

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 609 586**

51 Int. Cl.:

C07K 14/445 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.03.2010 PCT/US2010/028234**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.09.2010 WO10111220**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.03.2010 E 10710757 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.11.2016 EP 2430043**

54 Título: **Secuencias de nucleótidos y aminoácidos que codifican una proteína exportada 1 derivada de Plasmodium vivax y usos de las mismas**

30 Prioridad:

27.03.2009 US 412529

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

21.04.2017

73 Titular/es:

**ABBOTT LABORATORIES (100.0%)
100 Abbott Park Road
Abbott Park, IL 60064-3500, US**

72 Inventor/es:

**BIRKENMEYER, LARRY G.;
COFFEY, RUTHIE E.;
DAWSON, GEORGE J.;
DESAI, SURESH M.;
DILLE, BRUCE J. y
MUERHOFF, ANTHONY S.**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 609 586 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

Secuencias de nucleótidos y aminoácidos que codifican una proteína exportada 1 derivada de *Plasmodium vivax* y usos de las mismas

5

Campo

La presente invención se refiere a secuencias de ácidos nucleicos y a secuencias de aminoácidos codificados por las mismas, derivadas del gen *antígeno-1 exportado (EXP1)* de *Plasmodium vivax*, útiles en aplicaciones de diagnóstico, entre otras cosas.

10

Antecedentes

Transmisión de la malaria

15

La malaria es una enfermedad transmitida por un mosquito, causada por un parásito. Al menos cuatro especies de parásitos de la malaria pueden infectar a los seres humanos en condiciones naturales: *Plasmodium falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* y *P. malariae*. Las dos primeras especies causan la mayoría de las infecciones en todo el mundo. *P. vivax* y *P. ovale* tienen parásitos en estadio durmiente en el hígado (hipnozoítos) que puede reactivar (o "recidivar") y causar malaria varios meses o años después de la picadura del mosquito infectante; por consiguiente, estas especies pueden ser difíciles de detectar en los individuos infectados.

20

En la naturaleza, los parásitos de la malaria se propagan mediante la infección sucesivamente de dos tipos de huéspedes: seres humanos y mosquitos *Anopheles* hembras. En los seres humanos, los parásitos crecen y se multiplican en primer lugar en las células del hígado y luego en los glóbulos rojos de la sangre. En la sangre, las camadas sucesivas de parásitos crecen dentro de los glóbulos rojos y los destruyen, liberando parásitos hija (merozoítos) que continúan el ciclo al invadir otros glóbulos rojos.

25

Los parásitos en el estadio en la sangre causan los síntomas de la malaria. Cuando ciertas formas de parásitos en estadio en la sangre, los gametocitos, son captados por un mosquito hembra *Anopheles* cuando se alimentan de sangre, comienzan otro ciclo de crecimiento diferente y la multiplicación en el mosquito. Después de 10-18 días, los parásitos se encuentran como esporozoítos en las glándulas salivales del mosquito. Cuando el mosquito *Anopheles* ingiere sangre de otro ser humano, los esporozoítos se inyectan con la saliva del mosquito y empieza otra infección humana cuando parasitan las células del hígado (Wylar, 1992).

30

35

Síntomas y enfermedad de la malaria

La infección con parásitos de la malaria puede dar lugar a una amplia variedad de síntomas, que van desde síntomas ausentes o muy leves hasta enfermedades graves e incluso la muerte. La enfermedad de la malaria puede clasificarse como sin complicaciones o grave (complicada). En general, la malaria se puede curar si se diagnostica y se trata a tiempo. Tras la picadura de un mosquito infectivo, hay un período de incubación antes de que aparezcan los primeros síntomas. El período de incubación suele variar de 7 a 30 días. Los períodos más cortos se observan con mayor frecuencia con *P. falciparum* y los más largos con *P. vivax*. De hecho, *P. vivax* puede tener períodos de incubación extendidos, más de 450 días (Lee et al., 1998).

40

45

Diagnóstico

La malaria se debe reconocer de inmediato con el fin de tratar al paciente a tiempo y para evitar una mayor propagación de la infección en la comunidad. Debido al largo período de incubación de *P. vivax*, el diagnóstico puede ser difícil por métodos tradicionales frotis de sangre, lo que retrasa el tratamiento. El retraso en el diagnóstico y el tratamiento es una causa principal de muerte en los pacientes de malaria. Se puede sospechar malaria sobre la base de los síntomas del paciente y los hallazgos físicos en el examen. Sin embargo, para un diagnóstico definitivo, las pruebas de laboratorio deben demostrar la presencia de los parásitos de la malaria. La presente "referencia" de diagnóstico para la malaria depende de la demostración de los parásitos en un frotis de sangre examinada bajo un microscopio.

50

55

Detección de anticuerpos contra Plasmodium

Los anticuerpos contra los parásitos asexuales de la malaria (es decir, merozoítos) aparecen en cuestión de días o semanas después de que los parásitos invaden los eritrocitos y pueden persistir durante meses o incluso años (Vinetz et al., 1998). Sin embargo, normalmente no se recomienda la detección de anticuerpos para el diagnóstico de malaria aguda, debido a que la presencia de anticuerpos puede indicar una infección pasada o reciente. Se han desarrollado ensayos de inmunoabsorción enzimática (ELISA) que usan antígenos derivados de *Plasmodium* (Newmarket Laboratories, Reino Unido; Cellabs, Australia) o lisados del organismo entero *P. falciparum* (DiaMed) para detectar inmunoglobulinas (IgG y/o IgM) en el suero o plasma humano. Estos ensayos son más fáciles de realizar, exhiben un mayor rendimiento y una mejor sensibilidad y especificidad que el IFA (Kitchen et al., 2004;

60

65

Seed et al., 2005; Srivastava et al., 1991). Los ensayos ELISA comerciales actuales no son lo suficientemente sensibles como para detectar anticuerpos dirigidos contra cada una de las cuatro especies de Plasmodium (She et al., 2007).

5 Los antígenos utilizados para capturar anticuerpos han incluido candidatos a vacunas. Estos antígenos son atractivos para aplicaciones de diagnóstico debido a que se sabe que estos antígenos provocan respuestas de anticuerpos y, por lo tanto, es probable que sean útiles para la detección de anticuerpos producidos por individuos infectados que resultan de la infección por parásitos. Ejemplos de tales antígenos incluyen la proteína circumsporozoito (CSP), el antígeno de la membrana apical 1 (AMA-1), la proteína de superficie de merozoito (MSP) uno y dos, de ambos *P. vivax* y *P. falciparum* (Kitchen et al., 2004; Rodrigues et al., 2003). Otros antígenos de interés son MSP-2, -3, -4, -5, -8 -9, la proteína rica en glutamato, y el antígeno de repetición de serina (Girard et al., 2007).

15 La proteína 1 exportada (EXP1; también conocida como QF116, el antígeno 5.1 y el antígeno relacionado con el circumsporozoito (Meraldi et al., 2002)) se ha estudiado en *Plasmodium sp.*, aunque su ortólogo en *P. vivax* no se ha dilucidado, excepto por búsqueda de secuencias. En especies que no son de *P. vivax*, el polipéptido es una proteína vesicular que se piensa que es importante en el transporte intracelular de las proteínas del parásito (Simmons et al., 1987). En *P. falciparum*, EXP1 se expresa como una proteína de 23 kD en los estadios en la sangre pre-eritrocítico y asexual del parásito (Hope et al., 1984). Una proteína integral de membrana, se encuentra en las membranas de las vacuolas parasitóforas (vacuolas endoplasmático y envueltas en el retículo que protegen a los parásitos intracelulares) y en las vesículas en el citoplasma de la célula huésped (Kara et al., 1990; Sherman, 1985; Tolle et al., 1993). Los estudios que utilizan un homólogo murino de EXP1 demostraron que la proteína puede inducir inmunidad de células T protectora en ratones contra exposiciones letales con *P. yoelii* (Charoenvit et al., 1999). Los anticuerpos generados contra los polipéptidos de EXP1 *P. falciparum* han tenido éxito en la detección de infecciones de malaria (Meraldi et al., 2002). Generalmente, el extremo C es más antigénico en seres humanos (Meraldi et al., 2002).

30 Divulgado en Database EMBL [online], 22 de septiembre 2005, "Plasmodium vivax ctg 6977, whole genome shotgun sequence", recuperable de EPI n.º de acceso EMBL:AAKM01000005, es el genoma completo de *P. vivax* que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica el antígeno relacionado con el circumsporozoito-proteína.

35 Ha habido informes del uso de secuencias de EXP1 de *P. vivax* como herramientas para diagnosticar infección por *P. vivax* (Kim et al., 2003; Son et al., 2001); sin embargo, estos primeros esfuerzos parecen haberse basado en secuencias incorrectas y los diagnósticos resultantes muy probablemente detectaron secuencias de EXP1 de *P. falciparum*. Tanto en Kim et al. (2003) como en Son et al. (2001), los autores usaron secuencias de cebadores desarrolladas aparentemente usando las secuencias divulgadas por Simmons et al. (Simmons et al., 1987). Simmons et al. (1987) informaron sobre secuencias de EXP1 de *P. falciparum* y observaron que la secuencia estaba altamente conservada en cinco líneas de *P. falciparum*; sin embargo, Simmons et al. (1987) no informaron sobre ninguna secuencia de EXP1 de *P. vivax*. Kim et al. (2003) y Son et al. (2001) cita en número de acceso en GenBank. X05074 como de *P. vivax*; no obstante, la entrada en GenBank indica que este acceso es parte de *P. falciparum*. Par sortear esto, Kim et al. (2003) y Son et al. (2001) usaron como sangre modelo de un paciente de malaria de *vivax*, pero el análisis de los datos sugiere que los cebadores que usaron no amplificarían secuencias de polinucleótidos de *P. vivax* porque los últimos 3 nucleótidos (3') del cebador directo, y los últimos 6 nucleótidos (3') del cebador inverso no se hibridan con la supuesta secuencia EXP1 de *P. vivax*, tal como se entiende en la actualidad.

45 La detección de anticuerpos en suero o plasma donado se puede utilizar para identificar donantes individuales que han estado expuestos a organismos de malaria y que pueden haber sido infectados recientemente y, por lo tanto, están potencialmente parasitémicos. Las cuatro especies de Plasmodium que infectan a los seres humanos se han transmitido a través de la transfusión de sangre y, aunque la incidencia de la malaria después de una transfusión es baja en Estados Unidos (Mungai et al., 2001), la disponibilidad de donantes de sangre podría incrementarse mediante la aplicación del ensayos de detección selectiva de anticuerpos contra Plasmodium, de tal manera que solo en los individuos expuestos a un organismo de malaria organismo se aplaza la donación de sangre en lugar de todos los donantes que han viajado o vivido en regiones endémicas de malaria, como es la práctica actual. Dichos ensayos podrían detectar, teóricamente, anticuerpos contra especies de Plasmodium que infectan a los humanos y causan malaria (*P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* y *P. malariae*). Actualmente se usan ELISA de anticuerpos comerciales (Reino Unido, Australia, Francia) o se están considerando en otros países para el restablecimiento de los donantes aplazados (Elghouzzi et al., 2008; Kitchen et al., 2004; Seed et al., 2005). En estos casos, se analiza en los donantes la presencia de anticuerpos contra antígenos de Plasmodium en un plazo de varios meses desde el aplazamiento.

60 Un ensayo comercial (Pan Malaria Antibody CELISA) from Cellabs Pty. Ltd. (Brookvale, NSW, Australia) reclama la detección de anticuerpos contra las cuatro especies de Plasmodium que causan la malaria en seres humanos y una sensibilidad del 94 % frente a la prueba de inmunofluorescencia (IFAT) (según la ficha técnica). Una evaluación independiente sugiere que el ensayo tiene una escasa sensibilidad para la detección de anticuerpos contra la malaria por *falciparum* y no producida por *falciparum* en comparación con IFAT (Mertens et al., 1999). Una evaluación independiente del otro ensayo de DiaMed AG (Suiza) que usa una mezcla de extractos de la proteína

recombinante de *P. falciparum* y *P. vivax* cultivada (proteína del circumsporozoíto), demostró una escasa sensibilidad para la detección de individuos sintomáticos con *P. vivax* confirmado microscópicamente (18/24) pero detectaba anticuerpos en pacientes infectados con *P. ovale* (2/2), o *P. malariae* (2/2) (Doderer et al., 2007). El ensayo de anticuerpos de la malaria fabricado por Newmarket Laboratories Ltd (Kentford, Reino Unido) reclama la detección de las cuatro especies de Plasmodium responsables de la malaria humana, aunque solo contiene x antígenos recombinantes derivados de *P. falciparum* y *P. viva*. La ficha técnica indica sensibilidad para la detección de anticuerpos contra *P. ovale* y *P. malariae* de solo el 80 % y 67 %, respectivamente. La detección de anticuerpos en los individuos infectados con *P. ovale* o *P. malariae* puede deberse a una infección pasada con *P. falciparum* o *P. vivax* y, por lo tanto, la reactividad se debe a la detección de anticuerpos persistentes frente a estos agentes. Una evaluación independiente del ensayo demostró la detección de solamente 9/14 (64 %) de los pacientes con malaria aguda debido a infección por *P. ovale* y 85 % (15/18) de los pacientes con malaria por *P. vivax* (Kitchen et al., 2004). Por lo tanto, la capacidad reivindicada de estos ensayos para detectar los anticuerpos humanos provocados por la infección de *P. falciparum* así como de *P. ovale*, *P. vivax* y *P. malariae* es cuestionable. Para los ensayos cuya composición de antígeno en fase sólida se conoce (por ejemplo, Newmarket, DiaMed), la ausencia de antígenos específicos frente a *P. ovale* o *P. malariae* sugiere que la detección de anticuerpos contra estas especies puede deberse a la reactividad cruzada de los anticuerpos, que plantea importantes cuestiones sobre la especificidad del ensayo, así como sobre la sensibilidad, o la reactividad observados en las muestras de *P. ovale* o *P. malariae* se debe a la presencia de anticuerpos frente *P. falciparum* o *P. vivax* de infecciones previas

Por lo tanto, actualmente existe una necesidad significativa de detección fiable de anticuerpos contra Plasmodium de *P. vivax*.

Sumario

El alcance de la invención y diversas formas de realización de la invención se definen mediante las reivindicaciones adjuntas

En un primer aspecto, la invención se refiere a un ácido nucleico aislado que consiste en una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos del 98 % de identidad con la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1, no difiriendo dicho ácido nucleico en lo que respecta a la longitud de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1. La secuencia de ácido nucleico puede ser, por ejemplo, la de la SEQ ID NO: 1, o aislada de *Plasmodium vivax*.

En un segundo aspecto, la invención se refiere a una proteína purificada que consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 33.

En el presente documento también se divulgan métodos de producción de una proteína, donde el método comprende las etapas de:

- (a) aislar una secuencia de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1;
- (b) construir un vector que comprende la secuencia de ácido nucleico aislada unida operativamente a una secuencia reguladora; y
- (c) introducir dicho vector en una célula huésped durante un tiempo y en condiciones suficientes para la expresión de dicha proteína.

La célula huésped puede ser una célula procariota o eucariota.

En un tercer aspecto, la invención se refiere a vectores que comprenden una secuencia de ácido nucleico que consiste en la SEQ ID NO: 1, unida operativamente a una secuencia reguladora, y a las células huésped que comprenden dichos vectores.

En un cuarto aspecto, la invención se dirige a métodos de detección de anticuerpos contra *P. vivax* en una muestra de ensayo que se sospecha que contiene los anticuerpos, que comprenden las etapas de:

- (a) poner en contacto la muestra de ensayo con un antígeno que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3, durante un tiempo y en condiciones suficientes para la formación de complejos de anticuerpo / antígeno; y
- (b) detectar la presencia de anticuerpos presentes en la muestra de ensayo mediante la detección de la presencia de los complejos de anticuerpo / antígeno.

En un quinto aspecto, la invención se dirige a métodos de detección de anticuerpos contra *P. vivax* en una muestra de ensayo que se sospecha que contiene los anticuerpos, que comprenden las etapas de:

- (a) poner en contacto la muestra de ensayo con un antígeno que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3, durante un tiempo y en condiciones suficientes para la formación de complejos anticuerpo / antígeno;
- (b) añadir un conjugado a los complejos antígeno/anticuerpo resultantes durante un tiempo y en condiciones

suficientes para permitir que el conjugado se una al anticuerpo unido, donde el conjugado comprende un anticuerpo unido a un compuesto generador de señal capaz de generar una señal detectable; y

(c) detectar la presencia de anticuerpos presentes en la muestra de ensayo mediante la detección de la presencia de la señal generada por el compuesto generador de señal.

5 En un sexto aspecto, la invención se dirige a métodos de detección de anticuerpos contra *P. vivax* en una muestra de ensayo que se sospecha que contiene los anticuerpos, que comprenden las etapas de:

10 (a) poner en contacto la muestra de ensayo con un antígeno que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3, durante un tiempo y en condiciones suficientes para la formación de complejos anticuerpo / antígeno;

(b) añadir un conjugado a los complejos antígeno/anticuerpo resultantes durante un tiempo y en condiciones suficientes para permitir que el conjugado se una al anticuerpo unido, donde el conjugado comprende un antígeno que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO:2 y SEQ ID NO:3, unido a un compuesto generador de señal capaz de generar una señal detectable; y

15 (c) detectar la presencia de anticuerpos presentes en la muestra de ensayo mediante la detección de la presencia de la señal generada por el compuesto generador de señal.

20 En un séptimo aspecto, la invención se dirige a métodos de detección de la presencia de anticuerpos contra *P. vivax* en una muestra de ensayo que se sospecha que contiene los anticuerpos, que comprenden las etapas de:

(a) poner en contacto la muestra de ensayo con anti-anticuerpos durante un tiempo y en condiciones suficientes para permitir la formación de complejos de anti-anticuerpo/anticuerpo frente a *P. vivax*;

25 (b) añadir antígeno a los complejos de anti-anticuerpo/ anticuerpo de *P. vivax* durante un tiempo y en condiciones suficientes para permitir que el antígeno se una al anticuerpo unido, donde el antígeno comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3;

(c) añadir un conjugado a los complejos de anti-anticuerpo/ anticuerpo de *P. vivax*, donde el conjugado comprende una composición que comprende un anticuerpo monoclonal o policlonal generado contra complejos de anticuerpo/antígeno de *P. vivax* unidos a un compuesto generador de señal capaz de generar una señal detectable; y

30 (d) detectar la presencia de anticuerpos que pueden estar presentes en la muestra de ensayo mediante la detección de la presencia de la señal generada por el compuesto generador de señal.

35 En aún un octavo aspecto, la invención se refiere a métodos de detección de anticuerpos contra *P. malariae*, *P. falciparum*, *P. vivax* y *P. ovale* en una muestra de ensayo que se sospecha que contiene al menos uno de los anticuerpos, que comprenden las etapas de:

(a) poner en contacto la muestra de ensayo con: (i) un antígeno que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 2 y la SEQ ID NO: 3, (ii) un antígeno de *P. falciparum*;

40 (iii) un antígeno de *P. ovale*, y (iv) un antígeno de *P. malariae*, durante un tiempo y en condiciones suficientes para la formación de complejos de anticuerpo / antígeno de *P. malariae*, complejos de anticuerpo / antígeno de *P. falciparum*, complejos de anticuerpo / antígeno de *P. vivax* y complejos de anticuerpo / antígeno de *P. ovale*;

y

45 (b) detectar la presencia de anticuerpos presentes en la muestra de ensayo mediante la detección de la presencia de uno o más de los complejos.

50 En un noveno aspecto, la invención se refiere a métodos de detección de anticuerpos contra *P. malariae*, *P. ovale*, *P. vivax* y *P. falciparum* en una muestra de ensayo que se sospecha que contiene al menos uno de los anticuerpos, que comprenden las etapas de:

(a) poner en contacto la muestra de ensayo con: (i) un antígeno que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 2 y la SEQ ID NO: 3, (ii) un antígeno de *P. ovale*; (iii) un antígeno de *P. malariae*, y (iv) un antígeno de *falciparum*, durante un tiempo y en condiciones suficientes para permitir la formación de complejos de anticuerpo / antígeno de *P. malariae*, complejos de anticuerpo / antígeno de *P. ovale*, complejos de anticuerpo / antígeno de *P. vivax* y complejos de anticuerpo / antígeno de *P. falciparum* ;

(b) añadir cuatro conjugados a los complejos de anticuerpo / antígeno resultantes durante un tiempo y en condiciones suficientes para permitir que cada conjugado se una al anticuerpo unido, donde un primer conjugado comprende un antígeno que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 2 y la SEQ ID NO: 3, unida a un compuesto generador de señal capaz de generar una señal detectable; un segundo conjugado comprende un antígeno de *P. ovale* unido a un compuesto generador de señal capaz de generar una señal detectable; un tercer conjugado comprende un antígeno de *P. malariae* unido a un compuesto generador de señal capaz de generar una señal detectable y un cuarto conjugado comprende un antígeno de *P. falciparum* unido a un compuesto generador de señal capaz de generar una señal detectable; y

65 (c) detectar la presencia de anticuerpos contra *P. malariae*, *P. ovale*, *P. vivax* y *P. falciparum* que pueden estar

presentes en la muestra de ensayo mediante la detección de la presencia de la señal generada por el compuesto generador de señal.

5 En un décimo aspecto, la invención se refiere a métodos de detección de anticuerpos contra *P. malariae*, *P. ovale*, *P. vivax* y *P. falciparum* en una muestra de ensayo que se sospecha que contiene al menos uno de los anticuerpos, que comprenden las etapas de:

10 (a) poner en contacto la muestra de ensayo con (i) un antígeno que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 2 y la SEQ ID NO: 3, (ii) un antígeno de *P. malariae*; (iii) un antígeno de *P. ovale*, y (iv) un antígeno de *falciparum*, durante un tiempo y en condiciones suficientes para permitir la formación de complejos de anticuerpo / antígeno de *P. malariae*, complejos de anticuerpo / antígeno de *P. ovale*, complejos de anticuerpo / antígeno de *P. vivax* y complejos de anticuerpo / antígeno de *P. falciparum*;

15 (b) añadir un conjugado a los complejos antígeno/anticuerpo resultantes durante un tiempo y en condiciones suficientes para permitir que cada conjugado se una al anticuerpo unido, donde el conjugado comprende un anticuerpo unido a un compuesto generador de señal capaz de generar una señal detectable; y

20 (c) detectar la presencia de anticuerpos contra *P. malariae*, *P. ovale*, *P. vivax* y *P. falciparum* que pueden estar presentes en la muestra de ensayo mediante la detección de la presencia de la señal generada por el compuesto generador de señal.

25 En un undécimo aspecto, la invención se refiere a métodos de detección de la presencia de anticuerpos contra *P. malariae*, *P. ovale*, *P. vivax* y *P. falciparum* en una muestra de ensayo que se sospecha que contiene al menos uno de los anticuerpos, que comprenden las etapas de:

(a) poner en contacto la muestra de ensayo con anti-anticuerpos durante un tiempo y en condiciones suficientes para permitir la formación de complejos de anti-anticuerpo/*P. vivax*, anti-anticuerpo/*P. malariae*, anti-anticuerpo/*P. ovale* y anti-anticuerpo/*P. falciparum*;

30 (b) añadir un primer antígeno, un segundo antígeno, un tercer antígeno y un cuarto antígeno a los complejos de anti-anticuerpo/*P. vivax*, anti-anticuerpo/*P. malariae*, anti-anticuerpo/*P. ovale* y anti-anticuerpo/*P. falciparum* durante un tiempo y en condiciones suficientes para permitir que los antígenos se unan al anticuerpo unido, donde (i) el primer antígeno comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 2 y la SEQ ID NO: 3; (ii) el segundo antígeno comprende un antígeno de *P. ovale*; (iii) el tercer antígeno comprende un antígeno de *P. malariae*; y (iv) el cuarto antígeno comprende un antígeno de *P. falciparum*;

35 (c) añadir un primer conjugado, un segundo conjugado, un tercer conjugado y un cuarto conjugado a los complejos anti-anticuerpo / anticuerpo / antígeno resultantes durante un tiempo y en condiciones suficientes para permitir que los conjugados se unan a anticuerpo unido, donde los conjugados están cada uno unidos a un compuesto generador de señal capaz de generar una señal detectable; y (i) el primer conjugado comprende una composición que comprende un anticuerpo monoclonal o policlonal generado contra complejos de anticuerpo / antígeno de *P. vivax*; (ii) el segundo conjugado comprende una composición que comprende un anticuerpo monoclonal o policlonal generado contra complejos anticuerpo / antígeno de *P. ovale*; (iii) el tercer conjugado comprende una composición que comprende un anticuerpo monoclonal o policlonal generado contra complejos anticuerpo / antígeno de *P. malariae*; (vi) el cuarto conjugado comprende una composición que comprende un anticuerpo monoclonal o policlonal generado contra complejos anticuerpo / antígeno de *P. falciparum*; y

40 (d) detectar la presencia de anticuerpos que pueden estar presentes en la muestra de ensayo mediante la detección de la presencia de la señal generada por los compuestos generadores de señal.

50 En un decimosegundo aspecto, la invención se refiere a métodos de detección de la presencia de anticuerpos contra *P. malariae*, *P. ovale*, *P. vivax* y *P. falciparum* en una muestra de ensayo que se sospecha que contiene al menos uno de los anticuerpos, que comprenden las etapas de:

55 (a) poner en contacto la muestra de ensayo con anti-anticuerpo para permitir la formación de complejos anti-anticuerpo / anticuerpo;

(b) añadir un primer conjugado, un segundo conjugado, un tercer conjugado y un cuarto conjugado a los complejos anti-anticuerpo / anticuerpo resultantes durante un tiempo y en condiciones suficientes para permitir que los conjugados se unan al anticuerpo unido, donde el primer conjugado comprende un antígeno que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 2 y la SEQ ID NO: 3, unido a un compuesto generador de señal capaz de generar una señal detectable, donde el segundo conjugado comprende un antígeno de *P. ovale* unido a un compuesto generador de señal capaz de generar una señal detectable, donde el tercer conjugado comprende un antígeno de *P. malariae* unido a un compuesto generador de señal capaz de generar una señal detectable, y donde el conjugado comprende un cuarto antígeno de *P. falciparum* unido a un compuesto generador de señal capaz de generar una señal detectable; y

60 (c) detectar la presencia de anticuerpos contra *P. malariae*, *P. ovale*, *P. vivax* y *P. falciparum* en la muestra de ensayo mediante la detección de la presencia de la señal generada por el compuesto generador de señal.

En un decimotercer aspecto, la invención se refiere a vacunas que comprenden: (a) al menos un antígeno seleccionado del grupo que consiste en: un antígeno que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 o la SEQ ID NO: 3, o un epítipo del mismo. Tales vacunas pueden comprender, además, un antígeno seleccionado del grupo que consiste en *P. falciparum*, *P. ovale*, y *P. malariae*; y un adyuvante farmacéuticamente aceptable.

En un decimocuarto aspecto, la invención se refiere a kits para determinar la presencia de anticuerpos contra *P. vivax* en una muestra de ensayo, que comprende: a) un antígeno que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 2 y la SEQ ID NO: 3 y (b) un conjugado que comprende un anticuerpo unido a un compuesto generador de señal capaz de generar una señal detectable.

En un decimoquinto aspecto, la invención se refiere a kits para determinar la presencia de anticuerpos contra *PP. malariae*, *P. ovale*, *P. vivax* y *P. falciparum* en una muestra de ensayo, que comprende: a) (i) un antígeno que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 2 y la SEQ ID NO: 3, (ii) un antígeno de *P. ovale*, (iii) un antígeno de *P. malariae* y (iv) un antígeno de *P. falciparum* y (b) un conjugado que comprende un anticuerpo unido a un compuesto generador de señal capaz de generar una señal detectable.

En un decimosexto aspecto, la invención se refiere a kits para detectar anticuerpos contra *P. malariae*, *P. ovale*, *P. vivax* y *P. falciparum* en una muestra de ensayo, que comprende: a) un anti-anticuerpo y b) (i) un antígeno que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 2 y la SEQ ID NO: 3, (ii) un antígeno de *P. ovale*, (iii) un antígeno de *P. malariae* y (iv) un antígeno de *P. falciparum* y (b) un conjugado que comprende un anticuerpo unido a un compuesto generador de señal capaz de generar una señal detectable.

En un decimoséptimo aspecto, la invención se refiere además a kits para detectar anticuerpos contra *P. malariae*, *P. ovale*, *P. vivax* y *P. falciparum* en una muestra de ensayo, que comprende: (a) un anti-anticuerpo y (b) un primero conjugado que comprende un antígeno que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 2 y la SEQ ID NO: 3, unida a un compuesto generador de señal capaz de generar una señal detectable; un segundo conjugado que comprende un antígeno de *P. ovale* unido a un compuesto generador de señal capaz de generar una señal detectable; un tercer conjugado que comprende un antígeno de *P. malariae* unido a un compuesto generador de señal capaz de generar una señal detectable y un cuarto conjugado que comprende un antígeno de *P. falciparum* unido a un compuesto generador de señal capaz de generar una señal detectable.

En un decimoctavo aspecto, la invención se dirige a métodos de detección de la presencia de anticuerpos contra *P. vivax* en una muestra de ensayo que se sospecha que contiene los anticuerpos, que comprenden las etapas de:

- (a) poner en contacto la muestra de ensayo con anti-anticuerpos durante un tiempo y en condiciones suficientes para permitir la formación de complejos de anti-anticuerpo/anticuerpo frente a *P. vivax*;
- (b) añadir antígeno a los complejos de anti-anticuerpo/ anticuerpo de *P. vivax* durante un tiempo y en condiciones suficientes para permitir que el antígeno se una al anticuerpo unido, donde el antígeno comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3; donde el antígeno está conjugado a un compuesto generador de señal capaz de generar una señal detectable;
- y
- (c) detectar la presencia de anticuerpos que pueden estar presentes en la muestra de ensayo mediante la detección de la presencia de la señal generada por el compuesto generador de señal.

Breve descripción de las figuras

La **Figura 1A** muestra la secuencia de polinucleótidos del gen de la "proteína exportada 1" (EXP1) de optimizado *Plasmodium vivax* (SEQ ID NO: 1). La Figura 1B muestra la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 2) de la proteína EXP1 codificada por el gen EXP1 mostrado en la Figura 1A (SEQ ID NO: 1). La Figura 1C muestra un fragmento sintético (SEQ ID NO: 3) que constituye la porción C-terminal de la proteína EXP1 mostrada en la Figura 1B (SEQ ID NO: 2).

La **figura 2** muestra el formato de ensayo descrito en el Ejemplo 9.

Descripción detallada

La presente invención se refiere a nuevas secuencias de ácidos nucleicos y polipéptidos diseñadas a partir de *P. vivax*. Tales secuencias de ácidos nucleicos y polipéptidos se pueden utilizar para fines de diagnóstico, así como terapéuticos.

Secuencia de polinucleótidos y polipéptidos codificados

5 Los inventores encontraron que los anticuerpos anti-EXP1 están presentes en cuestión de días o semanas de la infección por *P. vivax*. Estos anticuerpos no parecen persistir, ya que son difíciles de detectar en muestras de suero tomadas de individuos que se recuperaron de la malaria años antes. Por lo tanto, la IgG anti-EXP1 es un marcador de infección reciente, que puede ser fundamental para la identificación de anticuerpos entre los donantes de sangre que viajaron recientemente a zonas endémicas de malaria.

10 La invención se refiere, en parte, a nuevos polinucleótidos y polipéptidos que son útiles, por ejemplo, para detectar infección por *P. vivax* de un sujeto. Los polinucleótidos y polipéptidos de la invención son particularmente útiles para la identificación de los sujetos que han sido recientemente infectados con *P. vivax*. Por tanto, la invención proporciona herramientas de diagnóstico, así como herramientas para seleccionar las muestras de sujetos, tales como tejidos, incluyendo, por ejemplo, sangre. La detección de infección reciente por *P. vivax* permite la eliminación de la sangre recolectada no apta del suministro de sangre, protegiendo de este modo a los sujetos receptores.

15 La presente invención tiene la ventaja de que los polipéptidos recombinantes de EXP1 pueden usarse para la detección específica de anticuerpos en el suero o plasma de individuos infectados con *P. vivax* en cuestión de días o semanas de la infección. Por lo tanto, como un marcador de la infección en fase temprana (aguda), los polipéptidos EXP1 tienen la capacidad de identificar a los individuos recientemente expuestos a *P. vivax*. Dado que estos individuos pueden ser donantes de sangre, la detección de anticuerpos pronto después de la seroconversión reduce el riesgo de malaria transmitida por transfusión.

20 Los inventores lograron la invención mediante la predicción con precisión de la secuencia de polinucleótidos que codifica la porción C-terminal del polipéptido EXP1 de *P. vivax* y, después, probar la capacidad de los polipéptidos codificados para unirse a anticuerpos anti-EXP1, incluidos los anticuerpos a partir de muestras recogidas de sujetos.

25 En una realización, un polipéptido EXP1 recombinante fusionado con una secuencia de CKS amino terminal y usado en un ELISA indirecto detecta anticuerpos anti-EXP1 IgG e IgM en los individuos infectados con *P. vivax*.

30 En una realización, un polipéptido EXP1 recombinante de la invención se aplica sobre un soporte en fase sólida y se utiliza para capturar los anticuerpos presentes en el suero o plasma. El conjugado anti-inmunoglobulina se utiliza para detectar la inmunoglobulina unida.

35 La secuencia de la proteína codificada por la proteína EXP1 de *P. vivax* se predijo mediante homología de secuencia con las proteínas de *P. falciparum* y *P. yoelii*, y mediante la identificación de potenciales sitios de corte y empalme de la secuencia genómica de *P. vivax*. La secuencia de polinucleótidos de la invención para el gen sintético EXP1 de *P. vivax* se muestra en la Figura 1A (SEQ ID NO: 1) y la secuencia de aminoácidos codificada se muestra en la Figura 1B (SEQ ID NO: 2); estas secuencias se muestran también en la Tabla A, que también indica características específicas. El gen contiene un sitio 5'-EcoRI seguido de un codón de iniciación (subrayado), el cuerpo del gen que codifica la secuencia de aminoácidos predicha en C-terminal de EXP1 de *P. vivax*, una secuencia que codifica un marcador de histidina (*cursiva*), un codón de terminación (**negrita**) y un sitio BamHI. Los sitios de enzimas de restricción se utilizaron para la clonación en vectores de expresión y se incluyó el marcador de histidina para facilitar la purificación posterior de la proteína expresada. Las composiciones y métodos de la invención comprenden las secuencias de polinucleótidos y polipéptidos no modificados, donde se elimina la cola de histidina, así como los polipéptidos que carecen de la metionina inicial y la cola de His, tal como la de SEQ ID NO: 3.

TABLA A

Polinucleótido de EXP1 (SEQ ID NO:1) y el polipéptido codificado (SEQ ID NO: 2)

gaattcc atg aac gcc ggt aac ggt cgt cat cca ttt tct ctg ggt ggt ggt aaa ggt ggc 61

Met Asn Ala Gly Asn Gly Arg His Pro Phe Ser Leu Gly Gly Gly Lys Gly Gly 18

gac gcg gcg cct acg gag ccg acg ccg gca ccg acc gcg ccg agc gca act ggt ctg aac 121

Asp Ala Ala Pro Thr Glu Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ala Pro Ser Ala Thr Gly Leu Asn 38

gat gac ggt tct tct tct ggc act gaa tct act tct *cat cat cac cat cac cat tga* gga 181

Asp Asp Gly Ser Ser Ser Gly Thr Glu Ser Thr Ser His His His His His His 56

tcc 184

La invención también se refiere a métodos de detección de infecciones recientes de *P. vivax*, donde una muestra de ensayo de un sujeto se analiza para detectar la presencia de anticuerpos anti-EXP1 de *P. vivax*. Usando anticuerpos anti-EXP1 para detectar infecciones recientes de *P. vivax* es efectiva, ya que los anticuerpos anti-polipéptido EXP1 están en sus títulos más altos y más fácilmente detectables en los sujetos que han sido infectados recientemente, pero el título disminuye con el tiempo a niveles indetectables en su mayoría. La muestra de ensayo se pone en contacto con un polipéptido EXP1 y, a continuación, se detecta la unión del polipéptido EXP1 por los anticuerpos presentes en la muestra de ensayo. En una realización, los polipéptidos EXP1 están unidos a un sustrato.

DEFINICIONES

Las siguientes definiciones son aplicables a la invención solo en la medida en que sean coherentes con el alcance de las reivindicaciones adjuntas.

Un "epítopo" es un determinante antigénico de un polipéptido. Un epítopo puede comprender al menos tres aminoácidos en una conformación espacial que es única para el epítopo. Generalmente, un epítopo consta de al menos cinco de dichos aminoácidos y, más habitualmente, consiste en al menos de ocho a diez aminoácidos.

"Hibridan específicamente" se refiere a la capacidad de un ácido nucleico para unirse de forma detectable y específica a un segundo ácido nucleico. Los polinucleótidos hibridan específicamente con hebras de ácido nucleico diana en condiciones de hibridación y de lavado que minimizan cantidades apreciables de unión detectable a ácidos nucleicos no específicos.

"Secuencia diana" o "secuencia de ácido nucleico diana" significa una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido EXP1 de *P. vivax*, o complementarios de las mismas, que se amplifica, detecta, o ambas cosas usando, por ejemplo, polinucleótidos complementarios. Adicionalmente, aunque el término secuencia diana hace referencia, en ocasiones, a una secuencia de ácido nucleico bicatenario, una secuencia diana también puede ser monocatenaria. En los casos donde la diana es bicatenaria, las secuencias del dejador polinucleotídico de la presente invención amplifican, preferentemente, ambas hebras de la secuencia diana.

"Muestra de ensayo" significa una muestra tomada de un sujeto, o un fluido biológico, donde la muestra puede contener polipéptido de *P. vivax* o anticuerpo anti-polipéptido de *P. vivax*. Una muestra de ensayo se puede obtener de cualquier fuente, por ejemplo tejido, sangre, saliva, esputo, mocos, sudor, orina, frotis uretrales, frotis cervicales, frotis urogenitales o anales, frotis conjuntivales, fluido del cristalino ocular, líquido cefalorraquídeo etc. Una muestra de prueba se puede usar (i) directamente según se obtiene de la fuente; o (ii) tras un pretratamiento para modificar el carácter de la muestra. Por tanto, una muestra de prueba se puede pretratar antes de usar mediante, por ejemplo, preparación de plasma o suero de sangre, rompiendo células o partículas víricas, preparando líquidos de materiales sólidos, diluyendo fluidos viscosos, filtrando líquidos, añadiendo reactivos, purificando ácidos nucleicos etc.

"Sujetos" incluyen un mamífero, un ave o un reptil. El sujeto puede ser una vaca, caballo, perro, gato, o un primate. El sujeto también puede ser un ser humano. Los sujetos pueden estar vivos o muertos.

Un "polinucleótido" es un polímero de ácido nucleico de ácido ribonucleico (ARN), ácido desoxirribonucleico (ADN), ARN o ADN o miméticos de ARN o ADN (tales como PNA) y derivados de los mismos y homólogos de los mismos. Por tanto, los polinucleótidos incluyen polímeros compuestos por bases nucleotídicas naturales, azúcares y enlaces internucleosídicos (estructura), así como polímeros que tienen porciones no naturales que funcionan de modo similar. Dichos polímeros de ácidos nucleicos modificados o sustituidos se conocen bien en la técnica y se denominan "análogos". En general, los oligonucleótidos son polinucleótidos cortos de aproximadamente 10 a aproximadamente 160 o 200 nucleótidos.

Un "polinucleótido variante" o una "secuencia de ácido nucleico variante" quiere decir un polinucleótido que tiene una identidad de secuencia de ácido nucleico al menos aproximadamente 60 %, más preferentemente una identidad de secuencia de ácido nucleico de al menos aproximadamente 61 %, 62 %, 63 %, 64 %, 65 %, 66 %, 67 %, 68 %, 69 %, 70 %, 71 %, 72 %, 73 %, 74 %, 75 %, 76 %, 77 %, 78 %, 79 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % y, todavía más preferentemente, una identidad de secuencia de ácido nucleico de al menos aproximadamente 99 % con la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 1. Las variantes no abarcan la secuencia de nucleótidos nativa. Otros polinucleótidos variantes incluyen aquellos que se diferencian de la SEQ ID NO: pero debido a la redundancia del código genético, codifican un polipéptido de SEQ ID No: 2 o 3 o los aminoácidos 2-50 de la SEQ ID No: 2, fragmentos de variantes de los mismos.

Habitualmente, los polinucleótidos variantes tienen una longitud de al menos aproximadamente 8 nucleótidos, a menudo una longitud de aproximadamente 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60 nucleótidos o incluso una longitud de aproximadamente 75-200 nucleótidos o mayor.

"Porcentaje (%) de identidad de secuencia de ácido nucleico" con respecto a las secuencias de ácido nucleico se define como el porcentaje de nucleótidos en una secuencia candidata que son idénticos a los nucleótidos en la secuencia de interés, tras alinear las secuencias e introducir huecos, en caso necesario, para alcanzar el porcentaje

máximo de identidad de secuencia. La alineación con el fin de determinar el % de identidad de secuencia de ácido nucleico se puede realizar de varias formas dentro de la experiencia en la técnica usando, por ejemplo, software informático disponible públicamente tal como el software BLAST, BLAST-2, ALIGN o Megalign (DNASTAR). Los expertos en la técnica pueden determinar los parámetros adecuados para alinear las secuencias, incluidos los algoritmos necesarios para alcanzar la alineación máxima a lo largo de toda la longitud de las secuencias que se están comparando.

Cuando se alinean las secuencias de nucleótidos, el % de identidad de secuencia de una secuencia de ácido dada C a, o con, o contra, una secuencia de ácido nucleico dada D (que puede, como alternativa, redactarse como una secuencia de ácido nucleico dada C o tiene comprende un determinado % de identidad de la secuencia de ácido nucleico con, o contra, una secuencia de ácido nucleico dada D) se calcula del siguiente modo:

$$\% \text{ de identidad de la secuencia de ácido nucleico} = W/Z.100$$

donde

W es el número de nucleótidos indicados como apareamientos idénticos por el programa de alineación se secuencia el algoritmo de alineación de C y D

y

Z es el número total de nucleótidos en D.

Cuando la longitud de la secuencia de ácido nucleico C no es igual a la longitud de la secuencia de ácido nucleico D, el % de identidad de la secuencia de ácido nucleico de C a D no será igual al % de identidad de la secuencia de ácido nucleico de D a C.

“Que consiste esencialmente en un polinucleótido que tiene un % de identidad de secuencia” quiere decir que el polinucleótido no difiere sustancialmente en longitud, pero puede diferir sustancialmente en la secuencia. Por tanto, un polinucleótido “A” constituido esencialmente por un polinucleótido que tiene una identidad de secuencia de al menos un 80 % con una secuencia conocida “B” de 100 nucleótidos significa que el polinucleótido “A” tiene aproximadamente una longitud de 100 nucleótidos, pero hasta 20 nucleótidos pueden variar con respecto a la secuencia “B”. La secuencia de polinucleótido en cuestión puede ser más larga o más corta debido a la modificación de los extremos, tal como, por ejemplo, la adición de 1-15 nucleótidos para producir tipos específicos de sondas, cebadores y otras herramientas moleculares etc., tal como el caso de cuando secuencias sustancialmente no idénticas se añaden para crear estructuras secundarias determinadas. Dichos nucleótidos no idénticos no se consideran en el cálculo de la identidad de secuencia cuando la secuencia está modificada por “constituido esencialmente por”.

La especificidad del ADN monocatenario para hibridar fragmentos complementarios viene determinada por la rigurosidad de las condiciones de reacción. La rigurosidad de la hibridación aumenta a medida que disminuye la tendencia a formar dúplex de ADN. En las reacciones de hibridación de ácidos nucleicos, la rigurosidad se puede elegir para favorecer hibridaciones específicas (rigurosidad alta). Se pueden usar hibridaciones menos específicas (rigurosidad baja) para identificar moléculas o segmentos de ADN relacionadas pero no exactas (homólogas, pero no idénticas).

Los dúplex de ADN se estabilizan mediante: (1) el número de pares de bases complementarias, (2) el tipo de pares de bases, (3) la concentración de sales (fuerza iónica) de la mezcla de reacción, (4) la temperatura de la reacción y (5) la presencia de ciertos disolventes orgánicos, tales como formamida, que disminuye la estabilidad del dúplex de ADN. Un enfoque habitual es variar la temperatura: temperaturas relativas más altas tienen como resultado condiciones de reacción más rigurosas. (Ausubel y col 1987) proporcionan una excelente explicación de la rigurosidad de las reacciones de hibridación.

Hibridación en “condiciones rigurosas” describe protocolos de hibridación donde secuencias de nucleótidos con una homología de al menos el 60 % entre sí permanecen hibridadas.

Los polinucleótidos pueden incluir grupos pendientes, tales como péptidos (p. ej., para apuntar a receptores en la célula huésped *in vivo*) o agentes que facilitan el transporte a través de la membrana celular. Además, los oligonucleótidos se pueden modificar con agentes de escisión desencadenados por hibridación (van der Krol y col., 1988) o agentes intercalantes (Zon, 1988). El oligonucleótido se puede conjugar con otra molécula, por ejemplo un péptido, un agente de reticulación desencadenado por hibridación, un agente de transporte, un agente de escisión desencadenado por hibridación y similares.

Análogos polinucleotídicos útiles incluyen polímeros que tienen estructuras modificadas o enlaces internucleosídicos no naturales. Estructuras modificadas incluyen aquéllas que retienen un átomo de fósforo en la estructura, tales como fosforioatos, fosforioatos quirales, fosforioatos, fosfotriésteres, aminoalquilfosfotriésteres, fosfonatos de metilo y otros alquilo, así como los que ya no tienen un átomo de fósforo, tal como estructuras formadas por enlaces internucleosídicos de alquilo o cicloalquilo de cadena corta, heteroátomos mixtos y enlaces internucleosídicos de

alquilo o cicloalquilo, o uno o más enlaces internucleosídicos de heteroátomos o heterociclos de cadena corta. Polímeros de ácido nucleico modificado (análogos) pueden contener uno o más restos de azúcar modificado.

- 5 También son útiles los análogos que son miméticos de ARN o ADN, donde tanto el azúcar como el enlace internucleosídico de las unidades nucleotídicas están sustituidas por grupos nuevos. En estos miméticos, las unidades básicas se mantienen para hibridación con la secuencia diana. Un ejemplo de tal mimético, que se ha demostrado que tiene excelentes propiedades de hibridación, es un ácido nucleico peptídico (PNA) (Buchardt et al., 1992; Nielsen et al., 1991).
- 10 El ámbito de nucleótidos incluye derivados donde la molécula de ácido nucleico se ha modificado covalentemente mediante sustitución, química, enzimática, u otros medios apropiados con un resto que no sea un nucleótido de origen natural.
- 15 El polinucleótido de SEQ ID NO:1 se puede preparar mediante técnicas convencionales, tales como síntesis en fase sólida usando equipo comercialmente disponible, tal como el disponible en Applied Biosystems USA Inc. (Foster City, CA; EE.UU.), DuPont, (Wilmington, DE; EE.UU.), o Milligen (Bedford, MA; EE.UU.). Los polinucleótidos modificados, tales como los fosforotioatos y derivados alquilados, también se pueden preparar fácilmente mediante procedimientos similares conocidos en la técnica (Fino, 1995; Mattingly, 1995; Ruth, 1990).
- 20 ("Identidad entre dos secuencias de aminoácidos se define como la presencia de una serie de residuos de aminoácidos exactamente iguales o invariables en ambas secuencias (véase la definición anterior de identidad entre las secuencias de ácido nucleico). Las definiciones de "complementariedad" e "identidad" son bien conocidas para los expertos en la técnica.
- 25 "Codificado por" hace referencia a una secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia polipeptídica, donde la secuencia polipeptídica o una porción de la misma contiene una secuencia de aminoácidos de al menos 3 aminoácidos, más preferentemente al menos 8 aminoácidos e incluso más preferentemente al menos 15 aminoácidos de un polipéptido codificado por la secuencia de ácido nucleico.
- 30 Las expresiones "fragmento o subfragmento que es funcionalmente equivalente" y "fragmento o subfragmento funcionalmente equivalente" se usan de forma intercambiable en el presente documento. Estas expresiones hacen referencia a una porción o subsecuencia de un fragmento de ácido nucleico aislado donde la capacidad para alterar la expresión génica o producir un determinado fenotipo se conserva si el fragmento o subfragmento codifica o no una enzima activa. Por ejemplo, el fragmento o subfragmento se pueden usar en el diseño de construcciones quiméricas para producir el fenotipo deseado en una planta transformada. Las construcciones quiméricas se pueden diseñar para usar en cosupresión o antisentido uniendo un fragmento de ácido nucleico o subfragmento del mismo, codifique o no una proteína activa, en la orientación adecuada respecto a una secuencia promotora de una planta.
- 35 Los términos "homología", "homólogo", "sustancialmente similar" y "correspondiente sustancialmente" se usan de forma intercambiable en el presente documento. Hacen referencia a fragmentos de ácido nucleico donde los cambios de una o más bases de nucleótidos no afectan a la capacidad del fragmento de ácido nucleico a participar en expresión génica o producir un determinado fenotipo. Estos términos también hacen referencia a modificaciones de los fragmentos de ácido nucleico, tales como delección o inserción de uno o más nucleótidos que no alteran sustancialmente las propiedades funcionales del fragmento de ácido nucleico resultante respecto al fragmento inicial no modificado.
- 40 "Gen" hace referencia a un fragmento de ácido nucleico que expresa una proteína específica, incluidas secuencias reguladoras precedentes (secuencias no codificantes en 5') y posteriores (secuencias no codificantes en 3') a la secuencia de codificación.
- 50 "Gen nativo" se refiere a un gen como se encuentra en la naturaleza con sus propias secuencias reguladoras. Por el contrario, "construcción quimérica" hace referencia a una combinación de fragmentos de ácido nucleico que normalmente no se encuentran juntos en la naturaleza. En consecuencia, una construcción quimérica puede comprender secuencias reguladoras y secuencias de codificación derivadas de diferentes fuentes o secuencias reguladoras y secuencias de codificación de la misma fuente, pero dispuestas de un modo distinto a como se encuentran normalmente en la naturaleza. (El término "aislado" significa que la secuencia se elimina de su ambiente natural).
- 55 Un gen "extraño" hace referencia a un gen que normalmente no se encuentra en el organismo huésped, pero que se introduce en el organismo huésped mediante transferencia génica. Los genes extraños pueden comprender genes nativos insertados en un organismo no nativo o construcciones quiméricas. Un "transgén" es un gen que se ha introducido en el genoma mediante un procedimiento de transformación.
- 60 Una "sonda" o "cebador", como se usa en el presente documento, es un polinucleótido que tiene al menos 8 nucleótidos de longitud y forma una estructura híbrida con una secuencia diana, debido a la complementariedad de al menos una secuencia en la sonda o cebador con una secuencia en la región diana. Las regiones de
- 65

polinucleótidos de la sonda pueden estar compuestas de ADN y / o ARN y / o análogos de nucleótidos sintéticos. Preferiblemente, la sonda no contiene una secuencia que es complementaria a la secuencia o secuencias utilizadas para cebar una secuencia diana durante la reacción en cadena de la polimerasa.

5 “Secuencia de codificación” hace referencia a una secuencia de ADN que codifica una secuencia de aminoácidos específica. “Secuencias reguladoras” se refieren a secuencias nucleotídicas localizadas cadena arriba (secuencias no codificantes en 5’), dentro, o cadena abajo (secuencias no codificantes en 3’) de una secuencia de codificación y que influyen sobre la transcripción, el procesamiento o la estabilidad del ARN o la traducción de la secuencia de codificación asociada. Las secuencias reguladoras pueden incluir, entre otros, promotores, secuencias líder de la traducción, intrones y secuencias de reconocimiento de la poliadenilación.

15 “Promotor” (o “secuencia reguladora”) hace referencia a una secuencia de ADN capaz de controlar la expresión de una secuencia de codificación o ARN funcional. La secuencia promotora, por ejemplo, consiste en elementos cadena arriba proximales y más distales, estos últimos elementos a menudo se denominan potenciadores. De acuerdo con esto, un “potenciador” es una secuencia de ADN que puede estimular la actividad del promotor o reguladora y puede ser un elemento innato del promotor o un elemento heterólogo insertado para potenciar el nivel de especificidad e tejido de un promotor. Las secuencias reguladoras (por ejemplo, un promotor) también se pueden localizar dentro de las porciones transcritas de los genes y/o cadena debajo de las secuencias transcritas. Los promotores pueden derivar en su totalidad de un gen nativo o estar compuestos por diferentes elementos derivados de diferentes promotores encontrados en la naturaleza, o incluso comprender segmentos de ADN sintético. Los expertos en la técnica entienden que diferentes promotores pueden dirigir la expresión de un gen en diferentes tejidos o tipos celulares, o en diferentes etapas de desarrollo, o en respuesta a diferentes condiciones ambientales o ambientales. Los promotores que hacen que un gen se exprese en la mayoría de los tipos de células huésped se denominan, en la mayoría de los casos, “promotores constitutivos”. Nuevos promotores de diversos tipos útiles en células de plantas se están descubriendo constantemente; pueden encontrarse numerosos ejemplos en la recopilación en Okamura et al. (1989) (Okamura y Goldberg, 1989). Además se reconoce que, ya que en la mayoría de los casos los límites exactos de las secuencias reguladoras no se han definido completamente, los fragmentos de ADN de alguna variación pueden tener una actividad promotora idéntica.

30 Un “intrón” es una secuencia intermedia en un gen que no codifica una porción de la secuencia proteica. Por tanto, dichas secuencias se transcriben en ARN pero después se escinden y no se traducen. El término también se usa para las secuencias de ARN escindidas. Un “exón” es una porción de la secuencia génica que se transcribe y se encuentra en el ARN mensajero maduro derivado del gen pero no necesariamente es una parte de la secuencia que codifica el producto génico final.

35 La “secuencia líder de traducción” hace referencia a una secuencia de ADN localizada entre la secuencia promotora de un gen y la secuencia de codificación. La secuencia líder de traducción está presente en el ARNm completamente procesado cadena arriba de la secuencia de iniciación de la traducción. La secuencia líder de traducción puede afectar al procesamiento del transcrito primario en ARNm, a la estabilidad del ARNm o a la eficiencia de la traducción. Se han descrito ejemplos de secuencias líder de la traducción (Turner y Foster, 1995).

45 Las “secuencias no codificantes en 3’” hacen referencia a secuencias de ADN localizadas cadena abajo de una secuencia de codificación e incluyen secuencias de reconocimiento de poliadenilación y otras secuencias que codifican señales reguladoras capaces de afectar al procesamiento del ARNm o a la expresión génica. La señal de poliadenilación normalmente se caracteriza porque afecta a la adición de tramos de ácido poliadenílico al extremo 3’ del precursor de ARNm. El uso de diferentes secuencias no codificantes en 3’ lo ilustran Ingelbrecht et al., (1989) Plant Cell 1:671-680.

50 “Transcrito de ARN” hace referencia al producto resultante de la transcripción catalizada por la ARN polimerasa de una secuencia de ADN. Cuando el transcrito de ARN es una copia complementaria perfecta de la secuencia de ADN, se denomina transcrito primario o puede ser una secuencia de ARN derivada del procesamiento postranscripcional del transcrito primario y se denomina ARN maduro. “ARN mensajero (ARNm)” se refiere al ARN que no tiene intrones y que se puede traducir en proteínas en la célula. “ADNc” hace referencia a un ADN que es complementario y se sintetiza a partir de un molde de ARNm usando la enzima transcriptasa inversa. El ADNc puede ser monocatenario o convertirse en bicatenario usando el fragmento Klenow de la ADN polimerasa I. ARN “sentido” hace referencia a un transcrito de ARN que incluye el ARNm y se puede traducir en proteínas dentro de una célula o *in vitro*. “ARN antisentido” se refiere a un transcrito de ARN que es complementario a todo o parte de un transcrito primario diana o ARNm y que bloquea la expresión de un gen diana (patente de EE.UU. N.º 5.107.065). La complementariedad de un ARN antisentido puede ser cualquier parte del transcrito génico específico, es decir en la secuencia no codificante en 5’, la secuencia no codificante en 3’, intrones o la secuencia de codificación. “ARN funcional” se refiere a ARN antisentido, ARN de ribozima u otro ARN que puede no traducirse, aunque tiene un efecto sobre los procesos celulares. Los términos y expresiones “complementario” y “complementario inverso” se usan de forma intercambiable en el presente documento con respecto a los transcritos de ARNm y se pretende que definan el ARN antisentido del mensaje.

65

“ARN endógeno” hace referencia a cualquier ARN que está codificado por una secuencia de ácido nucleico presente en el genoma del huésped antes de la transformación con la construcción recombinante de la presente invención, sea de origen natural o no natural, es decir, introducido por medios recombinantes, mutagénesis etc.

5 “De origen no natural” significa artificial, no consistente con lo que normalmente se encuentra en la naturaleza.

10 “Operativamente unido” se refiere a la asociación de secuencias de ácido nucleico en un único fragmento de ácido nucleico de modo que la función de una está regulada por la otra. Por ejemplo, un promotor está operablemente unido a una secuencia de codificación cuando es capaz de regular la expresión de dicha secuencia de codificación (es decir, que la secuencia de codificación está bajo el control transcripcional del promotor). Las secuencias de codificación pueden estar operablemente unidas a secuencias reguladoras en orientación sentido o antisentido. En otro ejemplo, las regiones de ARN complementarias de la invención pueden estar unidas operablemente, bien directa o indirectamente, en 5' del ARNm diana o en 3' del ARNm diana o dentro del ARNm diana, o una primera región complementaria está en 5' y su complementaria está en 3' del ARNm diana.

15 “Expresión” tal como se usa en el presente documento, hace referencia a un producto final funcional. La expresión de un gen implica la transcripción del gen y la traducción del ARNm en una proteína precursora o madura. “Inhibición antisentido” hace referencia a la producción de transcritos de ARN antisentido capaces e suprimir la expresión de la proteína diana. “Cosupresión” hace referencia a la producción de transcritos de ARN sentido capaces e suprimir la expresión de genes endógenos o extraños idénticos o sustancialmente similares (patente de EE.UU. N° 5.231.020).

20 Una “proteína madura” hace referencia a un polipéptido procesado postraduccionalmente, es decir uno del que se ha eliminado cualquier pre o propéptido presente en el producto primario de la traducción. Proteína “precursora” hace referencia al producto primario de la traducción del ARNm, es decir cuando todavía hay pre y propéptidos. Los prepéptidos y los propéptidos pueden ser, entre otros, señales de localización intracelular.

25 “Transformación estable” se refiere a la transferencia de un fragmento de ácido nucleico en un genoma de un organismo huésped, que tiene como resultado una herencia genéticamente estable. Por el contrario, “transformación transitoria” se refiere a la transferencia de un fragmento de ácido nucleico en el núcleo u orgánulo que contiene ADN, de un organismo huésped, que tiene como resultado la expresión sin integración o herencia estable. Los organismos huésped que contienen los fragmentos de ácido nucleico transformados se denominan organismos “transgénicos”. El término “transformación”, tal como se usa en el presente documento, hace referencia tanto a la transformación estable como a la transformación transitoria.

35 Técnicas de ADN recombinante y de clonación molecular estándar usadas en el presente documento son bien conocidos en la materia y se describen más detalladamente en Sambrook et al. (1989) (Sambrook, 1989) (en adelante en el presente documento “Sambrook”).

40 “Recombinante” hace referencia a una combinación artificial de dos segmentos de secuencia, por lo demás separados, por ejemplo mediante síntesis química o mediante la manipulación de segmentos aislados de ácidos nucleicos mediante técnicas de ingeniería genética.

45 “PCR” o “Reacción en cadena de la polimerasa” es una técnica para la síntesis de grandes cantidades de segmentos de ADN específicos y consiste en una serie de ciclos repetidos (Perkin Elmer Cetus Instruments, Norwalk, CT). Normalmente, el ADN bicatenario se desnaturaliza por calor, los dos cebadores complementarios a los extremos 3' del segmento diana se hibridan a temperatura baja y después se extienden a una temperatura intermedia. Un conjunto de estas tres etapas consecutivas se denomina ciclo.

50 PCR es una potente técnica usada para amplificar ADN millones de veces mediante replicación repetida de un molde en un periodo de tiempo corto. ((Mullis et al., 1986); Erlich et al., solicitud de patente europea n.º 50,424; solicitud de patente europea n.º 84.796; solicitud de patente europea n.º 258,017, solicitud de patente europea n.º 237.362; solicitud de patente europea n.º 201,184, patente de Estados Unidos n.º 4.683.202; patente de Estados Unidos n.º 4.582.788; y patente de Estados Unidos n.º 4.683.194). El proceso usa conjuntos de oligonucleótidos específicos sintetizados *in vitro* para cebar la síntesis de ADN. El diseño de los cebadores depende de las secuencias de ADN que se van a analizar. La técnica se lleva a cabo a través de muchos ciclos (normalmente 20-50) de fusión del molde a temperatura alta, o que permite a los cebadores hibridar con secuencias complementarias dentro del molde y después replicar el molde con la ADN polimerasa.

60 Los productos de las reacciones de PCR se analizan mediante electroforesis en gel de agarosa seguido de tinción con bromuro de etidio y visualización con transiluminación UV. Como alternativa, se pueden añadir dNTP radioactivos a la PCR con el fin de incorporar marcadores en los productos. En este caso, los productos de la PCR se visualizan mediante exposición del gel a una película de rayos X. La ventaja añadida de radiomarcarse los productos de PCR es que los niveles de los productos de amplificación individuales se pueden cuantificar.

65 “Construcción recombinante”, “construcción de la expresión” y “construcción de expresión recombinante” En el presente documento, los términos “de acción rápida” y “de acción veloz” se usan de forma intercambiable en el

presente documento. Estos términos hacen referencia a una unidad funcional de material genético que se puede insertar en el genoma de una célula usando metodología estándar bien conocida por un experto en la técnica. Dicha construcción puede usarse sola o junto con un vector. Si se usa un vector, la elección del vector depende del método que se usará para transformar plantas huésped como es bien conocido por los expertos en la técnica. Por ejemplo, se puede usar un plásmido. El experto en la técnica conoce bien los elementos genéticos que deben estar presentes en el vector con el fin de transformar con éxito, seleccionar y propagar células huésped que comprenden cualquiera de los fragmentos de ácido nucleico aislados de la invención. El experto en la técnica también reconocerá que diferentes acontecimientos de transformación independientes tendrán como resultado diferentes niveles y patrones de expresión (Jones et al., (1985) EMBO J. 4:2411 - 2418; De Almeida, 1989 #475) Mol. Gen. Genetics 475:78 - 86) y, por tanto, que se pueden someter a detección selectiva múltiples acontecimientos para obtener líneas que muestran el nivel y patrón de expresión deseados. Dicha detección selectiva se puede conseguir mediante análisis de tipo Southern de ADN, análisis de tipo Northern de la expresión de ARNm, análisis de tipo Western o análisis fenotípico.

15 Variantes de polipéptidos

En general, una variante de polipéptido preserva la función antigénica e incluye cualquier variante donde los residuos en una posición particular en la secuencia han sido sustituidos por otros aminoácidos e incluye además la posibilidad de insertar un residuo o residuos adicionales entre dos residuos del polipéptido parental, así como la posibilidad de suprimir uno o más residuos de la secuencia parental.

"Una variante de polipéptido" significa un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, o los residuos 2-50 de SEQ ID NO: 2, que tiene una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos aproximadamente 70 % con una secuencia nativa de longitud completa o un fragmento de una secuencia polipeptídica de longitud completa. Por ejemplo, variantes polipeptídicas incluyen aquellos donde se añaden, o delecionan uno o más residuos de aminoácidos en el extremo N o C de la secuencia de aminoácidos nativa de longitud completa. Una variante de polipéptido tendrá una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos aproximadamente 71 % - 75 %; una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos aproximadamente 76 % - 79 %; una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos aproximadamente 80 %, una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos aproximadamente 81 %, una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos aproximadamente 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % y una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos aproximadamente 99 % con una secuencia de longitud completa. Normalmente, los polipéptidos variantes tienen al menos aproximadamente 10 aminoácidos de longitud, a menudo de al menos aproximadamente 20 aminoácidos de longitud, más a menudo al menos aproximadamente 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200 o 300 aminoácidos de longitud, o más.

"Porcentaje (%) de la identidad de secuencia de aminoácidos" se define como el porcentaje de residuos de aminoácidos que son idénticos a los residuos de aminoácidos en una secuencia diana en una secuencia candidata cuando las dos secuencias están alineadas. Para determinar el % de identidad de aminoácidos, las secuencias están alineadas y, si es necesario, se introducen espacios para lograr el % máximo de identidad de secuencia; no se consideran sustituciones conservadoras como parte de la identidad de secuencia. Los procedimientos de alineación de la secuencias de aminoácidos para determinar el porcentaje de identidad son bien conocidos por los expertos en la técnica. Se pueden utilizar programas informáticos disponibles públicamente tales como BLAST, BLAST2, ALIGN2 o Megalign (DNASTAR) para alinear las secuencias de polipéptidos. Los expertos en la técnica pueden determinar los parámetros adecuados para alinear las secuencias, incluidos los algoritmos necesarios para alcanzar la alineación máxima a lo largo de toda la longitud de las secuencias que se están comparando.

Cuando las secuencia de aminoácidos están alineadas, el % de identidad de secuencia de aminoácidos de una secuencia de aminoácidos dada A a, o con, o contra, una secuencia de aminoácidos dada B (que puede, como alternativa, redactarse como una secuencia de aminoácidos dada A o tiene o comprende un determinado % de identidad de la secuencia de aminoácidos con, o contra, una secuencia de aminoácidos dada B) se calcula del siguiente modo:

$$\text{Calculado como: \% de identidad de secuencia de aminoácidos} = X/Y100$$

donde

X es el número de residuos de aminoácidos puntuados como apareamientos idénticos por el programa de alineación se secuencia el algoritmo de alineación de A y B

y

Y es el número total de residuos de aminoácidos en B.

Si la longitud de la secuencia de aminoácidos A no es igual a la longitud de la secuencia de aminoácidos B, el % de identidad de la secuencia de aminoácido A a B no será igual al % de identidad de la secuencia de aminoácidos de B a A.

Las sustituciones conservadoras útiles se muestran en la Tabla B, "Sustituciones de ejemplo". Las sustituciones conservadoras mediante las cuales un aminoácido de una clase se sustituye por otro aminoácido del mismo tipo no alteran materialmente la actividad biológica del compuesto. Si tales sustituciones dan lugar a un cambio en la actividad biológica, se introducen cambios más sustanciales, indicados en la Tabla C como ejemplos, y los productos seleccionados para determinar la actividad biológica de la secuencia diana.

TABLA B
Sustituciones de ejemplo

Residuo original	Sustituciones de ejemplo	Sustitución preferida
Ala (A)	Val, Leu, Ile	Val
Arg (R)	Lys, Gln, Asn	Lys
Asn (N)	Gln, His, Lys, Arg	Gln
Asp (D)	Glu	Glu
Cys (C)	Ser	Ser
Gln (Q)	Asn	Asn
Glu (E)	Asp	Asp
Gly (G)	Pro, Ala	Ala
His (H)	Asn, Gln, Lys, Arg	Arg
Ile (I)	Leu, Val, Met, Ala, Phe, Norleucina	Leu
Leu (L)	Norleucina, Ile, Val, Met, Ala, Phe	He
Lys (K)	Arg, Gln, Asn	Arg
Met (M)	Leu, Phe, Ile	Leu
Phe (F)	Leu, Val, Ile, Ala, Tyr	Leu
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Ser	Ser
Trp (W)	Tyr, Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp, Phe, Thr, Ser	Phe
Val (V)	Ile, Leu, Met, Phe, Ala, Norleucina	Leu

Las sustituciones no conservadoras que afectan (1) a la estructura del esqueleto polipeptídico, tal como una conformación en lámina beta o alfa hélice, (2) la carga o (3) hidrofobicidad, o (4) la mayor parte de la cadena lateral del sitio diana puede modificar la función del polipéptido. Los residuos se dividen en grupos basados en propiedades de cadena lateral comunes como se indica en la Tabla B. Las sustituciones no conservadoras implican el intercambio de un miembro de una de estas clases por otra clase. Las sustituciones se pueden introducir en sitios de sustitución conservadores o más usualmente en sitios no conservados.

TABLA C
Clases de aminoácidos

Clase	Aminoácidos
Hidrófobos	Norleucina, Met, Ala, Val, Leu, He
Hidrófilos neutros	Cys, Ser, Thr
ácidos	Asp, Glu
básicos	Asn, Gln, His, Lys, Arg
Alteración de la formación de la cadena	Gly, Pro
aromáticos	Trp, Tyr, Phe

Los polipéptidos variantes pueden prepararse usando, por ejemplo, mutagénesis mediada por oligonucleótidos (dirigida al sitio), barrido de alanina y mutagénesis por PCR. La mutagénesis dirigida al sitio (Carter, 1986; Zoller and Smith, 1987), mutagénesis de casete, mutagénesis de selección de restricción (Wells et al., 1985) u otras técnicas conocidas pueden realizarse sobre el ADN clonado para producir variantes de la secuencia diana (Ausubel et al., 1987; Sambrook, 1989).

Polipéptidos aislados/purificados

Un polipéptido "aislado" o "purificado" o fragmento biológicamente activo (tal como un fragmento Fab) se separa y / o se recupera de un componente de su entorno. Los componentes contaminantes incluyen materiales que normalmente interfieren con usos de diagnóstico para el polipéptido y pueden incluir enzimas, hormonas y otros materiales polipeptídicos o no polipeptídicos. Están sustancialmente aisladas, las preparaciones que tienen menos del 30 % en peso seco de contaminantes, usualmente menos del 20 %, 10 % y más a menudo, menos del 5 % de contaminantes. Una secuencia diana producida de forma recombinante aislada o porción biológicamente activa está deseablemente sustancialmente exenta de medio de cultivo, es decir, el medio de cultivo representa menos del 20 %, 10 % o 5 % del volumen de la preparación de la secuencia diana.

Los polipéptidos de la invención pueden sintetizarse *in vitro* o se expresan de forma recombinante a partir de las secuencias polinucleotídicas. Debido a la redundancia en el código genético, las secuencias no tienen que ser idénticas para poner en práctica la invención. Las identidades de la secuencia polinucleotídica pueden ser 98 %-100 %, tal como 98 %, 99 % y, por supuesto, 100 %.

Los polipéptidos de la invención pueden sintetizarse fácilmente *in vitro* usando química de polipéptidos. Por ejemplo, la síntesis de polipéptidos puede llevarse a cabo de manera escalonada sobre un soporte de fase sólida usando un sintetizador de polipéptido automatizado, tal como un sintetizador de péptidos Rainin Symphony Peptide Synthesizer, Advanced Chemtech Peptide Synthesizer, Argonaut Parallel Synthesis System o Applied Biosystems Peptide Synthesizer. El instrumento sintetizador de péptidos combina la química de Fmoc con la activación de HOBt / HBTU / DIEA para realizar la síntesis de péptidos en fase sólida.

Las cadenas laterales de muchos aminoácidos contienen grupos químicamente reactivos, tales como aminas, alcoholes o tioles. Estas cadenas laterales deben protegerse adicionalmente para evitar reacciones secundarias no deseadas durante la etapa de acoplamiento. Los grupos protectores de la cadena lateral que son estables en bases, más preferentemente tanto estables en bases como lábiles en ácido, son los más útiles.

Como alternativa, un polipéptido de interés puede introducirse en una célula huésped procariótica o eucariótica, mediante el uso de un vector o construcción, para que la célula huésped exprese la proteína de interés. El vector, por ejemplo, un bacteriófago, cósmido o plásmido, puede comprender la secuencia de ácido nucleico que codifica la enzima, así como cualquier secuencia reguladora (por ejemplo, promotor) que sea funcional en la célula huésped y sea capaz de inducir la expresión de la proteína codificada por la secuencia de ácido nucleico. La secuencia reguladora (por ejemplo, promotor) está en asociación operativa, o unida de forma operativa, con la secuencia de nucleótidos. (Se dice que una secuencia reguladora (por ejemplo, promotor) está "operativamente unida" a una secuencia codificante si la secuencia reguladora afecta a la transcripción o expresión de la secuencia codificante). Los promotores adecuados incluyen, por ejemplo, los de los genes que codifican alcohol deshidrogenasa, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, fosfoglucoisomerasa, fosfoglicerato quinasa, fosfatasa ácida, T7, TPI, lactasa, metalotioneína, temprano inmediato de citomegalovirus, proteína ácida del suero de la leche, glucoamilasa, promotores activados en presencia de galactosa, por ejemplo GAL1 y GAL 10, así como cualquier otro promotor implicado en sistemas de expresión procariota y eucariota. Además, también se pueden incluir secuencias de ácido nucleico que codifican otras proteínas dentro del vector, así como otras secuencias reguladoras no promotoras, tales como, por ejemplo, una señal de poliadenilación (por ejemplo, la señal poli A del antígeno SV-40T, ovalalbúmina u hormona de crecimiento bovina). La elección de las secuencias presentes en la construcción depende de los productos de expresión deseados, así como de la naturaleza de la célula huésped.

Como se ha indicado anteriormente, una vez que el vector se ha construido, puede introducirse en la célula huésped de elección mediante métodos conocidos por los expertos en la técnica incluyendo, por ejemplo, transfección, transformación y electroporación (Sambrook, 1989). A continuación, la célula huésped se cultiva en condiciones adecuadas que permiten la expresión de la proteína deseada que se recupera y purifica.

Entre los ejemplos de células huésped procariotas adecuadas se incluyen, por ejemplo, bacterias tales como *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, actinomicetos tales como *Streptomyces coelicolor*, *Streptomyces lividans*, así como cianobacterias tales como *Spirulina spp.* (es decir, algas verde-azuladas). Entre los ejemplos de células huésped eucariotas adecuadas se incluyen, por ejemplo, células de mamífero, células vegetales, células de levadura tales como *Saccharomyces spp.*, *Lipomyces spp.*, *Candida spp.*, tales como *Yarrowia (Candida) spp.*, *Kluyveromyces spp.*, *Pichia spp.*, *Trichoderma spp.* o *ansenula spp.*, o células fúngicas tales como células fúngicas filamentosas, por ejemplo, *Aspergillus*, *Neurospora* y *Penicillium*. Las células de insectos, tales como las utilizadas en sistemas de Baculovirus (Luckow, 1991), también son útiles para la producción *in vitro* de polipéptidos con modificaciones eucarióticas.

La expresión en una célula huésped puede conseguirse de forma transitoria o estable. La expresión transitoria puede ocurrir a partir de construcciones introducidas que contienen señales de expresión funcionales en la célula huésped, pero cuyas construcciones no se replican y rara vez se integran en la célula huésped, o cuando la célula huésped no está proliferando. La expresión transitoria también puede lograrse induciendo la actividad de un promotor regulable unido operativamente al gen de interés, aunque dichos sistemas inducibles exhiben con

frecuencia un bajo nivel basal de expresión. La expresión estable puede conseguirse mediante la introducción de una construcción que puede integrarse en el genoma del huésped o que se replica de forma autónoma en la célula huésped. La expresión estable del gen de interés puede seleccionarse a través del uso de un marcador seleccionable ubicado en o transfectedo con la construcción de expresión, seguida por la selección de células que expresan el marcador. Cuando la expresión estable es el resultado de la integración, el sitio de la integración de la construcción puede ocurrir aleatoriamente dentro del genoma huésped, o puede dirigirse a través del uso de construcciones que contienen regiones con homología suficiente con el genoma huésped como para dirigir la recombinación al locus del huésped. Cuando las construcciones están dirigidas a un locus endógeno, todas o algunas de las regiones reguladoras de la transcripción y la traducción pueden ser proporcionadas por el locus endógeno.

También se puede usar un mamífero transgénico para expresar la proteína de interés codificada por uno o ambos de las secuencias de ácido nucleico descritas anteriormente. Más específicamente, una vez que se ha creado la construcción descrita anteriormente, puede insertarse en el pronúcleo de un embrión. El embrión puede entonces implantarse en una hembra receptora. Como alternativa, también se podría utilizar un método de transferencia nuclear (Schnieke et al., 1997). Se permite entonces que se produzcan la gestación y el nacimiento (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos n.º 5.750.176 y la patente de Estados Unidos n.º 5.700.671), las muestras de leche, tejido u otros fluidos de la descendencia deben contener, por tanto, la proteína de interés. El mamífero utilizado como huésped puede seleccionarse del grupo que consiste, por ejemplo, en un ratón, una rata, un conejo, un cerdo, una cabra, una oveja, un caballo y una vaca. Sin embargo, puede utilizarse cualquier mamífero siempre que tenga la capacidad de incorporar ADN que codifique la proteína de interés en su genoma.

Uso de los polinucleótidos y polipéptidos de la invención

Las secuencias de ácido nucleico aisladas y las proteínas correspondientes codificadas tienen muchos usos beneficiosos. La presente invención proporciona inmunoensayos y, en particular, antígenos que detectan con precisión la presencia de anticuerpos contra *P. vivax* en sueros humanos.

En el presente documento también se divulgan anticuerpos policlonales y monoclonales contra las proteínas descritas anteriormente. Un anticuerpo de este tipo se puede usar, por ejemplo, en un inmunoensayo, una vacuna (para inmunización pasiva), un kit o para fines de investigación.

Inmunoensayos

Hay dos tipos básicos de ensayos, competitivos y no competitivos (por ejemplo, inmunométricos y sándwich, respectivamente). En ambos ensayos, los reactivos de anticuerpos o antígenos están unidos covalentemente o no covalentemente a la fase sólida (Wild, 2001). Los agentes de unión para la unión covalente son conocidos y pueden formar parte de la fase sólida o derivarse en ella antes del recubrimiento. Ejemplos de fases sólidas usadas en inmunoensayos son materiales porosos y no porosos, partículas de látex, partículas magnéticas, micropartículas, tiras, esferas, membranas, pocillos de microtitulación y tubos de plástico. La elección del material de fase sólida y el procedimiento de marcaje del reactivo de antígeno o anticuerpo se determinan en base a las características de rendimiento del formato de ensayo deseado. Para algunos inmunoensayos, no se requiere ningún marcador. Por ejemplo, si el antígeno está en una partícula detectable, tal como un glóbulo rojo, puede establecerse reactividad basándose en la aglutinación. Como alternativa, una reacción antígeno-anticuerpo puede dar lugar a un cambio visible (por ejemplo, inmunodifusión radial). En la mayoría de los casos, uno de los reactivos de anticuerpo o antígeno usados en un inmunoensayo está unido a un compuesto generador de señal o "marcador". Este compuesto generador de señal o marcador es en sí mismo detectable o puede hacerse reaccionar con uno o más compuestos adicionales para generar un producto detectable (véase también la patente de Estados Unidos n.º 6.395.472 B1). Entre los ejemplos de dichos compuestos generadores de señal se incluyen cromógenos, radioisótopos (por ejemplo, ^{125}I , ^{131}I , ^{32}P , ^3H , ^{35}S y ^{14}C), compuestos fluorescentes (por ejemplo, fluoresceína, rodamina), compuestos quimioluminiscentes, partículas (visibles o fluorescentes), ácidos nucleicos, agentes de formación de complejos o catalizadores, tales como enzimas por ejemplo, fosfatasa alcalina, fosfatasa ácida, peroxidasa de rábano, beta-galactosidasa y ribonucleasa). En el caso del uso enzimático, la adición de sustrato cromogénico, fluorogénico o luminogénico da como resultado la generación de una señal detectable. También son útiles otros sistemas de detección tales como fluorescencia resuelta por tiempo, fluorescencia de reflejo interno, amplificación (p. ej., reacción en cadena de la polimerasa) y espectroscopia de Raman.

Existen dos formatos generales usados habitualmente para controlar el título y el tipo de anticuerpos específicos en seres humanos: (1) el antígeno se presenta en una fase sólida, como se ha descrito anteriormente, el fluido biológico humano que contiene los anticuerpos específicos se deja reaccionar con el antígeno y luego se detecta el anticuerpo unido al antígeno con un anticuerpo antihumano acoplado a un compuesto generador de señal, y (2) un anticuerpo anti-humano está unido a la fase sólida, el fluido biológico humano que contiene anticuerpos específicos se deja reaccionar con el anticuerpo unido, y, después, se añade el antígeno unido a un compuesto generador de señal para detectar el anticuerpo específico presente en la muestra de fluido. En ambos formatos, el reactivo anticuerpo anti-anticuerpo humano puede reconocer todas las clases de anticuerpos, o, como alternativo, es específico para una clase o subclase particular de anticuerpos, dependiendo del propósito del ensayo. Estos formatos de ensayo así

como otros formatos conocidos están destinados a estar dentro del alcance de la presente invención y son bien conocidos por los expertos en la técnica.

Cualquiera de los formatos de ejemplo de la presente invención y cualquier ensayo o kit de acuerdo con la invención pueden adaptarse u optimizarse para su uso en sistemas automatizados y semiautomatizados (incluyendo aquellos donde existe una fase sólida que comprende una micropartícula), tal como se describe, por ejemplo, en las Patentes de Estados Unidos N.º 5.089.424 y 5.063.309, y, como, por ejemplo, los comercializados en el mercado por Abbott Laboratories (Abbott Park, IL) incluyendo, aunque sin limitaciones, las plataformas de Abbott ARCHITECT®, AxSYM, IMX, PRISM, y Quantum II, así como otras plataformas.

Los ensayos y kits de la presente invención pueden adaptarse u optimizarse para sistemas de ensayo en el punto de atención, incluyendo el sistema de inmunoensayo electroquímico de Abbott's Point of Care (i-STAT™). Se describen inmunosensores y métodos para fabricarlos y operarlos en dispositivos de ensayo de uso único, por ejemplo en la patente de Estados Unidos n.º 5.063.081 y en las solicitudes de patente de los Estados Unidos n.º 20030170881, 20040018577, 20050054078 y 20060160164.

La presente invención incluye un método para detectar anticuerpos contra *P. vivax* en una muestra de ensayo que comprende las etapas de: (a) poner en contacto la muestra de ensayo que se sospecha que contiene los anticuerpos con una proteína o antígeno de *P. vivax* que comprende un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 2 y la SEQ ID NO:3; y (b) detectar la presencia de anticuerpos presentes en la muestra de ensayo. Más específicamente, la presente invención incluye un método para detectar anticuerpos contra *P. vivax* en una muestra de ensayo que comprende las etapas de: (a) poner en contacto la muestra de ensayo que se sospecha que contiene los anticuerpos con una proteína o antígeno de *P. vivax* que comprende un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 2 y la SEQ ID NO: 3, durante un tiempo y en condiciones suficientes para permitir la formación de complejos anticuerpo / antígeno; (b) añadir un conjugado a los complejos anticuerpo / antígeno resultantes durante un tiempo y en condiciones suficientes para permitir que el conjugado se una al anticuerpo unido, comprendiendo el conjugado un anticuerpo unido a un compuesto generador de señales capaz de generar una señal detectable; (c) detectar la presencia del anticuerpo que puede estar presente en la muestra de ensayo detectando la señal generada por el compuesto generador de señal. También se puede usar un control o calibrador que se une al antígeno. El antígeno de *P. vivax* puede comprender una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3. El antígeno puede comprender un polipéptido que consiste esencialmente en las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3. Finalmente, el antígeno puede consistir en las secuencias de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3.

Además de los ensayos descritos anteriormente en los cuales uno está detectando la presencia de anticuerpos contra una especie de Plasmodium (por ejemplo, *P. malariae* o *P. ovale*), también se pueden realizar ensayos que detectan anticuerpos en una muestra de ensayo contra dos o más especies de Plasmodium. Por ejemplo, se puede desear llevar a cabo un ensayo donde se puedan detectar todas las especies conocidas de *Plasmodium* que infectan a seres humanos, eliminando así el riesgo de resultados falsos negativos obtenidos con los ensayos existentes. Por tanto, la presente invención incluye un método para detectar anticuerpos contra *P. malariae*, *P. falciparum*, *P. vivax* y *P. ovale* en una muestra de ensayo que comprende las etapas de: (a) poner en contacto la muestra de ensayo que se sospecha que contiene al menos uno de estos cuatro tipos de anticuerpos con: (1) un antígeno de *P. malariae*; (2) un antígeno de *P. ovale*; (3) un antígeno de *P. falciparum* y (4) un antígeno de *P. vivax* que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3; y (b) detectar la presencia de anticuerpos, frente a uno o más de dichos antígenos, presentes en la muestra de ensayo, detectando la presencia de complejos, por ejemplo. Más específicamente, la presente invención incluye un método para detectar anticuerpos contra *P. malariae*, *P. ovale*, *P. vivax* y *P. falciparum* en una muestra de ensayo que comprende las etapas de: (a) poner en contacto la muestra de ensayo con (1) un antígeno de *P. malariae*; (2) un antígeno de *P. ovale*; (3) un antígeno de *P. falciparum* y (4) un antígeno de *P. vivax*, que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 2 y la SEQ ID NO: 3; (b) añadir un conjugado a los complejos anticuerpo / antígeno resultantes durante un tiempo y en condiciones suficientes para permitir que cada conjugado se una al anticuerpo unido, donde dicho conjugado comprende un anticuerpo unido a un compuesto generador de señal capaz de generar una señal detectable; y (c) detectar la presencia del anticuerpo que puede estar presente en la muestra de ensayo detectando la señal generada por el compuesto generador de señal. También se puede usar un control o calibrador que se une a los antígenos. (La presencia de los complejos indica que al menos uno de los cuatro tipos de anticuerpos está presente en la muestra de ensayo. En particular, el ensayo tiene la capacidad de detectar la presencia de los cuatro tipos de anticuerpos en una muestra, haciendo de este modo que la muestra sea positiva y previniendo los falsos negativos. No se puede desear saber precisamente cual uno o más de los tipos de anticuerpos está presente (como cuando se está realizando la detección selectiva de una muestra de sangre adecuada para fines de donación); sin embargo, como se describe en el presente documento, dicha determinación es posible si se desea). El antígeno de *P. vivax* puede comprender una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3. El antígeno puede comprender un polipéptido que consiste esencialmente en las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3. Finalmente, el antígeno puede consistir en las secuencias de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3.

Cabe señalar que cualquier antígeno o antígenos de *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* y *P. ovale* descrito previamente pueden usarse en combinación con uno cualquiera o más de los antígenos de la presente invención (por ejemplo, proteína de superficie del merozoíto, proteína 1 exportada de la proteína de superficie del circumsporozoíto, antígeno de la membrana apical, gen asexual unido a la citoadherencia, proteína rica en His 2, FeSOD, pLDH y antígeno de unión a eritrocitos) con respecto a los kits, vacunas y ensayos descritos en el presente documento.

Vacunas

La presente invención también incluye una vacuna que comprende uno o más de los polipéptidos, o antígenos de los mismos, como se describe en el presente documento. Tal vacuna se usa para la inmunización activa de un mamífero, por ejemplo, un ser humano que corre el riesgo de estar expuesto a uno o más antígenos de *Plasmodium* (por ejemplo, debido a viajar dentro de una región donde la malaria es prevalente). La vacuna puede contener al menos un antígeno seleccionado del grupo que consiste en: un antígeno de *P. vivax* que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3. El antígeno puede comprender un polipéptido que consiste esencialmente en las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3. Finalmente, el antígeno puede consistir en las secuencias de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3.

Como alternativa, si se desea la inmunización pasiva, se pueden administrar uno o más anticuerpos a los siguientes antígenos (como vacunación): un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3. El antígeno puede comprender un polipéptido que consiste esencialmente en las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3. Finalmente, el antígeno puede consistir en las secuencias de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3.

Kits de diagnóstico

También se incluyen kits de diagnóstico dentro del ámbito de la presente invención. La presente invención incluye kits para determinar la presencia de anticuerpos contra *P. vivax* en una muestra de ensayo. Un kit puede comprender: (a) un antígeno de *P. vivax* que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 2 y la SEQ ID NO: 3 y (b) un conjugado que comprende un anticuerpo unido a un compuesto generador de señal capaz de generar una señal detectable. El kit también puede contener un control o calibrador que comprende un reactivo que se une al antígeno. El antígeno puede comprender un polipéptido que consiste esencialmente en las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3. Finalmente, el antígeno puede consistir en las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3.

La presente invención también incluye un kit para determinar la presencia de anticuerpos contra *P. vivax* en una muestra de ensayo. Un kit puede comprender: (a) un antígeno de *P. vivax* que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 2 y la SEQ ID NO: 3 y (b) un conjugado que comprende un anticuerpo unido a un compuesto generador de señal capaz de generar una señal detectable. El antígeno puede comprender un polipéptido que consiste esencialmente en las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3. Finalmente, el antígeno puede constar de las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3.

Adicionalmente, la presente invención incluye un kit para determinar la presencia de anticuerpos contra *P. malariae*, *P. ovale*, *P. vivax* y *P. falciparum*. Tal kit puede comprender: (1) un antígeno de *P. malariae*; (2) un antígeno de *P. ovale*; (3) un antígeno de *P. vivax* como se ha descrito anteriormente; y (4) un antígeno de *P. falciparum* y (5) un conjugado que comprende un anticuerpo unido a un primer compuesto generador de señal capaz de generar una señal detectable.

Producción de Ac

"Anticuerpo" (Ac) comprende Ac sencillos dirigidos contra un antígeno diana (un Ac anti-antígeno diana), composiciones de Ac anti-antígeno diana con especificidad poli-epitopo, Ac monocatenarios anti-antígeno diana y fragmentos de Ac anti- antígeno diana. Un "anticuerpo monoclonal" (Acmo) se obtiene de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por posibles mutaciones naturales, que pueden estar presentes en cantidades minoritarias. Los ejemplos de Ac incluyen Ac policlonales (Acpo), monoclonales (Acmo), humanizados, biespecíficos (Acbi) y heteroconjugados.

Los Ac policlonales se pueden producir en un huésped mamífero mediante una o más inyecciones de un inmunógeno y, si se desea, un adyuvante. Típicamente, el inmunógeno (y adyuvante) es inyectado en el mamífero mediante múltiples inyecciones subcutáneas o intraperitoneales. El inmunógeno puede incluir un antígeno diana o un polipéptido de fusión con el antígeno diana. Ejemplos de adyuvantes incluyen adyuvante completo de Freund y monofosforil lípido A sintético-dicorinomicolato de trehalosa (MPL-TDM). Para mejorar la respuesta inmune, un inmunógeno puede conjugarse a un polipéptido que es inmunogénico en el huésped, tal como hemocianina de lapa

californiana (KLH), seroalbúmina, tiroglobulina bovina, e inhibidor de tripsina de soja. Los protocolos para la producción de anticuerpos son bien conocidos (Ausubel et al., 1987; Harlow y Lane, 1988; Harlow y Lane, 1999). Como alternativa, los Acpo se pueden hacer en pollos, produciendo moléculas de IgY (Schade et al., 1996).

5 Los Acmo anti-antígeno diana se pueden preparar utilizando procedimientos de hibridoma (Milstein y Cuello, 1983). Los métodos de hibridoma consisten, por lo general, en al menos cuatro etapas: (1) inmunizar un hospedador, o linfocitos de un huésped; (2) recoger los linfocitos que secretan Acmo, (3) fusionar los linfocitos con células inmortalizadas, y (4) seleccionar las células que secretan el Acmo deseado (anti-antígeno diana).

10 Se inmuniza a un ratón, rata, cobaya, hámster u otro huésped apropiado para producir linfocitos que producen o son capaces de producir anticuerpos que se unirán específicamente al inmunógeno. Como alternativa, los linfocitos pueden inmunizarse *in vitro*. Si se desean células humanas, se pueden utilizar linfocitos de sangre periférica (PBL).

15 A continuación, los linfocitos se fusionan con una línea celular inmortalizada para formar células de hibridoma, facilitado por un agente de fusión tal como polietilenglicol (PEG) (Galfre et al., 1977; Goding, 1996). Se pueden usar células de mieloma de roedor, bovinas o humanas inmortalizadas mediante transformación o líneas células de mieloma de rata o de ratón. Debido a que se desean poblaciones puras de células de hibridoma o células inmortalizadas no fusionadas, las células después de la fusión se cultivan en un medio adecuado que inhibe el crecimiento o supervivencia de las células inmortalizadas no fusionadas. Una técnica común usa células parentales que carecen de la enzima hipoxantina guanina fosforribosil transferasa (HGPRT o HPRT). En este caso, se añaden hipoxantina, aminopterina y timidina al medio (medio HAT) para impedir el crecimiento de células deficientes en HGPRT al tiempo que permite el crecimiento de hibridomas.

25 Las células inmortalizadas deseables se fusionan de manera eficaz; se pueden aislar de poblaciones mixtas mediante la selección en un medio tal como HAT; y apoyar la expresión estable y de alto nivel de los anticuerpos después de la fusión. Las líneas celulares inmortalizadas útiles son líneas de mieloma murino, disponibles de la Colección Americana de Cultivos Tipo (Manassas, VA). También se han descrito líneas celulares de mieloma humano y de heteromieloma humano-ratón para la producción de Acmo humanos (Kozbor et al., 1984; Schook, 1987).

30 Dado que las células de hibridoma secretan anticuerpos extracelularmente, los medios de cultivo se pueden analizar para determinar la presencia de Acmo dirigidos contra un antígeno diana. La inmunoprecipitación o los ensayos de unión *in vitro*, tales como radioinmunoensayo (RIA) o ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), se pueden utilizar para medir la especificidad de unión de Acmo (Harlow y Lane, 1988; Harlow y Lane, 1999), incluyendo el análisis de Scatchard (Munson y Rodbard, 1980).

35 Las células de hibridoma que secretan Acmo anti-antígeno diana se pueden aislar como clones individuales por procedimientos de dilución límite y subcultivar (Goding, 1996). Los medios de cultivo adecuados incluyen medio Tagle modificado de Dulbecco, medio RPMI-1640, o si se desea, un medio sin proteínas, con un contenido en proteínas reducido o sin suero (por ejemplo, Ultra DOMA PF o HL-1; Biowhittaker; Walkersville, MD). Las células de hibridoma también se pueden cultivar *in vivo* como ascitis.

45 Los Acmo pueden aislarse o purificarse a partir del medio de cultivo o fluido de ascitis mediante procedimientos convencionales de purificación de Ig, tales como polipéptido A-Sepharose, cromatografía de hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis, precipitación con sulfato de amonio o cromatografía de afinidad (Harlow y Lane, 1988; Harlow and Lane, 1999).

50 Una vez que se han producido anticuerpos que reconocen un antígeno diana, las células que producen tales anticuerpos, tales como hibridomas, se pueden utilizar como una base para aislar las secuencias de polinucleótidos que codifican los anticuerpos. Una vez aisladas, estas secuencias se pueden usar para producir los anticuerpos *in vitro*, o manipularse para hacer, por ejemplo, anticuerpos quiméricos.

55 Los Ac también se pueden producir mediante métodos recombinantes. El ADN que codifica los Acmo anti-antígeno diana pueden aislarse y secuenciarse fácilmente usando procedimientos convencionales, por ejemplo, usando sondas de oligonucleótidos que se unen específicamente a genes de las cadenas pesada y ligera de anticuerpos murinos, para sondear el ADN aislado de líneas celulares de hibridoma que secretan Acmo anti-antígeno diana. Una vez aislados, los fragmentos de ADN aislados se subclonan en vectores de expresión que se transfectan a continuación en células huésped tales como células COS-7 de simio, células CHO o células de mieloma que, de otro modo, no producen polipéptido de Ig, para expresar Acmo. Los fragmentos de ADN aislados pueden modificarse sustituyendo la secuencia codificante por dominios constantes de las cadena pesadas y ligeras humanas en lugar de las secuencias murinas homólogas (Morrison et al., 1987), o fusionando la secuencia codificante de Ig a todo o parte de la secuencia de codificación para un polipéptido no Ig. Tal polipéptido no Ig puede sustituirse por los dominios constantes de un anticuerpo, o puede ser sustituido por los dominios variables de un sitio de combinación de antígenos para crear un anticuerpo bivalente quimérico.

65

Las células huésped de mamífero para expresar los anticuerpos recombinantes incluyen CHO (células CHO) (incluyendo células dhfr-CHO (Urlaub y Chasin, 1980), usadas con un marcador seleccionable DHFR (Kaufman, 1990), células de mieloma NS0, células COS y células SP2. Cuando los vectores de expresión que codifican genes de anticuerpo se introducen en células huésped de mamífero, los anticuerpos se producen mediante cultivo de las células huésped durante un periodo de tiempo suficiente para permitir la expresión del anticuerpo en las células huésped o, más preferentemente, la secreción del anticuerpo en el medio de cultivo donde crecen las células huésped. Los anticuerpos se pueden recuperar del medio de cultivo usando procedimientos de purificación proteica estándar.

En un sistema para expresión recombinante de un anticuerpo, o porción de unión a anticuerpo del mismo, un vector de expresión recombinante que codifica tanto la cadena pesada del anticuerpo como la cadena ligera del anticuerpo se introduce en las células dhfr-CHO mediante transfección. El vector de expresión recombinante porta un gen *DHFR*, que permite la selección de células CHO que se han transfectado con el vector. Las células huésped transformantes seleccionadas se cultivan para la expresión de las cadenas pesada y ligera del anticuerpo y se recupera el anticuerpo intacto del medio de cultivo.

Ac monovalentes

Los Ac monovalentes no se reticulan. Un método implica la expresión recombinante de la cadena ligera de Ig y de la cadena pesada modificada. Los truncamientos de cadena pesada generalmente en cualquier punto de la región Fc impiden la reticulación de la cadena pesada. Alternativamente, los restos de cisteína relevantes se sustituyen por otro resto de aminoácido o se eliminan, evitando la reticulación por unión de disulfuro. Los métodos *in vitro* son también adecuados para preparar Ac. monovalentes. Los Ac pueden digerirse para producir fragmentos, tales como Fab (Harlow y Lane, 1988; Harlow y Lane, 1999).

Ac humanizados y humanos

Las formas humanizadas de los Ac no humanos que se unen a un antígeno diana son Ig quiméricas, cadenas de Ig o fragmentos de las mismas (tales como Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ u otras subsecuencias de unión a antígeno de Ac), que contienen una secuencia mínima derivada de la Ig no humana.

En general, un anticuerpo humanizado tiene uno o más restos de aminoácidos introducidos procedentes de una fuente que no es humana. Estos restos de aminoácidos no humanos a menudo se denominan residuos de "importación", que normalmente proceden de un dominio variable de "importación": La humanización se consigue sustituyendo las CDR o las secuencias CDR de los roedores por las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano (Jones et al., 1986; Riechmann et al., 1988; Verhoeyen et al., 1988). Dichos Ac "humanizados" son Ac quiméricos, donde sustancialmente menos que un dominio variable humano intacto ha sido sustituido por la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, los Ac humanizados son típicamente Ac humanos donde algunos residuos de CDR y posiblemente algunos residuos de FR se sustituyen por residuos de sitios análogos en Ac de roedores. Los Ac humanizados incluyen inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) donde los residuos de una región determinante de la complementariedad (CDR) del receptor son sustituidos por residuos de una CDR de una especie no humana (anticuerpo donante), tal como ratón, rata, camelo, bovino, cabra o conejo que tenga la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los residuos no humanos correspondientes reemplazan los residuos del marco Fv de la Ig humana. Además, los Ac humanizados pueden incluir residuos que no se encuentran en el anticuerpo receptor ni en la CDR importada o las secuencias estructurales. En general, el anticuerpo humanizado contiene sustancialmente todos o al menos uno, y normalmente dos, dominios variables donde la mayoría, si no todas, las regiones CDR corresponden a las de una inmunoglobulina no humana y la mayoría, si no todas, las regiones FR son las de una secuencia consenso de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado también comprende óptimamente al menos una porción de una región constante de Ig (Fc), típicamente la de una Ig humana (Jones et al., 1986; Riechmann et al., 1988; Verhoeyen et al., 1988).

También se pueden producir Ac humanos usando diversas técnicas, incluyendo bibliotecas de presentación en fagos Hoogenboom et al., 1991; Marks et al., 1991) y Ac humanos (Boerner et al., 1991; Reisfeld y Sell, 1985). La introducción de genes de Ig humanas en animales transgénicos donde los genes de Ig endógenos han sido parcial o completamente inactivados puede explotarse para sintetizar Ac humanos. Tras la exposición, se observa la producción de anticuerpos humanos, que se parece mucho a la observada en seres humanos en todos los aspectos, incluyendo la reordenación, ensamblaje de genes y el repertorio de anticuerpos Fishwild et al., 1996; Lonberg y Huszar, 1995; Lonberg et al., 1994; Marks et al., 1992).

Acmo biespecíficos

Los Acmo biespecíficos se unen al menos dos antígenos diferentes. Por ejemplo, una especificidad de unión es un antígeno diana; la otra es para cualquier antígeno de elección.

La producción recombinante de Ac biespecíficos a menudo se logra coexpresando dos pares de cadenas pesadas / cadenas ligeras de Ig, cada uno con diferentes especificidades (Milstein y Cuello, 1983). La selección aleatoria de

estas cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulina en los hibridomas resultantes (cuadromas) producen una mezcla potencial de 10 moléculas de anticuerpo diferentes, de las cuales solo una tiene la estructura biespecífica deseada. El anticuerpo deseado puede purificarse usando cromatografía de afinidad u otras técnicas (Traunecker et al., 1991).

Para fabricar un anticuerpo biespecífico, los dominios variables con los sitios de combinación de anticuerpo-antígeno deseados, se fusionan a secuencias de dominio constante de Ig (Suresh et al, 1986). La fusión normalmente es con un dominio constante de la cadena pesada de Ig, que comprende al menos parte de las regiones bisagra, C_H2 y C_H3. La primera región constante de la cadena pesada (C_H1) que contiene el sitio necesario para la unión a la cadena ligera está presente en al menos una de las fusiones. Los ADN que codifican las fusiones de la cadena pesada de inmunoglobulina y, si se desea, la cadena ligera de Ig, se insertan en vectores de expresión separados y son cotransfectados en un organismo huésped adecuado.

La interfaz entre un par de moléculas de anticuerpo puede modificarse para maximizar el porcentaje de heterodímeros que se recuperan del cultivo de células recombinantes (Carter, 1986). En este método, una o más cadenas laterales pequeñas de aminoácidos de la interfaz de la primera molécula de anticuerpo se sustituyen por cadenas laterales más grandes (por ejemplo, tirosina o triptófano). Se crean "cavidades" compensatorias de tamaño idéntico o similar a la o las cadenas laterales grandes en la interfaz de la segunda molécula de anticuerpo mediante la sustitución de cadenas laterales grandes de aminoácidos por otras más pequeñas (por ejemplo alanina o treonina). Este mecanismo aumenta el rendimiento del heterodímero sobre productos finales no deseados, tales como homodímeros.

Los Ac biespecíficos se pueden preparar como Ac de longitud completa o fragmentos de anticuerpo (por ejemplo, Ac Fab-2 Fab'₂ biespecíficos). Una técnica para generar Ac biespecíficos explota el enlace químico. Los Ac Intactos pueden escindirse proteolíticamente para generar fragmentos Fab'₂ (Brennan et al., 1985). Los fragmentos se reducen con un agente de formación de complejos de ditiol, tal como arsenito de sodio, para estabilizar los ditioles vicinales y prevenir la formación de disulfuro intermolecular. Los fragmentos Fab' generados se convierten después en derivados de tionitrobenzoato (TNB). Uno de los derivados de Fab'-TNB se reconvierten a continuación en Fab'-tiol mediante la reducción con mercaptoetilamina y se mezcla con una cantidad equimolar del otro derivado de Fab'-TNB para formar el anticuerpo biespecífico.

Los fragmentos Fab' pueden recuperarse directamente de *E. coli* y acoplarse químicamente para formar Ac biespecíficos. Por ejemplo, se pueden producir Ac de Fab'₂ biespecíficos completamente humanizados (Shalaby et al., 1992). Cada fragmento Fab' se secretó por separado a partir de *E. coli* y se sometió a acoplamiento químico dirigido *in vitro* para formar el anticuerpo biespecífico.

También se han descrito diversas técnicas para preparar y aislar fragmentos de anticuerpos biespecíficos directamente a partir de cultivo celular recombinante. Por ejemplo, se pueden explotar motivos de cremallera de leucina (Kostelny et al., 1992). Los péptidos de los polipéptidos Fos y Jun se unieron a las porciones Fab' de dos Ac diferentes mediante fusión génica. Los homodímeros de anticuerpo se reducen en la región bisagra para formar monómeros y luego se reoxidaron para formar los heterodímeros de anticuerpo. Este método también puede producir homodímeros de anticuerpos. La tecnología "Diabody" proporciona un método alternativo para generar fragmentos de anticuerpos biespecíficos (Holliger et al., 1993). Los fragmentos consisten en un VH de la cadena conectado a una cadena ligera (V_L) mediante un enlazador que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena. Los dominios V_H y V_L de un fragmento se fuerzan a emparejarse con los dominios V_L y V_H complementarios de otro fragmento, formando dos sitios de unión a antígeno. También se ha descrito otra estrategia para fabricar fragmentos de anticuerpos biespecíficos mediante el uso de dímeros de Fv (sFv) monocatenarios (Gruber et al., Los Ac con más de dos valencias también se pueden hacer, como Ac trispecíficos (Tutt et al., 1991). Los Ac biespecíficos de ejemplo pueden unirse a dos epítopos diferentes en un antígeno diana dado.

A modo de ejemplo, y sin limitaciones, a continuación se proporcionarán ejemplos de la presente invención.

Ejemplo 1: Diseño, clonación y expresión de un dominio en C terminal del gen de EXP1 de *P. vivax*

Diseño del gen de EXP1 de Plasmodium vivax. Este ejemplo describe el diseño del gen sintético Pv-EXP1, que codifica la porción C-terminal de la proteína EXP1, de *P. vivax*, que está optimizado para la expresión en *E. coli*. Se usó el software Gene Designer de DNA 2.0, Inc. (Menlo Park, California) para diseñar la secuencia de genes que se describe a continuación. La secuencia de la proteína codificada por la proteína EXP1 de *P. vivax* se predijo mediante homología de secuencia con las proteínas de *P. falciparum* y *P. yoelii*, y mediante la identificación de potenciales sitios de corte y empalme de la secuencia genómica de *P. vivax*. La secuencia de nucleótidos para el gen EXP1 de *P. vivax* optimizado se muestra en la Figura 1A (SEQ ID NO: 1), y la secuencia de aminoácidos codificada se muestra en la Figura 1B (SEQ ID NO: 2). El gen contiene un sitio 5'-EcoRI seguido de un codón de iniciación, el cuerpo del gen que codifica la secuencia de aminoácidos predicha en C-terminal de EXP1 de *P. vivax*, una secuencia que codifica un marcador de histidina, un codón de terminación (negrita) y un sitio BamHI. Los sitios de enzimas de restricción se utilizaron para la clonación en vectores de expresión y se incluyó el marcador de 6-

histidina para facilitar la purificación posterior de la proteína expresada.

Preparación del gen sintético de EXP1 de *P. vivax*. Las células de *E. coli* que contenían el clon plasmídico del gen sintético de EXP1 de *P. vivax* (GenScript Corp., (Piscataway, Nueva Jersey)) se cultivaron, y el plásmido se purificó utilizando el kit de purificación Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification Kit (Promega, Madison, Wisconsin) de acuerdo con la ficha técnica. El plásmido se digirió en una reacción de 50 µl durante 2 horas a 37 °C en presencia de 20 unidades de la enzima de restricción EcoRI, 20 unidades de la enzima de restricción BamHI y 1 x tampón EcoRI (New England Biolabs, Beverly, Massachusetts). Las fracciones digeridas se sometieron a electroforesis en gel de 1,0 % de agarosa TAE con bromuro de etidio para separar el inserto del vector. El inserto de aproximadamente 185 pares de bases se escindió del gel de agarosa, y el ADN se extrajo de la agarosa usando el kit QIAEX II Agarose Gel Extraction (Qiagen, Valencia, California) de acuerdo con la ficha técnica.

Preparación del vector de expresión de CKS-fusión para la clonación. Las células de *E. coli* que contenían el vector de expresión de CKS-fusión pJO200 (Abbott Laboratories, Abbott Park, Illinois) se cultivaron y el plásmido se purificó utilizando el kit Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification Kit (Promega, Madison, Wisconsin) de acuerdo con la ficha técnica. El plásmido (10 µg) se digirió en una reacción de 1500 µl durante 2,5 horas a 37 °C en presencia de 200 unidades de la enzima de restricción EcoRI, 200 unidades de la enzima de restricción BamHI y 1 x tampón EcoRI (New England Biolabs, Beverly, Massachusetts). Las fracciones digeridas se sometieron a electroforesis en gel de 1,0 % de agarosa TAE con bromuro de etidio para separar el inserto del vector. El vector linearizado se escindió del gel de agarosa, y el ADN se extrajo de la agarosa usando el kit QIAEX II Agarose Gel Extraction (Qiagen, Valencia, California) de acuerdo con la ficha técnica.

Clonación del inserto de EXP1 en el vector de expresión de CKS-fusión. Una porción (2 l) del inserto EXP1 digerido con EcoRI / BamHI purificado (véase anteriormente) se añadió a una reacción de ligación (10 µl) que contenía el vector de expresión digerido con EcoRI / BamHI pJO200 vector (~ 0,6µ g, véase anteriormente), 1 x tampón de ADN ligasa de T4 y 400 unidades de ADN ligasa de T4 (New England Biolabs, Beverly, Massachusetts). Las reacciones de unión se incubaron durante la noche a 16 °C y luego se transformaron en células competentes TOP10 de *E. coli* (Stratagene, La Jolla, California) de acuerdo con el prospecto. Los plásmidos se purificaron a partir de los clones TOP10, como se ha descrito anteriormente y se transformaron en células competentes con deficiencia de proteasa BL21 (Novagen, Madison, Wisconsin) de acuerdo con la ficha técnica.

Expresión y purificación de la proteína recombinante EXP1. Las células BL21 que contenían el plásmido de expresión EXP1 (Véase la descripción anterior) se cultivaron en 100 ml de cultivo a 37 °C hasta alcanzar una DO₅₉₅ de aproximadamente 0,8, en cuyo momento se añadió IPTG a una concentración final de 1 mM para inducir la expresión. Después de 3 horas de inducción a 37 °C, las células se recogieron por centrifugación y las células sedimentadas se lisaron con reactivo de extracción BugBuster (Novagen, Madison, Wisconsin) de acuerdo con la ficha técnica. La EXP1 expresada presente en la fracción soluble del lisado se purificó utilizando un Kit de purificación His Bind (Novagen, Madison, Wisconsin) de acuerdo con la ficha técnica. La proteína recombinante purificada se dializó en un tampón fosfato 0,01M a pH 7,4 que contenía NaCl 0,15 M (PBS).

Ejemplo 2: Diseño del péptido sintético de EXP1 de EXP1

Este ejemplo describe el diseño del péptido *Pv*-EXP1 sintético que constituye la porción C-terminal de la proteína EXP1, de *P. vivax*. La secuencia de aminoácidos predicha de la proteína *Pv*-EXP1 se basó en la homología de secuencia con las proteínas de *P. falciparum* y *P. yoelii* y mediante la identificación de posibles sitios de corte y empalme dentro del gen de EXP1 putativo de la secuencia genómica de *P. vivax*. El péptido *Pv*-EXP1 se sintetizó mediante GenScript Corp. (Piscataway, New Jersey) con un marcador de biotina en el extremo N-terminal. La secuencia peptídica de *Pv*-EXP1 (véase, la Figura 1C (SEQ ID NO: 3)) comprende el dominio C-terminal putativo de EXP1 aguas abajo del anclaje de transmembrana.

Ejemplo 3: Inmunoensayo de EXP1 de *P. vivax* usando esferas de poliestireno

La proteína de fusión EXP1 CKS de *P. vivax* se analizó para determinar su capacidad para detectar anticuerpos IgG y / o IgM mediante el uso de un ensayo de esferas de poliestireno. Se analizaron varios paneles de sueros humanos, incluyendo chimpancés infectados experimentalmente, donantes de sangre normales y pacientes con malaria.

Los paneles representan poblaciones donde el tiempo entre el inicio de la enfermedad (es decir, el diagnóstico clínico) o de la infección y la obtención de muestras aumenta de días o semanas (chimpancés infectados experimentalmente, pacientes de malaria de la India, y pacientes de malaria americanos) a años (donantes de sangre americanos con antecedentes de la malaria pasada).

Los datos sugieren que los anticuerpos de EXP1 de *P. vivax* se detectan con mayor frecuencia poco después del inicio de la infección o enfermedad (días o meses), pero se detectan después de uno o más años tras la enfermedad de la malaria. Por lo tanto, parece que EXP1 de *P. vivax* es un marcador de infección reciente en lugar de infección pasada.

Recubrimiento de las esferas de poliestireno. Se usaron esferas de poliestireno de cuarto de pulgada como fase sólida para los EIA de péptidos. Antes del recubrimiento, las esferas se lavaron con 15 % de 1-propanol (en agua) a temperatura ambiente durante 20 minutos sin agitación. Se retiró el 1-propanol y las esferas lavaron dos veces con agua desionizada. Las esferas lavadas se añadieron después a un vial que contiene el antígeno recombinante diluido a 0,25 a 5 mg / ml en fosfato de sodio 0,1 M, pH 7,0 (0,233 ml por esfera). Las esferas se incubaron a 40 °C durante 2 horas con agitación suave. A continuación, las esferas se lavaron tres veces con PBS y después se incubaron en PBS que contenía 0,1 % de Triton X-100 a 40 °C durante 1 hora con agitación suave. Se lavaron de nuevo tres veces en PBS y después se incubaron a 40 °C en 5 % de BSA en PBS durante 1 hora con agitación suave. Las esferas se lavaron cuatro veces con PBS y después se incubaron a temperatura ambiente en PBS que contiene 5 % de sacarosa sin mezclar durante 20 minutos. Se retiró el ampón de sacarosa y las esferas se secaron al aire. Las esferas revestidas se almacenaron desecadas a 4 °C.

Método de inmunoensayo. El suero y el plasma se analizaron para determinar su inmunorreactividad a esferas de poliestireno recubiertas con antígeno. Las muestras se diluyeron 1:16 en tampón diluyente (tampón de Tris-fosfato a pH 7,8 que comprende 20 % de suero de cabra, 10 % de suero de ternera, 0,2 % de Triton X-100 y azida sódica), y se añadieron 0.010 ml a un pocillo de una bandeja de ensayo de plástico y, a continuación, se combinaron con un 0,20 ml adicional del mismo tampón diluyente para una dilución final de la muestra de 1:336. La esfera recubierta con la proteína recombinante se añadió a la muestra diluida y se incubó a 37 °C durante 90 minutos con mezcla. A continuación, las esferas se lavaron con 11-14 ml de agua desionizada, seguido de la adición de 0,2 ml de cabra IgG anti-humana de cabra marcada con peroxidasa (0,02 microgramos por ml) o IgM anti-humana. Las esferas se incubaron a 37 °C durante 30 minutos con agitación. Las esferas se lavaron con 11-14 ml de agua desionizada y después se transfirieron a tubos de plástico a los que se añadieron 0,3 ml de sustrato de OPD (0,3 % de O-fenilendiamina-2-HCl en tampón de citrato que contiene 0,02 % de H₂O₂), de y se incubaron en la oscuridad a temperatura ambiente durante 30 minutos sin mezclar. Las reacciones se inactivaron mediante la adición de 1 ml de H₂SO₄ 1N y se determinó la densidad óptica (DO) a 492 nm. La DO es directamente proporcional a la cantidad de anticuerpo unido a la esfera. Se calcularon relaciones de la señal al negativo (S / N) para cada muestra de ensayo dividiendo la DO de la muestra de ensayo por la DO media del control negativo. Las muestras con valores de S / N superiores que o igual a 5,00 (valor de corte provisional) se supusieron que eran inmunorreactivas.

Optimización del ensayo del anticuerpo de EXP1 de *P. vivax*. La proteína de fusión CKS-Pv-EXP1 se aplicó sobre esferas de poliestireno usando diversas condiciones con el fin de determinar las condiciones para la sensibilidad del ensayo óptima. A continuación, se analizaron las esferas para determinar la inmunorreactividad utilizando sueros humanos de los individuos con frotis de sangre diagnosticados con una infección por *Plasmodium*. Las condiciones de inmunoensayo fueron como las descritos anteriormente, excepto donde se indique. La concentración de recubrimiento del antígeno CKS-Pv-EXP1 era 2,0 ug / ml. La inmunorreactividad de CKS-Pv-EXP1 se comparó con la de CKS-Pv-MSP1-19 y para analizar los resultados obtenidos utilizando un ensayo de anticuerpos plasmodium comercial.

Condiciones de ensayo	Condiciones de recubrimiento de las esferas de poliestireno	Diluyentes del ensayo
1	NaPO ₄ 0,1 M (pH 7.2), 40 °C, X mM DTT	HCV 2.0 EIA
2	NaPO ₄ 0,1 M (pH 7,2), 40 °C	HCV 2.0 EIA
3	MES 50 mM (pH 6,3), 40 °C, X mM DTT	HCV 2.0 EIA
4	MES 50 mM (pH 6,3), 40 °C	HCV 2.0 EIA
5	MES 50 mM (pH 6,3), 40 °C	HTLV EIA
7	NaPO ₄ 0,1 M (pH 7.2), 56°C, X mM DTT	HCV 2.0 EIA
8	0. NaPO ₄ 1 M (pH 7,2), 56 °C	HCV 2.0 EIA
9	MES 50 mM (pH 6,3), 56°C, X mM DTT	HCV 2.0 EIA
10	MES 50 mM (pH 6,3), 56°C	HCV 2.0 EIA

Efecto de la condición de ensayo sobre los valores de fondo de la DO₄₉₂ Los valores más altos de OD se obtuvieron utilizando las condiciones 7 y 8 como se muestra a continuación en la Tabla 1, mientras que los más bajos se observaron usando condición 5. La adición de DTT a los tampones de recubrimiento no mejoró el fondo y, en algunos casos, (especialmente en comparación con las condiciones 9 a 10) aumentaron el fondo. El recubrimiento a 56 °C en cualquiera de los tampones aumentó lecturas de fondo.

Tabla 1

Condición de ensato y DO ₄₉₂ nm									
Muestra	1	2	3	4	5	7	8	9	10
PHN	0,094	0,099	0,036	0,028	0,025	0,136	0,123	0,058	0,037
PHN	0,085	0,094	0,027	0,026	0,020	0,155	0,108	0,043	0,038
PHN	0,088	0,088	0,042	0,028	0,022	0,131	0,112	0,041	0,037
PHN	0,089	0,065	0,040	0,025	0,020	0,158	0,123	0,043	0,035

PHN: Plasma humano normal

5 Efecto de la condición de ensayo sobre la sensibilidad. Los especímenes de suero recogidas de pacientes indios de malaria (infección por *Plasmodium* confirmada por frotis de sangre) se analizaron para determinar la presencia de IgG de CKS-Pv-EXP1. Los especímenes también se sometieron a ensayo para detectar IgG de CKS-Pv-MSP1-19. Todos los especímenes se habían analizado previamente para detectar anticuerpos de *Plasmodium* usando un ensayo comercial que detectó IgG, IgM y / o IgA dirigidas contra antígenos de *P. vivax* y *P. falciparum*.

10 Las condiciones de ensayo 4 y 5 mostradas en la Tabla 2 a continuación proporcionaron las relaciones S / N más altas (y las lecturas de fondo más bajas como se ha mostrado anteriormente) y detectaron la mayoría de las muestras positivas para IgG de Pv-MSP1-19. Las relaciones S / N utilizando la condición 4 tuvieron relaciones S / N ligeramente superiores a la condición 5.

Tabla 2

Muestra	Antígeno sobre esfera →		Condición de ensayo y relación S/N												
	Infección (frotis sanguíneo)	ELISA comercial S/CO	CKS-Pv-EXP1												
			MSP1-19	1	2	3	4	5	7	8	9	10			
M022	vivax	24,54	196,1	1,0	0,9	0,7	1,0	1,5	0,8	0,6	0,9	0,7			
M029	Pf y Pv	24,54	124,5	2,0	2,7	3,2	5,2	3,5	1,6	1,9	3,1	3,4			
M034	vivax	24,54	196,7	1,1	1,4	1,3	1,7	1,1	1,0	1,2	1,3	nr			
M039	vivax	24,54	72,1	1,2	1,4	1,6	2,1	1,7	0,9	1,3	1,2	nr			
M045	vivax	24,54	6,1	1,1	1,1	1,0	1,0	1,1	0,8	0,8	1,0	0,8			
M085	vivax	19,20	157,9	15,9	22,5	36,8	56,7	64,1	11,0	14,2	27,4	40,6			
M107	vivax	19,20	196,7	13,5	21,5	36,4	69,3	52,0	10,1	13,6	31,3	46,9			
M113	vivax	19,20	1,3	0,6	0,9	0,7	1,4	1,1	0,6	0,9	0,6	0,7			
M146	vivax	19,20	157,9	22,5	23,1	50,1	74,8	54,1	13,8	17,2	40,0	54,4			
M102	vivax	18,93	196,7	12,3	15,5	27,5	43,7	33,8	7,9	11,3	22,1	33,6			
M106	falcip	18,93	48,2	1,1	1,4	1,1	1,6	1,9	0,9	1,0	1,1	1,0			
M060	vivax	18,16	196,7	11,7	13,3	22,5	40,4	38,3	7,9	10,3	17,0	29,0			
M101	falcip	17,47	11,9	1,1	1,2	1,5	1,8	2,3	1,0	1,2	1,3	1,7			
M041	vivax	17,05	196,7	6,0	6,6	11,2	17,6	14,1	3,9	4,8	9,9	14,6			
M049	vivax	7,61	2,2	0,9	0,8	0,3	0,6	0,7	0,7	0,9	0,5	nr			
M040	vivax	6,39	63,3	1,6	2,7	2,1	4,2	7,2	1,1	1,7	2,3	3,0			
M081	falcip	6,09	1,0	0,8	1,1	0,8	1,1	0,9	0,8	1,2	1,0	0,9			
M063	vivax	5,61	4,2	1,1	1,1	0,9	0,8	1,1	0,9	0,9	0,9	0,8			
M065	vivax	4,70	2,8	1,0	1,2	1,1	1,3	0,9	0,8	1,1	1,0	1,0			
M002	vivax	2,93	3,2	0,8	0,7	0,6	0,7	0,5	0,7	0,9	0,6	0,7			
M046	falcip	2,41	0,8	0,7	1,0	0,5	0,6	0,6	0,8	0,8	0,7	0,5			
M080	falcip	2,19	1,8	0,9	1,1	1,0	1,2	1,0	0,9	0,8	1,0	0,9			
M042	vivax	1,95	4,4	1,2	1,1	1,2	1,5	1,7	0,8	1,2	1,2	1,3			
M023	vivax	0,37	0,7	0,9	0,9	0,6	0,7	0,7	0,7	0,9	0,9	0,9			
M094	falcip	0,34	0,9	0,8	0,7	0,7	0,9	0,6	0,8	0,8	1,0	0,5			
nr : no realizado.			14	6	6	6	7	7	5	5	6	6	6	6	

Ejemplo 4: Anticuerpos IgG frente a Pv-EXP1 en donantes de sangre con malaria previa

Los donantes de sangre en Estados Unidos deben completar un cuestionario antes de la donación. Los donantes que han tenido malaria no están autorizados a donar durante tres años después de que estén libres de síntomas. No se permite a los viajeros a las regiones endémicas de malaria donar sangre durante un año después de abandonar el área, siempre y cuando no hayan tenido síntomas de malaria. Los inmigrantes o residentes de países donde la malaria es frecuente no pueden donar durante tres años después de su salida de ese país.

Se encontraron especímenes de plasma de varios donantes que habían revelado enfermedad de malaria previa. Estos especímenes donantes se analizaron en cuanto a la presencia de anticuerpos IgG dirigidos contra los antígenos MSP1-19 de *P. malariae*, *P. ovale*, *P. falciparum* y *P. vivax* usando antígenos individuales que recubrían esferas de poliestireno de un cuarto de pulgada. También se examinó a los donantes para detectar la presencia de anticuerpos IgG dirigidos al antígeno recombinante EXP1 de *P. vivax*. Todos los especímenes dieron positivo para anticuerpos de plasmodium usando un ensayo comercial que detecta IgG, IgM y / o IgA dirigidas contra antígenos de *P. vivax* y *P. falciparum*. Los resultados del inmunoensayo se muestran en la Tabla 3 que se expone a continuación. De los 14 donantes positivos de anticuerpos EIA comerciales, 9 fueron positivos para anticuerpos Pv-MSP1-19 y 4 fueron reactivos para IgG de Pf-MSP1-19. De los especímenes inmunorreactivos para Pv-MSP1-19, ninguno fue reactivo en la EIA de Pv-EXP1. La enfermedad de malaria más reciente en la cohorte se produjo en 2006 (las muestras se recogieron en 2007) y la enfermedad de malaria más antigua se produjo en 1970. Por tanto, aunque se detectaron anticuerpos contra Pv-MSP1-19 entre los donantes cuya enfermedad de malaria se había producido en 1970 (37 años antes de la donación de sangre), los anticuerpos Pv-EXP1 no se detectaron, no siquiera entre los donantes con malaria tan reciente como de 2006.

Tabla 3

N.º DONANTE	Estado del donante	Año de malaria	EIA comercial S/CO	Reactividad en EIA, valores S/N				
				Pf-MSP1-19	Pm-MSP1-19	Pv-EXP1	Pm-MSP1-19	Po-MSP1-19
8	APLAZADO	1985	20,25	0,9	31,0	1,1	0,8	0,5
14	APLAZADO	1995	20,25	0,7	21,1	1,0	0,7	0,7
27	APLAZADO	2006	20,25	1,1	95,2	2,0	0,7	0,7
42	APLAZADO	1970	20,25	0,9	27,2	0,9	0,7	0,4
11	APLAZADO	1997	15,90	0,9	7,1	0,9	0,6	0,3
046	APLAZADO	1995	14,03	12,5	14,8	3,0	0,8	1,1
36	APLAZADO	1994	13,23	0,9	30,0	2,2	0,7	0,7
38	APLAZADO	1995	13,06	2,8	51,1	1,8	0,9	0,5
58	NO APLAZADO	Desconocido	11,46	22,1	0,4	0,5	1,2	0,7
1	APLAZADO	1997	10,53	2,5	5,9	0,9	1,0	0,7
51	NO APLAZADO	1968	9,51	30,2	0,6	2,8	0,8	0,3
73	NO APLAZADO	2004	5,70	0,7	4,0	1,0	0,6	0,4
43	APLAZADO	1970	3,45	6,9	1,8	1,5	0,7	0,3
33	APLAZADO	1980	2,50	2,7	4,7	0,9	0,9	0,4

Ejemplo 5: Anticuerpos IgG frente a Pv-EXP1 entre pacientes de malaria de India

La malaria es endémica en la mayoría de las partes de la India, con aproximadamente el 95 % de la población en riesgo de infección por las especies de plasmodium que causan la enfermedad. En la India, *P. falciparum* y *P. vivax* son los más frecuentes y *P. malariae* representa un pequeño número de casos y *P. ovale* prácticamente no existe. En la mayoría de las zonas del país, la incidencia de la malaria es baja, pero el riesgo de malaria varía en función de las lluvias. Durante períodos de epidemias o brotes, es posible que se produzcan muchas picaduras infecciosas por persona.

Se obtuvieron especímenes de suero de individuos infectados con plasmodium procedentes de la India con malaria pasada o reciente. La especie de plasmodium infectante se identificó mediante examen microscópico de frotis de sangre en el momento de la recogida de la muestra. Algunos individuos fueron diagnosticados por microscopia como

infecciones dobles. Se analizaron los especímenes para determinar la presencia de anticuerpos de plasmodium usando un ensayo comercial que detecta IgG, IgM y / o IgA dirigidas contra antígenos de *P. vivax* y *P. falciparum*. Los resultados se muestran en la Tabla 4 que se expone a continuación. Se detectaron anticuerpos IgG frente a Pv-MSP1-19 en los 27 (100 %) individuos, mientras que 13/27 (48 %) fueron positivos para el anticuerpo frente a Pv-EXP1. Entre los 19 individuos con infección por *P. vivax* confirmada por microscopía, 19 (100 %) fueron positivos para IgG frente a Pv-MSP1-19, mientras que solo 11/19 (58 %) fueron positivos para IgG de Pv-EXP1.

Tabla 4

ID de la muestra	Infección por Plasmodium	Intervalo desde el inicio a la extracción (d)	ELISA comercial S/CO	Pv-MSP1-19, S/N	Pv-EXP1, S/N
M034	Pv	30-60	24,5	196,7	1,5
M041	Pv	desconocido	17,1	196,7	17,1
M043	Pv	10	24,5	196,7	71,1
M050	Pf, Pv	9	24,5	196,7	6,7
M060	Pv	30-60	18,2	196,7	29,2
M102	Pv	3	18,9	196,7	38,3
M107	Pv	3	19,2	196,7	78,3
M022	Pv	30-60	24,5	196,1	0,8
M109	Pf	4	18,9	170,5	0,5
M104	Pf	2	18,9	166,5	14,5
M004	Pf	desconocido	19,2	157,9	1,1
M085	Pv	desconocido	19,2	157,9	49,1
M146	Pv	desconocido	19,2	157,9	67,2
M029	Pf, Pv	30-60	24,5	124,5	6,4
M121	Pv	desconocido	19,2	119,4	6,4
M048	Pf	10	24,5	99,4	8,5
M135	Pf, Pm	desconocido	19,2	82,4	2,3
M039	Pv	6	24,5	72,1	1,6
M044	Pv	11	24,5	65,3	6,0
M040	Pv	3	6,4	63,3	2,5
M106	Pf	3	18,9	48,2	1,4
M001	Pv	desconocido	19,2	38,3	2,2
M093	Pf	desconocido	18,9	24,9	0,8
M110	Pf	4	7,5	12,7	0,7
M101	Pf	3	17,5	11,9	2,1
M082	Pf	desconocido	18,9	8,3	2,5
M036	Pv	30-60	24,5	6,7	0,9
M045	Pv	10	24,5	6,1	1,1
M047	Pv	8	24,5	5,9	1,0

10 Ejemplo 6: Anticuerpos IgG frente a Pv-EXP1 entre pacientes de malaria de EE.UU.

Se obtuvieron muestras de suero humano de individuos infectados con *P. vivax* del Marianna Wilson, Chief, Reference Immunodiagnostic Laboratory, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA, EE.UU. (CDC). Se proporcionaron títulos de anticuerpos inmunofluorescentes para cada especie de plasmodium infeccioso humano para cada muestra, al igual que la identificación de la especie plasmódica determinada mediante frotis de sangre. Todas las muestras se recolectaron antes de 1990 y se consideran "especímenes humanos residuales anónimos", ya que los registros originales sobre la identidad del donante / paciente ya no existen. No se conoce el tiempo transcurrido entre la infección o la presentación clínica y la recolección de muestras. Sin embargo, se podría suponer que los especímenes se habían recogido poco después del inicio de los síntomas ya que (a) las muestras fueron remitidas al Laboratorio de Referencia de Diagnóstico del CDC para la prueba / confirmación y (b) se observaron parásitos de plasmodium en la sangre.

Los sueros de individuos con infección por *P. vivax* se analizaron para detectar la reactividad anti-MSP1-19 (todas las especies) y anti-Pv-EXP1 utilizando EIA con esferas (véase la Tabla 5 a continuación). Se detectó IgG frente a MSP1-19 de *P. vivax* en /8 individuos, mientras que se detectó IgG de EXP1 de *P. vivax* en 6/8 (75 %).

Tabla 5

Muestra	IgG específica de especie mediante IFA	ELISA comercial S/CO	Pv-EXP1	EIA de MSP1-19			
				Pv	Pf	Pm	Po
Pv-1	Pv	2,41	3,8	62,1	1,3	12,3	1,1
Pv-2	Pv	19,20	102,6	67,4	1,3	2,7	8,3
Pv-5	Pv, Po	19,20	102,6	67,4	1,3	2,0	11,0
Pv-9	Pv, Po	19,20	102,6	67,4	0,6	2,5	13,2
Pv-10	Pv	4,82	5,3	49,5	1,7	10,9	1,9
Pv-11	Pv, Po	19,20	88,0	67,4	10,6	1,6	1,0
Pv-12	Pv	6,69	5,0	41,0	0,5	0,9	1,4
Pv-14	Pv, Pf	19,20	4,3	67,4	11,4	0,8	2,4

Ejemplo 7: Anticuerpos contra EXP1 y MSP1-19 de *Plasmodium vivax* entre chimpancés infectados experimentalmente

5 Los especímenes de suero se recogieron aproximadamente 3-4 semanas después de la infección de chimpancés infectados experimentalmente con *Plasmodium vivax*. Los nueve animales tenían IgG de *P. vivax* fácilmente detectable como se determinó mediante IFA. La infección por *P. vivax* se confirmó mediante examen microscópico de frotis de sangre completa. Estos especímenes se ensayaron para determinar los anticuerpos de IgG e IgM frente a MSP1-19 y EXP1 de *P. vivax* usando EIA de esferas. Los resultados se muestran en la Tabla 6 con la reactividad expresada como la relación S / N (corte provisional para el resultado positivo ajustado a S / N de 5,00).

10 Se detectó IgG de MSP1-19 en 7 de 9 animales, mientras que se detectó IgM de MSP1-19 en los 9. Usando un EIA basado en tecnología recombinante, se detectó IgG de EXP1 en 7 de 9 chimpancés, mientras que se detectó IgG de EXP1 en un ensayo en basado en péptidos en 4 de 9. El ensayo de EXP1 basado en tecnología recombinante detectó anticuerpos IgM en 8 de los 9 animales.

Tabla 6

ID del animal	Título de IgG específica de especie mediante IFA				Pv-MSP1-19		Pv-EXP1		
	Pf	Pv	Pm	Po	IgG	IgM	Antígeno IgG	IgM	Péptido IgG
Amanda	256	>16384	256	>16384	25,2	107,1	49,8	40,4	5,6
Arthur	4096	>16384	1024	>16384	44,9	107,1	188,1	40,4	35,1
Brandy	64	>16384	16	>16384	1,0	16,7	3,0	1,0	0,7
Brodie	64	>16384	64	>16384	19,1	107,1	8,3	39,8	1,1
Callie	256	>16384	64	>16384	14,5	107,1	117,0	18,1	6,0
Edwina	256	4096	64	>16384	3,1	103,0	3,1	9,1	1,4
Luther	64	4096	64	256	12,8	107,1	12,0	40,4	2,0
Mary	4096	≥16384	1024	≥16384	107,1	107,1	31,4	35,9	2,8
Patrick	4096	≥16384	1024	≥16384	34,2	107,1	85,1	40,4	8,7

20 **Ejemplo 8: Reactivos para inmunoensayo a base de micropartículas**

Preparación de micropartículas. Las micropartículas se recubrieron con antígenos recombinantes clonados de las regiones de EXP1 de *Plasmodium vivax* (Pv-EXP1). Véase el Ejemplo 1 para la preparación de la proteína recombinante. Las micropartículas recubiertas con la proteína recombinante PvEXP1 se prepararon de la manera siguiente. Brevemente, una alícuota de 250 µl de micropartículas (4 % en peso / volumen, 3,2 micrómetros de diámetro (Interfacial Dynamics Corp., Portland, Oregon) se mezcló con 1,25 ml de un tampón de recubrimiento, tampón ácido (2-(N-morfolino)etanosulfónico (MES), pH 6,0) y se sedimentaron en una microcentrífuga durante 2 minutos a 14.000 xg. Las partículas se resuspendieron en 0,5 ml del tampón de recubrimiento MES y se añadieron 100 µg de la proteína recombinante. (En este ejemplo, solución de PvEXP1: 9,1 µl para una concentración final de 0,20 mg / ml). La solución de micropartículas/proteína se mezcló y agitó durante 16 horas a temperatura ambiente. Las micropartículas se sedimentaron a 14.000 Xg durante 2 minutos, y se retiró la solución. Las partículas se resuspendieron en 1 ml de solución salina tamponada con fosfato (pH 7,2) (PBS) y se volvieron a sedimentar. Las partículas se lavaron con PBS dos veces más, después se resuspendieron en 1 ml de diluyente de micropartículas (solución salina tamponada con fosfato (pH 6,5) con 11,5 % de sacarosa). La concentración de micropartículas se

determinó mediante la absorbancia a 700 nm en comparación con una curva estándar preparada a partir de concentraciones conocidas de micropartículas. La solución de micropartículas se diluyó a una concentración final de 0,05 % en diluyente de micropartículas.

5 Preparación de conjugados marcados con acridinio. Para el ensayo de anticuerpos, la IgG de ratón anti-humana marcada directamente con acridinio puede prepararse de la manera siguiente: 53,6 µl de tampón de conjugación (CB) que contiene fosfato de sodio, NaCl, 3-(3-cloramidopropil) dimetilamonio Propano-sulfonato (CHAPS, Sigma Chemical Company, Saint Louis, MO), pH 8,0 y 7,2 µl de éster de N-hidroxisuccinimida del ácido 10- (3-sulfopropil) - N-tosil-N- (2-carboxietil) -9-acridinio carboxamida (4 mg/ml en dimetilformamida) se añadió a 131 µl de IgG de ratón anti-humano (4,59 mg / ml) y 601 µl de PBS a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se mezcló con un rotador durante 20 minutos a temperatura ambiente. La reacción se inactivó mediante la carga de la mezcla de reacción en la HPLC. Esto se aplicó a una columna de filtración en gel Bio-Sil SEC-250 de 300 x 7,8 mm (Bio-Rad, Richmond, California) que se había equilibrado con tampón que contenía CHAPS, NaCl y fosfato sódico, pH 6,3. La columna se eluyó a 1,0 ml / minuto con el mismo tampón usando un controlador de Beckman 421A equipado con una bomba modelo 114M. Se recogieron fracciones de 1 ml y la absorbancia se determinó a 280 nm y 370 nm con un espectrofotómetro Beckman DU-7. La extensión de la incorporación de acridinio se calcula usando los métodos como se describen en la patente de Estados Unidos N.º 5.705.330. La relación acridinio/IgG (mol / mol) obtenida fue de aproximadamente 2,5. El conjugado se almacenó a 4 °C.

20 **Ejemplo 9: Ensayo PRISM Anti-Pv-EXP1**

El ensayo de anticuerpos se PRISM se describe en la patente de Estados Unidos n.º 5.705.330, que se incorpora en el presente documento por referencia y los ensayos PRISM de antígeno y anticuerpos se describen en Shah y Stewart, The Immunoassay Handbook, segunda edición, editado por David Wild, pág. 297-303 (2001), también incorporado en el presente documento por referencia. Con respecto a la presente invención, se utilizaron los siguientes procedimientos. El formato de ensayo se proporciona en la figura 2. Generalmente, en la estación 1, se dispensaron 50 µl de control o muestra, 50 µl de tampón diluyente de especímenes (SDB, tampón de borato, pH 7,5 que contiene Tween 20, Tritón X -100, urea, seroalbúmina bovino, suero de ternero recién nacido, NaCl, lisado de E. coli y azida), y 50 µl de micropartículas recubiertas con antígeno recombinante (preparado como se describe en el Ejemplo 7 anterior) en cada pocillo de incubación y se inició el tiempo de ensayo. Estos se mezclaron mediante difusión mutua de cada uno en el otro sin agitación externa o agitando para formar una mezcla de reacción. En la estación 4, la mezcla de la reacción se transfirió un pocillo de detección que contenía una matriz fibrosa y se lavó dos veces con 300 µl de lavado de transferencia (TW, que contiene tampón de borato, pH 7,0, con NaCl, Tween-20, glicerol, urea, y Proclin® 300). Después de 18 minutos de incubación a 37 °C, se dispensaron 50µ de anticuerpo anti-humano de ratón marcado con acridinio en la matriz del pocillo de detección en la estación 5. El pocillo se incubó durante 23 minutos a 37 °C y la matriz fibrosa que contenía la mezcla de reacción se lavó tres veces con 100 µl de lavado final (FW), que contenía tampón Tris, pH 9,0, con LiCl, dodecilsulfato de litio, polietilenglicol 1500 y Proclin® 300 en la estación 8 En la estación 9, se generó una señal de quimioluminiscencia (CL) mediante la adición de una solución de peróxido de hidrógeno alcalino y los fotones se midieron mediante un tubo fotomultiplicador. La cantidad de luz emitida es proporcional a la cantidad de anticuerpos en la muestra. La presencia o ausencia de anticuerpos en la muestra se determina comparando el número de fotones recogidos de la muestra a un valor negativo (S / N). Los resultados se expresan como S / N (señal a negativo) en la Tabla 7 a continuación para un conjunto de muestras de infecciones agudas y crónicas. Las muestras que tienen una S / N mayor que 5,0 se consideran reactivas para el antígeno. Los resultados se comparan con los resultados obtenidos a partir de un inmunoensayo ligado a enzimas disponible comercialmente.

Tabla 7

	Comercial	PvEXP1
<u>ID de la muestra</u>	ELISA	S/N
M001	Pos	4,17
M002	Pos	1,38
M003	Pos	2,87
M004	Pos	2,35
M005	Neg	0,92
M006	Pos	2,29
M021	Neg	2,08
M022	Pos	1,74
M023	Neg	1,13
M024	Neg	1,15
M025	Neg	1,57
M027	Neg	1,60

ES 2 609 586 T3

	Comercial	PvEXP1
<u>ID de la muestra</u>	ELISA	S/N
M028	Neg	2,97
M029	Pos	6,91
M030	Neg	1,55
M032	Neg	1,75
M033	Neg	1,85
M034	Pos	1,76
M035	Pos	5,69
M036	Pos	1,60
M037	Neg	1,08
M038	Pos	1,10
M039	Pos	4,37
M040	Pos	17,08
M041	Pos	17,98
M042	Pos	1,33
M043	Pos	57,40
M044	Pos	2,13
M045	Pos	3,72
M046	Pos	1,03
M047	Pos	1,65
M048	Pos	3,38
M049	Pos	1,27
M050	Pos	13,51
M060	Pos	21,11
M063	Pos	1,43
M065	Pos	1,38
M080	Pos	0,97
M082	Pos	1,80
M085	Pos	39,26
M093	Pos	23,92
M094	Neg	1,33
M095	Neg	21,62
M101	Pos	2,67
M102	Pos	45,31
M103	Pos	26,20
M104	Pos	29,81
M105	Pos	4,74
M106	Pos	28,46
M107	Pos	56,24
M108	Neg	6,72
M109	Pos	2,41
M110	Pos	1,52
M111	Pos	2,72
M112	Neg	0,53
M113	Pos	2,11
M115	Neg	0,95
M119	Pos	1,22
M120	Neg	0,57

ES 2 609 586 T3

	Comercial	PvEXP1
<u>ID de la muestra</u>	ELISA	S/N
M121	Pos	14,43
M122	Neg	1,61
M123	Neg	0,76
M126	Neg	0,67
M135	Pos	2,12
M146	Pos	48,40

Un total de 18 muestras fueron reactivas con PvEXP1. Las muestras M095 y M108 fueron reactivas con PvEXP1, pero no reactivas con el inmunoensayo comercial.

- 5 En la Tabla 8 a continuación, las muestras procedían de una población muy endémica para la malaria. Veintiocho de las veintinueve muestras fueron reactivas con el ensayo comercial y diecinueve de los veintinueve tenían valores de S/N superiores a 5,0 en el ensayo PRISM.

Tabla 8

	Comercial	PvEXP1
<u>ID de la muestra</u>	ELISA	S/N
647-12	Pos	0,66
427-41	Pos	77,54
1045-36	Pos	21,04
ABB/CE/306/00	Pos	0,98
1044-35	Pos	54,25
ABB775	Pos	28,53
A1795	Pos	20,30
645-10	Pos	17,90
5685-35	Pos	20,14
179-16	Pos	19,55
ABB/LT/14/00	Pos	3,92
ABB/CE/320/00	Pos	5,97
958-8	Pos	6,65
5621-2	Neg	1,27
A1371	Pos	4,81
609-39	Pos	10,22
ABB/CE/322/00	Pos	12,34
4098-28	Pos	20,29
240-16	Pos	5,75
ABB822	Pos	3,13
ABB1041	Pos	6,13
ABB/CE/344/00	Pos	20,00
315-15	Pos	13,21
478-24	Pos	4,07
193-15	Pos	5,79
783-51	Pos	4,08
612-2	Pos	3,88
ABB/CE/310/00	Pos	3,23
90-12	Pos	10,67
ABB866	Pos	1,24
K076	Pos	3,11

Todas las patentes y publicaciones mencionadas en esta memoria son indicativas del nivel de experiencia de los expertos en la técnica a la que pertenece la presente invención.

Citas adicionales

- 5 Ausubel, F.M., R. Brent, R.E. Kingston, et al. 1987. *Current protocols in molecular biology*. John Wiley & Sons, New York.
- Boerner, P., R. Lafond, W.Z. Lu, et al. 1991. Production of antigen-specific human monoclonal antibodies from in vitro-primed human splenocytes. *J Immunol.* 147:86-95.
- 10 Brennan, M., P.F. Davison, and H. Paulus. 1985. Preparation of bispecific antibodies by chemical recombination of monoclonal immunoglobulin G1 fragments. *Science.* 229:81-3.
- Buchardt, O., P. Nielsen, and R. Berg. 1992. PEPTIDE NUCLEIC ACIDS.
- Carter, P. 1986. Site-directed mutagenesis. *Biochem J.* 237:1-7.
- 15 Charoenvit, Y., V.F. Majam, G. Corradin, et al. 1999. CD4(+) T-cell- and gamma interferon-dependent protection against murine malaria by immunization with linear synthetic peptides from a *Plasmodium yoelii* 17-kilodalton hepatocyte erythrocyte protein. *Infect Immun.* 67:5604-14.
- Doderer, C., A. Heschung, P. Guntz, et al. 2007. A new ELISA kit which uses a combination of *Plasmodium falciparum* extract and recombinant *Plasmodium vivax* antigens as an alternative to IFAT for detection of malaria antibodies. *Malar J.* 6:19.
- 20 Elghouzzi, M.H., A. Senegas, T. Steinmetz, et al. 2008. Multicentric evaluation of the DiaMed enzyme-linked immunosorbent assay malaria antibody test for screening of blood donors for malaria. *Vox Sang.* 94:33-40.
- Fino, patente de Estados Unidos n.º 5.464.746. 1995. HAPTENS, TRACERS, IMMUNOGENS AND ANTIBODIES FOR CARBAZOLE AND DIBENZOFURAN DERIVATIVES.
- Fishwild, D.M., S.L. O'Donnell, T. Bengoechea, et al. 1996. High-avidity human IgG kappa monoclonal antibodies from a novel strain of minilocus transgenic mice [see comments]. *Nat Biotechnol.* 14:845-51.
- 25 Galfre, G., S.C. Howe, C. Milstein, et al. 1977. Antibodies to major histocompatibility antigens produced by hybrid cell lines. *Nature.* 266:550-2.
- Girard, M.P., Z.H. Reed, M. Friede, et al. 2007. A review of human vaccine research and development: malaria. *Vaccine.* 25:1567-80.
- 30 Goding, J.W. 1996. *Monoclonal antibodies: Principles and Practice*. Academic Press, San Diego. 492 pp.
- Harlow, E., and D. Lane. 1988. *Antibodies: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor. 726 pp.
- Harlow, E., and D. Lane. 1999. *Using antibodies: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- 35 Holliger, P., T. Prospero, and G. Winter. 1993. "Diabodies": small bivalent and bispecific antibody fragments. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90:6444-8.
- Hoogenboom, H.R., A.D. Griffiths, K.S. Johnson, et al. 1991. Multi-subunit proteins on the surface of filamentous phage: methodologies for displaying antibody (Fab) heavy and light chains. *Nucleic Acids Res.* 19:4133-7.
- 40 Hope, LA., R. Hall, D.L. Simmons, et al. 1984. Evidence for immunological cross-reaction between sporozoites and blood stages of a human malaria parasite. *Nature.* 308:191-4.
- Jones, J.D., P. Dunsmuir, and J. Bedbrook. 1985. High level expression of introduced chimaeric genes in regenerated transformed plants. *Embo J.* 4:2411-8.
- Jones, P.T., P.H. Dear, J. Foote, et al. 1986. Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse. *Nature.* 321:522-5.
- 45 Kara, U., B. Murray, C. Pam, et al. 1990. Chemical characterization of the parasitophorous vacuole membrane antigen QF 116 from *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol.* 38:19-23.
- Kaufman, R.J. 1990. Vectors used for expression in mammalian cells. *Methods Enzymol.* 185:487-511.
- Kim, S., H.J. Ahn, T.S. Kim, et al. 2003. ELISA detection of vivax malaria with recombinant multiple stage-specific antigens and its application to survey of residents in endemic areas. *Korean J Parasitol.* 41:203-7. Kitchen, A.D., P.H. Lowe, K. Laloo, et al. 2004. Evaluation of a malarial antibody assay for use in the screening of blood and tissue products for clinical use. *Vox Sang.* 87:150-5.
- 50 Kostelny, S.A., M.S. Cole, and J.Y. Tso. 1992. Formation of a bispecific antibody by the use of leucine zippers. *J Immunol.* 148:1547-53.
- Lee, J.S., W.G. Kho, H.W. Lee, et al. 1998. Current status of vivax malaria among civilians in Korea. *Korean J Parasitol.* 36:241-8.
- 55 Lonberg, N., and D. Huszar. 1995. Human antibodies from transgenic mice. *Int Rev Immunol.* 13:65-93.
- Lonberg, N., L.D. Taylor, F.A. Harding, et al. 1994. Antigen-specific human antibodies from mice comprising four distinct genetic modifications [see comments]. *Nature.* 368:856-9.
- Luckow, V.A. 1991. Cloning and expression of heterologous genes in insect cells with baculovirus vectors. In *Recombinant DNA technology and applications*. Vol. A. Prokop, R.K. Bajpai, and C. Ho, editors. McGraw-Hill, New York. 97-152.
- 60 Marks, J.D., A.D. Griffiths, M. Malmqvist, et al. 1992. By-passing immunization: building high affinity human antibodies by chain shuffling. *Biotechnology (N Y).* 10:779-83.
- Marks, J.D., H.R. Hoogenboom, T.P. Bonnert, et al. 1991. By-passing immunization. Human antibodies from V-gene libraries displayed on phage. *J Mol Biol.* 222:581-97.
- 65 Mattingly, P. US Patent No. 5,424,414. 1995. HAPTENS, TRACERS, IMMUNOGENS AND ANTIBODIES FOR 3-

PHENYL-A-ADAMANTANEACETIC ACIDS.

- Meraldi, V., I. Nebie, R. Moret, et al. 2002. Recognition of synthetic polypeptides corresponding to the N- and C-terminal fragments of *Plasmodium falciparum* Exp-1 by T-cells and plasma from human donors from African endemic areas. *Parasite Immunol.* 24:141-50.
- 5 Mertens, G., T. Vervoort, S. Heylen, et al. 1999. Malaria antibody ELISA insufficiently sensitive for blood donor screening. *Vox Sang.* 77:237-8.
- Milstein, C., and A.C. Cuello. 1983. Hybrid hybridomas and their use in immunohistochemistry. *Nature.* 305:537-40.
- 10 Morrison, S.L., L. Wims, S. Wallick, et al. 1987. Genetically engineered antibody molecules and their application. *Ann N Y Acad Sci.* 507:187-98.
- Mullis, K., F. Faloona, S. Scharf, et al. 1986. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 51 Pt 1:263-73.
- Mungai, M., G. Tegtmeier, M. Chamberland, et al. 2001. Transfusion-transmitted malaria in the United States from 1963 through 1999. *N Engl J Med.* 344:1973-8.
- 15 Munson, P.J., and D. Rodbard. 1980. Ligand: a versatile computerized approach for characterization of ligand-binding systems. *Anal Biochem.* 107:220-39.
- Nielsen, P.E., M. Egholm, R.H. Berg, et al. 1991. Sequence-selective recognition of DNA by strand displacement with a thymine-substituted polyamide. *Science.* 254:1497-500.
- 20 Okamura, J., and R. Goldberg. 1989. Regulation of plant gene expression: general principles. In *The Biochemistry of Plants: A Comprehensive Treatise*. Vol. 15. P. Stumpf and E. Conn, editors. Academic Press, New York. 1-82.
- Reisfeld, R.A., and S. Sell. 1985. Monoclonal antibodies and cancer therapy: Proceedings of the Roche-UCLA symposium held in Park City, Utah, January 26-February 2, 1985. Alan R. Liss, New York. 609 pp.
- 25 Riechmann, L., M. Clark, H. Waldmann, et al. 1988. Reshaping human antibodies for therapy. *Nature.* 332:323-7.
- Rodrigues, M.H., M.G. Cunha, R.L. Machado, et al. 2003. Serological detection of *Plasmodium vivax* malaria using recombinant proteins corresponding to the 19-kDa C-terminal region of the merozoite surface protein-1. *Malar J.* 2:39.
- Ruth, J. US Patent No. 4,948,882. 1990. Ruth, J. 1990. SINGLE-STRANDED LABELED OLIGONUCLEOTIDES, REACTIVE MONOMERS AND METHODS OF SYNTHESIS.
- 30 Sambrook, J. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor.
- Schade, R., C. Staak, C. Hendriksen, et al. 1996. The production of avian (egg yolk) antibodies: IgY. The report and recommendations of ECVAM workshop. *Alternatives to Laboratory Animals (ATLA).* 24:925-934.
- Schnieke, A.E., A.J. Kind, W.A. Ritchie, et al. 1997. Human factor IX transgenic sheep produced by transfer of nuclei from transfected fetal fibroblasts. *Science.* 278:2130-3.
- 35 Seed, C.R., A. Cheng, T.M. Davis, et al. 2005. The efficacy of a malarial antibody enzyme immunoassay for establishing the reinstatement status of blood donors potentially exposed to malaria. *Vox Sang.* 88:98-106.
- Shalaby, M.R., H.M. Shepard, L. Presta, et al. 1992. Development of humanized bispecific antibodies reactive with cytotoxic lymphocytes and tumor cells overexpressing the HER2 protooncogene. *J Exp Med.* 175:217-25.
- 40 She, R.C., M.L. Rawlins, R. Mohl, et al. 2007. Comparison of immunofluorescence antibody testing and two enzyme immunoassays in the serologic diagnosis of malaria. *J Travel Med.* 14:105-11.
- Sherman, I.W. 1985. Membrane structure and function of malaria parasites and the infected erythrocyte. *Parasitology.* 91 (Pt 3):609-45.
- Simmons, D., G. Woollett, M. Bergin-Cartwright, et al. 1987. A malaria protein exported into a new compartment within the host erythrocyte. *Embo J.* 6:485-91.
- 45 Son, E.S., T.S. Kim, and H.W. Nam. 2001. Western blot diagnosis of vivax malaria with multiple stage-specific antigens of the parasite. *Korean J Parasitol.* 39:171-6.
- Srivastava, I.K., M. Schmidt, M. Grall, et al. 1991. Comparative evaluation of an ELISA based on recombinant polypeptides and IFA for serology of malaria. *J Top Med Hyg.* 94:189-94.
- 50 Suresh, M.R., A.C. Cuello, and C. Milstein. 1986. Bispecific monoclonal antibodies from hybrid hybridomas. *Methods Enzymol.* 121:210-28.
- Tolle, R., K. Fruh, O. Doumbo, et al. 1993. A prospective study of the association between the human humoral immune response to *Plasmodium falciparum* blood stage antigen gp 190 and control of malarial infections. *Infect Immun.* 61:40-7.
- 55 Trauneker, A., F. Oliveri, and K. Karjalainen. 1991. Myeloma based expression system for production of large mammalian proteins. *Trends Biotechnol.* 9:109-13.
- Turner, R., and G.D. Foster. 1995. The potential exploitation of plant viral translational enhancers in biotechnology for increased gene expression. *Mol Biotechnol.* 3:225-36.
- Urlaub, G., and L.A. Chasin. 1980. Isolation of Chinese hamster cell mutants deficient in dihydrofolate reductase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 77:4216-20.
- 60 van der Krol, A.R., J.N. Mol, and A.R. Stuitje. 1988. Modulation of eukaryotic gene expression by complementary RNA or DNA sequences. *Biotechniques.* 6:958-76.
- Verhoeyen, M., C. Milstein, and G. Winter. 1988. Reshaping human antibodies: grafting an antilysozyme activity. *Science.* 239:1534-6.
- 65 Vinetz, J.M., J. Li, T.F. McCutchan, et al. 1998. *Plasmodium malariae* infection in an asymptomatic 74-year-old Greek woman with splenomegaly. *N Engl J Med.* 338:367-71.
- Wells, J.A., M. Vasser, and D.B. Powers. 1985. Cassette mutagenesis: an efficient method for generation of

multiple mutations at defined sites. *Gene*. 34:315-23.
 Wild, D. 2001. *The Immunoassay handbook*. Nature Pub. Group, London. xxix, 906 p. pp.
 Wyler, D. 1992. Plasmodium and Babeis. In *Infectious diseases*. Vol. S.L. Gorbach, J.G. Bartlett, and N.R. Blacklow, editors. Saunders, Philadelphia. 407.
 5 Zoller, M.J., and M. Smith. 1987. Oligonucleotide-directed mutagenesis: a simple method using two oligonucleotide primers and a single-stranded DNA template. *Methods Enzymol.* 154:329-50.
 Zon, G. 1988. Oligonucleotide analogues as potential chemotherapeutic agents. *Pharm Res.* 5:539-49.

LISTADO DE SECUENCIAS

10	<110> BIRKENMEYER, LARRY G. COFFIE, RUTHIE E.	
15	DAWSON, GEORGE J. DESAI, SURESH M. DILLE, BRUCE J. MUERHOFF, ANTHONY SCOTT	
20	<120> SECUENCIAS DE NUCLEÓTIDOS Y AMINOÁCIDOS QUE CODIFICAN UNA PROTEÍNA EXPORTADA I DERIVADA DE PLASMODIUM VIVAX Y USOS DE LAS MISMAS	
	<130> 9698WOO1	
25	<140> <141> <160> 4	
30	<170> PatentIn versión 3.5 <210> 1 <211> 184 <212> ADN	
35	<213> Plasmodium vivax <220> <221> CDS <222> (8)..(175)	
40	<400> 1	
	gaattcc atg aac gcc ggt aac ggt cgt cat cca ttt tct ctg ggt ggt	49
	Met Asn Ala Gly Asn Gly Arg His Pro Phe Ser Leu Gly Gly	
	1 5 10	
	ggt aaa ggt ggc gac gcg gcg cct acg gag ccg acg ccg gca ccg acc	97
	Gly Lys Gly Gly Asp Ala Ala Pro Thr Glu Pro Thr Pro Ala Pro Thr	
	15 20 25 30	
	gcg ccg agc gca act ggt ctg aac gat gac ggt tct tct tct ggc act	145
	Ala Pro Ser Ala Thr Gly Leu Asn Asp Asp Gly Ser Ser Ser Gly Thr	
	35 40 45	
	gaa tct act tct cat cat cac cat cac cat tgaggatcc	184
	Glu Ser Thr Ser His His His His His His	
	50 55	
45	<210> 2 <211> 56 <212> PRT <213> Plasmodium vivax	
50	<400> 2	

ES 2 609 586 T3

Met Asn Ala Gly Asn Gly Arg His Pro Phe Ser Leu Gly Gly Gly Lys
 1 5 10 15

Gly Gly Asp Ala Ala Pro Thr Glu Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ala Pro
 20 25 30

Ser Ala Thr Gly Leu Asn Asp Asp Gly Ser Ser Ser Gly Thr Glu Ser
 35 40 45

Thr Ser His His His His His His
 50 55

5 <210> 3
 <211> 49
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético
 <400> 3

Asn Ala Gly Asn Gly Arg His Pro Phe Ser Leu Gly Gly Gly Lys Gly
 1 5 10 15

Gly Asp Ala Ala Pro Thr Glu Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ala Pro Ser
 20 25 30

Ala Thr Gly Leu Asn Asp Asp Gly Ser Ser Ser Gly Thr Glu Ser Thr
 35 40 45

15 Ser
 <210> 4
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cola de 6 His sintética

25 <400> 4

His His His His His His
 1 5

REIVINDICACIONES

1. Un ácido nucleico aislado que consiste en una secuencia de ácido nucleico que tiene una identidad de al menos un 98 % con la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1, no siendo dicho ácido nucleico diferente en cuanto a la longitud de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1.
2. Una proteína purificada que consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 2 y la SEQ ID NO: 3.
3. La proteína purificada de la reivindicación 2, donde dicha proteína es una proteína sintética o recombinante.
4. Un vector que comprende la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 1, unido operativamente a una secuencia reguladora.
5. Un método de detección de anticuerpos contra *P. vivax* en una muestra de ensayo que se sospecha que contiene los anticuerpos que comprenden las etapas de:
- (a) poner en contacto la muestra de ensayo con un antígeno que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3, durante un tiempo y en condiciones suficientes para la formación de complejos anticuerpo / antígeno; y
- (b) detectar la presencia de anticuerpos presentes en la muestra de ensayo mediante la detección de la presencia de los complejos de anticuerpo / antígeno.
6. Un método de detección de anticuerpos contra *P. malariae*, *P. falciparum*, *P. vivax* y *P. ovale* en una muestra de ensayo que se sospecha que contiene al menos uno de los anticuerpos, que comprende las etapas de:
- (a) poner en contacto la muestra de ensayo con: (i) un antígeno que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 2 y la SEQ ID NO: 3, (ii) un antígeno de *P. falciparum*; (iii) un antígeno de *P. ovale*, y (iv) un antígeno de *P. malariae*, durante un tiempo y en condiciones suficientes para la formación de complejos de anticuerpo / antígeno de *P. malariae*, complejos de anticuerpo / antígeno de *P. falciparum*, complejos de anticuerpo / antígeno de *P. vivax* y complejos de anticuerpo / antígeno de *P. ovale*; y
- (b) detectar la presencia de anticuerpos presentes en la muestra de ensayo mediante la detección de la presencia de uno o más de los complejos.
7. El método de la reivindicación 6, para detectar anticuerpos contra *P. malariae*, *P. ovale*, *P. vivax* y *P. falciparum* en una muestra de ensayo que se sospecha que contiene al menos uno de los anticuerpos, que comprende las etapas de:
- (a) poner en contacto la muestra de ensayo con (i) un antígeno que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 2 y la SEQ ID NO: 3, (ii) un antígeno de *P. malariae*; (iii) un antígeno de *P. ovale*, y (iv) un antígeno de *falciparum*, durante un tiempo y en condiciones suficientes para permitir la formación de complejos de anticuerpo / antígeno de *P. malariae*, complejos de anticuerpo / antígeno de *P. ovale*, complejos de anticuerpo / antígeno de *P. vivax* y complejos de anticuerpo / antígeno de *P. falciparum*;
- (b) añadir un conjugado a los complejos antígeno/anticuerpo resultantes durante un tiempo y en condiciones suficientes para permitir que cada conjugado se una al anticuerpo unido, donde el conjugado comprende un anticuerpo unido a un compuesto generador de señal capaz de generar una señal detectable; y
- (c) detectar la presencia de anticuerpos contra *P. malariae*, *P. ovale*, *P. vivax* y *P. falciparum* que pueden estar presentes en la muestra de ensayo mediante la detección de la presencia de la señal generada por el compuesto generador de señal.
8. Una vacuna que comprende: al menos un antígeno seleccionado del grupo que consiste en un antígeno que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3, o un epítipo del mismo.
9. Un kit para determinar la presencia de anticuerpos contra *P. vivax* en una muestra de ensayo, que comprende: (a) un antígeno que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 2 y la SEQ ID NO: 3; y
- (b) un conjugado que comprende un anticuerpo unido a un compuesto generador de señal capaz de generar una señal detectable.
10. Un kit para determinar la presencia de anticuerpos contra *P. malariae*, *P. ovale*, *P. vivax* y *P. falciparum* en una muestra de ensayo, que comprende:
- (a) (i) un antígeno, que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO:2 y la SEQ ID NO:3, (ii) un antígeno de *P. ovale*, (iii) un antígeno de *P. malariae* y (iv) un antígeno de *P. falciparum*; y

(b) un conjugado que comprende un anticuerpo unido a un compuesto generador de señal capaz de generar una señal detectable.

FIGURA 1

Figura 1A

GAATTCATGAACGCCGGTAACGGTCGTCATCCATTTTCTCTGGGTGGTGGTAAAGG
TGGCGACGCGGCCTACGGAGCCGACGCCGGCACCGACCGCGCCGAGCGCAACTG
GTCTGAACGATGACGGTTCTTCTTCTGGCACTGAATCTACTTCTCATCATCACCATCA
CCATTGAGGATCC

Figura 1B

MNAGNGRHPFSLGGGKGGDAAPTEPTPAPTAPSATGLNDDGSSSGTESTSHHHHHH

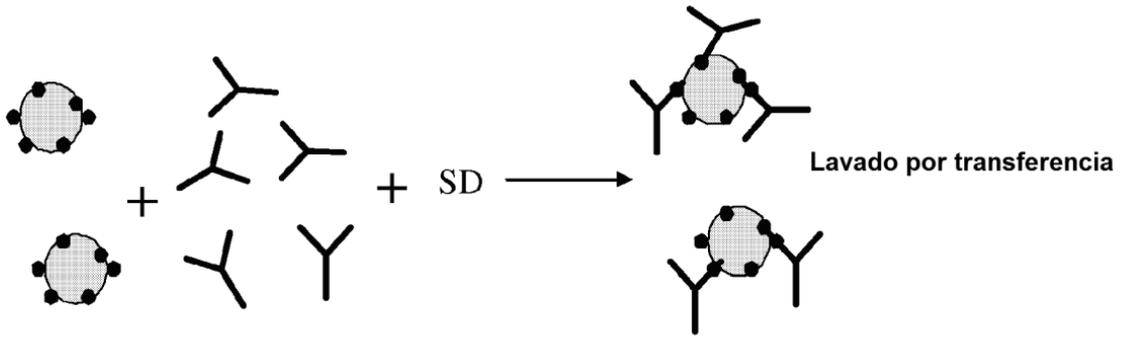
Figura 1C

Bio-NAGNGRHPFSLGGGKGGDAAPTEPTPAPTAPSATGLNDDGSSSGTESTS

FIGURA 2

Un prototipo de ensayo de malaria PRIM® de Abbott

Etapa 1



Etapa 2

