividad biológica. Un intervalo adecuado para la tasa de eclosión como medida de la actividad biológica de preparaciones de huevos de helmintos se encuentra en el 25 %-100 %.

Ejemplo 6:

Correlación de la capacidad de activación inducida por la temperatura *in vitro* con la actividad biológica *in vivo*

- 10 Para correlacionar la capacidad de activación inducida por la temperatura con la actividad biológica *in vivo* se sometieron a estudio 12 muestras de TSO de distinta calidad. Las muestras se sometieron a estudio en primer lugar con el procedimiento de PCR para determinar la completitud del desarrollo embrionario. A continuación se determinó el índice de motilidad y el contenido de ATP tras activación inducida por la temperatura. De manera paralela se realizó para cada una de las 12 muestras un ensayo de infectividad en el cerdo. El ensayo de infectividad se realizó según el procedimiento descrito por Kringel *et al.* en respectivamente 5 cerdos. Los dos parámetros *in vitro*, la motilidad y el contenido de ATP, se agruparon en una puntuación de la actividad *in vitro*:

$$\text{Puntuación de actividad in vitro} = \left(\text{Índice de motilidad} + \frac{\text{Contenido en ATP}}{50 \text{ nM}} \right) * 0,5$$

Tabla 11: determinación del índice de actividad de varias muestras

Muestra	Número de células/ larva (ITS2 PCR)	Contenido de ATP [nmol]	Índice de motilidad [%]	Puntuación de actividad <i>in vitro</i> [%]	Infectividad [%]
A	> 1000	6,13 ± 0,8	15,30 % ± 5,9 %	13,8 % ± 3,7 %	7,9 % ± 11,5 %
B	> 1000	13,40 ± 4,9	23,40 % ± 4,0 %	25,1 % ± 6,9 %	24,3 % ± 1,6 %
C	> 1000	20,70 ± 2,5	51,80 % ± 3,2 %	46,6 % ± 4,1 %	39,8 % ± 3,7 %
D	> 1000	36,35 ± 1,8	45,10 % ± 1,2 %	58,9 % ± 2,4 %	43,8 % ± 6,7 %
E	> 1000	32,75 ± 6,9	85,00 % ± 2,8 %	75,3 % ± 8,3 %	46,8 % ± 10,3 %
F	> 1000	35,73 ± 3,0	88,80 % ± 1,1 %	80,1 % ± 3,5 %	50,8 % ± 11,5 %
G	> 1000	41,27 ± 1,6	86,90 % ± 3,5 %	84,7 % ± 3,3 %	67,0 % ± 5,0 %
H	> 1000	40,20 ± 4,0	93,20 % ± 1,5 %	86,8 % ± 4,8 %	73,4 % ± 9,2 %
I	> 1000	51,88 ± 4,0	76,80 % ± 1,2 %	90,3 % ± 4,7 %	81,1 % ± 4,5 %
J	> 1000	46,60 ± 3,5	88,60 % ± 2,4 %	90,9 % ± 4,7 %	80,1 % ± 4,4 %
K	> 1000	46,44 ± 7,0	91,10 % ± 1,1 %	92,0 % ± 7,6 %	78,8 % ± 6,2 %
L	> 1000	48,67 ± 3,9	91,80 % ± 2,3 %	94,6 % ± 5,0 %	65,6 % ± 17,8 %

La correlación entre la puntuación de la actividad *in vitro* y la infectividad está mostrada en la figura 10.

- 20 El ejemplo muestra una buena correlación de la puntuación de la actividad *in vitro* con la actividad biológica *in vivo*.

Las ligeras desviaciones en muestras individuales pueden deberse probablemente más bien a debilidades del ensayo *in vivo*, que está afectado por una inseguridad intrínseca condicionada por la variabilidad biológica (factores del huésped).

5 La medición de una muestra con el ensayo de infectividad dura 6 semanas, requiere el uso de 5 cerdos y está asociada a un esfuerzo de trabajo considerable. El ensayo *in vitro* presentado en el presente documento que está constituido por tres de los cinco procedimientos presentados dura 1-2 días y puede hacerse funcionar con esfuerzo de trabajo y gasto de material comparativamente bajo.

LISTADO DE SECUENCIAS

- 10 <110> Dr. Falk Pharma GmbH
- <120> Procedimiento para la caracterización de la actividad biológica de huevos de helmintos, concretamente de huevos de *Trichuris*
- 15 <130> T.suis
- <160> 7
- <170> PatentIn versión 3.5
- 20 <210> 1
<211> 136
<212> ADN
<213> *Trichuris suis*
- 25 <400> 1
- | | |
|---|-----|
| tagcagcgac ggcaggtgcc cgtcatcgct ggcaggcagc cggagctgcg gagagcggct | 60 |
| aactcagcgc agtacggaag ctgcccgagt tggctacgtc gtcgctacat cgtcgtcagc | 120 |
| gtacagcgcg actgag | 136 |
- 30 <210> 2
<211> 19
<212> ADN
<213> secuencia artificial
- 35 <220>
<223> cebador
- <400> 2
- | | |
|----------------------|----|
| ctgcggagag cggctaact | 19 |
|----------------------|----|
- 40 <210> 3
<211> 23
<212> ADN
<213> secuencia artificial
- 45 <220>
<223> cebador
- <400> 3
- | | |
|---------------------------|----|
| agttggctac gtcgctgcta cat | 23 |
|---------------------------|----|
- 50 <210> 4
<211> 16
<212> ADN
<213> secuencia artificial
- 55 <220>
<223> sonda
- 60 <400> 4

ES 2 552 356 T3

cagtacggaa gctgcc 16

<210> 5

<211> 63

5 <212> PRT

<213> *Trichuris suis*

<400> 5

Ile Gly Arg Arg Tyr Asp Asp Ala Ala Val Gln Ser Asp Met Lys His
1 5 10 15

Trp Pro Phe Lys Val Val Ser Asp Gly Gly Lys Pro Lys Ile Gln Val
20 25 30

Glu Tyr Lys Gly Glu Thr Lys Met Phe Thr Pro Glu Glu Val Ser Ala
35 40 45

10 Met Val Leu Val Lys Met Lys Glu Thr Ala Glu Ala Tyr Leu Gly
50 55 60

<210> 6

<211> 120

15 <212> PRT

<213> *Caenorhabditis elegans*

<400> 6

Arg Asn Pro Glu Asn Thr Val Phe Asp Ala Lys Arg Leu Ile Gly Arg
1 5 10 15

Arg Phe Asp Glu Glu Thr Val Gln Ser Asp Ile Lys His Trp Pro Phe
20 25 30

Thr Val Lys Gly Lys Gln Gly Lys Pro Val Val Glu Val Glu Val Lys
35 40 45

Gly Glu Lys Arg Glu Phe Asn Ala Glu Glu Ile Ser Ala Met Val Leu
50 55 60

Gln Lys Met Lys Glu Thr Ala Glu Ala Val Leu Gly His Ser Val Arg
65 70 75 80

Asp Ala Val Ile Thr Val Pro Ala Tyr Phe Asn Asp Ser Gln Arg Gln
85 90 95

Ala Thr Lys Asp Ala Ala Thr Ile Ala Gly Leu Asn Ala Ile Arg Ile
100 105 110

Ile Asn Glu Pro Thr Ala Ala Ala
115 120

20

ES 2 552 356 T3

<210> 7
<211> 46
<212> ADN
<213> secuencia artificial

5

<220>
<223> sonda

10

<400> 7
ctccgtcact gaccacctg aaaggccaat gctcatgtc agactg 46

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la determinación fiable, con la exactitud necesaria para un producto farmacéutico, de la actividad biológica de huevos embrionados de *Trichuris*, en el que se realizan al menos 3 de las siguientes determinaciones:
- 5 a) determinación y/o comprobación del estadio del desarrollo embrionario de huevos de helmintos con ayuda del análisis por PCR cuantitativa usando secuencias de marcadores adecuadas para la determinación del número de copias del ADN genómico,
b) determinación de la actividad metabólica de huevos embrionados de helmintos con procedimientos bioquímicos y/o de biología molecular, midiéndose para la determinación de la actividad metabólica de huevos
10 embrionados de *Trichuris* el contenido de ATP y/o tratándose los huevos de *Trichuris* en primer lugar con un agente de pretratamiento seleccionado de ácido hipocloroso, quitinasa y/o proteasa y tifiéndose después con sales de tetrazolio,
c) determinación de la capacidad de inducción de la expresión génica en huevos embrionados de helmintos,
15 d) determinación microscópica de la motilidad de larvas de helmintos que se encuentran en el huevo durante largos espacios de tiempo de observación tras incubación previa a temperaturas elevadas y/o
e) determinación de la tasa de eclosión de larvas de *Trichuris* en el animal de experimentación, cuantificándose los huevos embrionados intactos recuperados del contenido intestinal en comparación con un patrón interno.
2. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1a), en el que por medio de análisis por PCR cuantitativa usando secuencias adecuadas, específicas para *Trichuris suis* se determina el número de copias del ADN genómico.
- 20 3. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1b), **caracterizado porque** los huevos de *Trichuris* antes de la medición de luminiscencia se incuban previamente en las siguientes condiciones:
aa) entre 36 °C y 42 °C
bb) entre 2 y 30 horas
cc) en un medio de suspensión con un valor de pH entre 0,1 y 3.
- 25 4. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1c), **caracterizado porque** se determina la capacidad de inducción de una proteína de choque térmico.
5. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1c), **caracterizado porque** la detección de la expresión se realiza mediante hibridación con una sonda de nucleótidos marcada con fluorescencia.
- 30 6. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1c), **caracterizado porque** la hibridación se detecta con ayuda de la citometría de flujo.
7. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1d), **caracterizado porque** la motilidad de las larvas de helmintos que se encuentran en el huevo se determina microscópicamente durante espacios de tiempo de 2 min a 8 horas con ayuda de registros a cámara rápida.
- 35 8. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1e), **caracterizado porque** los huevos de helmintos que van a someterse a prueba se marcan con sondas de fluorescencia y los patrones internos se marcan con sondas de fluorescencia de otro color.
9. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1e), **caracterizado porque** se usa el contenido intestinal de conejos y/o cerdos como sistema de prueba.
- 40 10. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1e), **caracterizado porque** como patrón interno para la determinación de la tasa de eclosión se usan huevos de *Trichuris* no embrionados o inactivados.
11. Procedimiento según una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado porque** se realizan al menos cuatro determinaciones seleccionadas entre las determinaciones 1a), 1b), 1c), 1d) y/o 1e).
- 45 12. Procedimiento según una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado porque** los huevos de *Trichuris* antes de la realización de la determinación se incubaron previamente durante un espacio de tiempo de al menos 30 minutos a 24 horas en condiciones exactamente normalizadas, comprendiendo la incubación previa dado el caso también una modificación de un parámetro esencial, en particular de la temperatura.

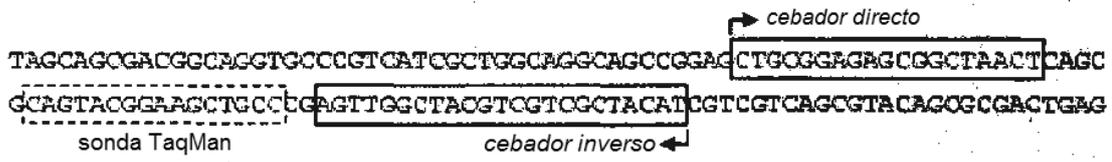


Figura 1: Fragmento de la secuencia de ITS2 de *T. suis* con cebadores y sonda TaqMan para la PCR cuantitativa

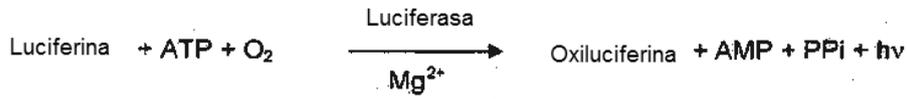
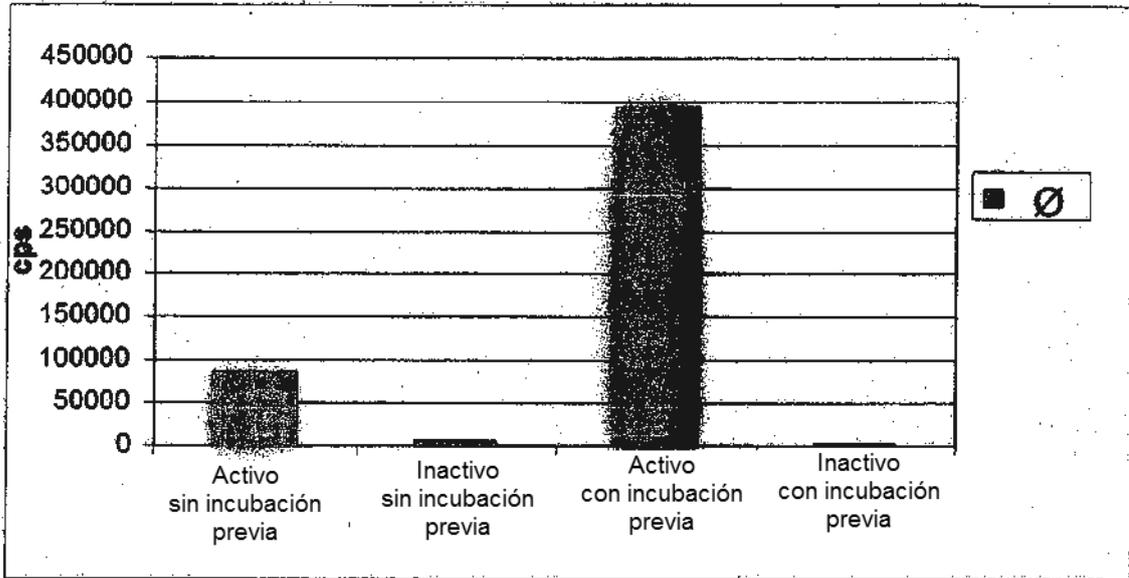


Figura 2: Reacción de la luciferasa para la detección cuantitativa de adenosintrifosfato



Explicaciones con respecto a la figura 3:

- Activo sin incubación previa: Huevos no inactivados sin pretratamiento a 37 °C durante 19 horas (huevos en estado de reposo a 2-8 °C)
- Inactivo sin incubación previa: Huevos crioinactivados sin pretratamiento a 37 °C durante 19 horas
- Activo con incubación previa: Huevos no inactivados con pretratamiento a 37 °C durante 19 horas
- Activo con incubación previa: Huevos crioinactivados con pretratamiento a 37 °C durante 19 horas

Figura 3: Reacción de la luciferasa para la detección cuantitativa de adenosintrifosfato

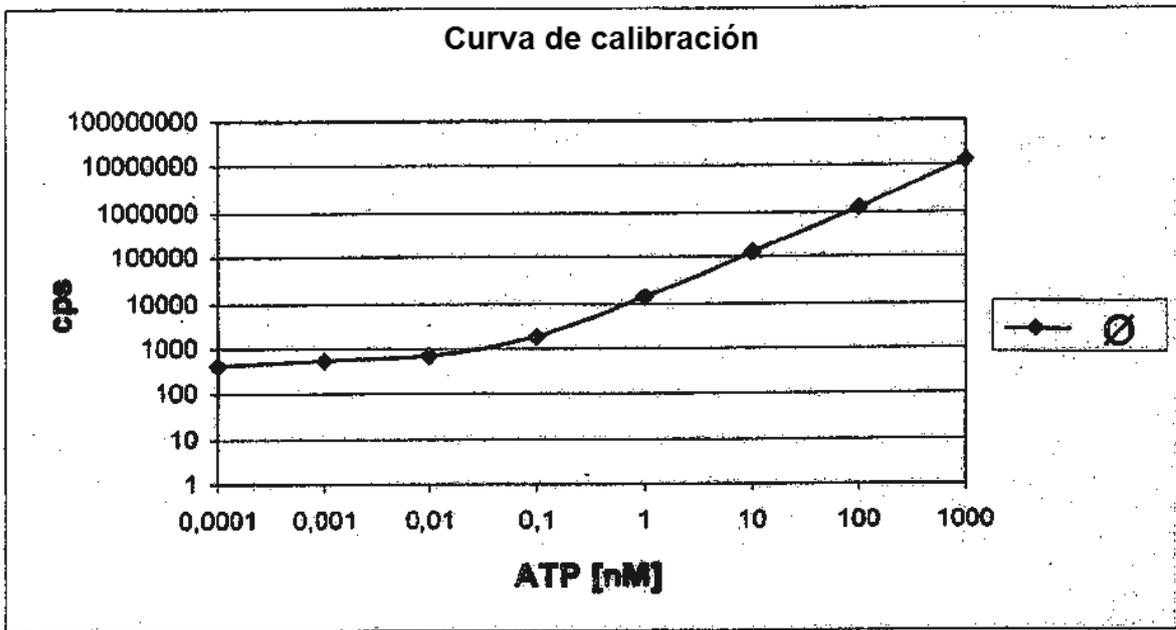


Figura 4: Curva patrón de adenosintrifosfato

```

T.suis_aa      -----IGRRYDDAAVQSDMKHWPFVVBDCGCKPKIQVEYRGETPKMFTPEEVE 47
C.elegans_aa   RNPENTVFDKRLIGRRFDEETVQSDIKHWPFVVGKQGEKPVVEVEVEGERRHFNAEIS 120
                ****;*; ;****;*****.* . . *** ;! ** **;. *.;**.*

T.suis_aa      AMVLVKMKETAAYLG----- 63
C.elegans_aa   AMVLQEMKETAAYLGHVYRDVAVITVPAYFNDSSQRQATKDAATLACLNAIRI INEPTAAA 160
                **** ***** **
    
```

Figura 5: Comparación de la secuencia de proteína de la supuesta proteína de choque térmico de *T. suis* (fragmento) con hsp70 de *C. elegans* (bases iguales: "**"; bases con propiedades fisicoquímicas similares "." o ".")

CICCGTCACIGACCACCTIGAAAGGCCAAIGCTTCATGICAGACTG

Figura 6: Sonda FISH para la detección de la expresión de ARNm de proteína de choque térmico en huevos embrionados activos de *T. suis* (T: bases de alil-amino-timina, a las que están acoplados fluoróforos)

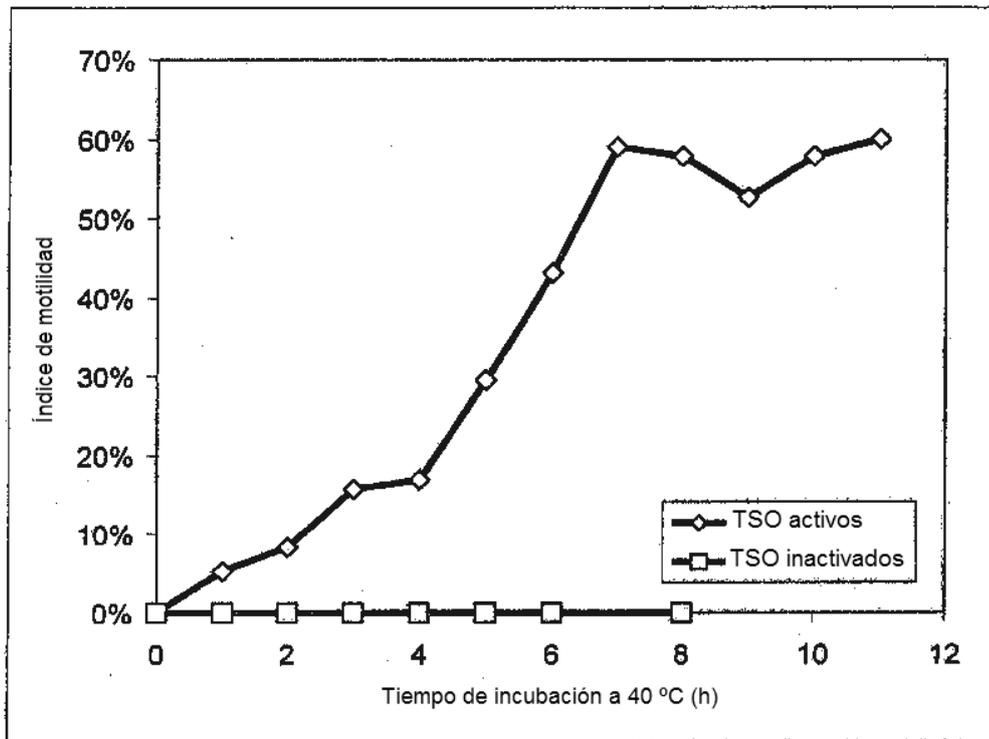


Figura 7: Índice de motilidad de huevos activos y térmicamente inactivados de *Trichuris suis* tras incubación a 39 °C

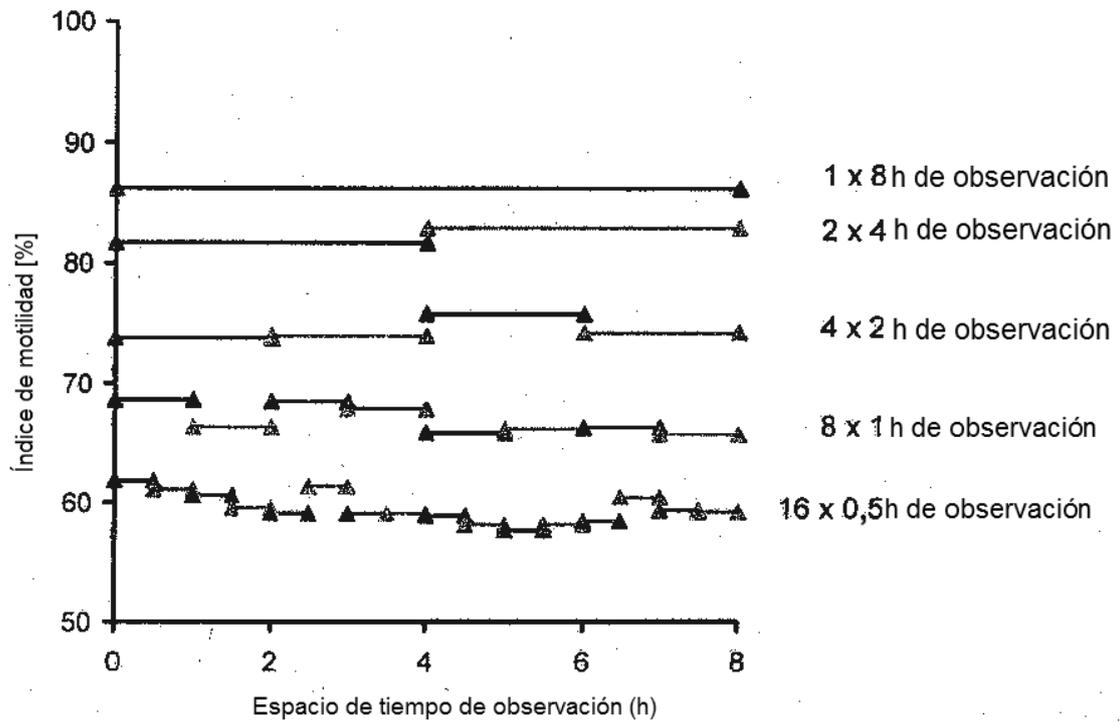


Figura 8: Índice de motilidad de una preparación de *Trichuris suis* tras espacios de tiempo de observación de distinta duración a 39,5 °C

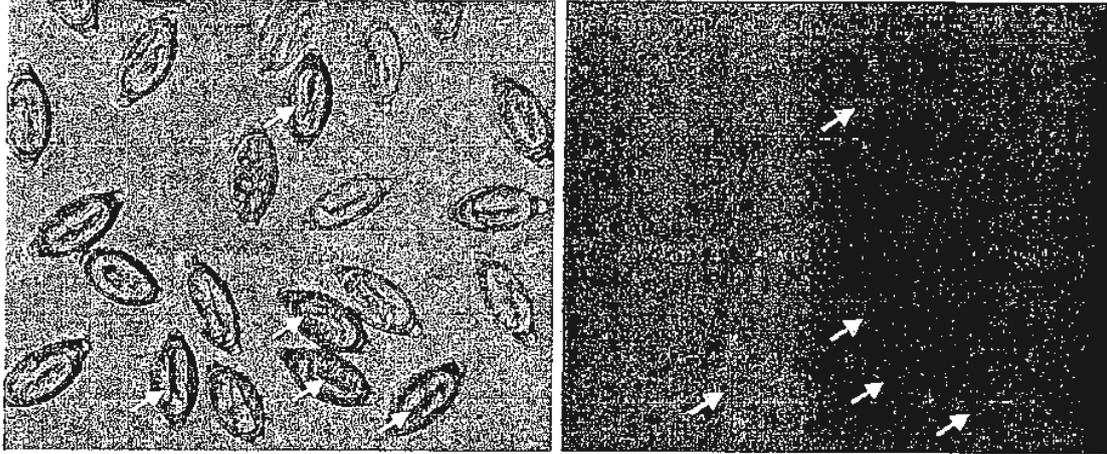


Figura 9: Registro de microscopía de fluorescencia de una mezcla de TSO marcados con rodamina-X y TSO no marcados como control (izquierda: microscopía óptica; derecha: microscopía de fluorescencia). Las flechas marcan los TSO marcados con fluorescencia

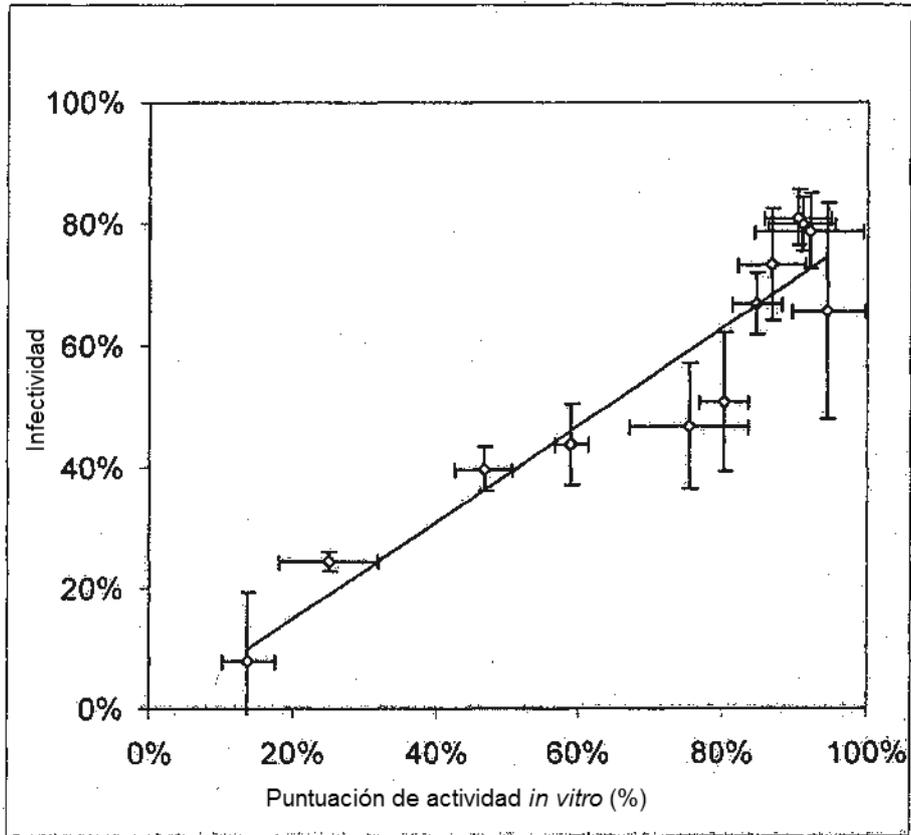


Figura 10