

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 636 976**

51 Int. Cl.:

C07H 21/00 (2006.01)
C07K 14/00 (2006.01)
C12P 21/00 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)
C12N 5/00 (2006.01)
C12N 1/00 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)
A61K 39/015 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.03.2009 PCT/US2009/036098**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **11.09.2009 WO09111599**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.03.2009 E 09717602 (8)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.05.2017 EP 2393824**

54 Título: **Genes de Plasmodium malariae y Plasmodium ovale y usos de los mismos**

30 Prioridad:

06.03.2008 US 68375 P
20.06.2008 US 143137
04.03.2009 US 397558

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
10.10.2017

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 636 976 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

Genes de *Plasmodium malariae* y *Plasmodium ovale* y usos de los mismos

5 Antecedentes de la invención

Campo técnico

10 La presente invención se refiere a métodos de detección de anticuerpos contra a *P. malariae*, *P. ovale*, *P. vivax* y *P. falciparum* utilizando antígenos derivados del gen de la Proteína de Superficie del Merozoito (MSP1) de las especies de *Plasmodium*. La presente invención también se refiere a kits para llevar a cabo los métodos.

Información Antecedente

15 Transmisión de la malaria

La malaria es una enfermedad transmitida por mosquitos 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 mayor cantidad de infecciones en todo el mundo. En particular, *Plasmodium falciparum* es el agente de la malaria grave, potencialmente mortal, causando de 700.000 a 2,7 millones de muertes anuales estimadas, la mayoría de ellos en niños pequeños en África. *Plasmodium vivax* y *P. ovale* tienen parásitos en estadio hepático latentes (hipnozoitos) que se pueden reactivar (o "recaer") y causar malaria varios meses o años después de la picadura del mosquito infectante. *Plasmodium malariae* produce infecciones de larga duración y, si se dejan sin tratar, pueden persistir asintóticamente en el anfitrión humano durante años, incluso de por vida (Gorbach, Bartlett & Blacklow "Infectious Diseases, 2ª Edición, Saunders Press, 1992).

Más recientemente, se ha demostrado que *Plasmodium knowlesi*, cuyos anfitriones naturales incluyen macacos que comen cangrejos (*Macaca fascicularis*) y macacos de cola de cerdo, infectan a seres humanos y pueden ser responsables de un número significativo de infecciones humanas en Malasia (Cox-Singh et al., Clinical Infectious Diseases 2008; 46:165-71) y se ha encontrado en seres humanos en Tailandia (Jongwutiwes et al., Emerg. Inf. Dis. 2004; 10:2211-2213) y Myanmar (Zhu et al., Zhongguo Ji Sheng Chong Xue Yu Ji Sheng Chong Bing Za Zhi 2006; 24:70-1).

35 En la naturaleza, los parásitos de la malaria se propagan infectando sucesivamente dos tipos de anfitriones: los seres humanos y los mosquitos *Anopheles* hembra. En los seres humanos, los parásitos crecen y se multiplican en primer lugar en las células del hígado y a continuación en los glóbulos rojos de la sangre. En la sangre, sucesivas progenies de parásitos crecen dentro de los glóbulos rojos y los destruyen, liberando parásitos descendientes (merozoitos) que continúan el ciclo invadiendo otros glóbulos rojos.

40 Los parásitos de la fase sanguínea causan los síntomas de la malaria. Cuando ciertas cepas de la sangre ("gametocitos") son recogidas por un mosquito *Anopheles* durante una ingesta de sangre, comienzan otro ciclo diferente de crecimiento y multiplicación en el mosquito. Después de 10-18 días, los parásitos se encuentran (como "esporozoitos") en las glándulas salivales del mosquito. Cuando el mosquito *Anopheles* toma una ingesta de sangre en otro ser humano, los esporozoitos se inyectan con la saliva del mosquito y comienzan otra infección humana cuando parasitan las células del hígado. (D. Wyler, "Plasmodium and Babesia", Capítulo 287, pág. 2407, en Gorbach, Bartlett y Blacklow, "Infectious Diseases, 2ª Edición, Saunders Press, 1992; http://www.cdc.gov/malaria/biology/life_cycle.htm).

50 Síntomas y enfermedad de la malaria

La infección con los 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 se puede clasificar como no complicada o severa (complicada). En general, la malaria es una enfermedad curable si se diagnostica y se trata temprana y correctamente. Después de la picadura infecciosa por el mosquito *Anopheles*, transcurre un período de tiempo (el "período de incubación") antes de que aparezcan los primeros síntomas. El período de incubación varía de 7 a 30 días. Los períodos más cortos se observan con mayor frecuencia con *P. falciparum* y los más largos con *P. malariae*.

60 Aunque la malaria no complicada es bastante tratable y los síntomas son no incapacitantes, la malaria severa se produce cuando las infecciones por *P. falciparum* se complican por fallos graves de órganos o anomalías en la sangre o el metabolismo del paciente. Las manifestaciones de malaria severa incluyen, por ejemplo, malaria cerebral, con comportamiento anormal, deterioro de la conciencia, convulsiones, coma u otras anomalías neurológicas; anemia severa, hemoglobinuria, edema pulmonar o síndrome de dificultad respiratoria aguda,

anomalías en la coagulación sanguínea y trombocitopenia, colapso cardiovascular y choque.

Diagnóstico

La malaria debe ser reconocida rápidamente para tratar al paciente a tiempo y prevenir la propagación de la infección en la comunidad. El paludismo debe considerarse una emergencia médica potencial y debe ser tratado en consecuencia. El retraso en el diagnóstico y tratamiento es una de las principales causas de muerte en pacientes con malaria en los Estados Unidos. Se puede sospechar de la existencia de malaria basándose en los síntomas del paciente y los hallazgos físicos en el examen. Sin embargo, para realizar un diagnóstico definitivo, las pruebas de laboratorio se deben demostrar la presencia de los parásitos de la malaria o sus componentes. El "patrón oro" de diagnóstico para la malaria depende de la demostración de parásitos en un frotis de sangre examinado bajo un microscopio. En la malaria por *P. falciparum*, los hallazgos adicionales de laboratorio pueden incluir anemia leve, leve descenso de las plaquetas en sangre (trombocitopenia), elevación de la bilirrubina, elevación de las aminotransferasas, albuminuria, y presencia de cuerpos anómalos en la orina ("cilindros urinarios").

Detección de anticuerpos de Plasmodium

Los anticuerpos contra los parásitos asexuales de la malaria (es decir, los merozoitos) aparecen en el plazo de días a semanas después de la invasión de los eritrocitos y pueden persistir durante meses o incluso años (Vinetz et al., NEJM 2007, 338(6): 367-371). No se recomienda la detección de anticuerpos para el diagnóstico de malaria aguda, ya que la presencia de anticuerpos puede indicar una infección pasada o actual (reciente). Históricamente, la detección de anticuerpos utilizó el ensayo de inmunofluorescencia (IFA), pero este ensayo no es particularmente sensible ni muy específico y requiere mano de obra intensiva y requiere reactivos cuidadosamente preparados. Se han desarrollado ensayos por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) que utilizan antígenos derivados de plasmodio (Newmarket Laboratories, Reino Unido; Cellabs, Australia) o *P. falciparum* (DiaMed) para detectar inmunoglobulinas (IgG y/o IgM) en suero o plasma humano. Estos ensayos son más fáciles de realizar, exhiben mayor rendimiento y una mayor sensibilidad y especificidad que IFA (Srivastava et al. J Trop. Med. Hyg. 1991, 94:189-194; Kitchen et al. Vox Sang. 2004, 87:150-155; Seed et al. Vox Sang. 2005, 88:98-106). Algunos ensayos ELISA pueden ser mejores que otros para la detección de anticuerpos dirigidos contra cada una de las cuatro especies de plasmodio que causan malaria en seres humanos (She et al. J. Trav. Med. 2007, 14:105-111).

Los antígenos utilizados para la captura de anticuerpos han incluido vacunas candidatas ya que su capacidad para provocar la respuesta de anticuerpos se determina a menudo en animales y la vacunas humanas y los anticuerpos de origen natural se miden antes de la vacunación. Algunos ejemplos de tales antígenos incluyen la proteína circunsporozoítica (CSP), el antígeno apical de membrana 1 (AMA-1), la proteína de la superficie de merozoitos (MSP) uno y dos, y en particular el fragmento C-terminal de 42kDa y 19kDa de MSP1 (a.k.a. MSP1-42 y MSP1-19) de *P. vivax* y *P. falciparum* (Kitchen et al. Vox Sang., 2004, 87:150-155; Rodrigues et al. Malaria J. 2003, 2:39-46). Otros antígenos de interés son MSP-2, -3, -4, -5, -8 -9, proteína rica en glutamato, antígeno de repetición de serina (Girard et al. Vaccine, 2007, 25(9):1567-1580).

La MSP1 de *Plasmodium falciparum* ha sido ampliamente estudiada y fue una de las primeras vacunas candidatas. Provoca una respuesta protectora de anticuerpos frente a la malaria grave y la presencia de anticuerpos MSP1 se correlaciona con la inmunidad protectora (Siddiqui et al. PNAS 1987, 84: 3014 - 3018). MSP1 se expresa como una molécula precursora de ~200 kDa conectada por un ancla de glicosil fosfatidilinositol a la membrana de superficie del merozoito. MSP1 se procesa hasta un complejo de polipéptidos sobre la superficie del merozoito, incluyendo las regiones N-terminales y centrales de 82, 30 y 38 kDa, así como la región C-terminal de 42 kDa. En el momento de la invasión de los glóbulos rojos, MSP1-42 se procesa adicionalmente mediante escisión proteolítica hasta un fragmento de 33 kDa (MSP1-33), que se desprende con el resto del complejo, y un fragmento C-terminal de 19 kDa (MSP1-19). Sólo el MSP1-19 C-terminal sigue anclado en la superficie del merozoito y se transporta al RBC parasitado. En monos, se ha demostrado que la inmunización con MSP1-42 y MSP1-19 recombinantes provoca diversos grados de protección contra la sensibilización con *P. falciparum* (Egan et al. Infect. Immun., 2000, 68:1418-1427; Kumar, et al. Mol. Med., 1995, 1:325-332). Las proteínas MSP1-19 de *P. falciparum* y *P. vivax* han sido propuestas como vacunas candidatas (Roas et al., Immunol Lett. 2004, 92(3):259-68; Stowers et al. Infect. Immun., 2001, 69:1536-1546; Faber et al. Infect. Immun., 2007, 75:5947-5955). Sin embargo, los genes MSP1 de *P. ovale* y *P. malariae*, los otros dos parásitos plasmodium principales que causan la malaria en seres humanos, no han estado disponibles para el examen como reactivos para la vacunación o la detección del anticuerpos.

La detección de anticuerpos en suero o plasma donado puede utilizarse para identificar donantes individuales que han estado expuestos a organismos palúdicos y que pueden haber sido infectados recientemente y, por lo tanto, son potencialmente parasitémicos. Las cuatro especies de plasmodium que infectan a los seres humanos se han transmitido a través de transfusiones de sangre, y aunque la incidencia de malaria post-transfusión es baja en los Estados Unidos (Mungai, et. Al., N. Engl. J. Med. 344, pág. 1973-1978, 2001), la disponibilidad de donantes de sangre podría aumentarse mediante la implementación de ensayos de escrutinio de anticuerpos plasmáticos de tal manera que sólo los individuos expuestos al organismo de la malaria sean postergados de 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. Tales ensayos teóricamente detectarían anticuerpos contra especies de plasmodium que infectan a seres humanos y causan malaria (*P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* y *P. malariae*). Actualmente se utilizan anticuerpos ELISA comerciales (Reino Unido, Australia, Francia) o se están considerando en otros países para la reincorporación de donantes aplazados (Seed et al. Vox Sang 2005, 88:98-106; Cocina y Chiodini, Vox Sang (2006) 90:77-84; Elghouzzi y col., Vox Sang., 2008, 94: 33-40). En estos casos, los donantes se someten a pruebas de anticuerpos contra antígenos derivados de plasmodio con varios meses de aplazamiento.

Un ensayo comercial (Pan Malaria Antibody CELISA) de Cellabs Pty. Limitado. (Brookvale, NSW, Australia) reclama la detección de anticuerpos contra las cuatro especies de plasmodio que causan malaria en seres humanos y una sensibilidad de 94% frente a la prueba de inmunofluorescencia (IFAT). La evaluación independiente sugiere que el ensayo tiene una sensibilidad escasa para la detección de anticuerpos de malaria falciparum y no falciparum en comparación con IFAT (Mertens et al. Vox Sang. 1999, 77:237-238). La evaluación independiente de otro ensayo de DiaMed AG (Suiza) que utiliza una mezcla de extractos de cultivo de *P. falciparum* y *P. vivax* recombinantes (proteína de circunsporozoito), demostró una escasa sensibilidad para la detección de individuos sintomáticos con confirmación microscópica de *P. vivax* (18/24), pero sí detectó anticuerpos en pacientes infectados con *P. ovale* (2/2), o *P. malariae* (2/2) (Doderer et al. Malaria J. 2007, 6:19). El ensayo de anticuerpos contra la malaria fabricado por Newmarket Laboratories Ltd (Kentford, Reino Unido) reclama la detección de las cuatro especies de plasmodio responsables de la malaria humana, aunque sólo contiene antígenos recombinantes derivados de *P. falciparum* y *P. vivax*. El folleto adjunto indica una sensibilidad para la detección de anticuerpos de *P. ovale* y *P. malariae* de sólo 80% y 67%, respectivamente. La detección de anticuerpos entre individuos infectados con *P. ovale* o *P. malariae* puede deberse a infecciones pasadas con *P. falciparum* o *P. vivax* y por lo tanto la reactividad se debe a la detección de anticuerpos persistentes contra estos agentes. La evaluación independiente del ensayo demostró la detección de sólo 9/14 (64%) de los pacientes con malaria aguda debido a Infección por *P. ovale* y 85% (15/18) de pacientes con malaria por *P. vivax* (Kitchen et al. Vox Sang. 2004, 87, 150-155). Por lo tanto, la capacidad reivindicada de estos ensayos para detectar anticuerpos humanos originados por infección de *P. falciparum* así como de *P. ovale*, *P. vivax* y *P. malariae* es ciertamente cuestionable. Para aquellos ensayos cuya composición de antígeno en fase sólida es conocida (p.ej. Newmarket, DiaMed), la ausencia de antígenos específicos contra *P. ovale* o *P. malariae* sugiere que la detección de anticuerpos a estas especies puede deberse a la reactividad cruzada del anticuerpo, lo que plantea importantes preguntas sobre la especificidad así como la sensibilidad del ensayo - a menos que la reactividad se deba a la presencia de anticuerpos de *P. vivax* o *P. falciparum* de infecciones previas. Por lo tanto, existe actualmente una necesidad significativa de detección fiable de anticuerpos de plasmodio en una población de bajo riesgo (por ejemplo, donantes de sangre normales) que requiere un ensayo con antígenos derivados de cada una de las cuatro especies principales de plasmodio.

En cuanto a otro antecedente, el documento WO 2007/006052 y la Patente de Estados Unidos Núm. 6.660.498 describen composiciones inmunogénicas que contienen una proteína que representa una porción carboxi-terminal de una proteína MSP-1 p42 nativa de *Plasmodium falciparum* para la vacunación contra la malaria.

Asimismo, WO 01/36587 describe el uso de una proteína recombinante MSP-1 de *Plasmodium vivax* para detectar infección malárica por *Plasmodium vivax*.

Compendio de la invención

El alcance de la presente invención está definido por las reivindicaciones adjuntas. Por consiguiente, la presente invención proporciona en primer lugar un método para detectar anticuerpos contra *P. Malariae*, *P. ovale*, *P. vivax* y *P. falciparum* en una muestra de ensayo sospechosa de contener al menos uno de dichos anticuerpos que comprende las etapas de:

(a) poner en contacto dicha muestra de ensayo con 1) un antígeno del polipéptido MSP1-p19 de *P. malariae* que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 47, 2) un antígeno del polipéptido MSP1-p19 de *P. ovale* que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 48, 3) un antígeno del polipéptido MSP1-p19 de *P. vivax* que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 45 y 4) un antígeno del polipéptido MSP1-p19 de *P. falciparum* que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 46, en donde los antígenos se anclan a una fase sólida, durante un tiempo y bajo 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 producto conjugado a los complejos de anticuerpo/antígeno resultantes durante un tiempo y bajo condiciones suficientes para permitir que cada producto conjugado se una al anticuerpo unido, en donde dicho producto conjugado comprende un anti-anticuerpo humano anclado a un compuesto generador de señal capaz de generar una señal detectable; y

(c) detectar la presencia del anticuerpo contra el anticuerpo de *P. Malariae*, *P. ovale*, *P. vivax* y *P. falciparum* que puede estar presente en dicha muestra de ensayo detectando la presencia de dicha señal generada por dicho compuesto generador de señal.

La presente invención también proporciona un kit para determinar la presencia de anticuerpo contra *P. malariae*, *P. ovale*, *P. vivax* y *P. falciparum* en una muestra de ensayo que comprende:

a) i) un antígeno del polipéptido MSP1-p19 de *P. malariae* que consiste en la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 47, ii) un antígeno del polipéptido MSP1-p19 de *P. ovale* que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 48, iii) un antígeno del polipéptido MSP1-p19 de *P. vivax* que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 45, y iv) un antígeno del polipéptido MSP1-p19 de *P. falciparum* que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 46; y

b) un producto conjugado que comprende un anti-anticuerpo humano unido a un compuesto generador de señal capaz de generar una señal detectable.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 ilustra la secuencia de nucleótidos de *P. malariae* (SEQ ID NO: 2) de un gen o molécula de ácido nucleico derivada de MSP1.

La Figura 2 ilustra la secuencia de aminoácidos de *P. malariae* (SEQ ID NO: 1) de la proteína codificada por el SEQ ID NO: 2.

La Figura 3 ilustra la secuencia de nucleótidos de *P. ovale* (SEQ ID NO: 4) de un gen o molécula de ácido nucleico derivada de MSP1.

La Figura 4 ilustra la secuencia de aminoácidos de *P. ovale* (SEQ ID NO: 3) de la proteína codificada por el SEQ ID NO: 4.

La Figura 5 ilustra un alineamiento de la secuencia del gen PmMSP1 (SEQ ID NO: 2) con su secuencia de aminoácidos traducida (SEQ ID NO: 1).

La Figura 6 ilustra un alineamiento de la secuencia de aminoácidos de PmMSP1 (*P. malariae* (porción superior) (SEQ ID NO: 1) frente a *P. vivax* (porción inferior) (SEQ ID NO: 5)).

La Figura 7 ilustra el alineamiento de la secuencia de ADN de *P. malariae* (Muestra de Camerún 0014) (SEQ ID NO: 2) frente a *P. malariae* (Secuencia GenBank AF138881 secuencia de ADN 5' de MSP1) (SEQ ID NO: 6).

La Figura 8 ilustra un alineamiento de la secuencia génica de MSP1 de *P. ovale* (SEQ ID NO: 4) con su secuencia de aminoácidos traducida (SEQ ID NO: 3).

La Figura 9 ilustra un alineamiento de la secuencia de aminoácidos de MSP1 de *P. Ovale* (porción superior) (SEQ ID NO: 3) frente a *P. vivax* (porción inferior) (SEQ ID NO: 5).

La Figura 10 ilustra una comparación de secuencias de aminoácidos de MSP1 (% de identidad) entre *P. falciparum* (Núm. Genbank BAF62278), *P. vivax* (Núm. Genbank AAA63427), *P. malariae* (Muestra Camerún 0014) y *P. ovale* (Muestra Camerún 510-10).

La Figura 11 ilustra la ubicación de las subregiones MSP1 y MSP1 para *P. malariae* y *P. ovale*.

La Figura 12 muestra las relaciones evolutivas de 16 secuencias de proteínas MSP1 inferidas utilizando el método de Unión de Vecinos (Saitou N & Nei M (1987) Molecular Biology and Evolution 4:406 - 425). El árbol de consenso de remuestreo de datos ("bootstrap") inferido a partir de 500 repeticiones (Felsenstein, J. (1985) Evolution 39: 783 - 791) se toma para representar la historia evolutiva de los taxones analizados (Felsenstein, más arriba). Las ramas correspondientes a particiones reproducidas en menos de 50% de las réplicas de remuestreo de datos se desploman. El porcentaje de réplicas de árboles en el que los taxones asociados se agrupan en la prueba de remuestreo de datos (500 repeticiones) se muestra junto a las ramas (Felsenstein, más arriba). El árbol se dibuja a escala, con longitudes de rama en las mismas unidades que las de las distancias evolutivas utilizadas para inferir el árbol filogenético. Las distancias evolutivas se calcularon utilizando el método basado en la matriz de Dayhoff (Schwarz R. & Dayhoff M. (1979) Matrices for detecting distant relationships. En Dayhoff M, editor, Atlas of protein sequences, páginas 353 - 58. National Biomedical Research Foundation) y están en las unidades del número de sustituciones de aminoácidos por sitio. Todas las posiciones que contenían huecos y datos perdidos fueron eliminadas del conjunto de datos (Opción de eliminación completa). Hubo un total de 1354 posiciones en el conjunto de datos final. Se realizaron análisis filogenéticos en MEGA4 (Tamura et al., (2007) Molecular Biology and Evolution 24:1596-1599).

La Figura 13 muestra las relaciones evolutivas de 16 secuencias de la proteína MSP1 inferidas utilizando el método de Máxima Parsimonia (Eck RV & Dayhoff MO (1966) Atlas of Protein Sequence and Structure. National Biomedical Research Foundation, Silver Spring, Maryland). El árbol de consenso de remuestreo de datos inferido a partir de 500 repeticiones se toma para representar la historia evolutiva de los taxones analizados (Felsenstein J (1985) Evolution 39:783-791). Las ramas correspondientes a particiones reproducidas en menos del 50% de réplicas de remuestreo de datos se desploman. El porcentaje de árboles replicados en el que los taxones asociados se agrupan en la prueba de remuestreo de datos (500 repeticiones) se muestran junto a las ramas (Felsenstein, más arriba). El árbol MP se obtuvo utilizando el algoritmo de Intercambio por un Vecino Cercano (Nei M & Kumar S (2000) Molecular Evolution and Phylogenetics. Oxford University Press, Nueva York, pág. 128) con el nivel de búsqueda 3 (Felsenstein, más arriba; Nei M & Kumar S (2000) Molecular Evolution and Phylogenetics. Oxford University Press, New York) en el que los árboles iniciales se obtuvieron con la adición aleatoria de secuencias (10 repeticiones). Todas las posiciones que contenían huecos y datos perdidos fueron eliminadas del conjunto de datos (Opción de

Eliminación Completa). Hubo un total de 1354 posiciones en el conjunto de datos final, de las cuales 1001 informaron de parsimonia. Se realizaron análisis filogenéticos en MEGA4 (Tamura et al. (2007) Molecular Biology and Evolution 24:1596-1599).

La Figura 14 muestra las relaciones evolutivas de 16 secuencias de proteínas MSP1 inferidas utilizando el método UPGMA (Sneath PHA & Sokal RR (1973) Numerical Taxonomy. Freeman, San Francisco). El árbol de consenso de remuestreo de datos deducido a partir de 500 repeticiones (Felsenstein, más arriba se toma para representar la historia evolutiva de los taxones analizados (Felsenstein, más arriba). Las ramas correspondientes a particiones reproducidas en menos de 50% de réplicas de remuestreo de datos se desploman. El porcentaje de árboles replicados en el que los taxones asociados se agrupan en la prueba de remuestreo de datos (500 repeticiones) se muestran junto a las ramas (Felsenstein, más arriba). El árbol se dibuja a escala, con longitudes de rama en las mismas unidades que las de las distancias evolutivas utilizadas para inferir el árbol filogenético. Las distancias evolutivas se calcularon utilizando el método basado en la matriz de Dayhoff (Schwarz R & Dayhoff M (1979) Matrices for detecting distant relationships. In Dayhoff M, editor, Atlas of protein sequences, páginas 353 - 58. National Biomedical Research Foundation) y están en las unidades del número de sustituciones de aminoácidos por sitio. Todas las posiciones que contenían huecos y datos perdidos fueron eliminadas del conjunto de datos (Opción de eliminación completa). Hubo un total de 1354 posiciones en el conjunto de datos final. Se realizaron análisis filogenéticos en MEGA4 (Tamura et al. (2007) Molecular Biology and Evolution 24:1596-1599).

La Figura 15 ilustra un formato de ensayo Abbott® PRISM® (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL) prototipo.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a métodos y kits como los definidos anteriormente y en las reivindicaciones adjuntas.

Definición de términos

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

El término "complementariedad" se define como el grado de relación entre dos segmentos de ADN. Se determina midiendo la capacidad de la hebra de efectora de un segmento de ADN para hibridarse con la hebra antisentido del otro segmento de ADN, en condiciones apropiadas, para formar una doble hélice. En la doble hélice, dondequiera que aparezca adenina en una hebra, aparece timina en la otra hebra. De manera similar, dondequiera que se encuentre guanina en una hebra, se encuentra citosina en la otra. Cuanto mayor es la relación entre las secuencias de nucleótidos de dos segmentos de ADN, mayor es la capacidad para formar dúplex híbridos entre las cadenas de dos segmentos de ADN.

El término "identidad" se refiere a la relación de dos secuencias en una base nucleótido a nucleótido sobre una ventana o segmento de comparación concreto. Por lo tanto, identidad se define como el grado de similitud, correspondencia o equivalencia entre las mismas cadenas (ya sea efectora o antisentido) de dos segmentos de ADN (o dos secuencias de aminoácidos). El "porcentaje de identidad de secuencia" se calcula comparando dos secuencias alineadas óptimamente sobre una región concreta, determinando el número de posiciones en las que aparece la misma base o aminoácido en ambas secuencias con el fin de producir el número de posiciones emparejadas, dividiendo el número de tales posiciones por el número total de posiciones en el segmento que se compara y multiplicando el resultado por 100. El alineamiento óptimo de las secuencias puede llevarse a cabo mediante el algoritmo de Smith & Waterman, Appl. Math. 2:482 (1981), mediante el algoritmo de Needleman y Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443 (1970), mediante el método de Pearson y Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 85:2444 (1988) y mediante programas informáticos que implementan los algoritmos pertinentes (p.ej., Clustal Macaw Pileup (<http://cmgm.stanford.edu/biochem218/11Multiple.pdf>); Higgins et al., CABIOS, 5L151-153 (1989)), FASTDB (Intelligenetics), BLAST (National Center for Biomedical Information; Altschul et al., Nucleic Acids Research 25:3389-3402 (1997)), PILEUP (Genetics Computer Group, Madison, WI) o GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA (Wisconsin Genetics Software Package Versión 7.0, Genetics Computer Group, Madison, WI). (Véase la Patente de Estados Unidos Núm. 5.912.120)

"Identidad entre dos secuencias de aminoácidos" se define como la presencia de una serie de residuos de aminoácidos exactamente iguales o invariantes en ambas secuencias (véase la definición anterior de identidad entre secuencias de ácidos nucleicos). Las definiciones de "complementariedad" e "identidad" son bien conocidas por los expertos en la técnica.

"Codificado por" se refiere a una secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia polipeptídica, en donde la secuencia polipeptídica o una porción de la misma contiene una secuencia de aminoácidos de al menos 3 aminoácidos, más preferiblemente al menos 8 aminoácidos, e incluso más preferiblemente al menos 15 aminoácidos

de un polipéptido codificado por la secuencia de ácido nucleico. Una molécula de ácido nucleico es "hibridable" con otra molécula de ácido nucleico cuando una forma monocatenaria de la molécula de ácido nucleico puede hibridarse con la otra molécula de ácido nucleico bajo las condiciones apropiadas de temperatura y fuerza iónica (véase Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Segunda Edición (1989), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York)). Las condiciones de temperatura y fuerza iónica determinan la "rigurosidad" de la hibridación. La "hibridación" requiere que dos ácidos nucleicos contengan secuencias complementarias. Sin embargo, dependiendo de la rigurosidad de la hibridación, pueden producirse emparejamientos erróneos entre las bases. La rigurosidad apropiada para la hibridación de ácidos nucleicos depende de la longitud de los ácidos nucleicos y del grado de complementación. Tales variables son bien conocidas en la técnica. Más específicamente, cuanto mayor sea el grado de similitud, identidad o homología entre dos secuencias de nucleótidos, mayor será el valor de Tm para los híbridos de ácidos nucleicos que tengan esas secuencias. Para híbridos de más de 100 nucleótidos de longitud, se han obtenido ecuaciones para calcular Tm (véase Sambrook et al., más arriba (1989)). Para la hibridación con ácidos nucleicos más cortos, la posición de los emparejamientos erróneos se hace más importante, y la longitud del oligonucleótido determina su especificidad (véase Sambrook et al., más arriba (1989)).

Según se utiliza en la presente memoria, un "fragmento o secuencia de ácido nucleico aislado" es un polímero de ARN o ADN que es monocatenario o bicatenario, que contiene opcionalmente bases nucleotídicas sintéticas, no naturales o alteradas. Un fragmento de ácido nucleico aislado en forma de un polímero de ADN puede estar compuesto de uno o más segmentos de ADNc, ADN genómico o ADN sintético. (Un "fragmento" de un polinucleótido especificado se refiere a una secuencia polinucleotídica que comprende una secuencia contigua de aproximadamente al menos alrededor de 6 nucleótidos, preferiblemente al menos alrededor de 8 nucleótidos, más preferiblemente al menos alrededor de 10 nucleótidos e incluso más preferiblemente al menos alrededor de 15 nucleótidos y lo más preferiblemente al menos alrededor de 25 nucleótidos idénticos o complementarios a una región de la secuencia de nucleótidos especificada). Los nucleótidos (usualmente encontrados en su forma de 5'-monofosfato) son referidos mediante denominación de una letra como sigue: "A" para el adenilato o desoxiadenilato (para ARN o ADN, respectivamente), "C" para el citidilato o desoxicitidilato, "G" para el guanilato o desoxiguanilato, "U" para el uridilato, "T" para el desoxitimidilato, "R" para las purinas (A o G), "Y" para las pirimidinas (C o T), "K" para G o T, "H" para A o C o T, "I" para inosina, y "N" para cualquier nucleótido.

Los términos "fragmento o subfragmento que es funcionalmente equivalente" y "fragmento o subfragmento funcionalmente equivalente" se utilizan indistintamente en la presente memoria. Estos términos se refieren a una porción o subsecuencia de un fragmento de ácido nucleico aislado en el que se conserva la capacidad de alterar la expresión génica o producir cierto fenotipo independientemente de que el fragmento o subfragmento codifique una enzima activa. Por ejemplo, el fragmento o subfragmento puede usarse en el diseño de constructos quiméricos para producir el fenotipo deseado en una planta transformada. Los constructos quiméricos pueden diseñarse para su uso en la co-supresión o antisentido conectando uno de sus fragmentos o subfragmentos de ácido nucleico, codifique o no una proteína activa, en la orientación apropiada con respecto a una secuencia promotora.

Los términos "homología", "homólogo", "sustancialmente similar" y "que corresponde sustancialmente" se utilizan indistintamente en la presente memoria. Se refieren a fragmentos de ácido nucleico en los que los cambios en una o más bases nucleotídicas no afectan a la capacidad del fragmento de ácido nucleico para mediar la expresión génica o producir cierto fenotipo. Estos términos se refieren también a modificaciones de los fragmentos de ácido nucleico de la presente invención tales como la delección o inserción de uno o más nucleótidos que no alteran sustancialmente las propiedades funcionales del fragmento de ácido nucleico resultante con respecto al fragmento inicial no modificado.

"Gen" se refiere a un fragmento de ácido nucleico que expresa una proteína específica, incluyendo las secuencias reguladoras anteriores (secuencias no codificantes 5') y posteriores a la secuencia codificante (secuencias no codificantes 3').

"Gen nativo" se refiere a un gen tal como se encuentra en la naturaleza con sus propias secuencias reguladoras. En contraste, "constructo quimérico" se refiere a una combinación de fragmentos de ácido nucleico que normalmente no se encuentran juntos en la naturaleza. Por consiguiente, un constructo quimérico puede comprender secuencias reguladoras y secuencias codificantes obtenidas de diferentes fuentes, o secuencias reguladoras y secuencias codificantes obtenidas de la misma fuente, pero dispuestas de una manera diferente a la que normalmente se encuentra en la naturaleza. (El término "aislado" significa que la secuencia se elimina de su entorno natural.)

Un gen "foráneo" se refiere a un gen que no se encuentra normalmente en el organismo anfitrión, pero que se introduce en el organismo anfitrión por transferencia génica. Los genes foráneos pueden comprender genes nativos insertados en un organismo no nativo o constructos quiméricos. Un "transgén" es un gen que se ha introducido en el genoma mediante un procedimiento de transformación.

Una "sonda" o "cebador" según se utiliza en la presente memoria 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 polinucleotídicas 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 sea complementaria a la secuencia o secuencias usadas para cebar para una secuencia diana durante la reacción en cadena de la polimerasa.

"Secuencia de codificante" se refiere a una secuencia de ADN que codifica una secuencia de aminoácidos específica. "Secuencias reguladoras" se refiere a secuencias nucleotídicas situadas aguas arriba (secuencias no codificantes 5'), dentro, o aguas abajo (secuencias no codificantes 3') de una secuencia codificante, que influyen en la transcripción, procesamiento o estabilidad del ARN, o traducción de la secuencia codificante asociada. Las secuencias reguladoras pueden incluir, pero no se limitan a, promotores, secuencias líder de traducción, intrones y secuencias de reconocimiento de poliadenilación.

"Promotor" (o "secuencia reguladora") se refiere a una secuencia de ADN capaz de controlar la expresión de una secuencia codificante o ARN funcional. La secuencia promotora, por ejemplo, consiste en elementos proximales y más distales aguas arriba, los últimos elementos a menudo referidos como intensificadores. Por consiguiente, un "intensificador" es una secuencia de ADN que puede estimular la actividad del promotor y puede ser un elemento innato del promotor o un elemento heterólogo insertado para mejorar el nivel o la especificidad del tejido de un promotor. Las secuencias reguladoras (p.ej., un promotor) también pueden estar localizadas dentro de las porciones transcritas de los genes, y/o aguas abajo de las secuencias transcritas. Los promotores pueden derivarse en su totalidad de un gen nativo, o estar compuestos de diferentes elementos derivados de diferentes promotores encontrados en la naturaleza, o incluso comprender segmentos de ADN sintéticos. Los expertos en la técnica entenderán que diferentes promotores pueden dirigir la expresión de un gen en diferentes tejidos o tipos de células, o en diferentes etapas del desarrollo, o en respuesta a diferentes condiciones ambientales. Los promotores que hacen que un gen se exprese en la mayoría de los tipos de células anfitrionas, en la mayoría de los casos, se denominan comúnmente "promotores constitutivos". Se están descubriendo constantemente nuevos promotores de diversos tipos útiles en células vegetales; se pueden encontrar numerosos ejemplos en la compilación Okamoto y Goldberg, (1989) *Biochemistry of Plants* 15:1-82. Se reconoce adicionalmente que puesto que, en la mayoría de los casos, los límites exactos de las secuencias reguladoras no han sido completamente definidos, los fragmentos de ADN de cierta variación pueden tener actividad promotora idéntica.

Un intrón es una secuencia intermedia en un gen que no codifica una porción de la secuencia proteica. Por lo tanto, tales secuencias se transcriben a ARN, pero a continuación se escinden y no se traducen. El término también se utiliza 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 es necesariamente una parte de la secuencia que codifica el producto génico final.

La "secuencia líder de traducción" se refiere a una secuencia de ADN situada entre la secuencia promotora de un gen y la secuencia codificante. La secuencia líder de traducción está presente en el ARNm completamente procesado aguas arriba de la secuencia de inicio de la traducción. La secuencia líder de traducción puede afectar al procesamiento de la transcripción primaria a ARNm, a la estabilidad del ARNm o a la eficacia de traducción. Se han descrito ejemplos de secuencias líder de traducción (Turner, R. y Foster, G.D. (1995) *Molecular Biotechnology* 3:225).

Las secuencias no codificantes 3' se refieren a secuencias de ADN situadas aguas abajo de una secuencia codificante e incluyen secuencias de reconocimiento de poliadenilación y otras secuencias que codifican señales reguladoras capaces de afectar el procesamiento de ARNm o a la expresión génica. La señal de poliadenilación se caracteriza generalmente por afectar a la adición de tramos de ácido poliadenílico al extremo 3' del precursor de ARNm. El uso de diferentes secuencias no codificantes 3' es ilustrado por Ingelbrecht et al., (1989) *Plant Cell* 1:671-680.

"Transcrito de ARN" se refiere al producto resultante de la transcripción catalizada por 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 post-transcripcional del transcrito primario y se denomina ARN maduro. El "ARN mensajero (ARNm)" se refiere al ARN que está sin intrones y que puede traducirse a proteína por la célula. El "ADNc" se refiere a un ADN que es complementario y sintetizado a partir de un molde de ARNm utilizando la enzima transcriptasa inversa. El ADNc puede ser monocatenario o convertirse en la forma de doble hebra utilizando el fragmento de Klenow de la ADN polimerasa I. El ARN de "efector" se refiere a un transcrito de ARN que incluye el ARNm y puede traducirse a proteína dentro de una célula o *in vitro*. El "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 Estados Unidos Núm. 5.107.065). La complementariedad de un ARN antisentido puede ser con cualquier parte del transcrito génico específico, es decir, en la secuencia no codificante 5', la secuencia no codificante 3', en los intrones o en la secuencia codificante. "ARN funcional" se refiere a ARN antisentido, ARN de ribozima, u otro ARN que puede no ser traducido pero que todavía tiene un efecto sobre los procesos celulares. Los términos "complemento" y "complemento inverso" se utilizan

indistintamente en la presente memoria con respecto a los transcritos de ARNm, y están destinados a definir el ARN antisentido del mensaje.

5 El término "ARN endógeno" se refiere a cualquier ARN que esté codificado por cualquier secuencia de ácido nucleico presente en el genoma del anfitrión antes de la transformación con el constructo recombinante, ya sea de origen natural o no natural, es decir, introducido por medios recombinantes, mutagénesis, etc.

El término "no natural" significa artificial, no compatible con lo que normalmente se encuentra en la naturaleza.

10 El término "conectado operativamente" se refiere a la asociación de secuencias de ácido nucleico en un único fragmento de ácido nucleico de manera que la función de uno está regulada por el otro. Por ejemplo, un promotor está conectado operativamente a una secuencia codificante cuando es capaz de regular la expresión de dicha secuencia codificante (es decir, que la secuencia codificante está bajo el control transcripcional del promotor). Las secuencias codificantes pueden estar conectadas operablemente a secuencias reguladoras en una orientación efectora o antisentido. En otro ejemplo, las regiones de ARN complementarias pueden estar conectadas operablemente, directa o indirectamente, 5' con respecto al ARNm diana, o 3' con respecto al ARNm diana, o dentro del ARNm diana, o una primera región complementaria es 5' y su complemento es 3' con respecto al ARNm diana.

20 El término "expresión", tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a la producción de un producto final funcional. La expresión de un gen implica la transcripción del gen y la traducción del ARNm hasta un precursor o proteína madura. La "inhibición antisentido" se refiere a la producción de transcritos de ARN antisentido capaces de suprimir la expresión de la proteína diana. La "co-supresión" se refiere a la producción de transcritos de ARN efectores de suprimir la expresión de genes foráneos o endógenos idénticos o sustancialmente similares (Patente de Estados Unidos Núm. 5.231.020).

25 La proteína "madura" se refiere a un polipéptido procesado después de la traducción; es decir, uno de los cuales se ha eliminado cualquier pre- o pro-péptido presentes en el producto de traducción primario. La proteína "precursora" se refiere al producto primario de traducción de ARNm; es decir, con pre - y pro - péptidos todavía presentes. Los pre - y pro - péptidos pueden ser, pero no están limitados a, señales de localización intracelular.

30 "Transformación estable" se refiere a la transferencia de un fragmento de ácido nucleico a un genoma de un organismo anfitrión, dando como resultado una herencia genéticamente estable. Por el contrario, "transformación transitoria" se refiere a la transferencia de un fragmento de ácido nucleico al núcleo, u organelo que contiene ADN, de un organismo anfitrión que da como resultado la expresión génica sin integración o herencia estable. Los organismos anfitriones que contienen los fragmentos de ácido nucleico transformados se denominan organismos "transgénicos". El término "transformación", según se utiliza en la presente memoria, se refiere tanto a la transformación estable como a la transformación transitoria.

40 Las técnicas de ADN recombinante y de clonación molecular convencionales utilizadas en la presente memoria son bien conocidas en la técnica y son descritas más completamente por Sambrook, J., Fritsch, E.F. y Maniatis, T. en Molecular Cloning: A Laboratory Manual; Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, 1989 (en adelante "Sambrook").

45 El término "recombinante" se refiere a una combinación artificial de dos segmentos de secuencia por lo demás separados, p.ej., mediante síntesis química o mediante manipulación de segmentos aislados de ácidos nucleicos por técnicas de ingeniería genética.

50 La "PCR" o "Reacción en Cadena de la Polimerasa" es una técnica para la síntesis de grandes cantidades de segmentos de ADN específicos, consiste en una serie de ciclos repetitivos (Perkin Elmer Cetus Instruments, Norwalk, CT). Típicamente, el ADN de doble hebra se desnaturaliza por calor, los dos cebadores complementarios a los límites 3' del segmento diana se reasocian a baja temperatura y a continuación se extienden a una temperatura intermedia. Un conjunto de estas tres etapas consecutivas se denomina ciclo.

55 La reacción en cadena de la polimerasa ("PCR") es una potente técnica utilizada para amplificar ADN millones de veces, mediante replicación repetida de un molde, en un corto período de tiempo. (Mullis et al., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 51:263-273 (1986); Erlich et al., Solicitud de Patente Europea Núm. 50.424; Solicitud de Patente Europea Núm. 84.796; Solicitud de Patente Europea Núm. 258.017, Solicitud de Patente Europea Núm. 237.362; Solicitud de Patente Europea Núm. 201.184, Patente de Estados Unidos Núm. 4.683.202; Patente de Estados Unidos Núm. 4.582.788; y Patente de Estados Unidos Núm. 4.683.194). El procedimiento utiliza conjuntos de oligonucleótidos sintetizados *in vitro* específicos para iniciar la síntesis de ADN.

60 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 alta temperatura, permitiendo que los cebadores se hibriden con secuencias complementarias dentro del molde y a continuación replicando el molde con ADN polimerasa.

Los productos de las reacciones de PCR se analizan por separación en geles de agarosa seguido de tinción con bromuro de etidio y visualización con transiluminación UV. Alternativamente, se pueden añadir dNTP radiactivos a la PCR para incorporar la marca a los productos. En este caso, los productos de PCR se visualizan por exposición del gel a una película de rayos X. La ventaja añadida del radiomarcaje de los productos de PCR es que pueden

cuantificarse los niveles de productos de amplificación individuales.

Los términos "constructo recombinante", "constructo de expresión" y "constructo de expresión recombinante" se utilizan indistintamente en la presente memoria. Estos términos se refieren a una unidad funcional de material genético que se puede insertar en el genoma de una célula utilizando una metodología convencional bien conocida por un experto en la técnica. Tal constructo puede ser él mismo o puede usarse conjuntamente con un vector. Si se utiliza un vector, la elección del vector depende del método que se utilizará para transformar plantas anfitrionas, 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, seleccionar y propagar con éxito células anfitrionas que comprenden cualquiera de los fragmentos de ácido nucleico aislados. El experto en la técnica también reconocerá que diferentes eventos de transformación independientes darán lugar a diferentes niveles y patrones de expresión (Jones et al., (1985) EMBO J. 4:2411-2418; De Almeida et al., (1989) Mol. Gen. Genetics 218:78-86), y por lo tanto que los eventos múltiples deben ser escrutados con el fin de obtener líneas que muestren el nivel y patrón de expresión deseado. Dicho escrutinio puede realizarse mediante análisis Southern de ADN, análisis Northern de expresión de ARNm, análisis Western de expresión proteica, o análisis fenotípico.

Producción de las proteínas

Una vez que el gen que codifica la proteína de interés ha sido aislado, puede ser introducido en una célula anfitriona procariótica o eucariótica, mediante el uso de un vector o constructo, para que la célula anfitriona 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 (p.ej., promotor) que sea funcional en la célula anfitriona y sea capaz de inducir la expresión de la proteína codificada por la secuencia de ácido nucleico. La secuencia reguladora (p.ej., promotor) está en asociación operable con la secuencia de nucleótidos, o está conectada operablemente a ella. Se dice que una secuencia reguladora (p.ej., promotor) está "conectada operablemente" a una secuencia codificante si la secuencia reguladora afecta a la transcripción o a la expresión de la secuencia codificante). Los promotores adecuados incluyen, por ejemplo, los de genes que codifican alcohol deshidrogenasa, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, fosfoglucoisomerasa, fosfoglicerato quinasa, fosfatasa ácida, T7, TPI, lactasa, metalotioneína, temprano inmediato de citomegalovirus, proteína ácida de suero de leche, glucoamilasa, promotores activados en presencia de galactosa, por ejemplo GAL1 y GAL10, así como cualquier otro promotor implicado en sistemas de expresión procarióticos y eucarióticos. 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 (p.ej., la señal poli-A del antígeno SV-40T, albúmina de huevo u hormona de crecimiento bovina). La elección de las secuencias presentes en el constructo depende de los productos de expresión deseados, así como de la naturaleza de la célula anfitriona.

Como se ha indicado anteriormente, una vez que se ha construido el vector, éste puede introducirse en la célula anfitriona de elección por métodos conocidos por los expertos en la técnica incluyendo, por ejemplo, transfección, transformación y electroporación (véase Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª edición, Vol. 1-3, ed. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989))). La célula anfitriona se cultiva después en condiciones adecuadas que permiten la expresión de la proteína deseada que a continuación se recupera y purifica.

Los ejemplos de células anfitrionas procarióticas adecuadas incluyen, por ejemplo, bacterias tales como *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, Actinomycetes tales como *Streptomyces coelicolor*, *Streptomyces lividans*, así como cianobacterias tales como *Spirulina spp.* (es decir, algas verde-azuladas). Los ejemplos de células anfitrionas eucarióticas adecuadas 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 *Hansenula spp.*, o células fúngicas tales como células fúngicas filamentosas, por ejemplo, *Aspergillus*, *Neurospora* y *Penicillium*. Preferiblemente, se utilizan células de *Saccharomyces cerevisiae* (levadura panadera).

La expresión en una célula anfitriona puede lograrse de una manera transitoria o estable. La expresión transitoria puede ocurrir a partir de constructos introducidos que contienen señales de expresión funcionales en la célula anfitriona, pero cuyos constructos no se replican y rara vez se integran en la célula anfitriona, o cuando la célula anfitriona no es proliferante. La expresión transitoria también puede lograrse induciendo la actividad de un promotor regulable conectado 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 un constructo que puede integrarse en el genoma del anfitrión o que se replica de forma autónoma en la célula anfitriona. La expresión estable del gen de interés puede seleccionarse mediante el uso de un marcador seleccionable situado

sobre o transfectado con el constructo de expresión, seguido por la selección de las células que expresan el marcador. Cuando la expresión estable resulta de la integración, el sitio de la integración del constructo puede ocurrir aleatoriamente dentro del genoma del anfitrión o puede ser dirigido a través del uso de constructos que contienen regiones de homología con el genoma anfitrión suficientes para dirigir la recombinación con el locus anfitrión. Cuando los constructos están dirigidos 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 no humano para expresar la proteína de interés codificada por una o ambas de las secuencias de ácido nucleico descritas anteriormente. Más específicamente, una vez que se ha creado el constructo anteriormente descrito, éste puede insertarse en el pronúcleo de un embrión no humano. El embrión no humano puede ser implantado a continuación en una hembra receptora. Alternativamente, también se podría utilizar un método de transferencia nuclear (Schnieke et al., Science (1997) 278:2130-2133). Se permite después que se produzcan la gestación y el nacimiento (véase, p.ej., la Patente de Estados Unidos Núm. 5.750.176 y la Patente de Estados Unidos Núm. 5.700.671) y la leche, tejidos u otras muestras de fluidos de la descendencia deben contener la proteína de interés. El mamífero utilizado como anfitrión 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, se puede usar cualquier mamífero siempre que tenga la capacidad de incorporar ADN que codifique la proteína de interés a su genoma.

En vista de lo anterior, la presente descripción también abarca un método para producir una o más de las proteínas descritas anteriormente que comprende las etapas de: 1) aislar la secuencia o secuencias de ácido nucleico deseadas del gen que codifica la proteína o proteínas, (es decir, SEQ ID NO: 2 y/o SEQ ID NO: 4); 2) construir un vector que comprende dicha secuencia o secuencias de ácido nucleico; y 3) introducir dicho vector en una célula anfitriona durante un tiempo y condiciones suficientes para la producción de la proteína o proteínas.

Usos de los genes y de las proteínas codificadas por los mismos

Como se ha indicado anteriormente, las secuencias (o genes) de ácido nucleico aisladas y las proteínas (o polipéptidos purificados) correspondientes codificados por las mismas tienen muchos usos beneficiosos. Las dificultades de los ensayos existentes para la detección de anticuerpos frente a las cuatro especies de Plasmodium se han descrito con detalle en lo que antecede. Por lo tanto, hubo una necesidad significativa de descubrir antígenos en relación con las cuatro especies que podrían ser utilizados en inmunoensayos que podrían detectar con precisión la presencia de tales anticuerpos en suero o plasma positivos, eliminando así el problema de las pruebas de falsos negativos. La presente invención proporciona tales inmunoensayos necesarios y, en particular, utilizando combinaciones de antígenos que detectan con precisión la presencia de anticuerpos para las cuatro especies de Plasmodium en sueros humanos.

Los usos mencionados anteriormente se describen, en detalle, como sigue:

Inmunoensayos

Existen dos tipos básicos de ensayos, competitivos y no competitivos (p.ej., inmunométricos y sándwich, respectivamente). En ambos ensayos, los reactivos de anticuerpos o antígenos están anclados de forma covalente o no covalente a la fase sólida. (Véase The Immunoassay Handbook, 2ª Edición, editado por David Wild, Nature Publishing Group, Londres 2001). Los agentes conectores para el anclaje covalente son conocidos y pueden formar parte de la fase sólida o derivatizarse con ella antes del recubrimiento. Algunos ejemplos de las fases sólidas utilizadas en los 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 la fase sólida y el método 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 ninguna marca. Por ejemplo, si el antígeno está en una partícula detectable tal como un glóbulo rojo, puede establecerse reactividad basándose en la aglutinación. Alternativamente, una reacción antígeno-anticuerpo puede dar como resultado un cambio visible (p.ej., inmunodifusión radial). En la mayoría de los casos, uno de los reactivos de anticuerpo o antígeno utilizados en un inmunoensayo está anclado a un compuesto generador de señal o "marca". Este compuesto generador de señal o "marca" 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 Núm. 6.395.472 B1). Algunos ejemplos de tales compuestos generadores de señales incluyen cromógenos, radioisótopos (p.ej., 125I, 131I, 32P, 3H, 35S y 14C), compuestos fluorescentes (p.ej., fluoresceína, rodamina), compuestos quimioluminiscentes, partículas (visibles o fluorescentes), ácidos nucleicos, agentes complejantes o catalizadores tales como enzimas (p.ej., fosfatasa alcalina, fosfatasa ácida, peroxidasa de rábano picante, beta-galactosidasa y ribonucleasa). En el caso del uso enzimático, la adición de sustrato cromo-, fluoro- o lumogénico da como resultado la generación de una señal detectable. También son útiles otros sistemas de detección tales como fluorescencia resuelta en el tiempo, fluorescencia de reflexión interna, amplificación (p.ej., reacción en cadena de la polimerasa) y espectroscopia Raman.

Existen dos formatos generales comúnmente utilizados para verificar el título y el tipo de anticuerpo específico en seres humanos: (1) el antígeno se presenta en una fase sólida, como se ha descrito anteriormente, se permite que el fluido biológico humano que contiene los anticuerpos específicos reacciona con el antígeno y a continuación se detecta el anticuerpo unido al antígeno con un anti-anticuerpo humano acoplado a un compuesto generador de señal y (2) un anti-anticuerpo humano se une a la fase sólida, se permite que el anticuerpo unido que contiene anticuerpos específicos de un fluido biológico humano reaccione con el anticuerpo unido, y a continuación se añade el antígeno anclado a un compuesto generador de señal para detectar el anticuerpo específico presente en la muestra de fluido. En ambos formatos, el reactivo de anti-anticuerpo humano puede reconocer todas las clases de anticuerpos, o alternativamente, ser específico para una clase o subclase concretas de anticuerpo, dependiendo del propósito del ensayo. El formato de ensayo de la presente invención está abarcado por el formato general (1) anterior.

Por supuesto, cualquiera de los formatos ilustrativos de la presente invención y cualquier ensayo o kit de acuerdo con la invención pueden adaptarse o optimizarse para su uso en sistemas automatizados y semi-automatizados (incluyendo aquellos en los que existe una fase sólida que comprende una micropartícula), como los descritos, p.ej. en las Patentes de Estados Unidos Núm. 5.089.424 y 5.006.309, y, p.ej., comercializados por Abbott Laboratories (Abbott Park, IL) incluyendo, pero sin limitarse a las plataformas ARCHITECT®, AxSYM, IMX, PRISM y Quantum II de Abbott, así como otras plataformas.

Además, los ensayos y kits de la presente invención opcionalmente pueden adaptarse o optimizarse para los sistemas de ensayo de los lugares de atención, incluyendo el sistema de inmunoensayo electroquímico Abbott's Point of Care (i-STAT™). Se describen inmunoensayos y métodos para fabricarlos y hacerlos funcionar en dispositivos de ensayo de un solo uso, por ejemplo en la Patente de Estados Unidos Núm. 5.063.081 y en las Solicitudes de Patente de los Estados Unidos publicadas Núm. 20030170881, 20040018577, 20050054078, y 20060160164.

En los siguientes ejemplos, el método de la presente invención se ilustra mediante los cuatro ensayos de anticuerpos de Plasmodium en los Ejemplos 8, 12 y 14. Otros ensayos en los ejemplos no son métodos de la invención.

Ejemplos

Ejemplo 1

Identificación de muestras clínicas infectadas con *P. malariae* y *P. ovale*

El ADN se extrajo de 82 muestras de sangre completa (200 µl cada una) obtenidas de una región endémica de malaria (Camerún) utilizando el QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Valencia, California) de acuerdo con el folleto adjunto. Con posterioridad, se utilizó el método de Mangold et. al. (J. Clin. Micro., 43, pág. 2435-2440, 2005, descrito más adelante) para detectar la presencia de ADN de Plasmodium, y cuando se detectó, para realizar una determinación de especie.

La PCR se realizó en cada una de las muestras de Camerún extraídas utilizando un par de cebadores diseñados para amplificar una porción corta del gen de ARNr 18S de cualquiera de las cuatro especies de Plasmodium infecciosas en seres humanos (*P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* y *P. ovale*). Las PCR se realizaron en un volumen final de 25 µl que contenía 1 x SYBR Green I Master (Roche, Indianápolis, Indiana), 0,5 µM de cada uno de los dos cebadores PL1473F18 (SEQ ID NO: 7) y PL1679R18 (SEQ ID NO: 8) y ADN extraído del equivalente de 1 µl de sangre completa. Las condiciones de ciclo térmico para la amplificación fueron las siguientes: 1 ciclo (95°C durante 9 minutos), 40 ciclos (94°C durante 20 segundos, 50°C durante 30 segundos, 72°C durante 30 segundos) y 1 ciclo (72°C durante 5 minutos). Para la comparación, se realizaron cuatro PCR de control, conteniendo cada una 10⁵ copias de plásmido del gen de ARNr 18S clonado (disponible en la Colección de Cultivos Tipo Americana, Manassas, VA) de una de las cuatro especies de Plasmodium infecciosas en seres humanos.

Se sometió a electroforesis una porción (5 µl) de cada reacción sobre un gel de agarosa al 1,0% con bromuro de etidio en TAE al para detectar la presencia del amplicón de ADNr 18S. De las 82 muestras analizadas, se seleccionaron 30 para un análisis adicional basándose en la presencia de un amplicón del tamaño pronosticado (~200 pares de bases). Se realizó un análisis de la curva de fusión sobre el resto (20 µl) de las 30 PCR seleccionadas tal como se ha descrito (Mangold et. Al., J. Clin. Micro., 43, pág. 2435-2440, 2005) y la T_m para cada amplicón se comparó con las de los cuatro amplicones de control, cada uno de los cuales tiene una T_m característica. Basándose en estos resultados, se identificaron tres muestras potenciales infectadas con *P. malariae* y cuatro muestras potenciales infectadas con *P. Ovale*. Las tres muestras que contenían *P. malariae* (Núm. 0014, Núm. 609-39, Núm. 240-16) y las dos de *P. ovale* (Núm. 684-22, Núm. 1045-36) parecían estar co-infectados con *P. falciparum*, mientras que las otras dos muestras de *P. ovale* (Núm. 283-4, Núm. 510-10) parecían ser infecciones únicas. Todas las demás muestras parecían estar infectadas individualmente con *P. falciparum*.

Se generaron más amplicones de ADNr 18S como se describió anteriormente, y los amplicones se purificaron con posterioridad utilizando el Gene Clean Spin Kit (MP Biochemicals, Solon, Ohio) de acuerdo con el folleto adjunto. Se determinó la secuencia de los amplicones de ADNr 18S para las dos muestras con *P. ovale* únicamente (Núm. 283-4, Núm. 510-10), y para uno de las muestras co-infectadas con *P. malariae*/*P. falciparum* (Núm. 0014). El análisis blast vs. Genbank demostró 100% de homología de los supuestos amplicones de *P. ovale* con las secuencias de ADNr de *P. ovale* en la base de datos, lo que confirma la presencia de ADN de *P. ovale* en estas dos muestras. La secuencia de la muestra co-infectada con 0014 fue altamente homóloga a *P. falciparum*. Sin embargo, a partir de los cromatogramas de secuenciación, resultaba evidente que también estaba presente una segunda secuencia subyacente. Este no fue el caso para las dos secuencias de *P. ovale*, que no tenía ninguna indicación de la presencia de una secuencia secundaria. La confirmación de la presencia de ADN de *P. malariae* en la muestra co-infectada 0014 se describe en el Ejemplo 2.

Ejemplo 2

Amplificación y secuenciación del gen MSP1 de *P. malariae*

Región 5' de PmMSP1

Esta sección describe el enfoque utilizado para obtener la secuencia desde cerca del extremo 5' del gen MSP1 de *P. malariae*. Se ha publicado un corto tramo de secuencia situado cerca del extremo 5' del gen MSP1 de *P. malariae* (Fandeur et. Al., Parasitology, 120, pág. 11-21, 2000) y se pueden encontrar en la base de datos Genbank (Núm. de acceso AF138881). Los cebadores degenerados As1 (SEQ ID NO: 9) y As2 (SEQ ID NO: 10) diseñados para amplificar una región de aproximadamente 387 pares de bases del extremo 5' del gen MSP1 de múltiples especies de Plasmodium han sido descritos, junto con un par de cebadores específicos de *P. malariae* anidados PmMSP1 - F1 (SEQ ID NO: 11) y PmMSP1-R1 (SEQ ID No: 12) (Fandeur et. Al., Parasitology, 120, pág. 11-21, 2000). Las secuencias de cebadores As1 (SEQ ID NO: 9) y PmMSP1-F1 (SEQ ID NO: 11) utilizadas en la presente memoria son ligeramente diferentes de las referidas por Fandeur et al.

Se realizó la amplificación mediante PCR anidada utilizando los cebadores degenerados y específicos de *P. malariae* en las tres muestras extraídas que se había identificado previamente que posiblemente contenían ADN de *P. malariae* (Núm. 0014, Núm. 609-39, Núm. 240-16, véase el Ejemplo 1) de la siguiente manera. La PCR de la primera ronda se realizó en un volumen final de 20 µl conteniendo 1 x SYBR Green I Master (Roche, Indianápolis, Indiana), 1,0 µM de cada uno de los dos cebadores As1 (SEQ ID NO: 9) y As2 (SEQ ID NO: 10) y ADN extraído del equivalente de 1 µl de sangre completa (véase el Ejemplo 1). Las condiciones de ciclo térmico para la amplificación fueron las siguientes: 1 ciclo (95°C durante 5 minutos), 3 ciclos (94°C durante 30 segundos, 45°C durante 30 segundos, 72°C durante 1 minuto), 35 ciclos (94°C durante 10 segundos, 54°C durante 1,5 minutos, 72°C durante 2 minutos) y 1 ciclo (72°C durante 3 minutos). Basándose en las secuencias de MSP1 en Genbank, el tamaño de amplicón pronosticado generado por los cebadores As oscila entre 326 pares de bases y 536 pares de bases dependiendo de las especies de Plasmodium.

La PCR de la segunda ronda se realizó en un volumen final de 20 µl que contenía 1 x SYBR Green I Master (Roche, Indianápolis, Indiana), 1,0 µM de cada uno de los dos cebadores PmMSP1-F1 (SEQ ID NO: 11) y PmMSP1-R1 (SEQ ID NO: 12) y 1 µl de la primera ronda de PCR (véase más arriba). Las condiciones de ciclo térmico para la amplificación fueron las siguientes: 1 ciclo (95°C durante 5 minutos), 20 ciclos (94°C durante 1 minuto, 55°C durante 1,5 minutos, 72°C durante 2 minutos) y 1 ciclo (72°C durante 3 minutos). Basándose en las secuencias de MSP1 en Genbank para *P. malariae*, o la especie altamente relacionada *P. brasilianum*, el tamaño de amplicón pronosticado generado por los cebadores PmMSP1 es de 237 pares de bases o 261 pares de bases dependiendo de la presencia o ausencia de una secuencia de inserto de 24 pares de bases.

Se sometió a electroforesis una porción (5 µl) de cada primera ronda y cada PCR de segunda ronda en un gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio en TAE para detectar la presencia de amplicones. Una de las muestras de *P. malariae* (Núm. 0014) dio como resultado un amplicón del tamaño pronosticado después de la primera ronda de PCR. Después de la PCR de segunda ronda, las tres muestras de *P. malariae* contenían un amplicón del tamaño correcto. Se sometieron a electroforesis los fragmentos del volumen restante (14 µl) de las tres PCR de segunda ronda y a continuación se escindieron de un gel de agarosa y el ADN se extrajo de la agarosa utilizando QIAEX II Agarose Gel Extraction Kit QIAEX II (Qiagen, Valencia, California) de acuerdo con el folleto adjunto.

Se obtuvieron secuencias de ADN de los tres amplicones purificados en gel, utilizando PmMSP1-F1 (SEQ ID NO: 11) y PmMSP1-R1 (SEQ ID NO: 12) como cebadores y se compararon con secuencias en la base de datos Genbank mediante análisis blast. Los tres presentaron alta homología (>98%) con secuencias de ADN de *P. malariae* y *P. brasilianum* situadas en el extremo 5' del gen MSP1, confirmando la presencia de ADN de *P. malariae* en estas tres muestras.

Región 3' de PmMSP1

Esta sección describe el enfoque utilizado para obtener la secuencia desde cerca del extremo 3' del gen MSP1 de *P. malariae*. Las secuencias de nucleótidos cerca del extremo 3' del marco de lectura abierto de MSP1 se recogieron de la base de datos Genbank para todas las especies de Plasmodium disponibles (14 especies en total). La secuencia de *P. malariae* no está disponible en esta región. Las secuencias se alinearon y se diseñaron cebadores inversos degenerados, dirigidos a la región más conservada. Se utilizaron estos cebadores MSP1-R1 (SEQ ID NO: 13) y MSP1-R2 (SEQ ID NO: 14) junto con los cebadores directos PmMSP1-F1 (SEQ ID NO: 11) y PmMSP1-F2 (SEQ ID NO: 15) específicos de *P. malariae* para amplificar mediante PCR el gen de MSP1 de *P. malariae* casi completo.

Las PCR se realizaron en un volumen final de 20 µl que contenía 1 x LA PCR Buffer II (más Mg²⁺) 0,4 mM de cada dNTP, 1 unidad de LA Taq HS por PCR (Takara, Otsu, Shiga, Japón), ADN extraído del equivalente de 1 µl de sangre completa (véase el Ejemplo 1) de la muestra infectada con *P. malariae* Núm. 0014 y 1,0 µM de cada cebador directo [PmMSP1-F1 (SEQ ID NO: 11) o PmMSP1-F2 (SEQ ID NO: 15)] y el cebador inverso [MSP1-R1 (SEQ ID NO: 13) o MSP1-R2 (SEQ ID NO: 14)]. Se llevaron a cabo PCR que contenían las cuatro combinaciones posibles de cebadores directos e inversos. Las condiciones de ciclo térmico para la amplificación fueron las siguientes: 1 ciclo (94°C durante 1 minuto), 3 ciclos (94°C durante 30 segundos, 45°C durante 1 minuto, 72°C durante 5 minutos), 35 ciclos (94°C durante 30 segundos, 54°C durante 1,5 minutos, 72°C durante 5 minutos) y 1 ciclo (72°C durante 5 minutos). Basándose en las secuencias de MSP1 en Genbank, el tamaño de amplicón pronosticado es de aproximadamente 5000 pares de bases.

Una porción (5 µl) de cada PCR se sometió a electroforesis en un gel de agarosa al 8% con bromuro de etidio en TAE para detectar la presencia de amplicones. Dos de las combinaciones de cebadores (es decir, PmMSP1-F1/MSP1-R2 y PmMSP1-F2/MSP1-R2) generaron un amplicón menor del tamaño pronosticado. El amplicón de 5000 pares de bases del volumen restante (14 µl) de la PCR de PmMSP1-F1/MSP1-R2 se sometió a electroforesis y a continuación se escindió de un gel de agarosa, y el ADN se extrajo de la agarosa utilizando el QIAEX II Agarose Gel Extraction Kit (Qiagen, Valencia, California) de acuerdo con el folleto adjunto.

La secuencia de un extremo del amplicón purificado de 5000 pares de bases se obtuvo utilizando MSP1-R2 (SEQ ID NO: 14) como cebador. La secuencia contenía un único marco de lectura abierto largo, y la secuencia de aminoácidos deducida se comparó con la de la base de datos Genbank mediante análisis BLAST. Se obtuvieron concordancias altamente significativas con las secuencias de aminoácidos de la región C-terminal de MSP1 de múltiples especies de *Plasmodium*, ninguna de las cuales mostró más del 50% de identidad con la secuencia de aminoácidos deducida de la muestra Núm. 0014. Esto indica que se obtuvo de una especie de Plasmodium para la cual esta región de la secuencia de MSP1 no se había determinado previamente.

Extremo 3' de PmMSP1

La secuencia restante en el extremo 3' del gen PmMSP1, que se extendía a lo largo del codón de parada, se obtuvo realizando un experimento de paseo cromosómico por PCR. El ADN extraído de la muestra infectada Núm. 0014 de *P. malariae* (26 µl equivalentes de sangre completa) se dirigió en una reacción de 30 µl durante 1 h. a 37°C en presencia de 50 unidades de la enzima de restricción DpnII y 1 x DpnII Buffer (New England Biolabs, Beverly, Massachusetts). Los productos de digestión se purificaron utilizando el QBiogene GeneClean Spin Kit (MP Biochemicals, Solon, Ohio) de acuerdo con el folleto adjunto.

Se añadió todo el ADN digerido con DpnII a una mezcla de reacción de ligación (30 µl) que contenía 1 x T4 DNA Ligase Buffer (New England Biolabs, Beverly, Massachusetts) y 15 µM de cada uno de los oligonucleótidos adaptadores S-Bam24 (SEQ ID NO: 16) y S-Bam12 (SEQ ID NO: 17). La mezcla de reacción de ligación se calentó a 50°C y después se enfrió a 10°C durante un período de una hora para recolectar el adaptador S-Bam24/12 a los extremos cortados de DpnII y después se colocó sobre hielo. Se añadió ADN ligasa T4 (400 unidades/µl) (New England Biolabs, Beverly, Massachusetts) a la mezcla de ligación recocida y la reacción se incubó durante la noche a 16°C. Los productos de ligación se purificaron utilizando el QBiogene GeneClean Spin Kit (MP Biochemicals, Solon, Ohio) de acuerdo con el folleto adjunto, y posteriormente se desnaturalizaron por calor.

La PCR para el paseo se realizó en un volumen final de 20 µl que contenía 1 x SYBR Green I Master (Roche, Indianápolis, Indiana), 0,2 µM de cada uno de los dos cebadores S-Bam24 (SEQ ID NO: 16) y PmMSP1-F3 ID NO: 18) y 1 µl de ADN desnaturalizado extraído de la reacción de ligación descrita anteriormente. Las condiciones de ciclo térmico para la amplificación fueron las siguientes: 1 ciclo (95°C durante 4,5 minutos), 40 ciclos (94°C durante 30 segundos, 55°C durante 30 segundos, 72°C durante 1 minuto) y 1 ciclo (72°C durante 4 minutos).

La PCR para el paseo (20 ml) se sometió a electroforesis en un gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio en TAE para detectar la presencia de amplicones. Se extrajo un amplicón de 500 pb del gel de agarosa, y se extrajo el ADN de la agarosa utilizando el QBiogene GeneClean Kit (MP Biochemicals, Solon, Ohio) de acuerdo con el folleto adjunto y posteriormente se desnaturalizó por calor.

La PCR para el paseo se realizó en un volumen final de 20 µl que contenía 1 x SYBR Green I Master (Roche, Indianápolis, Indiana), 0,2 µM de cada uno de los dos cebadores S-Bam24 (SEQ ID NO: 16) y PmMSP1-F3 ID NO: 18) y 1 µl de ADN desnaturalizado extraído de la reacción de ligación descrita anteriormente. Las condiciones de ciclo térmico para la amplificación fueron las siguientes: 1 ciclo (95°C durante 4,5 minutos), 40 ciclos (94°C durante 30 segundos, 55°C durante 30 segundos, 72°C durante 1 minuto) y 1 ciclo (72°C durante 4 minutos).

La PCR para el paseo (20 µl) se sometió a electroforesis en un gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio en TAE para detectar la presencia de amplicones. Se extrajo un amplicón de 500 pb del gel de agarosa, y se extrajo el ADN de la agarosa utilizando el QBiogene GeneClean Kit (MP Biochemicals, Solon, Ohio) de acuerdo con el folleto adjunto.

La secuencia del amplicón purificado de 500 pares de bases se obtuvo utilizando S-Bam24 (SEQ ID NO: 16) y PmMSP1-F3 (SEQ ID NO: 18) como cebadores. La secuencia se solapó con la de la región 3' previamente determinada de PmMSP1 (descrita anteriormente), y contenía un marco de lectura abierto que terminaba con un codón de parada. La secuencia de aminoácidos deducida se comparó con la de la base de datos Genbank mediante análisis BLAST. Se obtuvieron emparejamientos altamente significativos para secuencias de aminoácidos del extremo C-terminal de MSP1 de múltiples especies de *Plasmodium*, lo que indicaba que se había obtenido la secuencia C-terminal completa de PmMSP1.

Extremo 5' de PmMSP1

La secuencia restante en el extremo 5' del gen PmMSP1, que se extendía a lo largo del codón de inicio, se obtuvo mediante la realización de un experimento de paseo por PCR inversa. El ADN extraído del equivalente de 20 µl de sangre completa (véase el Ejemplo 1) de la muestra infectada Núm. 0014 de *P. malariae* se digirió en una reacción de 100 µl durante 1 h. A 37°C en presencia de 20 unidades de la enzima de restricción Apol y 1 x Apol Buffer (New England Biolabs, Beverly, Massachusetts). Los productos de digestión se purificaron utilizando el QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Valencia, California) de acuerdo con el folleto adjunto.

Se añadió todo el ADN digerido con Apol purificado a una mezcla de reacción de autoligación (500 µl) que contenía 1 x T4 DNA Ligase Buffer y 2000 unidades T4 DNA Ligase (New England Biolabs, Beverly, Massachusetts). La mezcla de reacción de ligación se incubó durante la noche a 14°C, y los productos de ligación se purificaron utilizando el QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Valencia, California) de acuerdo con el folleto adjunto.

La PCR inversa se realizó en un volumen final de 20 µl que contenía 1 x SYBR Green I Master (Roche, Indianápolis, Indiana), 0,5 µM de cada uno de los dos cebadores PmMSP1-F7 (SEQ ID NO: 19) y PmMSP1-R8 ID NO: 20) y 2 µl (~ 7%) de la reacción de autoligación purificada descrita anteriormente. Las condiciones de ciclo térmico para la amplificación fueron las siguientes: 1 ciclo (95°C durante 4,5 minutos), 40 ciclos (94°C durante 30 segundos, 55°C durante 30 segundos, 72°C durante 1 minuto) y 1 ciclo (72°C durante 4 minutos).

La PCR inversa (15 µl) se sometió a electroforesis en un gel de agarosa al 8% con bromuro de etidio en TAE para detectar la presencia de amplicones. Se extrajo un amplicón de 250 pb del gel de agarosa, y se extrajo el ADN de la agarosa utilizando el kit QBiogene GeneClean (MP Biochemicals, Solon, Ohio) de acuerdo con el folleto adjunto.

La secuencia del amplicón purificado de 250 pares de bases se obtuvo utilizando como cebadores PmMSP1-F7 (SEQ ID NO: 19) y PmMSP1-R8 (SEQ ID NO: 20). La secuencia se solapó con la de la región de extremo 5' previamente determinada de PmMSP1 (descrita anteriormente), y contenía un marco de lectura abierto que comenzaba con un codón de inicio. La secuencia de aminoácidos deducida se comparó con la de la base de datos Genbank por análisis blast. Se obtuvieron emparejamientos altamente significativos para secuencias de aminoácidos del extremo N de MSP1 de múltiples especies de *Plasmodium*, lo que indicaba que se había determinado la secuencia N-terminal completa de PmMSP1.

PmMSP1 completa

En esta sección se describe el enfoque utilizado para obtener la secuencia del gen MSP1 de *P. malariae*. Basándose en secuencias obtenidas a partir del extremo 3' del gen PmMSP1 (véase más arriba), se diseñaron dos nuevos cebadores inversos específicos de *P. malariae*. Estos cebadores, PmMSP1-R2 (SEQ ID NO: 21) y PmMSP1-R3 (SEQ ID NO: 22) se usaron conjuntamente con los cebadores directos PmMSP1-F1 (SEQ ID NO: 11) y PmMSP1-F2 (SEQ ID NO: 15) específicos de *P. malariae* para realizar una amplificación por PCR anidada específica para el gen MSP1 casi completo de *P. malariae*.

La PCR de la primera ronda se realizó en un volumen final de 20 µl que contenía 1 x LA PCR Buffer II (más Mg²⁺) 0,4 mM cada dNTP, 1 unidad de LA Taq HS por PCR (Takara, Otsu, Shiga, Japón), ADN extraído del equivalente de 1 µl de sangre completa (véase el Ejemplo 1) de la muestra Núm. 0014 infectada con *P. malariae* y 0,5 µM de cada cebador directo [PmMSP1-F1 (SEQ ID NO: 11) o PmMSP1-F2 (SEQ ID NO: 15)] y el cebador inverso [PmMSP1-R2

(SEQ ID NO: 21) o PmMSP1-R3 (SEQ ID NO: 22)]. Se llevaron a cabo PCR que contenían las cuatro combinaciones posibles de cebadores directos e inversos. Las condiciones de ciclo térmico para la amplificación fueron las siguientes: 1 ciclo (94°C durante 1 minuto), 35 ciclos (94°C durante 30 segundos, 55°C durante 30 segundos, 72°C durante 5 minutos) y 1 ciclo (72°C durante 5 minutos).

Las PCR de segunda ronda se realizaron como se ha descrito para la primera ronda, salvo que sólo se utilizaron combinaciones de cebadores totalmente anidados o semi-anidados, y que el molde fue 1 µl de la PCR de primera ronda.

Se sometió a electroforesis una porción (5 µl) de todas las PCR de primera y segunda rondas en un gel de agarosa al 8% con bromuro de etidio en TAE para detectar la presencia de amplicones. No se observaron amplicones después de la primera ronda de PCR. Sin embargo, todas excepto una de las PCR de la segunda ronda generaron amplicones de una sola banda del tamaño pronosticado. Los amplicones de 5000 pares de bases del volumen restante (15 µl) de la PCR de segunda ronda se purificaron utilizando el QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Valencia, California) de acuerdo con el folleto adjunto.

Las PCR purificadas de 5000 pares de bases sirvieron como molde para varias rondas de secuenciación utilizando cebadores de secuenciación directos e inversos de *P. malariae* específicos dirigidos a la porción central desconocida del gen PmMSP1. Después de cada ronda de secuenciación, se diseñaron cebadores específicos de *P. malariae* adicionales a partir de la secuencia recién adquirida para su uso en la siguiente ronda. Este procedimiento se continuó hasta que se obtuvo la secuencia a través del resto del gen PmMSP1. La secuencia resultante se combinó con secuencias de los extremos 5' y 3' (descritos anteriormente) para generar el gen PmMSP1 completo. Los cebadores específicos de *P. malariae* adicionales utilizados para la secuenciación son PmMSP1-F3 (SEQ ID NO: 18), PmMSP1-F4 (SEQ ID NO: 23), PmMSP1-F5 (SEQ ID NO: 24), PmMSP1-R4 (SEQ ID NO: 25) y PmMSP1-R5 (SEQ ID NO: 26).

Ejemplo 3

Amplificación y secuenciación del gen MSP1 de *P. ovale*

Región 5' de PoMSP1 (muestra 510-10)

Esta sección describe el enfoque utilizado para obtener la secuencia desde cerca del extremo 5' del gen MSP1 de *P. ovale*. Los cebadores degenerados As1 (SEQ ID NO: 9) y As2 (SEQ ID NO: 10) diseñados para amplificar una región de aproximadamente 387 pares de bases del extremo 5' del gen MSP1 de múltiples especies de *Plasmodium* se describieron en el Ejemplo 2.

Se realizó una primera ronda de amplificación utilizando los cebadores As degenerados en dos de las muestras extraídas (Núm. 283-4 y Núm. 510-10) que se había identificado previamente que contenían ADN de *P. ovale* (véase el Ejemplo 1) de la siguiente manera. Las PCR se realizaron en un volumen final de 20 µl que contenía 1 x SYBR Green I Master (Roche, Indianápolis, Indiana), 1,0 µM de cada uno de los dos cebadores As1 (SEQ ID NO: 9) y As2 (SEQ ID NO: 10) y ADN extraído del equivalente de 1 µl de sangre completa (véase el Ejemplo 1). Las condiciones de ciclo térmico para la amplificación fueron las siguientes: 1 ciclo (95°C durante 5 minutos), 3 ciclos (94°C durante 30 segundos, 45°C durante 30 segundos, 72°C durante 1 minuto), 35 ciclos (94°C durante 10 segundos, 54°C durante 1,5 minutos, 72°C durante 2 minutos) y 1 ciclo (72°C durante 3 minutos). Basándose en secuencias de MSP1 en Genbank, el tamaño de amplicón pronosticado generado por los cebadores As oscila entre 326 pares de bases a 536 pares de bases dependiendo de la especie de *Plasmodium*.

Una porción (5 µl) de cada PCR se sometió a electroforesis en un gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio en TAE para detectar la presencia de amplicones. Ambas PCR de *P. ovale* generaron un amplicón muy débil (~ 420 pb) dentro del intervalo de tamaño pronosticado. Este amplicón se purificó en gel para la muestra 510-10 y se reamplificó como se describió anteriormente, excepto que las condiciones de ciclación térmica para la amplificación fueron las siguientes: 1 ciclo (95°C durante 5 minutos), 20 ciclos (94°C durante 1 minuto, 55°C durante 1,5 minutos, 72°C durante 2 minutos) y 1 ciclo (72°C durante 3 minutos). El producto de PCR reamplificado se purificó utilizando el QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Valencia, California) de acuerdo con el folleto adjunto del envase.

La secuencia de ADN del amplicón reamplificado se obtuvo utilizando As1 (SEQ ID NO: 9) y As2 (SEQ ID NO: 10) como cebadores. La secuencia contenía un único marco de lectura abierto largo, y la secuencia de aminoácidos deducida se comparó con la de la base de datos Genbank mediante análisis BLAST. Se obtuvieron emparejamientos altamente significativos para secuencias de aminoácidos de la región N-terminal de MSP1 de múltiples especies de *Plasmodium*, ninguna de las cuales mostró más del 45% de identidad con la secuencia de aminoácidos deducida. Esto indica que se obtuvo de una especie de *Plasmodium* para la cual esta región de la secuencia de MSP1 no se había determinado previamente.

Extremo 3' de PoMSP1

Esta sección describe el enfoque utilizado para obtener la secuencia desde cerca del extremo 3' del gen MSP1 de *P. ovale*. Un par de cebadores específicos de *P. ovale* se diseñaron basándose en la secuencia 5'-PoMSP1 obtenida anteriormente. Los cebadores directos (SEQ ID NO: 27) y PoMSP1-F2 (SEQ ID NO: 28) específicos de *P. ovale* se utilizaron junto con los cebadores inversos degenerados MSP1-R1 (SEQ ID NO: 13) y MSP1-R2 (SEQ ID NO: 14) desde el extremo 3' del gen MSP1 (descrito en el Ejemplo 2) para realizar la amplificación anidada del gen MSP1 de *P. ovale* casi completo. Basándose en las secuencias de MSP1 en Genbank, el tamaño de amplicón previsto es de aproximadamente 5000 pares de bases.

La PCR de la primera ronda se realizó en un volumen final de 20 µl que contenía 1 x LA PCR Buffer II (más Mg²⁺), 0,4 mM cada dNTP, 1 unidad de LA Taq HS por PCR (Takara, Otsu, Shiga, Japón), ADN extraído del equivalente de 1 µl de sangre completa (véase el Ejemplo 1) de la muestra Núm. 510-10 infectada con *P. ovale* u 1,0 µM de cada uno del cebador directo [PoMSP1-F1 (SEQ ID NO: 27) o PoMSP1-F2 (SEQ ID NO: 28)] y el cebador inverso [MSP1-R1 (SEQ ID NO: 13) o MSP1-R2 (SEQ ID NO: 14)]. Se llevaron a cabo PCR que contenían las cuatro combinaciones posibles de cebadores directos e inversos. Las condiciones de ciclo térmico para la amplificación fueron las siguientes: 1 ciclo (94°C durante 1 minuto), 3 ciclos (94°C durante 30 segundos, 45°C durante 1 minuto, 72°C durante 5 minutos), 35 ciclos (94°C durante 30 segundos, 50°C durante 1,5 minutos, 72°C durante 5 minutos) y 1 ciclo (72°C durante 5 minutos).

Las PCR de segunda ronda se realizaron como se ha descrito para la primera ronda, excepto que únicamente se utilizaron combinaciones de cebadores totalmente anidados o semi-amidados se utilizaron, y que para el molde se utilizaron 0,2 µl de la primera ronda de PCR.

Se sometió a electroforesis una porción (5 µl) de todas las PCR de primera y segunda rondas en un gel de agarosa al 8% con bromuro de etidio en TAE para detectar la presencia de amplicones. Ninguna de las PCR de la primera ronda produjo amplicones del tamaño pronosticado. Sin embargo, una de las PCR de segunda ronda generó un amplicón menor de aproximadamente 5000 pares de bases. Este producto resultó de una PCR de segunda ronda completamente anidada utilizando los cebadores PoMSP1-F2 (SEQ ID NO: 28) y MSP1-R2 (SEQ ID NO: 14) para amplificar la PCR de primera ronda realizada con los cebadores PoMSP1-F1 (SEQ ID NO: 27) y MSP1-R1 (SEQ ID NO: 13). El amplicón de 5000 pares de bases del volumen restante (15 µl) de la PCR completamente anidada se sometió a electroforesis y a continuación se escindió de un gel de agarosa, y el ADN se extrajo de la agarosa utilizando el QIAEX II Agarose Gel Extraction Kit (Qiagen, Valencia, California) de acuerdo con el folleto adjunto.

La secuencia del extremo 3' del amplicón purificado de 5000 pares de bases se obtuvo utilizando MSP1-R2 (SEQ ID NO: 14) como cebador. La secuencia contenía un solo marco de lectura abierto largo, y la secuencia de aminoácidos deducida se comparó con la de la base de datos Genbank mediante análisis blast. Se obtuvieron emparejamientos altamente significativos con las secuencias de aminoácidos de la región C-terminal de MSP1 de múltiples especies de *Plasmodium*, ninguna de las cuales mostró más de 51% de identidad con la secuencia de aminoácidos deducida. Esto indica que se obtuvo de una especie de *Plasmodium* para la cual esta región de la secuencia de MSP1 no se había determinado previamente.

Extremo 5' de PoMSP1 (muestra 510 - 10)

La secuencia restante en el extremo 5' del gen PoMSP1, que se extendía a lo largo del codón de inicio, se obtuvo realizando un experimento de paseo por PCR inversa. El ADN extraído del equivalente de 20 µl de sangre completa (véase el Ejemplo 1) de la muestra Núm. 510-10 infectada con *P. ovale* se digirió en una reacción de 100 µl durante 1 h. A 37°C en presencia de 20 unidades de la enzima de restricción Apol y 1 x Apol Buffer (New England Biolabs, Beverly, Massachusetts). Los productos de digestión se purificaron utilizando el QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Valencia, California) de acuerdo con el folleto adjunto.

Se añadió todo el ADN digerido con Apol purificado a una mezcla de reacción de autoligación (500 µl) que contenía 1 x T4 DNA Ligase Buffer y 2000 unidades T4 DNA Ligase (New England Biolabs, Beverly, Massachusetts). La mezcla de reacción de ligación se incubó durante la noche a 14°C, y los productos de ligación se purificaron utilizando el QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Valencia, California) de acuerdo con el folleto adjunto.

Se utilizaron un par de cebadores directos [PoMSP1-F1 (SEQ ID NO: 27) y PoMSP1-F2 (SEQ ID NO: 28)] específicos de *P. Ovale* junto con los cebadores inversos específicos de *P. ovale* [PoMSP1-R3 (SEQ ID NO: 29) y PoMSP1-R6 (SEQ ID NO: 30)] para realizar la PCR inversa anidada en el extremo 5' del gen MSP1 de *P. ovale*.

La primera ronda de PCR inversa se realizó en un volumen final de 20 µl que contenía 1 x SYBR Green I Master (Roche, Indianápolis, Indiana), 0,5 µM de cada cebador directo [PoMSP1-F1 (SEQ ID NO: 27)] y el cebador inverso [PoMSP1-R3 (SEQ ID NO: 29)] y 2 µl (~7%) de la reacción de auto-ligación purificada descrita anteriormente. Las condiciones de ciclo térmico para la amplificación fueron las siguientes: 1 ciclo (95°C durante 4,5 minutos), 40 ciclos

(94°C durante 30 segundos, 55°C durante 30 segundos, 72°C durante 1 minuto) y 1 ciclo (72°C durante 4 minutos).

La PCR de segunda ronda (35 ciclos) se realizó como se ha descrito para la primera ronda, excepto que se utilizó una combinación de cebadores completamente anidados [PoMSP1-F2 (SEQ ID NO: 28) y PoMSP1-R6 (SEQ ID NO: 30)], y que se utilizaron como molde 1,0 µl de la PCR de primera ronda.

Se sometió a electroforesis una porción (15 µl) de la PCR inversa de la segunda ronda en un gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio en TAE para detectar la presencia de amplicones. Se extrajo un amplicón de 250 pb del gel de agarosa, y se extrajo el ADN de la agarosa utilizando el QBiogene GeneClean Kit (MP Biochemicals, Solon, Ohio) de acuerdo con el folleto adjunto.

La secuencia del amplicón purificado de 250 pares de bases se obtuvo utilizando PoMSP1-F2 (SEQ ID NO: 28) y PoMSP1-R6 (SEQ ID NO: 30) como cebadores. La secuencia se solapó con la de la región del extremo 5' previamente determinada de PoMSP1 (descrita anteriormente), y contenía un marco de lectura abierto que comenzaba con un codón de inicio. La secuencia de aminoácidos deducida se comparó con la de la base de datos Genbank por análisis blast. Se obtuvieron emparejamientos altamente significativos para secuencias de aminoácidos del extremo N de MSP1 de múltiples especies de *Plasmodium*, los que indicaba que se había determinado la secuencia N-terminal completa de PoMSP1.

Extremo 3' de PoMSP1 (muestra 510 - 10)

La secuencia restante en el extremo 3' del gen PoMSP1, que se extiende a lo largo del codón de inicio, se obtuvo mediante la realización de un experimento de paseo por PCR inversa. La digestión, la ligación y la purificación del molde se realizó como se ha descrito para el experimento de PCR inversa en el extremo 5' de PoMSP1 (véase más arriba).

Se utilizó un cebador directo específico de *P. ovale* [PoMSP1-F8 (SEQ ID NO: 31)] junto con los cebadores inversos específicos de *P. ovale* [PoMSP1-R1 (SEQ ID NO: 32) y PoMSP1-R2 (SEQ ID NO: 33)] para realizar la PCR inversa semi-anidada en el extremo 3' del gen MSP1 de *P. ovale*.

La primera ronda de PCR inversa se realizó en un volumen final de 20 µl que contenía 1 x LA PCR Buffer II (más Mg²⁺), 0,4 mM cada dNTP, 1 unidad de LA Taq HS (Takara, Otsu, Shiga, Japón), 0,5 µM de cada uno de los cebadores directos [PoMSP1-F8 (SEQ ID NO: 31)] y el cebador inverso [PoMSP1-R1 (SEQ ID NO: 32)] y 2 µl (~ 7%) de la reacción de autoligación purificada descrita anteriormente. Las condiciones de ciclo térmico para la amplificación fueron las siguientes: 1 ciclo (95°C durante 1,0 minutos), 40 ciclos (94°C durante 30 segundos, 55°C durante 30 segundos, 72°C durante 5 minutos) y 1 ciclo (72°C durante 5 minutos).

La PCR de segunda ronda (35 ciclos) se realizó como se ha descrito para la primera ronda, excepto que se utilizó una combinación de cebadores semi-anidados [PoMSP1-F8 (SEQ ID NO: 31) y PoMSP1-R2 (SEQ ID NO: 33)] y que se utilizaron como molde 1,0 µl de la primera ronda de PCR.

Una porción (15 µl) de la PCR inversa de la segunda ronda se sometió a electroforesis en un gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio en TAE para detectar la presencia de amplicones. Se escindió un amplicón de 800 pares de bases del gel de agarosa y se extrajo el ADN de la agarosa utilizando el GeneClean QBiogene Kit (MP Biochemicals, Solon, Ohio) de acuerdo con el folleto adjunto.

El producto purificado de 800 pares de bases se clonó en el vector pGEM-T Easy (Promega, Madison, Wisconsin) de acuerdo con el folleto adjunto y los transformantes que contenían el amplicón clonado se obtuvieron en células XL10-Gold Untracompetent (Stratagene, La Jolla, California) de acuerdo con el folleto adjunto.

La secuencia del amplicón clonado de 800 pares de bases se obtuvo utilizando los cebadores vectoriales pGEM T7 y pGEM SP6 (Promega, Wisconsin). La secuencia se solapaba con la de la región de extremo 3' de PoMSP1 (descrita anteriormente) previamente determinada, y contenía un marco de lectura abierto que terminaba con un codón de parada. La secuencia de aminoácidos deducida se comparó con la de la base de datos Genbank mediante análisis blast. Se obtuvieron emparejamientos altamente significativos para secuencias de aminoácidos del extremo C-terminal de MSP1 de múltiples especies de *Plasmodium*, lo que indicaba que se había determinado la secuencia C-terminal completa de PoMSP1.

PoMSP1 completa (muestra 510-10)

En esta sección se describe el método utilizado para obtener la secuencia restante del gen MSP1 de *P. ovale*. Basándose en secuencias obtenidas a partir del extremo 3' del gen PoMSP1 (véase más arriba), se diseñaron dos nuevos cebadores inversos específicos de *P. ovale*. Estos cebadores, PoMSP1-R1 (SEQ ID NO: 32) y PoMSP1-R2 (SEQ ID NO: 33) se usaron junto con los cebadores directos PoMSP1-F1 (SEQ ID NO: 27) y PoMSP1-F2 (SEQ ID

NO: 28) específicos de *P. ovale* para realizar una amplificación por PCR específica para el gen PoMSP1 casi completo.

Las PCR se realizaron en un volumen final de 20 µl que contenía 1 x LA PCR Buffer II (más Mg²⁺), 0,4 mM de cada dNTP, 1 unidad de LA Taq HS por PCR (Takara, Otsu, Shiga, Japón), ADN extraído del equivalente de 1 µl de sangre completa (véase el Ejemplo 1) de la muestra Núm. 510 -10 infectada con *P. ovale* y 0,5 µM de cada uno del cebador directo [PoMSP1-F1 (SEQ ID NO: 27) o PoMSP1-F2 (SEQ ID NO: 28)] y el cebador inverso [PoMSP1-R1 (SEQ ID NO: 32) o PoMSP1-R2 (SEQ ID NO: 33)]. Se llevaron a cabo PCR que contenían las cuatro combinaciones posibles de cebadores directos e inversos. Las condiciones de ciclo térmico para la amplificación fueron las siguientes: 1 ciclo (94°C durante 1 minuto), 35 ciclos (94°C durante 30 segundos, 55°C durante 30 segundos, 72°C durante 5 minutos) y 1 ciclo (72°C durante 5 minutos).

Una parte (15 µl) de todas las PCR se sometió a electroforesis en un gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio en TAE para detectar la presencia de amplicones. Todas las PCR generaron amplicones de una sola banda del tamaño pronosticado. Los amplicones de 5000 pares de bases se extrajeron a continuación del gel de agarosa y el ADN se extrajo de la agarosa utilizando el QIAEX II Agarose Gel Extraction Kit (Qiagen, Valencia, California) de acuerdo con el folleto adjunto.

Los amplicones de 5000 pares de bases purificados en gel sirvieron como molde para varias rondas de secuenciación utilizando cebadores de secuenciación directos e inversos específicos de *P. ovale* dirigidos a la porción central desconocida del gen PoMSP1. Después de cada ronda de secuenciación, Se diseñaron cebadores específicos de *P. ovale* adicionales a partir de la secuencia recién adquirida para utilizarlos en la siguiente ronda. Este procedimiento se continuó hasta que se obtuvo la secuencia a través del resto del gen PoMSP1. La secuencia resultante se combinó con secuencias de los extremos 5' y 3' (descritos anteriormente) para generar el gen PoMSP1 completo. Los cebadores específicos de *P. ovale* adicionales utilizados para la secuenciación son PoMSP1-F3 (SEQ ID NO: 34), PoMSP1-F4 (SEQ ID NO: 35), PoMSP1-F5 (SEQ ID NO: 36), PoMSP1-F6 (SEQ ID NO: 37), PoMSP1-F7 (SEQ ID NO: 38), PoMSP1-R4 (SEQ ID NO: 39) y PoMSP1-R5 (SEQ ID NO: 40).

Ejemplo 4

Diseño, clonación y expresión del gen MSP1p19

Diseño de genes MSP1-p19

Esta sección describe el diseño de los genes sintéticos MSP1-p19, que codifican la porción p19 del extremo C-terminal de la proteína MSP1, de *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* y *P. ovale*, que se optimizan para su expresión en *E. coli*. Se utilizó soporte lógico Gene Designer de DNA 2.0, Inc. (Menlo Park, California) para diseñar las secuencias de genes enunciadas a continuación. Las proteínas p19 codificadas para los constructos de *P. falciparum* y *P. vivax* son idénticas a los números de acceso de Genbank P19598 y AAN86211 respectivamente, mientras que las proteínas p19 codificadas para los constructos de *P. malariae* y *P. ovale* se obtienen de las secuencias deducidas presentadas en esta patente. Las secuencias de nucleótidos para la optimización de los genes MSP1-p19 de *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* y *P. ovale* se presentan en los SEQ ID NO: 41, 42, 43 y 44 respectivamente, y las secuencias de aminoácidos codificadas para las proteínas MSP1-p19 de *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* y *P. ovale* se presentan en los SEQ ID NO: 45, 46, 47 y 48, respectivamente. Cada gen contiene un sitio 5'-EcoRI seguido por un codón de inicio, el cuerpo del gen que codifica la secuencia de aminoácidos de p19, una secuencia que codifica una etiqueta de 6-histidina, un codón de parada y un sitio BamHI. Los sitios para las enzimas de restricción se usaron para la clonación en vectores de expresión y se incluyó el marcador de 6-histidina para facilitar la subsiguiente purificación de la proteína expresada. Los nueve residuos de aminoácidos C-terminales codificados en el extremo de la porción MSP1-p19 de los constructos de *P. malariae* y *P. ovale*, antes de la etiqueta de 6-histidina, se diseñaron para emparejarse con la secuencia consenso derivada del alineamiento de este segmento altamente conservado de MSP1-p19 de otras 14 especies de *Plasmodium*. Las proteínas de *P. malariae* y *P. ovale* codificadas por las secuencias diseñadas (SEQ ID NO: 47 y 48, respectivamente) dentro de este tramo de nueve aminoácidos difieren en una sola posición frente a las secuencias deducidas de los genes nativos de *P. malariae* y *P. ovale* (SEQ ID NO: 1 y 3, respectivamente), los cuales codifican Gly (nativo) en lugar de Ser (diseñado) inmediatamente después del último residuo de Cys.

Preparación de genes sintéticos MSP1-p19 de *P. falciparum* y *P. vivax*

Los oligonucleótidos que codificaban las porciones adyacentes de la proteína MSP1-p19 de *P. falciparum* o de *P. vivax*, y que contenían extremos solapantes complementarios, se ensamblaron y los productos ensamblados resultantes se modificaron adicionalmente en un procedimiento de PCR de dos etapas. En la primera etapa de modificación por PCR, se introdujo el sitio de clonación 5' (EcoRI) y una secuencia que codificaba una porción de la etiqueta de histidina C-terminal en los extremos 5' y 3' respectivamente de los genes ensamblados. En la segunda etapa de modificación por PCR, se incorporó el resto de la secuencia que codifica la etiqueta de histidina, seguido

por un codón de parada y el sitio de clonación 3' (BamHI).

Las reacciones de ensamblaje (25 µl) contenían 1 x Amplitaq Gold Buffer, 2 mM de MgCl₂, 1,25 unidades de ADN polimerasa Amplitaq Gold (Roche, Branchburg, New Jersey), 0,25 mM cada dNTP (New England Biolabs, Beverly, Massachusetts) y 0,4 µM de cada uno de los cuatro oligonucleótidos (Oligos Etc., Inc., Wilsonville, Oregon) utilizado para formar el gen para *P. falciparum* [MSP1 (SEQ ID NO: 49), MSP2 (SEQ ID NO: 50), MSP3 (SEQ ID NO: 51) y MSP4 (SEQ ID NO: 52)] o para *P. vivax* [MSP5 (SEQ ID NO: 53), MSP6 (SEQ ID NO: 54), MSP7 (SEQ ID NO: 55) y MSP8 (SEQ ID NO: 56)]. Las condiciones de ciclo térmico para el ensamblaje fueron las siguientes: 1 ciclo (95°C durante 9 minutos), 10 ciclos (94°C durante 20 segundos, 50°C durante 30 segundos, 72°C durante 30 segundos) y 1 ciclo (72°C durante 5 minutos).

La primera mezcla de modificación por PCR (50 µl) contenía 1 x Amplitaq Gold Buffer, 2 mM de MgCl₂, 5 unidades de ADN polimerasa Amplitaq Gold (Branchburg, New Jersey), 0,25 mM de cada dNTP (New England Biolabs, Beverly, Massachusetts), 5 µl (20%) de la reacción de ensamblaje (véase más arriba) y 0,5 µM de cada cebador de PCR (Oligos Etc., Inc., Wilsonville, Oregon) [*P. Falciparum* = fMSP1-F1 (SEQ ID NO: 57) y fMSP1-R1 (SEQ ID NO: 58)] o [*P. Vivax* = VMSP1-F1 (SEQ ID NO: 59) y vMSP1-R1 (SEQ ID NO: 60)]. Las condiciones de ciclo térmico fueron las siguientes: 1 ciclo (95°C durante 9 minutos), 35 ciclos (94°C durante 20 segundos, 50°C durante 30 segundos, 72°C durante 30 segundos) y 1 ciclo (72°C durante 5 minutos). Las PCR (50 µl) se sometieron a electroforesis en un gel de agarosa al 1,0%, y los amplicones se extrajeron de la agarosa utilizando el QIAEX II Agarose Gel Extraction Kit (Qiagen, Valencia, California) de acuerdo con el folleto adjunto.

La segunda mezcla de modificación por PCR (25 µl) contenía 1 x LA Taq PCR Buffer, MgCl 2,5 mM₂, 0,2 mM de cada dNTP, 1,7 unidades de ADN polimerasa LA Taq por PCR (Takara, Otsu, Shiga, Japón), 1,0 µl (5%) del amplicón purificado de la primera PCR y 0,5 µM de cada cebador de PCR (Oligos Etc., Inc., Wilsonville, Oregon) [*P. Falciparum* = fMSP1-F1 (SEQ ID NO: 57) y pL-His (SEQ ID NO: 61)] o [*P. Vivax* = vMSP1-F1 (SEQ ID NO: 59) y pL-His (SEQ ID NO: 61)]. Las condiciones de ciclo térmico fueron las siguientes: 1 ciclo (94°C durante 2 minutos), 5 ciclos (94°C durante 30 segundos, 43°C durante 30 segundos, 72°C durante 2 minutos), 35 ciclos (94°C durante 30 segundos, 65°C durante 30 segundos, 72°C durante 2 minutos) y 1 ciclo (72°C durante 10 minutos). Las PCR se sometieron a electroforesis en un gel de agarosa al 1,0%, y los amplicones se extrajeron de la agarosa utilizando el QIAEX II Agarose Gel Extraction Kit (Qiagen, Valencia, California) de acuerdo con el folleto adjunto. Cada amplicón purificado se digirió en una reacción de 100 µl durante 45 minutos 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 EcoRI Buffer (New England Biolabs, Beverly, Massachusetts). Los productos de digestión se purificaron utilizando el QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Valencia, California) de acuerdo con el folleto adjunto.

Preparación de genes sintéticos MSP1-p19 de *P. malariae* y *P. ovale*

Se cultivaron células de *E. coli* que contenían clones de plásmidos de los genes MPS1-p19 sintéticos de *P. malariae* y *P. ovale* [GenScript Corp. (Piscataway, New Jersey)], y se purificaron los plásmidos utilizando el kit de purificación de ADN Wizard Plus SV Minipreps (Promega, Madison, Wisconsin) de acuerdo con el folleto adjunto. Cada plásmido se digirió en una reacción de 200 µl durante 1 h. a 37°C en presencia de 100 unidades de la enzima de restricción EcoRI, 100 unidades de la enzima de restricción BamHI y 1 x EcoRI Buffer (New England Biolabs, Beverly, Massachusetts). Las digestiones se sometieron a electroforesis en un gel de agarosa al 8% con bromuro de etidio en TAE para separar el inserto del vector. Los insertos de aproximadamente 350 pares de bases se separaron a continuación del gel de agarosa y el ADN se extrajo de la agarosa utilizando el QIAEX II Agarose Gel Extraction Kit (Qiagen, Valencia, California) de acuerdo con el folleto adjunto.

Preparación del vector de expresión de la fusión de CKS para su clonación

Se cultivaron células de *E. coli* que contenían el vector de expresión de la fusión de CKS pJO200 (Abbott Laboratories, Abbott Park, Illinois) y el plásmido se purificó utilizando Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification Kit (Promega, Madison, Wisconsin) de acuerdo con el folleto adjunto. El plásmido (10 µg) se digirió en una reacción de 1500 µl durante 2,5 h. 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 EcoRI Buffer (New England Biolabs, Beverly, Massachusetts). Las digestiones se sometieron a electroforesis en un gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio en TAE para separar el inserto del vector. El vector linealizado se escindió a continuación del gel de agarosa y el ADN se extrajo de la agarosa utilizando el QIAEX II Agarose Gel Extraction Kit (Qiagen, Valencia, California) de acuerdo con el folleto adjunto.

Clonación de los insertos de MSP1-p19 en el vector de expresión

Se añadió una porción (2 µl) de cada uno de los cuatro insertos purificados de MSP1-p19 digeridos con EcoRI/BamHI (véase más arriba) a reacciones de ligación separadas (10 µl) que contenían el vector de expresión pJO200 (-0,6 µg, véase más arriba) digerido con EcoRI/BamHI, 1 x T4 DNA Ligase Buffer y 400 unidades T4 DNA Ligase (New England Biolabs, Beverly, Massachusetts). Las reacciones de ligación se incubaron durante la noche a

4°C o 16°C y a continuación se transformaron en competentes XL1-Blue de *E. coli* (Stratagene, La Jolla, California) de acuerdo con el folleto adjunto. Los plásmidos se purificaron a partir de los clones XL1-Blue como se describió anteriormente y se transformaron en células competentes de la Cepa BL21 de *E. Coli* deficiente en proteasa (Novagen, Madison, Wisconsin) de acuerdo con el folleto adjunto.

Expresión y purificación de proteínas recombinantes MSP1-p19

Las células BL21 que contenían cada uno de los cuatro plásmidos de expresión de MSP1-p19 (véase más arriba) se hicieron crecer en cultivos separados de 100 ml a 37°C hasta que se alcanzó una DO595 de aproximadamente 0,5, momento en el que 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 cosecharon por centrifugación y las células sedimentadas se lisaron con BugBuster Extraction Reagent (Novagen, Madison, Wisconsin) de acuerdo con el folleto adjunto. La MSP1-p19 expresada presente en la fracción soluble de cada producto lisado se purificó utilizando un kit de purificación His·Bind (Novagen, Madison, Wisconsin) de acuerdo con el folleto adjunto. Las proteínas recombinantes purificadas se dializaron en tampón fosfato 0,01 M, pH 7,4 que contenía NaCl 0,15 M (PBS) antes de la cuantificación.

Ejemplo 5

Análisis Filogenético de Secuencias MSP1

Los organismos relacionados generalmente tienen un alto grado de concordancia en la estructura molecular del ADN, ARN y proteínas, mientras que las moléculas de los organismos distantemente relacionados suelen mostrar un patrón de disimilitud. La filogenia molecular utiliza datos de secuencia para construir un "árbol de relación" que muestra la probable evolución de varios organismos sobre la base del grado de disimilitud entre las secuencias. Las relaciones evolutivas entre las especies de plasmodium se han examinado utilizando secuencias de genes que codifican proteínas (p.ej., citocromo b o circunsporozoito) o moléculas de ARN (es decir, ARN ribosómico de subunidad pequeña, ARNss o ARN 18S). Algunos de estos genes (citocromo b y ARNss) son los genes constitutivos que se conservan altamente no sólo dentro del phylum Apicomplexa, en donde se clasifica el género Plasmodium, sino también en organismos multicelulares. Tales genes acumulan mutaciones lentamente y por tanto las relaciones antiguas no han sido oscurecidas por acontecimientos aleatorios de mutación, como puede ocurrir en los genes que son menos esenciales o están bajo intensa presión de selección inmunológica. Las secuencias génicas del citocromo b y ARNss de *P. ovale* y *P. malariae* se han utilizado para examinar su relación evolutiva con especies de plasmodium de primates, roedores y aves (Perkins y Schall, 2002, J. Parasitol. 88:972-978; Escalante y Ayala, 1995, PNAS 91:11373-11377; Leclerc et al., 2004, Parasitology 129: 677-684). Basándose en estos análisis publicados, aunque sus orígenes evolutivos siguen siendo un tema de debate, se ha demostrado que *P. ovale* y *P. malariae* son los únicos Plasmodium parásitos de los seres humanos.

Las secuencias de la proteína MSP1 de *P. ovale* y *P. malariae* se compararon con todos los genes ortólogos disponibles de otros parásitos plasmodium de primates, seres humanos y aves para determinar su grado de relación. Las secuencias de aminoácidos de MSP1 completa para *P. malariae* (SEQ ID NO: 1) y *P. ovale* (SEQ ID NO: 3) se alinearon con otras 14 secuencias de la proteína MSP1 completa disponibles en GenBank (véase la Tabla 1). Los alineamientos se realizaron con el soporte lógico CLUSTALW (Thompson et al., 1994, Nucl. Acids Res. 22:4673-4680). Se produjeron árboles filogenéticos utilizando el soporte lógico MEGA4 (Tamura et al., 2007, Mol. Biol. Evol. 24:1596-1599) bajo tres modelos evolutivos diferentes.

Los modelos están en acuerdo básico en que todas las secuencias de roedor y primate (mono) forman subgrupos con soporte de remuestreo de datos significativo (es decir, >70%). *P. ovale* y *P. malariae* no son absorbidos por ninguno de los grupos de secuencias de roedores o primates, ni están agrupados en ninguno de los modelos. Las secuencias de MSP1 de *P. Ovale* y *P. malariae* ocupan las ramas en el centro del árbol, lo que indica que son lo suficientemente divergentes de todas las otras secuencias (y entre sí) como para ocupar ramas individuales en el árbol.

Tabla 1

Secuencias MSP1 de especies de plasmodium de GenBank		
Especie	Anfitrión	Núm. de acceso
<i>P. berghei</i>	Roedor	AAF13063.1
<i>P. chabaudi</i>	Roedor (<i>Thamnomys rutilans</i>)	AAA29499.1
<i>P. coatneyi</i>	Primate (<i>Macaca fascicularis</i>)	BAF74048.1
<i>P. cynomolgi</i>	Primate	BAF74063.1
<i>P. falciparum</i>	Humano	BAF62278.1

Secuencias MSP1 de especies de plasmodium de GenBank		
<u>Especie</u>	<u>Anfitrión</u>	<u>Núm. de acceso</u>
<i>P. frágil</i>	Primate (Macaca sinica)	BAF74049.1
<i>P. gallinaceum</i>	Pájaro (Gallus gallus)	CAH10838.1
<i>P. hylobati</i>	Primate (gibón)	BAF74050.1
<i>P. inui</i>	Primate (Cynopithecus niger)	BAF74051.1
<i>P. knowlesi</i>	Primate (Macaca fascicularis)	BAF74052.1
<i>P. reichenowi</i>	Chimpancé (Pan troglodytes)	CAH10285.1
<i>P. simiovale</i>	Primate (Macaca sinica)	BAF74053.1
<i>P. vivax</i>	Humano	AAA63427.1
<i>P. yoelii</i>	Roedor (Thamnomys rutilans)	EAA17822.1

Ejemplo 6

Preparación de Micropartículas

Las micropartículas se recubrieron con antígenos recombinantes clonados de las regiones MSP1 de Plasmodium.

Micropartículas para el ensayo de anticuerpos:

Se utilizaron las siguientes proteínas recombinantes para recubrir las micropartículas para el ensayo de anticuerpos.

A. Preparación de Proteínas Recombinantes:

Véase el Ejemplo 4 anterior.

- i. *P. ovale* MSP1-19.
- ii. *P. malariae* MSP1-19.
- iii. *P. falciparum* MSP1-19.
- iv. *P. vivax* MSP1-19.

A1. Preparación de micropartículas recubiertas con antígeno r

i. Preparación de partículas recubiertas con un solo antígeno

Las micropartículas recubiertas con una de las proteínas MSP1-19 recombinantes se prepararon de la siguiente manera. En resumen, se mezclaron una alícuota de 250 µl de micropartículas (4% en peso/volumen, 3,2 micrómetros de diámetro (Interfacial Dynamics Corp., Portland, Oregón) y 1,25 ml de un tampón de recubrimiento (ácido 2- (N-morfolino) etanosulfónico (MES) Tampón, 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 de MES y se añadieron 100 µg de una de las proteínas recombinantes. (En este ejemplo, solución de MSP1-19 de *P. ovale*: 350 µl para una concentración final de 0,12 mg/ml; solución de MSP1-19 de *P. malariae*: 200 µl para una concentración final de 0,14 mg/ml; solución de MSP1 - 19 de *P. Vivax*: 15,3 µl para una concentración final de 0,19 mg/ml; o solución de MSP1-19 de *P. falciparum*: 10 µl para una concentración final de 0,20 mg/ml.) La solución de micropartículas/proteína se mezcló y se volteó 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 sacarosa al 11,5%). La concentración de micropartículas se determinó mediante absorbancia a 700 nm en comparación con una curva patrón preparada a partir de concentraciones conocidas de micropartículas. La solución de micropartículas se diluyó hasta una concentración final de 0,05% en Diluyente de Micropartículas.

ii. Preparación de partículas recubiertas con antígenos mixtos

Las micropartículas recubiertas con una mezcla de las proteínas MSP1-19 recombinantes se prepararon de la siguiente manera. En resumen, se mezclaron una alícuota de 250 µl de micropartículas (4% en peso/volumen, 3,2

micrómetros de diámetro (Interfacial Dynamics Corp., Portland, Oregón) y 1,25 ml de un tampón de recubrimiento (tampón 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 de MES y se añadieron 25 µg de cada una de las proteínas recombinantes (solución de MSP1-19 de *P. ovale*: 87,5 µl; solución de MSP1-19 de *P. malariae*: 50 µl; solución de MSP1-19 de *P. vivax*: 3,8 µl; solución de MSP1-19 de *P. falciparum*: 2,5 µl). La solución de micropartículas/proteína se mezcló y se volteó 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 PBS (pH 7,2) 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 sacarosa al 11,5%). La concentración de micropartículas se determinó mediante absorbancia a 700 nm en comparación con una curva patrón preparada a partir de concentraciones conocidas de micropartículas. La solución de micropartículas se diluyó hasta una concentración final de 0,05% en Diluyente de Micropartículas.

iii. Combinación de partículas recubiertas con un solo antígeno

Las micropartículas recubiertas con un solo antígeno se resuspendieron hasta una concentración de 0,1% en el Diluyente de Micropartículas. Se mezcló un volumen igual de cada una de las cuatro disoluciones de partículas para formar la mezcla de partículas recubiertas con un solo antígeno con una concentración final de partículas de 0,1%.

Ejemplo 7

Preparación de productos conjugados marcados con acridinio

A. Producto conjugado para el ensayo de anticuerpos:

Para el ensayo de anticuerpos, la IgG anti-humana de ratón marcada directamente con acridinio puede prepararse de la siguiente manera:

(i) Anti-IgG humana de ratón marcada con acridinio:

Se añadieron 53,6 µl de tampón de conjugación (CB) que contenía fosfato de sodio, NaCl, 3-(3-cloramidopropil)-dimetilamonio-1-propano-sulfonato (CHAPS, Sigma Chemical Company, Saint Louis, MO), pH 8,0 y 7,2 µl de éster de N-hidroxisuccinimida de 10-(3-sulfopropil)-N-tosil-N-(2-carboxietil)-9-acridiniocarboxamida (4 mg/ml en dimetilformamida) a 131 µl de anti-IgG humana de ratón (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 cargando la mezcla de reacción sobre 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 había sido equilibrada con tampón que contenía CHAPS, NaCl y fosfato sódico, pH 6,3. La columna se eluyó a 1,0 ml/min con el mismo tampón utilizando un controlador Beckman 421A equipado con una bomba modelo 114M. Se recogieron fracciones de 1 ml y se determinó la absorbancia a 280 nm y 370 nm con un espectrofotómetro Beckman DU-7. El grado de incorporación de acridinio se calculó como se ha descrito en la Patente de Estados Unidos Núm. 5.705.330. La proporción de acridinio a IgG (mol/mol) obtenida fue de aproximadamente 2,5. El producto conjugado se almacenó a 4°C.

Ejemplo 8

Ensayo PRISM de anticuerpos anti-Plasmodium

El ensayo PRISM de anticuerpos se describe en Patente de Estados Unidos Núm. 5.705.330, y los ensayo de antígeno y anticuerpo PRISM son descritos por Shah and Stewart, The Immunoassay Handbook, segunda edición, editado por David Wild, págs 297-303 (2001).

Con respecto a la presente invención, se utilizaron los procedimientos siguientes:

Ensayo de anticuerpos de especies individuales de Plasmodium:

El formato de ensayo se proporciona en la Figura 15. En general, en la estación se dispensaron 1,50 µl de control o muestra, 50 µl de tampón diluyente de espécimen (SDB, tampón de borato, pH 7,5 que contenía Tween 20, tritón X-100, urea, suero bovino, suero de ternero recién nacido, NaCl, producto lisado de *E. coli* y azida), y se dispensaron 50 µl de micropartículas individuales recubiertas con antígeno recombinante [(preparadas como se ha descrito en el Ejemplo (6) (A1) (i) anterior] a cada pocillo de incubación y se inició el tiempo de ensayo. Éstas se mezclaron por difusión mutua entre sí sin agitación o movimiento de vaivén externos para formar una mezcla de reacción. En la estación 4, la mezcla de reacción se transfirió a un pocillo de detección que contenía una matriz fibrosa y se lavó dos veces con 300 µl de lavado de transferencia (TW, que contenía tampón borato, pH 7,0, con NaCl, Tween-20, Glicerol, urea y Proclin 300). Después de 18 minutos de incubación a 37 grados C, se dispensaron 50 µl de anti-

anticuerpo humano marcado con acridinio a la matriz del pocillo de detección en la estación 5. El pocillo se incubó durante 23 minutos a 37 grados 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 alcalina de peróxido de hidrógeno, y los fotones se midieron mediante un tubo fotomultiplicador. La cantidad de luz emitida es proporcional a la cantidad de anticuerpo en la muestra. La presencia o ausencia de anticuerpo en la muestra se determina comparando el número de fotones recogidos de la muestra con un valor negativo (S/N). Los resultados se expresan como S/N (señal a negativo) en la Tabla 2 a continuación. Las muestras que tienen una S/N superior a 5,0 se consideran reactivas para el antígeno. Los resultados se comparan con los resultados obtenidos a partir de un inmunoensayo ligado a enzima comercialmente disponible.

Ensayo de Anticuerpo de Plasmodium de cuatro especies:

El formato de ensayo se proporciona en la Figura 15. Generalmente, en la estación 1, se dispensaron 50 µl de control o muestra, 50 µl de SDB y 50 µl de micropartículas recubiertas de antígenos recombinantes mixtos [preparadas como se ha descrito en el Ejemplo (6) (A1) (ii) anterior] o 50 µl de micropartículas recubiertas de antígeno recombinante individuales combinadas [preparadas como se ha descrito en el Ejemplo (6) (A1) (iii) anterior] a cada pocillo de incubación, y se inició el tiempo de ensayo.

Éstas se mezclaron por difusión mutua entre sí sin agitación o movimiento de vaivén externos para formar una mezcla de reacción. En la estación 4, la mezcla de reacción se transfirió a un pocillo de detección, que contenía una matriz fibrosa y se lavó dos veces con 300 µl de TW. Después de 18 minutos de incubación a 37 grados C, se dispensaron 50 µl de anti-anticuerpo humano marcado con acridinio a la matriz del pocillo de detección en la estación 5. El pocillo se incubó durante 23 minutos a 37 grados C y la matriz fibrosa que contenía la mezcla de reacción se lavó tres veces con 100 µl de FW en la estación 8. En la estación 9, se generó una señal de quimioluminiscencia (CL) mediante la adición de una solución alcalina de peróxido de hidrógeno, y los fotones se midieron mediante un tubo fotomultiplicador. La cantidad de luz emitida es proporcional a la cantidad de anticuerpo en la muestra. La presencia o ausencia de anticuerpo en la muestra se determina comparando el número de fotones recogidos de la muestra con un valor negativo (S/N). Los resultados se expresan como S/N en la Tabla XII a continuación. Las muestras que tienen una S/N superior a 5,0 se consideran reactivas para el antígeno. Los resultados se comparan con los resultados obtenidos de un inmunoensayo enzimático ligado a enzima asequible comercialmente (Newmarket Labs., Kentford, UK).

Tabla 2

Detección de muestras de <i>P. ovale</i> y <i>P. malariae</i> con PoMSP1-19 y PmMSP1-19				
ID Muestra	Especie determinada por frotis de sangre	Micropartícula		Resultados de la prueba ELISA comercial
		PoMSP1-19	PmMSP1-19	
01	<i>P. ovale</i>	29,63	1,49	positivo
19	<i>P. ovale</i>	40,25	15,12	positivo
20	<i>P. ovale</i>	2,28	1,73	negativo
21	<i>P. ovale</i>	84,90	31,82	positivo
23	<i>P. ovale</i>	80,73	11,57	positivo
24	<i>P. ovale</i>	32,92	3,85	positivo
25	<i>P. ovale</i>	44,06	0,97	negativo
26	<i>P. ovale</i>	31,31	3,78	negativo
2	<i>P. malariae</i>	1,29	8,88	negativo
15	<i>P. malariae</i>	0,99	20,25	negativo

Tabla 3

Detección de muestras de <i>P. falciparum</i> y <i>P. vivax</i> con PfMSP1-19 y PvMSP1-19				
ID Muestra	Especie determinada por frotis de sangre	Micropartícula		Resultados de la prueba ELISA comercial
		PvMSP1-19	PfMSP1-19	
1	<i>P. vivax</i>	7,40	1,63	Positivo

Detección de muestras de <i>P. falciparum</i> y <i>P. vivax</i> con PfMSP1-19 y PvMSP1-19				
ID Muestra	Especie determinada por frotis de sangre	Micropartícula		Resultados de la prueba ELISA comercial
		PvMSP1-19	PfMSP1-19	
2	<i>P. vivax</i>	89,38	1,39	Positivo
5	<i>P. vivax</i>	97,07	1,13	Positivo
9	<i>P. vivax</i>	90,17	1,17	Positivo
10	<i>P. vivax</i>	5,47	1,38	Positivo
11	<i>P. vivax</i>	105,07	60,22	Positivo
12	<i>P. vivax</i>	28,84	3,31	Positivo
14	<i>P. vivax</i>	75,24	54,86	Positivo
6	<i>P. falciparum</i>	1,23	133,29	Positivo
17	<i>P. falciparum</i>	35,34	7,36	Positivo
18	<i>P. falciparum</i>	38,41	3,92	Positivo
16	<i>P. falciparum</i>	23,13	65,58	Positivo

Tabla 4

Detección multiespecífica utilizando recubrimiento recombinante mixto o micropartículas de recubrimiento individuales combinadas				
ID Muestra	Especie determinada por frotis de sangre	Micropartícula		Resultados de la prueba ELISA comercial
		Recubrimiento Recombinante Mixto	Recubrimiento Individual Combinado	
01	<i>P. ovale</i>	15,57	20,41	positivo
19	<i>P. ovale</i>	99,31	63,90	positivo
20	<i>P. ovale</i>	2,03	1,83	negativo
21	<i>P. ovale</i>	78,71	58,97	positivo
23	<i>P. ovale</i>	62,03	49,27	positivo
24	<i>P. ovale</i>	33,74	34,29	positivo
25	<i>P. ovale</i>	16,94	21,19	negativo
26	<i>P. ovale</i>	27,44	23,95	negativo
1	<i>P. vivax</i>	2,54	3,49	positivo
2	<i>P. vivax</i>	59,88	47,38	positivo
5	<i>P. vivax</i>	65,85	44,38	positivo
9	<i>P. vivax</i>	73,14	45,25	positivo
10	<i>P. vivax</i>	2,32	2,43	positivo
11	<i>P. vivax</i>	81,37	65,27	positivo
12	<i>P. vivax</i>	18,35	19,27	positivo
14	<i>P. vivax</i>	78,32	52,69	positivo
6	<i>P. falciparum</i>	87,76	54,63	positivo
17	<i>P. falciparum</i>	31,40	25,33	positivo
18	<i>P. falciparum</i>	37,35	23,50	positivo

Detección multiespecífica utilizando recubrimiento recombinante mixto o micropartículas de recubrimiento individuales combinadas				
ID Muestra	Especie determinada por frotis de sangre	Micropartícula		Resultados de la prueba ELISA comercial
		Recubrimiento Recombinante Mixto	Recubrimiento Individual Combinado	
16	<i>P. falciparum</i>	42,98	27,04	positivo
2	<i>P. malariae</i>	3,38	5,70	negativo
15	<i>P. malariae</i>	11,41	10,04	negativo

Las muestras 25, 26, 2 y 15 fueron reactivas tanto en el recubrimiento con antígenos mixtos como en los ensayos de recubrimiento individuales combinados, pero fueron negativas en el ELISA comercial, demostrando una detección mejorada utilizando antígenos recombinantes que representan las cuatro especies de Plasmodium.

Ejemplo 9

Detección de anticuerpos IgG utilizando antígenos recombinantes MSP1-19 de *P. ovale* y *P. malariae*

La detección de anticuerpos en suero o plasma dirigidos contra la proteína MSP1-19 de *P. ovale* y *P. malariae* se realizó mediante un inmunoensayo enzimático (EIA). Los antígenos recombinantes CKS-MSP1-19 descritos en el Ejemplo 4 se recubrieron sobre un soporte de fase sólida y los anticuerpos presentes en las muestras de ensayo que se unieron a las proteínas recombinantes se detectaron utilizando un producto conjugado anti-anticuerpo humano de cabra - peroxidasa rábano picante.

Recubrimiento de esferas de poliestireno:

Se utilizaron esferas de poliestireno de 6,4 mm (un cuarto de pulgada) como fase sólida para los EIA de péptidos. Antes del recubrimiento, las esferas se lavaron con 1-propanol al 15% (en agua) a temperatura ambiente durante 20 minutos sin agitación. Se eliminó el propanol y las esferas se aclararon dos veces con agua desionizada. A continuación, las esferas lavadas se añadieron a un vial que contenía antígeno recombinante diluido a 0,25-5 microgramos por mL en fosfato sódico 0,1 M, pH 7,0 (0,233 ml por esfera). Las esferas se incubaron a 40°C durante 2 horas mezclando suavemente. Las esferas se lavaron a continuación tres veces con PBS y después se incubaron en PBS que contenía Triton X-100 al 0,1% a 40°C durante 1 hora mezclando suavemente. Se volvieron a lavar tres veces en PBS y a continuación se incubaron a 40°C en BSA al 5% en PBS durante 1 hora mezclando suavemente. Las esferas se lavaron cuatro veces con PBS y a continuación se incubaron a temperatura ambiente en PBS que contenía sacarosa al 5% sin mezclar durante 20 minutos. El tampón de sacarosa se retiró y las esferas se secaron al aire. Las esferas recubiertas se almacenaron desecadas a 4°C.

Método de inmunoensayo:

Se sometieron a ensayo suero y plasma para determinar su inmunoreactividad con esferas de poliestireno recubiertas con CKS-MSP1-19. Los especímenes se diluyeron 1:16 en tampón diluyente (tampón Tris-fosfato pH 7,8 que comprendía suero de cabra al 20%, suero de ternera al 10%, Triton X-100 al 0,2% y azida de sodio) y se añadieron 0,010 ml a un pocillo de una bandeja de ensayo de plástico y a continuación se combinaron con 0,20 ml adicionales del mismo tampón diluyente para una dilución final de la muestra de 1:336. La esfera recubierta de proteína recombinante se añadió a la muestra diluida y se incubó a 37°C durante 90 minutos mezclando. Las esferas se lavaron a continuación con 11-14 ml de agua desionizada seguido de la adición de 0,2 ml de IgG anti-humano de cabra marcada con peroxidasa (0,02 microgramos por ml). Las esferas se incubaron a 37°C durante 30 min mezclando. 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 OPD (O-fenilendiamina-2-HCl al 0,3% en tampón citrato que contenía 0,02% de H₂O₂) y se incubaron en la oscuridad a temperatura ambiente durante 30 minutos sin mezclar. Las reacciones se sofocaron 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 calculan relaciones de señal a negativo (S/N) para cada muestra de ensayo dividiendo la DO de la muestra de ensayo por la DO media de control negativo. Se supuso que los especímenes con valores S/N mayores o iguales a 5,00 (valor de corte provisional) eran inmunorreactivos.

Individuos infectados con Plasmodium:

Las muestras de suero humano de individuos infectados con *P. ovale*, *P. malariae*, *P. falciparum* o *P. vivax* fueron

obtenidas de Marianna Wilson, Jefe, Laboratorio de Immunodiagnostic de Referencia, Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades, Atlanta, GA, EEUU. Se proporcionaron títulos de anticuerpos inmunofluorescentes para cada especie de plasmodio infectivo humano para cada muestra, al igual que la identificación de la especie de plasmodio determinada mediante frotis sanguíneo (véase la Tabla 5, más adelante). Todas las muestras se recogieron antes de 1990 y se consideraron "especímenes humanos residuales anónimos" ya que los registros originales sobre la identidad del donante/paciente ya no existen.

Tabla 5

Muestra	Especies	Resultados del IFA CDC			
		P. vivax	P. falciparum	P. malariae	P. ovale
Pv-1	<i>P. vivax</i>	1024	64	<4	16
Pv-2	<i>P. vivax</i>	>4096	64	16	64
Pv-5	<i>P. vivax</i>	>4096	64	16	256
Pv-9	<i>P. vivax</i>	1024	64	64	256
Pv-10	<i>P. vivax</i>	>4096	64	16	64
Pv-11	<i>P. vivax</i>	1024	64	4	256
Pv-12	<i>P. vivax</i>	>4096	64	16	16
Pv-14	<i>P. vivax</i>	1024	256	4	16
Pf-6	<i>P. falciparum</i>	64	1024	16	64
Pf-16	<i>P. falciparum</i>	64	256	64	64
Pf-17	<i>P. falciparum</i>	256	256	64	256
Pf-18	<i>P. falciparum</i>	256	1024	64	64
Pm-2	<i>P. malariae</i>	16	64	>4096	64
Pm-15	<i>P. malariae</i>	64	>4096	>4096	64
Po-1	<i>P. ovale</i>	<4	256	16	1024
Po-19	<i>P. ovale</i>	256	64	64	1024
Po-20	<i>P. ovale</i>	<4	16	<4	256
Po-21	<i>P. ovale</i>	256	64	64	1024
Po-23	<i>P. ovale</i>	<4	256	64	1024
Po-24	<i>P. ovale</i>	4	64	4	64
Po-25	<i>P. ovale</i>	<4	16	4	256
Po-26	<i>P. ovale</i>	64	64	64	256

EIA de Anticuerpo Po y Pm - MSP1-19:

La presencia de anticuerpos IgG contra Po-MSP1-19 y Pm-MSP1-19 se determinó utilizando el procedimiento descrito anteriormente en aquellos individuos que se demostró que estaban infectados con *P. malariae* o *P. ovale* mediante IFA y/o frotis de sangre. Las razones S/N obtenidas se muestran en la Tabla 6, a continuación. Los especímenes también se sometieron a ensayo en cuanto a la presencia de anticuerpos anti-Plasmodium utilizando un ensayo ELISA disponible comercialmente (NewMarket Labs., Kentford, RU).

Tabla 6

Muestra	Especie determinada por frotis de sangre	Esfera recubierta de antígeno		Resultados de la prueba ELISA comercial
		P. malariae CKS-MSP1-19	P. ovale CKS-MSP1-19	
Pm-2	<i>P. malariae</i>	67,42	0,90	Negativo
Pm-15	<i>P. malariae</i>	7,96	0,55	Negativo

Muestra	Especie determinada por frotis de sangre	Esfera recubierta de antígeno		Resultados de la prueba ELISA comercial
		P. malariae CKS-MSP1-19	P. ovale CKS-MSP1-19	
Po-1	<i>P. ovale</i>	4,31	100,00	Positivo
Po-19	<i>P. ovale</i>	6,34	43,70	Positivo
Po-20	<i>P. ovale</i>	0,51	11,50	Negativo
Po-21	<i>P. ovale</i>	24,84	100,00	Positivo
Po-23	<i>P. ovale</i>	5,33	100,00	Positivo
Po-24	<i>P. ovale</i>	1,25	47,80	Positivo
Po-25	<i>P. ovale</i>	0,78	44,30	Negativo
Po-26	<i>P. ovale</i>	2,16	69,25	Negativo

Estos datos demuestran que los individuos con infecciones por *P. ovale* o *P. malariae* poseen anticuerpos IgG MSP1-19 específicos de la especie detectables. Además, las muestras que resultan negativas en el ELISA comercial son positivas para anticuerpos en al menos uno de los EIA de esferas. La inmunorreactividad cruzada aparente observada corresponde en algunos casos a los resultados del ensayo de anticuerpos inmunofluorescentes, es decir, muchos individuos tienen anticuerpos contra más de una especie de Plasmodium.

Ejemplo 10

Detección de anticuerpos IgG contra MSP1-19 de *P. ovale* y *P. malariae* en muestras de fuentes de clonación génica

Se sometieron a ensayo muestras de suero humano de donantes de sangre de África Occidental para determinar la presencia de anticuerpos MSP1-19 de *P. ovale* y *P. malariae* utilizando el ensayo descrito en el Ejemplo 9. África occidental es endémica para la malaria incluyendo *P. falciparum*, *P. malariae*, *P. ovale*, y en menor medida, *P. vivax*. También se obtuvieron muestras de sangre completa de los mismos donantes para la extracción de ADN y posterior análisis utilizando un ensayo de PCR para la detección de secuencias de genes de ADN ribosómico (véase el Ejemplo 1) que permitió la identificación de las especies de plasmodio presentes en el momento en que se obtuvo la donación. Se utilizó ADN extraído de la sangre del donante 0014 como fuente de clonación para MSP1 de *P. malariae*. Se utilizó ADN extraído de la sangre del donante 510-10 como fuente de clonación para MSP1 de *P. ovale*. Los fragmentos MSP1-P19 de estos genes se clonaron y se expresaron como fusiones de CKS en *E. coli* (Ejemplo 4), se aplicaron como recubrimiento sobre esferas y se usaron para la detección de anticuerpos como se ha descrito en el Ejemplo 9.

Los resultados que se muestran en la Tabla 7 a continuación (valores S/N) demuestran que los anticuerpos IgG contra *P. malariae* MSP1-19 están presentes en el suero del Donante 0014, la fuente de clonación para MSP1 de *P. malariae*. Igualmente, los anticuerpos IgG contra MSP1 de *P. ovale* están presentes en el suero del donante 510-10, la fuente de clonación para MSP1 de *P. ovale*. Se ha demostrado que el suero de dos donantes de sangre adicionales que está infectado con *P. malariae* también exhibe inmunorreactividad de IgG con el antígeno de tipo homólogo. Se ha demostrado que el suero de dos de los otros tres donantes de sangre *P. ovale* exhibe inmunorreactividad con antígeno de tipo homólogo.

Estos datos indican que el suero de individuos con parasitemia por *P. malariae* portan anticuerpos dirigidos contra el antígeno MSP1-19 de *P. malariae*. Del mismo modo, el suero de individuos con parasitemia por *P. ovale* alberga anticuerpos contra el antígeno MSP1-19 de *P. ovale*.

Tabla 7

ID Muestra	Especies identificadas mediante PCR de ADNr	<u>P. malariae</u> EIA de esferas con MSP1-19, S/N	<u>P. ovale</u> EIA de esferas con MSP1-19, S/N
0014	Pm, Pf	55,94	3,82
609-39	Pm, Pf	55,94	4,79
240-16	Pm, Pf	46,13	6,07
510-10	Correos	55,94	87,91

ID Muestra	Especies identificadas mediante PCR de ADNr	<u>P. malariae</u> EIA de esferas con MSP1-19, S/N	<u>P. ovale</u> EIA de esferas con MSP1-19, S/N
283-4	Correos	24,98	76,18
1045-36	Po, Pf	27,50	3,30
684-22	Po, Pf	55,94	35,96

Ejemplo 11

Detección de anticuerpos IgG contra MSP1-19 de *P. falciparum* y *P. vivax*

La detección de anticuerpos MSP1-19 de *P. vivax*, y *P. falciparum* se realizó utilizando EIA individuales. Se aplicaron como recubrimiento antígenos de fusión de MSP1-19 y CKS recombinantes de cada especie de plasmodio (véase el Ejemplo 4) sobre esferas de poliestireno como se ha descrito en el Ejemplo 9. Los anticuerpos IgG se midieron en el suero de individuos que se demostró que estaban infectados con *P. vivax* o *P. falciparum* utilizando el método EIA indirecto descrito en el Ejemplo 9. Las razones de señal a negativo (S/N) se muestran en la Tabla 8. Los especímenes también se sometieron a ensayo para determinar la presencia de anticuerpos anti-plasmodio utilizando un ensayo ELISA disponible comercialmente (NewMarket Labs., Kentford, UK).

Tabla 8

		Esfera recubierta de antígeno		
Muestra	Especie determinada por frotis de sangre	CKS-MSP1-19 de <i>P. falciparum</i>	CKS-MSP1-19 de <i>P. vivax</i>	Resultados de la prueba ELISA comercial
Pv-1	<i>P. vivax</i>	1,27	62,12	Positivo
Pv-2	<i>P. vivax</i>	1,34	67,42	Positivo
Pv-5	<i>P. vivax</i>	1,34	67,42	Positivo
Pv-9	<i>P. vivax</i>	0,61	67,42	Positivo
Pv-10	<i>P. vivax</i>	1,70	49,52	Positivo
Pv-11	<i>P. vivax</i>	10,63	67,42	Positivo
Pv-12	<i>P. vivax</i>	0,54	40,96	Positivo
Pv-14	<i>P. vivax</i>	11,39	67,42	Positivo
Pf-6	<i>P. falciparum</i>	72,29	0,98	Positivo
Pf-16	<i>P. falciparum</i>	7,81	2,93	Positivo
Pf-17	<i>P. falciparum</i>	1,77	14,63	Positivo
Pf-18	<i>P. falciparum</i>	1,01	8,19	Positivo

Estos resultados demuestran la capacidad de las proteínas de fusión MSP1-19 para detectar anticuerpos en individuos infectados con especies de plasmodio de tipo homólogo. La inmunoreactividad cruzada entre especies aparente observada corresponde en algunos casos a los resultados del ensayo de anticuerpos inmunofluorescentes, es decir, muchos individuos tienen anticuerpos contra más de una especie de plasmodio.

Ejemplo 12

EIA multiespecie

Detección de anticuerpos IgG contra *P. ovale*, *P. malariae*, *P. vivax* o *P. falciparum*, utilizando un único ensayo, se realizó mediante recubrimiento simultáneo de esferas de poliestireno con antígenos recombinantes CKS-MSP1-19 purificados de cada una de las cuatro especies. Las esferas se recubrieron simultáneamente con antígenos recombinantes (véase el Ejemplo 4 para la clonación y expresión de rAg MSP1-19 de Pf/Pv y Po/Pm, respectivamente) a 0,5 microgramos por ml como se ha descrito en el Ejemplo 9, excepto que para el tampón de recubrimiento se usó MES 50 mM de pH 6,3. La inmunoreactividad de sueros humanos de individuos con

infecciones por plasmodio diagnosticadas que representan cada una de las cuatro especies se determinó utilizando el método EIA descrito en el Ejemplo 9. Las razones S/N se muestran en la Tabla 9. Los especímenes también se sometieron a ensayo para determinar la presencia de anticuerpos anti-plasmodio utilizando un ensayo ELISA disponible comercialmente (NewMarket Labs, Kentford, RU).

5

Tabla 9

Muestra	Especie determinada por frotis de sangre	Esfera recubierta simultáneamente con MSP1-19 de Pf/Pv/Po/Pm	Resultados de la prueba ELISA comercial
Pv-1	<i>P. vivax</i>	58,35	Positivo
Pv-2	<i>P. vivax</i>	65,93	Positivo
Pv-5	<i>P. vivax</i>	65,93	Positivo
Pv-9	<i>P. vivax</i>	65,93	Positivo
Pv-10	<i>P. vivax</i>	47,27	Positivo
Pv-11	<i>P. vivax</i>	65,93	Positivo
Pv-12	<i>P. vivax</i>	37,62	Positivo
Pv-14	<i>P. vivax</i>	65,93	Positivo
Pf-6	<i>P. falciparum</i>	65,93	Positivo
Pf-16	<i>P. falciparum</i>	8,51	Positivo
Pf-17	<i>P. falciparum</i>	20,27	Positivo
Pf-18	<i>P. falciparum</i>	12,76	Positivo
Pm-2	<i>P. malariae</i>	65,93	Negativo
Pm-15	<i>P. malariae</i>	5,11	Negativo
Po-1	<i>P. ovale</i>	65,93	Positivo
Po-19	<i>P. ovale</i>	65,93	Positivo
Po-20	<i>P. ovale</i>	2,64	Negativo
Po-21	<i>P. ovale</i>	65,93	Positivo
Po-23	<i>P. ovale</i>	65,93	Positivo
Po-24	<i>P. ovale</i>	55,35	Positivo
Po-25	<i>P. ovale</i>	23,47	Negativo
Po-26	<i>P. ovale</i>	32,37	Negativo

Estos datos demuestran la capacidad de los antígenos de CKS-MSP1-19 de *P. ovale*, *P. malariae*, *P. vivax* y *P. falciparum* para ser aplicados como recubrimiento simultáneamente sobre un soporte sólido y conservar su capacidad para detectar anticuerpos IgG en suero de individuos infectados con una de las cuatro especies de plasmodium. Cuatro de los cinco especímenes que son negativos en el ensayo comercial son positivos en el ensayo de MSP1-19 de cuatro especies.

10

Ejemplo 13

15

Preparación de micropartículas paramagnéticas

Las micropartículas paramagnéticas se recubrieron con antígenos recombinantes clonados de las regiones MSP1 de *Plasmodium*.

20

Micropartículas para el ensayo de anticuerpos:

Se usaron las siguientes proteínas recombinantes para revestir las micropartículas para el ensayo de anticuerpos.

25

A. Preparación de Proteínas Recombinantes:

Véase Ejemplo 4 anterior.

- i. P. ovale MSP1-19.
- ii. P. malariae MSP1-19.
- iii. P. falciparum MSP1-19.
- iv. P. vivax MSP1-19.

A1. Preparación de micropartículas paramagnéticas recubiertas de antígeno r

i. Preparación de partículas recubiertas de un solo antígeno

Las micropartículas paramagnéticas recubiertas con una de las proteínas MSP1-19 recombinantes se prepararon de la siguiente manera. En resumen, se mezcló una alícuota de microplacas de 196 µl (5,1% en peso/volumen, 4,5-5,4 micrómetros de diámetro (Polymer Laboratories Ltd., Shropshire, Reino Unido) con 0,784 ml de un tampón de recubrimiento (ácido 2- (N-morfolino)etanosulfónico (MES), pH 6,0) y se separó de la solución utilizando un soporte magnético (Promega, Madison, Wisconsin), y se retiró la solución. Las partículas se resuspendieron en 1,0 ml del tampón de recubrimiento MES y se separaron de la solución utilizando un soporte magnético, y se retiró la solución. Las micropartículas lavadas se resuspendieron en tampón MES y se añadieron 25 µg de una de las proteínas recombinantes junto con 732 µg de hidrócloruro de N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida. (En este ejemplo, solución de MSP1-19 de *P. ovale*: 7,15 µl para una concentración final de 0,10 mg/ml; solución de MSP1-19 de *P. malariae*: 1,0 µl para una concentración final de 0,10 mg/ml; solución de MSP1-19 de *P. vivax*: 3,8 µl para una concentración final de 0,10 mg/ml; o solución de MSP1-19 de *P. falciparum*: 2,5 µl para una concentración final de 0,10 mg/ml). La solución de micropartícula/proteína se mezcló y se agitó durante 3 horas a temperatura ambiente. Las micropartículas se separaron de la solución utilizando un soporte magnético, y se retiró la solución. Las partículas se resuspendieron en tampón MES y se separaron de la solución utilizando un soporte magnético, y se retiró la solución. Las partículas se lavaron con MES dos veces más y después se resuspendieron en 1 ml de diluyente de micropartículas (tampón MES 20 mM con NaCl 0,14 M y dihidrato de etilendiaminotetraacetato disódico 0,4 M (pH 6,6) con 11,5% peso/volumen de sacarosa). Se supuso que las micropartículas estaban al 1% en peso/volumen. La solución de micropartículas se diluyó hasta una concentración final de 0,1% en peso/volumen en Diluyente de Micropartículas.

ii. Preparación de partículas recubiertas con antígenos mixtos

Las micropartículas recubiertas con una mezcla de las proteínas MSP1-19 recombinantes se prepararon de la siguiente manera. En resumen, se mezcló una alícuota de microplacas de 196 µl (5,1% en peso/volumen, 4,5-5,4 micrómetros de diámetro (Polymer Laboratories Ltd., Shropshire, Reino Unido) con 0,784 ml de un tampón de recubrimiento (ácido 2-(N-morfolino) etanosulfónico (MES), pH 6,0) y se separó de la solución utilizando un soporte magnético (Promega, Madison, Wisconsin), y se retiró la solución. Las partículas se resuspendieron en 1,0 ml del tampón de recubrimiento MES y se separaron de la solución utilizando un soporte magnético, y se retiró la solución. Las micropartículas lavadas se resuspendieron en tampón MES y se añadieron 25 µg de cada una de las proteínas recombinantes (solución de MSP1-19 de *P. ovale*: 7,15 µl; solución de MSP1-19 de *P. malariae*: 1,0 µl; solución de MSP1-19 de *P. vivax*: 3,8 µl; solución de MSP1-19 de *P. falciparum*: 2,5 µl) junto con 732 µg de hidrócloruro de N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida. La solución de micropartículas/proteínas se mezcló y se volteó durante 3 horas a temperatura ambiente. Las micropartículas se separaron de la solución utilizando un soporte magnético, y se retiró la solución. Las partículas se resuspendieron en tampón MES y se separaron de la solución utilizando un soporte magnético, y se retiró la solución. Las partículas se lavaron con MES dos veces más, y a continuación se resuspendieron en 1 ml de Diluyente de Micropartículas. Se supuso que las micropartículas estaban al 1% en peso/volumen. La solución de micropartículas se diluyó hasta una concentración final de 0,1% en peso/volumen en Diluyente de Micropartículas.

iii. Combinación de partículas recubiertas con un solo antígeno

Las micropartículas recubiertas de antígeno único se resuspendieron a una concentración de 0,1% en peso/volumen en el Diluyente de Micropartículas. Se mezcló un volumen igual de cada una de las cuatro disoluciones de partículas para formar la mezcla de partículas recubiertas con un solo antígeno con una concentración final de partículas de 0,1% en peso/volumen.

Ejemplo 14

60 Inmunoensayo de anticuerpos anti-Plasmodium basado en micropartículas paramagnéticas automatizado.

Las micropartículas preparadas como se ha descrito en los ejemplos anteriores se sometieron a ensayo en cuanto a su capacidad para detectar anticuerpos anti-plasmódicos utilizando un inmunoanalizador automático que utiliza micropartículas paramagnéticas y productos conjugados quimioluminiscentes (sistema ARCHITECT®, Abbott

Laboratories, Abbott Park, IL, véanse "Bulk Reagent Random-Access Analyzer: ARCHITECT i2000" Frank A. Quinn, páginas 363-367. En The Immunoassay Handbook, Second Edition, editado por David Ward, Nature Publishing Group, London, Reino Unido; la Patente de Estados Unidos Núm. 5.795.784 y la Patente de Estados Unidos Núm. 5.856.194).

5

Con respecto a la presente invención, se utilizaron los procedimientos siguientes:

Ensayo de anticuerpo de especies individuales de Plasmodium:

10 En este formato de 2 etapas, se mezclaron en un recipiente de reacción muestras, diluyentes de especímenes y micropartículas paramagnéticas recubiertas de una especie de plasmodio (del Ejemplo 13.A1.i.), se sometieron a vórtice y se incubaron durante 18 min. Después de esta incubación, las micropartículas se almacenaron a un lado del recipiente de reacción utilizando un imán mientras se eliminaba el sobrenadante de la reacción. Las micropartículas se lavaron posteriormente con agua/solución detergente. Los anticuerpos presentes en las muestras y capturados en las micropartículas se mantuvieron durante la etapa o etapas de lavado. Inmediatamente después del lavado, se añadió un producto conjugado de anti-IgG humana marcado con acridinio (se puede preparar como se ha descrito en el Ejemplo 7) en tampón de diluyente conjugado (MES 50 mM a pH 6,6 con triton-X405 al 1,4% en volumen/volumen, NaCl 0,4 M y albúmina de suero bovino al 1% en peso/volumen), al recipiente de reacción, que se sometió a vórtice y después se dejó incubando durante 4 minutos. La incubación fue seguida por una segunda etapa de lavado y finalmente una activación del acridinio y la medición simultánea de la salida de luz, que es proporcional a la cantidad de producto conjugado unido a las micropartículas. La cantidad de luz emitida es proporcional a la cantidad de anticuerpo en la muestra y se expresa en unidades de luz relativa (ULR). La presencia o ausencia de anticuerpo en la muestra de ensayo se determina comparando la ULR obtenida de la muestra de ensayo con la obtenida a partir de una muestra negativa conocida (es decir, razón de muestra a negativo o de señal a negativo o S/N). Las muestras de ensayo con una razón S/N de 5,0 o superior se consideran positivas para la presencia de anticuerpos de plasmodio. Los resultados se expresan como S/N (señal a negativo) en la Tabla 10, Tabla 11, y Tabla 13 a continuación, y se comparan con los resultados obtenidos de un inmunoensayo ligado a enzima comercialmente disponible (Lab 21 Healthcare Malaria Antibody ELISA, Kentford, UK) .

30 Ensayo de anticuerpo de cuatro especies de Plasmodium:

En este formato de 2 etapas, se mezclaron en un recipiente de reacción muestras, diluyentes de especímenes y micropartículas paramagnéticas recubiertas (del Ejemplo 13.A1.ii o 13.A1.iii.), se sometieron a vórtice y se incubaron durante 18 min. Después de esta incubación, las micropartículas se almacenaron a un lado del recipiente de reacción usando un imán mientras se eliminaba el sobrenadante de la reacción. Las micropartículas se lavaron posteriormente con agua/solución detergente. Los anticuerpos presentes en las muestras y capturados en las micropartículas se mantuvieron durante la etapa o etapas de lavado. Inmediatamente después del lavado, se añadió un producto conjugado de anti-IgG humana marcado con acridinio en tampón diluyente conjugado, al recipiente de reacción, que se sometió a vórtice y después se dejó incubando durante 4 minutos. La incubación estuvo seguida por una segunda etapa de lavado y finalmente una activación del acridinio y la medición simultánea de la salida de luz, que es proporcional a la cantidad de producto conjugado unido a las micropartículas. La cantidad de luz emitida es proporcional a la cantidad de anticuerpo en la muestra y se expresa en unidades de luz relativa (ULR). La presencia o ausencia de anticuerpo en la muestra de ensayo se determina comparando la ULR obtenida de la muestra de ensayo con la obtenida a partir de una muestra negativa conocida (es decir, razón de muestra a negativo o señal a negativo o S/N). Las muestras de ensayo con una razón S/N de 5,0 o superior se consideran positivas para la presencia de anticuerpos de plasmodio. Los resultados se expresan como S/N (señal a negativo) en la Tabla 12 y la Tabla 13 a continuación, y se comparan con los resultados obtenidos de un inmunoensayo ligado a enzima comercialmente disponible (Lab 21 Healthcare Malaria Antibody ELISA, Kentford, UK) .

50 Table 10

Detección de muestras de <i>P. ovale</i> y <i>P. malariae</i> con PoMSP1-19 y PmMSP1-19				
ID Muestra	Especie determinada por frotis de sangre	Micropartícula Paramagnética		Resultados de la prueba ELISA comercial
		PoMSP1-19	PmMSP1-19	
01*	<i>P. ovale</i>	17,54	0.29	positivo
19	<i>P. ovale</i>	39,38	NTNúm.	positivo
20	<i>P. ovale</i>	2,86	NTNúm.	negativo
21*	<i>P. ovale</i>	74,81	0,70	positivo

Detección de muestras de <i>P. ovale</i> y <i>P. malariae</i> con PoMSP1-19 y PmMSP1-19				
ID Muestra	Especie determinada por frotis de sangre	Micropartícula Paramagnética		Resultados de la prueba ELISA comercial
		PoMSP1-19	PmMSP1-19	
23*	<i>P. ovale</i>	19,73	0,25	positivo
24	<i>P. ovale</i>	33,45	#NT	positivo
25	<i>P. ovale</i>	17,90	#NT	negativo
26	<i>P. ovale</i>	36,99	#NT	negativo
2	<i>P. malariae</i>	#NT	101,16	negativo
15	<i>P. malariae</i>	#NT	4,54	negativo

* Las muestras se sometieron a ensayo diluidas 1:16 en plasma humano normal #NT: no sometido a ensayo no diluido debido al volumen insuficiente de la muestra

Tabla 11

Detección de muestras de <i>P. falciparum</i> y <i>P. vivax</i> con PfMSP1-19 y PvMSP1-19				
ID Muestra	Especie determinada por frotis de sangre	Micropartícula Paramagnética		Resultados de la prueba ELISA comercial
		PvMSP1-19	PfMSP1-19	
1	<i>P. vivax</i>	77,70	#NT	Positive
2*	<i>P. vivax</i>	233,24	0,43	Positive
5*	<i>P. vivax</i>	248,36	0,45	Positive
9*	<i>P. vivax</i>	242,66	0,51	Positive
10	<i>P. vivax</i>	78,93	#NT	Positive
11*	<i>P. vivax</i>	134,06	1,01	Positive
12	<i>P. vivax</i>	85,24	#NT	Positive
14*	<i>P. vivax</i>	12,32	0,88	Positive
6*	<i>P. falciparum</i>	0,56	268,11	Positive
17	<i>P. falciparum</i>	#NT	1,73	Positive
18	<i>P. falciparum</i>	#NT	1,32	Positive
16	<i>P. falciparum</i>	#NT	5,71	Positive

* Las muestras se sometieron a ensayo diluidas 1:16 en plasma humano normal #NT: no sometido a ensayo no diluido debido al volumen insuficiente de la muestra

Tabla 12

Detección multiespecie utilizando micropartículas de recubrimiento recombinante mixto o de recubrimiento individual combinadas				
ID Muestra	Especie determinada por frotis de sangre	Micropartícula Paramagnética		Resultados de la prueba ELISA comercial
		Recubrimiento Recombinante Mixto	Recubrimiento Individual Combinado	
01*	<i>P. ovale</i>	10,38	10,89	positivo
19*	<i>P. ovale</i>	81,12	78,28	positivo
20	<i>P. ovale</i>	2,63	1, 67	negativo

Detección multiespecie utilizando micropartículas de recubrimiento recombinante mixto o de recubrimiento individual combinadas				
ID Muestra	Especie determinada por frotis de sangre	Micropartícula Paramagnética		Resultados de la prueba ELISA comercial
		Recubrimiento Recombinante Mixto	Recubrimiento Individual Combinado	
21*	<i>P. ovale</i>	43,18	45,92	positivo
23*	<i>P. ovale</i>	11,52	12,46	positivo
24	<i>P. ovale</i>	47,11	40,26	positivo
25	<i>P. ovale</i>	10,55	8,63	negativo
26	<i>P. ovale</i>	37,15	23,19	negativo
1	<i>P. vivax</i>	27,42	19,84	positivo
2*	<i>P. vivax</i>	68,12	64,79	positivo
5*	<i>P. vivax</i>	73,79	66,63	positivo
9*	<i>P. vivax</i>	75,12	65,95	positivo
10	<i>P. vivax</i>	#NT	20,33	positivo
11*	<i>P. vivax</i>	38,79	50,44	positivo
12	<i>P. vivax</i>	29,98	25,34	positivo
14	<i>P. vivax</i>	75,99	65,59	positivo
6*	<i>P. falciparum</i>	80,12	63,91	positivo
17	<i>P. falciparum</i>	13,27	18,87	positivo
18	<i>P. falciparum</i>	6,60	10,61	positivo
16	<i>P. falciparum</i>	6,38	4,14	positivo
2	<i>P. malariae</i>	62,41	73,33	negativo
15	<i>P. malariae</i>	3,49	3,43	negativo

* Las muestras se sometieron a ensayo diluidas 1:16 en plasma humano normal #NT: no sometido a ensayo no diluido debido al volumen insuficiente de la muestra

Las muestras 25, 26, y 2 fueron reactivas en la ensayos de recubrimiento con antígeno mixto y de recubrimiento individual combinado, pero fueron negativas en el ELISA comercial, demostrando una mejora de la detección utilizando los antígenos recombinantes que representan las cuatro especies de Plasmodium.

5

Tabla 13

Detección de especies individuales y multiespecie utilizando micropartículas de recubrimiento individual combinadas en donantes de sangre humanos normales						
ID Muestra	Micropartícula Paramagnética				Recubrimiento individual combinado	Resultados de la prueba ELISA comercial
	PfMSP1-19	PvMSP1-19	PoMSP1-19	PmMSP1-19		
001	1,03	1,04	0,55	3,43	1,89	Negativo
002	2,21	2,16	2,72	3,12	2,62	Negativo
003	1,28	1,10	1,01	0,99	1,06	Negativo
004	1,62	1,65	2,62	2,80	2,52	Negativo
005	2,61	2,42	1,26	0,99	1,39	Negativo
006	0,84	0,95	25,80	32,56	21,16	Negativo
007	1,10	1,16	0,62	0,53	0,70	Negativo

ES 2 636 976 T3

Detección de especies individuales y multiespecie utilizando micropartículas de recubrimiento individual combinadas en donantes de sangre humanos normales						
	Micropartícula Paramagnética					
ID Muestra	PfMSP1-19	PvMSP1-19	PoMSP1-19	PmMSP1-19	Recubrimiento individual combinado	Resultados de la prueba ELISA comercial
008	0,98	1,16	1,04	0,99	0,94	Negativo
009	1,19	1,23	2,01	2,29	1,80	Negativo
010	1,16	1,10	1,03	1,00	1,01	Negativo
011	1,33	1,19	0,86	0,84	0,95	Negativo
012	0,78	0,77	0,91	0,99	0,84	Negativo
013	1,14	1,20	0,57	0,53	0,67	Negativo
014	2,35	2,45	1,44	1,16	1,50	Negativo
015	2,30	2,11	3,94	4,44	3,46	Negativo
016	1,41	1,22	1,63	1,86	1,47	Negativo
017	2,12	2,00	1,08	0,92	1,31	Negativo
018	1,50	1,33	1,56	1,51	1,48	Negativo
019	1,23	1,43	0,63	0,50	0,72	Negativo
020	1,57	1,56	1,35	0,89	1,22	Negativo
021	1,23	1,22	0,68	0,52	0,79	Negativo
022	2,47	2,48	1,20	1,08	1,43	Negativo
023	1,36	1,38	0,95	0,84	0,93	Negativo
024	1,47	1,51	2,65	2,74	2,49	Negativo
025	0,99	0,95	1,21	1,06	1,03	Negativo
026	2,87	2,57	2,98	3,02	2,77	Negativo
027	1,19	1,23	0,68	0,64	0,75	Negativo
028	1,47	1,40	0,68	0,58	0,80	Negativo
029	1,10	0,92	0,45	0,41	0,52	Negativo
030	1,11	1,23	0,59	0,46	0,74	Negativo
031	1,28	1,52	0,78	0,70	0,88	Negativo
032	0,82	1,06	0,59	0,52	0,63	Negativo
033	1,25	1,39	0,75	0,68	0,92	Negativo
034	1,94	1,98	1,02	0,91	1,23	Negativo
035	1,73	1,75	0,82	0,64	1,00	Negativo
036	1,48	1,28	0,85	0,80	0,92	Negativo
037	1,09	1,15	0,50	0,40	0,67	Negativo
038	0,87	0,97	0,60	0,58	0,62	Negativo
039	2,12	2,07	1,50	1,47	1,67	Negativo
040	1,67	1,66	0,96	0,94	1,12	Negativo
041	1,07	1,20	0,74	0,69	0,69	Negativo
042	1,23	1,09	0,60	0,47	0,68	Negativo
043	3,31	2,98	1,58	1,36	1,80	Negativo

ES 2 636 976 T3

Detección de especies individuales y multiespecie utilizando micropartículas de recubrimiento individual combinadas en donantes de sangre humanos normales						
	Micropartícula Paramagnética					
ID Muestra	PfMSP1-19	PvMSP1-19	PoMSP1-19	PmMSP1-19	Recubrimiento individual combinado	Resultados de la prueba ELISA comercial
044	1,15	1,13	7,50	9,42	6,61	Negativo
045	1,22	1,22	0,74	0,74	0,89	Negativo
046	1,45	1,74	0,72	0,56	0,90	Negativo
047	1,01	1,08	0,47	0,38	0,58	Negativo
048	1,00	1,13	0,67	0,63	0,79	Negativo
049	1,47	1,47	0,90	0,78	0,97	Negativo
050	1, 90	1,95	4,52	5,07	3,81	Negativo
051	1,18	1,19	1,00	0,94	0,97	Negativo
052	0,92	0,97	0,42	0,39	0,54	Negativo
053	1,61	1,44	0,90	0,70	0,98	Negativo
054	1,45	1,40	1,14	1,09	1,16	Negativo
055	2,47	2,37	1,23	0,91	1,44	Negativo
056	1,25	1,23	0,74	0,69	0,89	Negativo
057	1,23	1,18	0,67	0,54	0,75	Negativo
058	1,86	1,98	0,86	0,74	1,17	Negativo
059	0,71	0,88	0,95	0,98	0,88	Negativo
060	1,27	1,46	1,11	1,01	1,18	Negativo
061	0,72	0,78	3,31	3,68	2,50	Negativo
062	1,29	1,35	3,98	4,70	3,20	Negativo
063	1,62	1,58	0,87	1,15	1,03	Negativo
064	1,87	1, 67	0,83	0,72	1,05	Negativo
066	1,73	1,65	1,02	0,78	1,14	Negativo
067	3,84	3,77	1,11	0,92	1,78	Negativo
068	1,32	1,22	0,81	0,79	0,92	Negativo
069	2,49	2,35	4,16	4,78	4,07	Negativo
070	1,15	1,28	0,59	0,44	0,65	Negativo
071	1,44	1,45	0,73	0,61	0,85	Negativo
072	1,87	1,74	0,88	0,90	1,12	Negativo
073	1,73	1,73	1,10	0,96	1,12	Negativo
074	1,62	1,76	1,36	1,36	1,41	Negativo
075	1,59	1,64	1,60	1,83	1,54	Negativo
076	1,26	1,21	1,46	1,58	1,35	Negativo
077	1,08	1,50	1,22	1,24	1,18	Negativo
078	2,80	2,79	1,70	1,37	1,85	Negativo
080	1,63	1,53	1,30	1,31	1,30	Negativo
081	0,78	0,89	0,48	0,39	0,54	Negativo

ES 2 636 976 T3

Detección de especies individuales y multiespecie utilizando micropartículas de recubrimiento individual combinadas en donantes de sangre humanos normales						
	Micropartícula Paramagnética					
ID Muestra	PfMSP1-19	PvMSP1-19	PoMSP1-19	PmMSP1-19	Recubrimiento individual combinado	Resultados de la prueba ELISA comercial
082	1,29	1,15	0,68	0,55	0,82	Negativo
083	1,11	1,07	0,54	0,47	0,56	Negativo
084	1,20	1,18	1,39	1, 60	1,27	Negativo
085	1,06	1,04	1,01	0,95	1,22	Negativo
086	1,17	1,45	1,38	1,53	1,32	Negativo
087	2,08	2,03	1,07	0,87	1,21	Negativo
088	1,42	1,46	0,70	0,64	0,85	Negativo
089	1,18	1,17	0,81	0,75	0,83	Negativo
091	2,27	2,13	0,90	0,65	1,13	Negativo
092	1,87	1,85	0,95	0,87	1,16	Negativo
093	1,48	1,45	0,68	0,70	0,89	Negativo
094	0,94	0,87	2,02	2,29	1,79	Negativo
095	1,09	1,19	0,74	0,70	0,78	Negativo
096	1,76	1,53	1,16	0,68	1,11	Negativo
097	0,76	0,82	0,38	0,34	0,53	Negativo
098	0,91	1,02	0,52	0,48	0,66	Negativo
099	1,07	1,08	0,59	0,63	0,76	Negativo
100	0,72	0,88	0,41	0,39	0,51	Negativo
101	1,63	1,63	1,39	1,26	1,35	Negativo
102	1,60	1,45	1,06	0,98	1,18	Negativo
103	0,84	0,75	0,70	0,63	0,74	Negativo
104	1,02	0,98	0,55	0,42	0,61	Negativo
105	2,00	119,91	2,53	1,09	36,69	Positive
106	1,10	1,08	0,68	0,59	0,78	Negativo
107	1,23	1,19	0,58	0,48	0,66	Negativo
108	0,76	0,76	2,04	2,77	1,66	Negativo
109	1,56	1,49	1,00	0,91	1,03	Negativo
110	1,27	1,20	0,65	0,51	0,68	Negativo
111	1,90	2,07	1,12	0,98	1,30	Negativo
112	1,21	1,21	1,23	1,37	1,18	Negativo
113	1,18	1,12	0,61	0,53	0,75	Negativo
114	1,67	1,64	0,98	0,85	1,05	Negativo
115	1,57	1,86	1,35	1,08	1,34	Negativo
116	1,46	1,41	0,72	0,63	0,85	Negativo
117	1,24	1,39	0,97	0,95	1,03	Negativo
118	1,04	1,14	0,66	0,55	0,72	Negativo

Detección de especies individuales y multiespecie utilizando micropartículas de recubrimiento individual combinadas en donantes de sangre humanos normales

ID Muestra	Micropartícula Paramagnética					Resultados de la prueba ELISA comercial
	PfMSP1-19	PvMSP1-19	PoMSP1-19	PmMSP1-19	Recubrimiento individual combinado	
119	0,98	0,95	0,57	0,48	0,57	Negativo
120	1,04	1,01	0,54	0,49	0,63	Negativo
121	1,75	1,91	4,00	4,56	3,37	Negativo
122	1,40	1,48	0,84	0,85	0,98	Negativo
123	0,80	0,81	0,46	0,41	0,51	Negativo
124	3,02	3,02	1,48	1,30	1,77	Negativo
125	1,12	1,22	0,58	0,49	0,62	Negativo

Un total de 122 donantes de sangre normales se escrutaron con el ELISA comercial para anticuerpos anti-plasmodio y la muestra 105 fue reactiva. Esta muestra también era reactiva con las micropartículas recubiertas individualmente con PvMSP1-19 y con las micropartículas mixtas. Las muestras 006 y 044 no eran reactivas con el ELISA comercial, que sólo tiene antígenos para *P. falciparum* y *P. vivax*, pero estas muestras eran reactivas con las micropartículas recubiertas individualmente con PoMSP1-19 y PmMSP1-19 y con las micropartículas mixtas. Estas dos muestras pueden contener anticuerpos anti-plasmodio que los ensayos comerciales actuales no detectarían, pero pueden detectarse con la inclusión de MSP1-19 recombinante de las cuatro especies de plasmodio.

LISTA DE SECUENCIAS INFORMAL

SEQ ID NO:1 secuencia de aminoácidos deducida de MSP1 de *P. malariae*

MKALIFLFSFVFFSINCHCETNEDYEQLIQKLGKLEELVVEGYNLFHKKKFALTDINKDGNSTSTTDANNKDDSKV
SSVTAKIGNFVSKVLNLPYVQLTFSIRELITKYSGLYKYLIEGYEEFNELMYGINFYDILLRAKLNMDHLNGY
CDIPNHLKINEKELEMLKKVFGYRKPLENIKDDINKMEKFITNEATVNNIKELIKKEYNNIADENKKLEAPSE
SGSDDEDIKNCNEKQKIYKSRNIFLYEKQLLEAQKLIIEVLKKRIQTLKENTDIKKLLDEIKEIEGKLPTSGSEA
SASAAAPGAIKEPENTQIKERQEKIKEIAKNIVFNMDGLFTDAFELDYYVREKEKKSFNSTATTQLANGKAVNRTP
PAPVMYPHGIIYAVSDDAISNLSKSSSTQLTLEELQNPDRKQITIDDLKDNKRKELITKIKNKITEEGKLNA
LKGVDVSKLEKFKKIEGEFPLLEKFDYDERLDNSITENFEKFLSKRTEYLTETKNLLESSSYELSKALVKKLKKQ
LMYLEDYSLRKEVDFEENVHFNCLDLQNLADHKLSEIKRKENLLTVVDTLKFSDVVELQVQKVLGKKIGQLK
NVEAFLQKAKLKETFHIPQAYGTGEQSEPYLIALKREIDKLNISIPKIEEMLKNEKKLEEEKIKAAAQNVSGHV
SGADETSNSHGSSGGGGSTQVTTTTPTTTTATTSSQTVSVGETGSAQAQAQPPQPPQPPQTQTQTQTPQAAG
ATGTPGQSGQSGQSGQSGAEGTTETTGTTGQAGTTGTPEQAAAAGPQAETTATPGQAGAAGAAGPQAETTGTGPGQ
AGAAGPQTETEVEETQEIGIVVPTLSKLQYLEKLYDFLKTAYVCHINILVNNSTMNETLLQQYKLEEDKKLLE
KCDQLDLLFNVQNNLQVMYSMYDSVSNVLQNYKELNQKEMIYNIYKLVKKNDKLNFLNLTANSAAASSALPPP
PSVPPAVPPASQPPQPAALPAQPAAPPAQSQATVPAQSQAAVPATTQSSSVSAPTGTNGASPATPVAPAGSEN
AIQLKANDNEDDANELDFDIDDIYIKYLEQVSKYDENFNKFIIESKKDIINKMSESEWKELGEEINTLKQDIQSSSF
DNFGKYKLERLLKKKNKITSSTNHIKEYSILKAQLLRKKNIINNPRHVLAAFVVFNNKIEAEKKEVENALKN
TDIMLKYYYKARTKYIIEAFPLKTITEQSLQKEINYLHLEKFKVYSRLLEGRIKMLNLEKENITYLSGGLHHVLT
ELKEIINDKTYTGYTHTKNNEEVNKNALNVYEELLPKQISTEEQPDNALADGTENATEGAEVRAATAESLVQGEDE
YPEEVDEVIVFPIVGGKKEKENPLDQITKQAEKQDDNLIKPIITNEYEVLYIKPLAGVYRVLRKQIGDQIDAFNS
NLTNALDTRKKKRTYFLDVLNSDLIQFKHATSDSYIIPKPYKLLDVKKAKLIGSYKYIVSAIEKDITSANGVE
YYDKMTKLYKTQLEAVKSAIAEAQKEGDKKTENEKYIPFLTNTMQLTYENLLNKINGNIINLKTITNCNLEKDAV
NITISKLTEYSKFDEKIEFMFNSKNEKDIIASSGILDILKQKGLVKNNESTKIISELLGVDSNALLNISAKHACTE
TKYPENAGCYRYEDGKEVWRCLLNYKLVDGGCVEDEEPPSCQVNNGGCAPEANCTKGDDNKIVCACNAPYSEPIFE
GVFCGSSSFLGLSLLLAALLIMFNLL

SEQ ID NO:2 secuencia de ácidos nucleicos del gen MSP1 de *P. malariae*

AAAAAAAAAATTTTATTTTACCAATTATAAAATACTCTATATTATCAAGTTTAATTCAAAAATGAAAGCACTTAT
 ATTTTGTCTCTCTTTGTCTTTTTTCTATAAATTGTCAGTGTGAAACAAATGAAGATTATGAACAACCTTATTCA
 AAAGTTGGGAAAACCTGGAGGAACTAGTTGTAGAAGGGTATAACCTATTTACAAAAAATTTGCCTTAACAGA
 CATTAATAAGGATGGTAATACCAGTACTACTGATGCAAATAATAAGATGATAGTAAGGTTTCCCTCCGTAACAGC
 AAAAAATAGGAAATTTTGTAGCAAAGTTCTAAACCTGAATTTGCCAGGTTATGTTTCAGTTAACTTTTCAATTAG
 GGAATTAATTACAAAGTACAGTGGTTTGAATATCTAATTGAAGGATATGAAGAATCAATGAATTAATGTATGG
 AATTAATTTTACTATGATTTATTAAGAGCTAAGTTGAATGATATGCATCTAAATGGCTACTGTGATATACCTAA
 TCATCTAAAAATTAATGAAAAGGAATTAGAAATGCTTAAAAAAGTCGTATTTGGATATAGAAAACCATTAGAAAA
 TATTAAGACGATATTAACAAAATGGAGAAATTTATCACAACAAATGAAGCAACAGTAAATAATATAAAGGAATT
 AATTAAGAAGGAATATAATAACATCGCTGATGAGAAATAAAAAATTAGAGGCTCCTAGTGAATCAGGGTCAGATGA
 CGAAGATATAAAGAATTGTAATGAAAAACAGAAAAATATACAAATCTCGATATAACATTCTTTTTTACGAAAAGCA
 GTTGCTAGAGGCACAAAAATTAATAGAAGTTTAAAGAAGCGTATTCAAACTTTAAAAGAAAAATACCGATATAAA
 AAAATTGCTCGACGAAATAAAGGAAATTGAAGGGAACCTTCCTACAAGTGGTAGTGAAGCATCTGCCCTCTGCAGC
 AGCTCCTGGTGTATAAAGGAACCGAAAAATACTCAAATAAAAGAACGTCAAGAAAAGATTAAAGAAATTGCGAA
 AAATATAGTATTCAATATGGATGGTCTATTTACAGATGCCTTCGAATTGGATTACTATGTAAGAGAAAAAGAAAA
 AAAATCATTCAACTCGGCAACTACTCAACTAGCTAACGGTAAAGCAGTAAACAGAACACCTCCTGCACCAGTAAT
 GTATCCTCATGGAATAATTTATGCTGTATCAGATGATGCTATAAGTAACATACTATCTAAAAGTAGTACACAGTT
 AACACTTGAAGAATTACAAAATCCTGACAATAGAAAACAAATTACTATTGACGATCTTAAAGACGAAAACAAAAG
 AAAAGAATTGATACTAAATAAAAAATAAAATTACAGAAGAAGAGGGAATTAATGCATTAAAAGGAGATGT
 TGATAGTAAATTAGAGAAATTTAAGAAAAATAGAAGGGGAATTTAAACCATTACTTGAAAAATTTTATGATGAAAG
 ACTTGATAAATAGCATTACAACAGAGAATTTTGAAAAATTTTAAAGTAAAAGAACAGAATATTTAACGGAAAAAGAA
 TTTGCTTGAAAGCTCTTCTTACGAATTGTGCAAGCATTGGTAAAGAAATTA AAAAGCAACTTATGTATTTAGA
 AGACTATTCATTAAGAAAAGAAGTATTTGATGAAGAGGTAAATCATTTCAACTGCTTAGACTTACAATTAATGC
 TGATATTCATAAATTAGAAAGTGAAATTA AAAAGAAAAGAAAATTTACTTACAGTAGTTGATACCTTAAATTTTC
 AGATGTCGTGGAATTACAAGTACAAAAAGTATTATTAGGTAAAAAATAGGACAACATAAAAAATGTAGAAGCATT
 TTTACAAAAAGCAAAATTA AAAAGAAACGTTTCACATCCCCCAAGCATACGGAACAGGAGAACAAATCCGAACCATA
 CTATTTAATTGCCTAAAGAGGGAAATTGATAAATTAATATTTCTATTCCAAAAATTGAGGAAATGTTAAAAAA
 TGAGAAAAAACTGGAGGAAGAAAAAATCAAGGCGGCAGCACAAAATGTAAGCGGCCATGTTTCCGGAGCAGATGA
 AACATCAAACAGTCATGGATCATCTGGAGGAGGAGGATCAACACAAACAGTAACGACAACACCATCAACTACAAC
 AACAGCAACTACATCATCACAACAGTATCAGTAGGAGAAACAGGATCAGCACAAAGCACAAAGCACACCACAAC

ACAACCACAACCACAACCACAACACAAACACAACACAACACAACACAAGCAGCAGGAGCAACGGGAACACC
 AGGACAATCAGGACAATCAGGACAATCAGGACAATCAGGAGCTGAAGGAACAACAGAACTACGGGAACAACAGG
 ACAGGCAGGAACACCGGGAACACCAGAACAAGCAGCAGCTGCAGGACCACAAGCAGAACTACGGCAACACCAGG
 ACAAGCAGGAGCTGCAGGAGCTGCAGGACCACAAGCAGAACTACGGGAACACCAGGACAAGCGGGAGCTGCAGG
 ACCACAAACAGAGACAGAAGTAGAAGAACTCAGGAATTTGGAATCGTTGTTCCGACATTGTCCAAATTTGCAATA
 TCTTGAAAAGCTATATGACTTTTTGAAAAGCTGCTTATGTGTGTATATCAACATTTTGGTAAATACTCAACCAT
 GAATGAAACGTTACTACAACAATATAAACTGAAGATAGAAGAAGATAAGAAATTATTAGAGAAGTGCAGCAATT
 AGATTGTATTATTAATGTTTCAGAATAAAGTACAGTATGATTTCAATGTATGACAGTGTGAGCAATGTTCTACA
 AAATCAGTACAAAGAAATTAACCAAAAAGGAAATGATTATATAATTTTATAAACTGGTGAAGAAGATGACAACT
 TAAAACTTCTTAACTTAACTGCAACAGTGCAGCTGCATCTTCGGCATTACCACCTCCACCATCAGTACCACC
 TGCAGTACCACCAGCATCACAAACAGCCACAACCTCAAGCAGCATTACCAGCACAACCTCAAGCAGCAGTACCAGC
 ACAATCTCAAGCAACAGTACCAGCACAATCTCAAGCAGCAGTACCAGCAACAACCTCAATCCTCATCGGTATCAGC
 ACCAACAGGTACAAATGGTGCATCCCCAGCAACTCCTGTAGCTCCAGCTGGTAGTGAAAAATGCGATTGAGTTAAA
 AGCGAATGACAACGAGGACGATGCAATGAAGTAGATTTTCGACATTGACGATATTTATATAAAATACCTAGAACAA
 AGTGAGCAAAATACGACGAGAACTTCAAAAATTTTATAGAGTCCAAAAAAGATATAATAAATAAGATGAGCGAAAG
 TGAATGGAAAGAAATTAGGAGAAGAAATCAACACATTTGAAACAAGATATACAATCATCATTTTGATAATTTTGGAAA
 ATATAAACTTAAATTTGAAAGATTATTAATAAAGAAAAATAAAATTAACAAGCAGTACTAATCATATTAAGAATA
 TAGTATTTTAAAGCACAATTATTAAGGAAAAAATAATTTCTAAATAACCAAGACATGTACTAGCAGCTTTTGT
 AGTATCTCTTAAATAAAGATAGAAGCAGAAAAAGAAAGATTGAAAATGCTTTAAAAAATACTGATATTTATGTT
 GAAATATTATAAGGCAAGAACCATAATTTATATTAGTGAAGCATTCCCCTTAAAAACAATAACTGAACAATCACT
 TCAAAAAGAAATTAATTTACATTTAGAAAAATTTAAAGTATATAGTAGATTAGAAGGACGCATTAAAGAAAAAT
 GTTGAAATTTAGAAAAAGAAAAATTTACCTTACTTATCTGGTGGATTACATCATGTAATTTACAGAAATTAAGAGAT
 CATAAATGATAAAACATACACCGGTTATACACATACTAAAAATAACGAAGAAGTTAACAAAGCGTTAAATGTTTA
 TGAGGAATTGCTTCCAAAGCAATATCCACAGAAGAGCAACCGGATAATGCATTAGCAGATGGAACGGAAAAATGC
 AACAGAAGGTGCAGAAGTGCGTGCAGCAACTGCAGAAAGTTTAGTGCAGGGAGAAGATGAGTACCCTGAAGAAGT
 TGATGAGGTGATCGTGTTCCTTGTGGGTAAAGAAAGAAAGGAAAAATCCATTAGATCAATAACAAAAGGACA
 AGCTGAAACTAAACAAGATGATAATATATTGAAACCAATTTACAAATGAGTATGAAGTATATATATTAACCAAT
 AGCTGGAGTATATAGAGTTTTAAGAAAAACAATAGGAGATCAGATAGACGCTTTTAAATAGTAATTTGACAAATGC
 TTTGGATACTCGAAAAAAGAAAAAGAACATATTTCTTAGATGTATTAAATTTCTGATTTAATTTCAATTTAAACATGC
 AACTCCGACAGTTATATTATAAAGATCCGTATAAACTATTAGATGTTGATAAGAAAGCGAAGCTTATAGGTAG
 CTATAAATATATCGTCTCTGCAATAGAAAAGGATATCACTTCAGCTGAGAACGGAGTAGAATATTATGATAAGAT
 GACCAAGTTGTACAAGACTCAGTTAGAAGCAGTAAAAAGCGCAATTGCTGAAGCACAACAAAGAGGGTGATAAAAA
 AACTGAAAAATGAAAAATATATTTCCATTCTTAACGAACATGCAGACATTATATGAAAAATTTATTGAATAAATAA
 TGGAAACATAATAAATTTAAAACTTTAATTACAACTGTAATTTAGAAAAAGATGCAGTAAACATTACTATAAG
 TAAATTAACAGAATACAGCAATTTGATGAAAAAATGAAATGTTTAAAACTCTAAAAATGAAAAGGATATAGC
 AAGTCTGGAATATTAGACATACTTAAACAAAAAGGACTTGTTAATAAAAAATGAATCAACTAAGATTATATCAGA
 ATTACTTGGTGTAGACTCTAATGCATTACTGAATATTAGCGCAAAACATGCATGTACCGAAACAAAAATATCCTGA
 AAATGCAGGATGTTATAGATATGAAGACGGAAGAAAGATATGGAGATGCTTATTAATTAATAAACTAGTTGATGG
 AGGATGTGTTGAAGATGAAGAGCCTTCTGTCAAGTTAACAATGGAGGATGTGCTCCTGAAGCTAACTGTACCAA
 AGGAGATGACAACAAAATTTGTCTGTGCTTGAACGCACCTATTCTGAACCTATATTTGAAGGTGTTTTCTGTGG
 TTCTTCAAGTTTCTCGGCTTATCACTATTATTAGCAGCTTTATTAATTATGTTTAACTTACTTTAAGAAAAAAA
 GACAGAAAAGAAGGATACGAATGAACATAAAATGAGAAGGATTAAGACTGAGCAAGAGGAAAAGAGAGAAAATCA
 TAGATC

SEQ ID NO:3 secuencia de aminoácidos deducida de MSP1 de *P. ovale*

MKVVFVFSFIFFIVNCQCELTENYKELLHKLNNLEALVVDGYNLFHKPTPLTLQKLETEVTTTGRSGSSTT
 SVSSIPSDASRAVSTRDSNSNINNQVVSCLTADIRFLLSRFLQLNIPGHGDLMHFIRESLDTNGLKYLIEG
 YEEFNELMYILNFYYDLFRALKHDMCANDYCEIPDHLKISDKELDMLKKVVLGYRKPLENIKDDISKMETFI
 QKNTQTVENIKGLIEAEKKRYGEVAVSGNTGSAGAASGTNASASSGQENSSTESSETEKYNKAKALYQSIYN
 ALFYKKQLTEAEKLIIEVLKKRVQTLKEHKEIKKLEIEAEKESKVTPPSNTASQTQLQEEINKLKTQIKNIA
 KTVKFEMEGLFTDPVELDYLLREKDKKASKVVETQSGSTTPPKPTYPNGLIYPLEKENISELLSKAVTETTF
 GDLQNVEIGKALNKEIFTNDDKRNEFIDKLKNKIKQEEELLSKQKVDYDAKLKLYEEQKKKAIPLFEQFHNG
 KLDNLTLPSPKFEFFKVERDKYMLKNELNKCPYEMTKNTVDKLNKQLAYLNDYSLRKEVFNKEVKHFTGLEW
 KLQTEIDKLANEIKKNENILITASTLPLSNVVELQVQKVLVAKKIELLKKVEKLLHKAQLKDHLYVPQVYGT
 QAKPEAYYLFVLKKEIDKLGEFMPKIKEMLDKEKANPTPATAQGALPVRGVDEILVMGNQNEATAVTSPSTS
 TESSEGATQPAATVQPAAPGVQTGIPVAPQPGASAPGVPEAPAPEATAPEVPAIEAQAPVQPTQGGVQAATQN
 GPTMTKLQYLEKLYFLYTSYVCHKYILVTNSTMNKDLLAKYNLTPEEEEEKKTIKCDQLDLLFNLNQNNLPV
 MYSLFNMSSTLQSNYIQLYEKEMLYNYKMKNSDKAIKEFLETQGITGTAPDATPLVNTQATQATQVTT
 QAATQTATQTATHASTHASTQAATQGNVPQASNDHTPSATTVNPAATTPDKSLKESTSEGTLMTQGNADDD

VSEPEKKEIEVEEFYKKYLEEVDKYDDYFKAFLSSKKDAVNKMTTEKDWKELEEEVKTLSRLDMSLDHYNKY
 KLKLGRLFKKNEKVLSSKEHIKELSILKAQLMRRQFMLNNPRHVIHNFVFFNKKRETEKKEVENTLKNTDA
 LLKYYKARVKYNYNGETFLPKLTISEDTELEKENNYLNLEKFKLYSRLEGKLEKQINLEKENITYLSSALYHVLS
 ELKGIHNNKKTGNPHAANMVEVNNALNLYKDLLPKVETVASTGAATQTQGGEGASAAAAPPAALPAAPPAA
 PPAAPPAASAAAAPGTANGETATVAHAEDYTEDDNNVIVLPLFGKKGTHAFDQVTQGEAQDKDDNIILNEITNE
 YEVVYVKPLAGVYKTLKKQLEAHVTAHNSVNTNMLLESRLKKRNYFLEVLSNLDLTQYKHATSDNYVIRDAYKL
 LDFEKKKKLLSSYKIKDSVEKDVEIATDGDIDYEEKMAALYKTYLESVNAQVDAIDKTGDDATKATNKKFLP
 FLASINAMYETLLEKVNTYNSQLKSSLSNQCQLEKIRVGIVVDKLN DYVMFDEKLEELKSSKEKDLTKLYKDI
 DTSNIINKLKRSGFVDTDESKKLLSELLDVDSAQLLSMGSKHKCIDITYPDNAGCYRFSDBGREEWRCLLNFK
 KVGETCVPNNPTCAENNGCDPTADCAESENKICTCTGQNESFFEGVFCGSSSFLSLFLLAVLLILFN
 LL

SEQ ID NO:4 secuencia de ácidos nucleicos del gen MSP1 de *P. ovale*

AATTCAAAAATGAAGGTGTTTCGTATTTGCGCTCTCTTTTCATTTTTTTTATTGTGAAGTGTCAATGTGAAACG
 CTCGAAAATTATAAAGAGCTTCTTCATAAGTTAAATAATTTGGAAGCTCTAGTGGTTGATGGCTACAACCTTA
 TTTCACAAAACCTCCCTTAACCTACAAAAGTTAGAACTGAAGTCACAACCTACTGGAAGAGGTAGTGGTAGC
 AGTACTACTTCTGTTTCTCCATTCCAAGTGATGCAAGTAGAGCTGTATCTACCCGTGATTCTAATAGCAAC
 ATCAACAACCAAGTGGTTAGCAAGTTAACAGCGGACATAAGATTCCCTTCTATCAAGATTTTTCAGTGTAAAT
 ATTCAGGACATGGAGATTTAATGCATTTTCATAAGAGAAATTTTCGTTAGATACAAACGGACTAAAATATCTTA
 ATAGAAGGATATGAAGAATTTAACGAGTTAATGTACATATTGAACCTTTTATTATGATCTGTTTCAGAGCTAAA
 CTACATGATATGTTGCAAAATGATTATTGTGAAATACCAGACCATCTTAAATTAGTGATAAGGAATTGGAC
 ATGCTCAAAAAAGTTGTATTAGGATACAGAAAACCGTTAGAAAATATAAAAGACGATATTTCAAAAAATGGAG
 ACATTATTCAAAAAAATACTCAACAGTGGAAAATATAAAGGGCTTAATAGAGGCAGAGAAAAAAGG
 TATGGTGAGGTTTCAGTAAGTGGAAATACAGGAAGTGCAGGAGCTGCCTCAGGAACCTAATGCATCTGCAAGT
 TCAGGCCAAGAAAATCTCTTACTGAAAGCGAAACAGAAAAGTATAACAAAGCTAAAGCTTTATATCAATCC
 ATATATAACGCCTTATTTTACAAAAAGCAGTTAACAGAAAGCAGAAAAATTAATCGAAGTTTAAAAAAGCGT
 GTGCAACCGTTAAAGAGCACAAAGAGATAAAAAATTAATCGAAGAAATCGCGGAAAAGGAAAGCAAAGT
 ACCCCACCGAGTAATACCGCTTCACAAACGCAACTGCAGGAAGAAATTAACAACTTAAACTCAAATTAAG
 AACATCGCAAAAACCTGTAAATTCGAAATGGAAAGGTCTGTTTACTGATCCTGTTGAATTGGATTACTACTTA
 CGAGAAAAGGACAAAAAGGCAAGTAAAGTAGTAGAAACACAAAGTGGTTCAACAACCTCCGCTAAGCCTACG
 TATCCCAATGGTCTCATCTACCCTTTGGAAAAAGAAAACATCTCTGAGTTGTTATCAAAAGCCGTGACAGAA
 ACACTTTTGGTGATTTACAAATGTAGAAATGGAAAAGCATTAAATAAAGAAATTTTACGAATGATGAT
 AAGAGAAATGAATTCATAGACAACTTAAAAATAAAATTAACAACAAGAAGAACTTTTATCTAAACAAAAA
 GTGGACTATGATGCAAACTTAAATTTGACGAGGAGCAAAAGAGAAAGCTATTCCCTTATTTGAGCAGTTT
 CACAATGGAAAACCTTGACAACACACTTATTCCTAGTAAATTCGAAGAATTTAAAGTAGAAAGAGACAAGTAT
 ATGCAACTCAAGAACGAGTTAAAAAATGTCCATACGAAATGACAAAAACACGGTGGATAAGTTAAATAAA
 CAACTTGATATTTGAATGACTACTCATTTGAGAAAAGAGTTTAAATAAAGAAAGTTAAACATTTTACAGGA
 TTAGAGTGGAACTACAACTGAAATTGACAAATTAGCAACGAAATAAAGAAAAATGAAAATATACTTATA
 ACAGCATCTACCTTACCATTATCTAATGTAGTAGAATTACAAGTACAAAAAGTATTAGTAGCAAAAAAAT
 GAACCTTTAAAAAAGTAGAAAACTTTTACACAAAGCACAGTTGAAAGATCACCTTTACGTCCCTCAGGTT
 TATGGTACACAAGCGAAACCTGAAGCATACTATTTATTTGTCCTGAAAAAGGAAATTGACAACTGGGGGAA
 TTTATGCCTAAAAATAAAGGAGATGTTAGATAAGGAGAAGGCAACCCCACTCCAGCGACAGCACAGGGAGCC
 CTTCCAGTTCGAGGGGTTGATGAAATACTAGTCATGGGAAATCAAAACGAAGCTACAGCAGTAACATCACCA
 TCAACATCAACAGAATCATCCGAGGGAGCAACACAACCAGCAGCAACAGTACAGCCAGCAGGCCAGGAGTA
 CAAACGGGAATACCAGTAGCACAGCCAGGAGCATCAGCACCAGGAGTACCAGAAGCACCAGCACCAGAAGCA
 ACAGCACCAGAAGTACCAGCAATAGAAGCACAAGCACCTGTGCAACCTACGCAAGGACAGGTCCAAGCAGCC
 ACCCAAAATGGCCCAACAATGACAAAATTACAATATCTCGAGAAGTTATATTACTTTTTGTATACCTCCTAT
 GTATGTCATAAGTACATTTTAGTGACAACTCTACAATGAACAAAGATTTGTTGGCAAAATATAATCTTACA
 CCAGAAGAAGAAGAAAAAAGACAAATAAATGTGATCAGTTAGATTTATGTTTAACTTACAAAACAAT
 TTACCAGTCATGTATTCTCTCTTTGATAATATGAGCTCGACTTTGCAAGCAATTACATTCAATTATATGAA
 AAGGAAATGCTGTACAATATATACAAGTGAACAAAGTGAAGGCGATCAAAGAATTTCTAGAGACACAA
 GGTATAACAGGTACAGCACCCAGATGCTACTCTCTAGTCAATACACAAGCCACTACGCAAGCCGCTACACAA
 GTCACTACGCAAGCCGCTACACAAACCGCTACACAAACCGCTACACATGCCTCTACACATGCCTCTACACAA
 GCCGCTACACAAGGTAATGTTCCACAAGCCTCTAATGATGAACATACACCTTCAGCAACAACAGTTAATCCG
 GCAACGACAACACCAGATAAATCTTTGAAAGAAAGCACATCTGAGGGAACGTTGATGACACAGGGAACGCA
 GATGATGATGTATCTGAGCCTGAAAAAAGGAAATAGAAGTGGAAAGATTTTACAAGAAGTATTTAGAGGAA
 GTAGATAAGTATGATGACTACTTTAAAGCTTTTCTTTTCATCCAAAAGGATGCTGTAAATAAATGACAGAA
 AAAGATTGGAAAGAATTAGAGAAGAAGTAAAAACATTAAGAGTAGGTTAGATATGTCATTAGATCATATT
 AATAAGTATAAATTAATTAAGTAGATTGTTTAAAAAAGTAAAGAGTTTAAAGTAGTAAAGAACATATT
 AAAGAATTGAGTATTTTAAAGCACAAATTGATGAGAAGACAATTTATGCTTAATAACCAAGACATGTAATA

CATAACTTTTAGAGTTTTTTTTAATAAAAAAAGAGAACTGAAAAGAAAGAAGTTGAAAATACACTAAAAAAT
ACAGATGCATTGTTAAAAATTACAAAGCAAGAGTTAAGTACTATAATGGAGAACTTTCCCATTTAAAAACA
ATAAGTGAAGATACATTAGAAAAAGAAAAATAATTATCTCAATTTGGAAAAATTTAAGTTATACAGCAGATTG
GAAGGAAAACTAAAAACAAACATAAATTTGGAAAAAAGAAATATCACATACCTATCTAGTGCATTATATCAC
GTTCTTTTCAAGATTAAAGGGGATTATACACATAAAAAAGTACACAGGAAATCCTCATGCTGCAAAATATGGT
GAGGTTTAAACATGCGTTGAATCTGTACAAAGATTTGCTTCCAAAAGTGGAACTGTGGCTTCCACTGGTGCC
GCGACGCAGACACAAGGCGGGGAAGGAGCATCAGCAGCAGCAGCACCACCAGCAGCGTTACCAGCAGCACCA
CCAGCAGCACCACCAGCAGCACCACCAGCAGCATCAGCAGCAGCAGCCTGGAACTGCAAAATGGTGAAACAGCA
ACGGTAGCAGCAGCAGAAAGACTATACGGGAAGACGACAATAACGTCATTGTACTACCCCTTTTTCGGAAGAAA
GGAACACATCGGTTTTCAGCAAGTGACGCAAGGTGAAGCAACAAGACAAAGGACGACAATATACGTAATGAAAT
ACCAACGAATACGAAGTTGTGTACGTGAAACCGTTAGCTGGTGTATATAAAACGTTGAAGAAGCAATTTGGAA
GCACATGTTACAGCATTTTACAGTAACGTAACAAACATGTTGGAATCTCGTTTGAIAAAAAAGAAATTTATTT
TTGGAAGTGTTAAACTCTGATTTGACTCAATACAAACATGCACTTCTGACAATTACGTTATTAGAGATGCG
TACAAATTTATTAGACTTTGAAAAAIAAAAAAATTTGTTAAGTAGCTACAAATATATTAAAGATTCTGTTGAG
AAAGATGTAGAAATTTGCTACGGATGGAATTGACTATTATGAAAAAATGGCTGCTGTATAGACAGTACCTTA
GATCGGTTAATGCTCAGTGATAGTGCATGATATAAACTGGGATGATGCTACTAAGGCACTAATAAAAAA
TTTCTTCCCTTTTGGCTAGTATCAATGCTATGTACGAACTTTGTTAGAAAAAGTGAACACCTACAATTCC
CAATTTAAAAATCAAGTTTTAAACAGTTGCCAGTTTGGAAAAAATTTAGAGTAGGTATTGTTGTGGATAAACATGAAT
GACTATGTAATGTTTGTATGAAAAATTAGAAGAGTTAAAACTGAGTAAGGAAAAAGATTGACAAAATTATAT
AAAGATATAGATACATACATAACATAAACAAGTTAAAGAGATCAGGTTTTGTAGATACAGATGAGTCAAG
AATTTATTATCCGAGTTGTAGATGTAGATTCTGCTCAATTTGTGTCTATGGGATCTAAACATATAATGTATT
GATATAACATATCCAGATAATGCAGGATGTTATAGATTTTCTGATGGACGAGAAGAATGGAGATGTTTGTTA
AACTTTAAAAAAGTTGGAGAAACATGTGTACCAATAACAATCCTACATGTGCAGAAAAATATGGTGGATGT
GATCCCCTGAGATTTGTGCAGAACTGAAAAATAAATAAATTAATCTGTACATGTACTGGACAAAATGAATCA
TTCTTCGAAGGTGTTTTCTGTGGCTCATCAAGTTTCCCTTAGCTTATCTTTCTATTGGCAGTCTTATTGATC
CTATTAACTTACTTTTAAAGGAGAGATGTGAGGTTAAATACAAAAGTTGTTACATTTTTTTTTTTTTTTTTT

SEQ ID NO:5 secuencia de aminoácidos de MSP1 de *P. vivax* (Núm. de acceso AAA63427)

MKALLFFFSFIFVTKCQCETESYKQLVANVDKLEALVVDGYELFHKKKLGENDIKVDANANNNNNNNQVSVLTSK
 IRNFVGKFLLELQIPGHTDLLHLIRELAFEPNGIKYLVESYEEFNQLMHVINPHYDLLRANVHDMCAHDYCKIPEH
 LKISDKLEMDMLKKVVLGLWKPLDNLKDDIGKLETFITKNKETISNINKLISDENAKRGGSQSTNTTNGPGAQNNA
 QGSTGNTETGTTRSSASNTLSGGDGTTVVGTSSPAPAPSTNEDYDEKKIKIYQAMYNGIFYSQLEEAQKLVIE
 LEKRVKVLKEHKGIGIKALLEQVEAEKKLKPDKNTNRPLTDEQQKAQKIKADLESQIVANAKTVNFDDGLGFTDA
 EELEYLREKAKMAGTLIIPESTKSAGTPGKTVPTLKETYPHGISYALAENSIYELIEKIGSDETFGDLQNPDDG
 KQPKKGILINETKRKELLEKIMNKIKIEEDKLPNLKKELEEKYKVYEAKVNEFKPAFNHFYEARDNTLVENKFD
 EFKTKREAYMEEKKLLBSCSYEQNTNLINKLKKQLTYLEDYVLRKDTADDEIKHFSFMEWKLLKSEIYDLAQEIRK
 NENKLTVENKFDGSGVGEQVQKVLIKKIEALKNVQNLNKKVAKKDDLYVKKVQNTTEGKEPEYYLMLVKREIDQ
 LKDFIPKIESMIATEKAKPAASVPTSGQKLLRGSSEAATEVTNAVSTDESDQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQSQ
 VVPAPAGDAQQVISTQPTSQSAAPGVSATPAPTAAAAAPAPAMSKLEYLEKLLDFLKSAYACHKHIFVTNSTMD
 KLLKEYELNADEKTKINQNKCDLDBLLFNVQNNLPAMYSIYDSMSNELONLYIELYQKEMVNYIYKNKDTDKK
 KAFLETSNNKAAAPASQAAPSGQAEYYSSNDNACSNHNNSYSKSPNISCNKHTSTPQAEENQRVGGNSEEKPEA
 DTAQVEKFYDKHLSQIDKYNDFYKFKLENSKKEEICMDDTKWNALKEIEELKKQLQVSLDHYGYKYLKLERFLK
 KNNKINSKQDIKKLTSLNKLERQNLNNPTSVLKNYTAFFNKRETEKKEVENTLKNTEILLYKYKARAKYY
 IGEFPPLKTLSEESMQKEDNYLNLEKFRCSADWKEIRKDTELERSNISYLSSGLLHVLDRAEEIINDKKYSKGDH
 AKNIAEVKKALQAYQELIPKVTSQBSTSVAVTVPGAVVPGVPTAAAAGSGASGAVPPAAAAGSGASGAVPPAGGP
 SPPATGGVVPVPGVESAEAQTKAQADYAEDYDKVIALPLFGNDDDEEDQVTFTEAEESEAPEILVPAGISDYDV
 VYLKPLAGMYKTIKKQLENHVAFNTNITMDLSRLKKRNYFLEVLNLDNPFKYSFSGEYIICKPYKLLDLEKK
 KLLGSYKYIGASIDKDLATANDGVTYNKGMELEYKTLHTAVNEEVKKVEADIKAEADDKIKKIGSDSTKTEKTQ
 SMAKKAEELEKYLPLFLNSLQKEYESLVSKVNTYTDNLKKVINNCQLEKKEAEITVKKLQDYNKMDEKLEEYKSEK
 KNEVKSSGELLEKLMKSKLKENESKEILSQLNLNVQTQLLTMSSEHTCIDTNVPDNaACYRYLDGMEEWRCLLTFK
 EEGGKCVPGSNVTCCKDNNGGCAPEAECKMTDSNKIVCKCTKEGSEPLFEGVFCSSSSFLSLSFLLMLLFLLCME
 L.

SEQ ID NO:6 secuencia de ADN 5' de MSP1 de *P. malariae* (Núm. de acceso AF138881)

TTTTTCGTTATCAATTCTCAATGTGTAAACAAATGAAGATTATGAACAACCTCATTCAAAAGTTGGGAAAACCTGGAG
GAACTAGTTGTAGAAGGGTATAACCTATTTACAAAAAAAATTTGCCTTAACAGACATTAATAAGGATGGTAAT

ACCAGTACTACTGATGCAAATAATAAAGATGATAGTAAGGTTTCCTCCGTAACAGCAAAAATAGGAAATTTGTC
AGCAAAGTTCTAAACCTGAATTTGCCAGGTTATGTTTCAGTTAACTTTTTCAATTAGGGAATTAATTACAAAGTAC
AGTGGTTTGGAAAATCTAATTGAAGGATATGAAGAATTCAATGAATTAATGTATGGAATTAACCTTTCACATATGAT
TTAATTAGGGCA

SEQ ID NO:7 PL1473F18
TAACGAACGAGATCTTAA

SEQ ID NO:8 PL1679R18
GTTCTCTAAGAAGCTTT

5 SEQ ID NO:9 As1
TTTTTYRTTATCAAWTGWCAATGTGWAAC

SEQ ID NO:10 As2
GCYCTYAAAYAAATCATARTTAAAGTT

10 SEQ ID NO:11 PmMSP1-F1
AATGAAGATTATGAACAACCTYATTCAA

SEQ ID NO:12 PmMSP1-R1
AATTAATTCCCTAATTGAAAAAGTTAA

15 SEQ ID NO:13 MSP1-R1
GAAGCTGGARGARCTRCAGAA

SEQ ID NO:14 MSP1-R2
20 GAAGAACTRCAGAAAAYWCCMTC

SEQ ID NO:15 PmMSP1-F2
AAGTTGGGAAAACCTGGAGGAAC

25 SEQ ID NO:16 S-Bam24
AGGGACCTGGACATACGATGACTG

SEQ ID NO:17 S-Bam12
GATCCAGTCATC

30 SEQ ID NO:18 PmMSP1-F3
TCAGAATTACTTGGTGTAGACTC

SEQ ID NO:19 PmMSP1-F7
35 AGAAGGGTATAACCTATTTCAC

SEQ ID NO:20 PmMSP1-R8
CTAGTTCCTCCAGTTTTCCCAAC

40 SEQ ID NO:21 PmMSP1-R2
GAAGGCTCTTTATCTTCAACAC

SEQ ID NO:22 PmMSP1-R3
CAACACATCCTCCATCAMCTAG

45 SEQ ID NO:23 PmMSP1-F4
CCTGGTGCTATAAAGGAACCAG

SEQ ID NO:24 PmMSP1-F5
50 AGATGTCGTGGAATTACAAGTAC

SEQ ID NO:25 PmMSP1-R4
CTCTATATACTCCAGCTAATGG

55 SEQ ID NO:26 PmMSP1-R5
GAAGTTCTCGTCGTATTGCTC

SEQ ID NO: 27 PoMSP1-F1
CAAGTGTTAGCAAGTTAACAG

60 SEQ ID NO: 28 PoMSP1-F2
CGGACATAAGATTCCTTCTATC

SEC ID NO: 29 PoMSP1-R3

CTGTAACTTGCTAACCACTTG

SEQ ID NO: 30 PoMSP1-R6
TGTTGATGTTGCTATTAGAATCAC

SEQ ID NO: 31 PoMSP1-F8
CCACTGCAGATTGTGCAGAATCTG

SEC ID NO: 32 PoMSP1-R1
TTGGTACACATGTTTCTCCAAC

SEC ID NO: 33 PoMSP1-R2
ATCTCCATTCTTCTCGTCCATC

SEQ ID NO: 34 PoMSP1-F3
GTTGTTAGATGTAGATTCTGCTC

SEQ ID NO: 35 PoMSP1-F4
TTGAATTGGATTACTACTTACGAG

SEQ ID NO: 36 PoMSP1-F5
GATCACCTTTACGTCCCTCAG

SEC ID NO: 37 PoMSP1-F6
GACAATAAAATGTGATCAGTTAG

SEC ID NO: 38 PoMSP1-F7
AGTAGGTTAGATATGTCATTAGATC

SEC ID NO: 39 PoMSP1-R4
AGGTACGTCTTATACAGAGCAG

SEC ID NO: 40 PoMSP1-R5
GAAACGAGATTCCAACATGTTTG

SEQ ID NO: 41 ADN de PfMSP1-p19 (gen sintético)

GAATTCCATGAACATCAGCCAGCACCAGTGCCTTAAAAAGCAATGTCCGCAGAACTCCGGTTGCTTCCGTCATCT
GGACGAACGCGAAGAGTGTAAATGCCTGCTGAACACAAACAAGAGGCGATAAATGCGTGGAAAATCCGAACCC
AACCTGTAAACGAAAACAATGGTGGCTGCGACGCGGATGCTAAATGTACCGAGGAAGACTCTGGTTCCAACGGCAA
AAAGATCACTTGCGAATGTACCAAGCCGGACAGCTACCCGCTGTTCCGACGGTATTTCTGCTCTTCCAGCAACCA
TCATCACCATCACCATTGAGGATCC

SEQ ID NO: 42 ADN de PvMSP1-p19 (gen sintético)

GAATTCCATGGTTTCAGACCCAGCTGCTGACTATGTCCTCTGAACACACCTGTATCGACACCAACGTGCCGGACAA
CGCGGCTTGTTACCGTTATCTGGACGGCACCAGAGTGGCGCTGCCTGCTGACTTTCAAAGAAGAGGGTGGCAA
GTGCGTACCGGCGAGCAACCTGTAAGATAACAATGGCGGTTGCGCACCAAGAAGCTGAATGCAAAATGAC
TGACAGCAACAAGATTGTGTGTAAATGCACCAAGAAGGCTCCGAACCGCTGTTTGAAGGTGTGTTCTGTAGCTC
TTCCAGCCATCATCACCATCACCATTGAGGATCC

SEQ ID NO: 43 ADN PmMSP1-p19 (gen sintético)

GAATTCCATGGTTGATTCTAACGCGCTGCTGAATATCTCTGCAAAACACGCTTGCAACCGAACTAAGTACCCGGA
AAACGCTGGCTGCTACCGCTATGAAGATGGTAAAGAAGTGTGGCGCTGTCTGCTGAACATATAAACTGGTTGACGG
CGGCTGTGTTGAAGATGAAGAACCGTCTTGCCAGGTTAACAACGGCGGTTGCGCACCGGAAGCTAACTGCACTAA
AGGTGATGATAACAAAATTGTATGCGCGTGCAACGACCGTACTCTGAACCGATCTTCGAAGGCGTGTGTTGTTT
TTCTTCTCTCATCATCACCATCACCATTGAGGATCC

SEQ ID NO: 44 ADN de PoMSP1-p19 (gen sintético)

GAATTCATGGTGGATTCTGCACAACCTGCTGTCTATGGGCTCTAAACACAAATGTATTGATATCACGTATCCGGA
CAACGCAGGCTGCTACCGTTTTAGCGATGGCCGTGAGGAGTGGCGCTGCCTGCTGAACCTCAAAAAGGTTGGTGA
GACCTGCGTTCCGAACAACAACCCGACCTGCGCGGAGAACACGCGGTTGCGACCCGACTGCCGACTGTGCGGA
AAGCGAAAACAATAAGATTACCTGCACGTGCACCGGTCAGAACGAGAGCTTTTTCGAAGGTGTCTTCTGTTCTC
CTCTCTCATCATCACCATCACCATTGAGGATCC

SEQ ID NO: 45 secuencia de aminoácidos de PfMSP1-p19

5 MNISQHQCVKKQCPQNSGCFRHLDEREECKCLLNKQEGDKCVENPNPTCNENNGGCDADAKCTEEDSGSNGKKI
TCECTKPDSPYPLFDGIFCSSSNHHHHHH

SEQ ID NO: 46 secuencia de aminoácidos de PvMSP1-p19

10 MVQTQLLTMSSEHTCIDTNVPD^ˆNAAC^ˆRYRLDGTEEWRC^ˆLLTFK^ˆEEGGKCVPASNV^ˆTKDNNGGCAPEAECKMTDS
NKIVCKCTKEGSEPLFEGVFCSSSSHHHHHH

SEQ ID NO: 47 Secuencia de aminoácidos de PmMSP1-p19

15 MVDSNALLNISAKHACTETKYPENAGCYRYEDGKEVWRCLLN^ˆYKLVDGGC^ˆVEDEEPSCQVNNGGCAPEANCTKGD
DNKIVCACNAPYSEPIFEGVFCSSSSHHHHHH

SEQ ID NO: 48 Secuencia de aminoácidos de PoMSP1-p19

20 MVDSAQLLSMGSKHKCIDITYPDNAGCYRFS^ˆDGREEWRC^ˆLLNFKK^ˆVGETCVPNNNPTCAENNGGCDPTADCAESE
NNKITCTCTGQNESFFEGVFCSSSSHHHHHH

SEQ ID NO: 49 MSP1

20 ATGAACATCAGCCAGCACCAGTGC^ˆGTAAAAAGCAATGTCCGCAGAACTCCGGTTGCTTCGGTCATCTGGACGAA
CGCGAAGAGTGTA

SEQ ID NO: 50 MSP2

25 TTCGTTACAGGTTGGGTTCCGATTTTCCACGCATTTATCGCCTTCTTGT^ˆTTGTAGTTCAGCAGGCATTTACACTC
TTCGCGTTCTGTC

SEQ ID NO: 51 MSP3

30 CGAACCCAACTGTAACGAAAA^ˆCAATGGTGGCTGCGACGCGGATGCTAAATGTACCGAGGAAGACTCT
GGTTCCAACGGCAAAAAGAT

SEQ ID NO: 52 MSP4

35 GTTGCTGGAAGAGCAGAAAA^ˆTACCGTCGAACAGCGGGTAGCTGTCCGGCTTGGTACATTCGCAAGTGA
TCTTTTGGCGTTGGAACC

SEQ ID NO: 53 MSP5

40 ATGGTTCAGACCCAGCTGCTGACTATGTCCTCTGAACACACCTGTATCGACACCAACGTGCCGGACAACGCGGCT
TGTTACCGTTATCTG

SEQ ID NO: 54 MSP6

40 TGCTCGCCGGTACGCACTTGCCACCCTCTTCTTTGAAAGTCAGCAGGCAGCGCCACTCTTCGGTGCCGTCCAGAT
AACGGTAACAAGCCG

SEQ ID NO: 55 MSP7

45 CAAGTGCGTACCGGCGAGCAACGTAACCTGTAAAGATAACAATGGCGGTTGCGCACCAGAAGCTGAATGCAAAAT
GACTGACAGCAACAA

SEQ ID NO: 56 MSP8

GCTGGAAGAGCTACAGAACACACCTTCAAACAGCGGTTCCGAGCCTTCTTTGGTGCATTTACACACAATCTTGTT
GCTGTCAGTCATTTT

ES 2 636 976 T3

SEQ ID NO: 57 fMSP1-F1
ATCGAATTCCATGAACATCAGCCAGCACCAGTG

5 SEQ ID NO: 58 fMSP1-R1
TGGTGATGGTGATGATGGTTGCTGGAAGAGCAGAAAAT

SEQ ID NO: 59 vMSP1-F1
ATCGAATTCCATGGTTCAGACCCAGCTGC

10 SEQ ID NO: 60 vMSP1-R1
TGGTGATGGTGATGATGGCTGGAAGAGCTACAGAACAC

15 SEQ ID NO: 61 pL - His
TATGGATCCTCAATGGTGATGGTGATGATG

REIVINDICACIONES

1. Un método 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 dichos anticuerpos que comprende las etapas de:

(a) poner en contacto dicha muestra de ensayo con 1) un antígeno de polipéptido MSP1-p19 de *P. malariae* que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 47, 2) un antígeno de polipéptido MSP1-p19 de *P. ovale* que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 48, 3) un antígeno de polipéptido MSP1-p19 de *P. vivax* que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 45 y 4) un antígeno de polipéptido MSP1-p19 de *P. falciparum* que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 46, en donde que los antígenos están unidos a una fase sólida, durante un tiempo y bajo 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 producto conjugado a los complejos de anticuerpo/antígeno resultantes durante un tiempo y bajo condiciones suficientes para permitir que cada producto conjugado se una al anticuerpo unido, en donde dicho producto conjugado comprende un anti-anticuerpo humano anclado a un compuesto generador de señal capaz de generar un complejo detectable señal; y

(c) detectar la presencia de anticuerpo contra el anticuerpo de *P. malariae*, *P. ovale*, *P. vivax* y *P. falciparum* que puede estar presente en dicha muestra de ensayo detectando la presencia de dicha señal generada por dicho compuesto generador de señal.

2. 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 de polipéptido MSP1-p19 de *P. malariae* que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 47, ii) un antígeno de polipéptido MSP1-p19 de *P. ovale* que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 48, iii) un antígeno de polipéptido MSP1-p19 de *P. vivax* que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 45, y iv) un antígeno de polipéptido MSP1-p19 de *P. falciparum* que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 46; y

b) un producto conjugado que comprende un anti-anticuerpo humano anclado a un compuesto generador de señal capaz de generar una señal detectable.

FIG. 1A

AACTGGTGAGAGAAATGACAACTTAAAACTTCTTAACTTAACTGCAACACAGTGCAGCTGCACTCTGGGCACTTACCAGCTCCACCCTCAGTACCACC
TGCAGTACCACAGGATCACAACAGCCACAACTCAAGCAGCACTTACCAGCACAACCTCAAGCAGCAGTACCAGCACAACCTCAAGCACAACAGTACCAGCA
CAATCTCAAGCAGCAGTACCAGCAACAACTCAATCCCTCA TGGTATCAGCACCACAGGTACAAA TGGTGCATCCCCAGCAACCTCCGTAGCTCCAGCTG
GTAGTGAATA TGGGATTGAGTTAAAGCGAA TGACAGCAGCAGTGCAAA TGAAC TAGATTTCCACATGAGGATATTTATATAAAATACITTAGAACA
AGTCAGCAAA TAGCAGCAGAACTTCAAAAAATTTTATAGAGTCCAAAAGACATATAAATTAAGTACGCGAAGTGAA TGGAAAGAAATTAGGAAGAA
ATCAACACATTTGAACAAGATACAAATCATCTTTGATAATTTTGGAAAAATATAAACTTAAATTTGAAAGATATTTAAAAAGAAAAATAAAAATTACAA
GCAGTACTAATCATATTAAGAAATATAGTATTTTAAAGCACAATTAAGGAAAAAAAATTTCTAAATAACCCAGACATGTACTAGCAGCTTTTGT
AGTATCTTTAATAAAGATAGAACGAGAAAAAGAAAGTTGAAA TGGTTTAAAAATACTGATATTATGTGAAAAATTTAAGGCAAGAAACCAAA
TATTAATTAGTGAAGCATTCCTTTAAAAACAATACTGACAAATCCTTCAAAAAGAAA TTAAC TATTTACATTTAGAAAAATTTAAAGTATATAGTA
GATTAGAAGGACGCAATTAAGAAAAATGTTGAAATTTAGAAAAAGAAAATTAAC TACTTATCTGGTGGATTACATCATGTACTACAGAAATTAAGAGAT
CATAAA TGATAAACAATACACGGTTATACACATACATAAAATTAACGAAGTTAAACAAGCGTTAAATGTTTATGAGGAATGCTTCCAAAGCAATA
TCCACAGAGAGCAACCGGATAA TGCAATTAGCAGATGGAACGAAAAATGCAACAGAGGTGCAGAGTGGTGCAGCAACTGCAGAAAGTTTAGTCCAGG
GAGAAGATGAGTACCTTGAAGAGTTGATGAGGTGATCGTGTTCCTCATTTGGGTAAGAAAGAAAAAGGAAAAATCCATTAGATCAAAATACAAAAGGACA
AGCTGAACTAAACAGATGATAATATTGAACCAATTACAAA TGAGTATGAAGTATTAATATAATTAACCACTTAGCTGGAGTATATAGAGTTTAAAGA
AAACAAATAGGAGATCAGATGAGCGCTTTTAAATAGTAATTTGACAAATGCTTTGGATACCTGCAAAAAGAAAAAGAACATAATTTCTTAGATGTTAAATTT
CTGATTTAATTTCAATTTAAACATGCAACTTCCGACAGTTATATTAAGAATCCGTATAAACTATTAGATTTGATAAGAAAGCGAAGCTTATAGSTAG
CTATAAATATATGCTCTCTGCAATAGAAAAGSATATCCTTCACTGAGAACGAGTAGAATATATGATAAGATGACCAAGTTGTACAAGACTCAGTTA
GAAGCAGTAAAAGCGCAATTCCTGAAGCACAAGAGAGGTTGATAAAAACTGAAAATGAAAATATATTCCTTCTTAAGCAACATGCAAGACATTAAT
ATGAAAAATTTTGAATAAATTAATGGAACATAATAAATTTAAAACTTTTAAATACAACTGTAATTTAGAAAAGATGCAAGTAAACATTTACTATAAG
TAAATTAACAGAAATACAGCAATTTGATGAAAAATAGAAA TGTAAAACTTAAAAATGAAAAGGATATAGCAAGTTCTGSAATATTAGACATACTTT
AAACAAAAGGACTTGTATATAAATGAATCAACTAGATTATATCAGAA TTTACTTGGTG TAGACTCTAAATGCAATTTACTGAAATTTAGCGCAAAAACA TG
CATGTACCGAAACAAAA TATCCCTGAAAA TGCAAGCA TGTATAGATA TGAAGACCGGAAAAAGAGTA TGGAGATGCTTTAATAATTAATAAHC TAGTTGATGG
AGGATGTTTGAAGATGAAGAGCTTCTTGTCAAGTTAACA TGGAGGATGTCCTCC TGAAGCTAAC TG TACCAAGGAGATGACAAACAAAA TTTGCTGT
GCCTGTAAACCGCACCTTATCTGAACCTATATTTTGAAGG TGTTCGTG TGGTCTTCAAGCTTCCCTGCTTATCATA TTTAGCAGCTTTTATTAATTA
TGTTTAACTTACTTTAGAAAAAAGACAGAAAAAGAGGATACGAA TGAACA TAAAA TGAAGGATTAAGACTGAGCAAGGAAAAAGAGAGAAAAATCA
TAGATC 5406

 = Codón de inicio

 = Codón de parada

Negrita = Secuencia que codifica MSP1 - p33

Cursiva = Secuencia que codifica MSP1 - p19

FIG.1B

SEQ ID NO:1 (Secuencia de aminoácidos deducida de PmMSP1)

1
TNYEQL IQKLGKLEELWEGYNLFHKKKFFALTDINKDNTSTTDANNKDDSKVSSVTAKIGNFVSKVLNLLNLPGVYVQL
TFSIRELITKYSGLKYLIEGYEENELMYGINFYYDLRAKLNMDHLNGYQDIPNHLKINEKELEMLKVVGYRKPLENIKDDINKMEKFIITNEATVN
NIKELIKKEYNNIADENKKLEAPSESGDDEIKVNEKQIKYKSRYNILFYEQALLEAQKLEVLKKRIQTLKENTDJKLLDEIKEIEGKLPITSGSEA
SASAAAPGAIKEPENTQIKERQEKIKEIAKNI VFNMDGLFTDAFELDYYREKEKKSNSATQLANGKAVNRTPPAVMYPHGIIYAVSDDAISNILSK
SSQLTLEELQNPDPNRKQITIDDLKDNKRKELITIKNKITIEEGKLNALKGVDSKLEKFKIIEGEFKPLLEKFYDERLDNSITTENEKFI SKRTEY
LTEKNLLESSVELSKALVKLKKQLMYLEDYSLRKEVFDEEWNHFQDQLNADITHKLESEIKRKENLLTWDTLKFSDVVELQVQKVLGKKIGQLK
NVEAFLOKAKLKEITHIPQAYGTGEQSEPYLIALKREIDKLNISIPKIEEMLKNEKLEEEKIKAAQNVSGHVSAGDETNSHGSSGGGGSTQTVTT
PSTTTATTSSQTVSVGETGSAQAQAQPQPQPQIQTIQTQTPQAAGATGPGQSGSGSGSGSAGEGTETTGTTGQAGTGTGPEQAAAAGPQAE
TATPGQAGAAGAGPQAEITGTPGQAGAAGPQETETEVEETQETIGIVPTLSKLYLEKLYDFLKTAYQCHINILVNNSTMNLTLLQQYKLIKIEEDKKLLE
KQDQLDLFLNVQNNLQVMYSVDSVSNVLQNOYKELNQKEMTYNYKLVKNDKLNFLNLTANSAASSALPPPPSVPPASQQPQPAALPAQPQ
AAVPAQSQATVPAQSQAAVPAATTQSSSVSAPTGTNGASPA TPVAPAGSENAIQLKANDNEDDANELDFDIDDIYIKYLEQVSKYDENFKNFIESKKDIN
KMSESEWKEGEEINTLKQDIQSSDFNGKYKLERLLKKNNKITSSTNHIKEYSILKAQLLRKNILNPRHVLAAFVFFNKKIEAEKKEVENALKN
TDMLYKYPARTKYIYSEAFPLKTIIEQSLQKINYLHLEKFKVSRLEGRICKMLNEKENITYLSGGLHHVLTELKEINDKTYTGYTHTKNNEEVNK
ALNVYEELLPKQISTEEQPDNALADGTENATEGAEVRAATAESVQGEDEYPEEVDENVFPVIGKKEKENPLDQITKGQAEITKQDDNLLKPITINEYEV
YIKPLAGVYRVLRKIQGQIDAFNSNLTNALDTRKKKRTYFLDVLNSDLIQFKHATSQSYI IKOPYKLLDVDKAKLIGSYKYIVSAIEKDI TSAENGVE
YYDKMTKLKYLQLEAVKSAIEAQEGDKKTENEKYTPFLTNMOTLYENLLNKINGNIINLKTLITNQLKEQAWNITTSKLTYSKFKDEKIEKFNKSN
EKDIASSGILDILKQKGLVKNESTKIISELGLGVDSMALLNISAKHAGIETKYPEMACQRYEDGKEVHMQLLNYKLVGGQIIEDEEPPSQVWNGGQAPE
ANDTKGDDNKIVQAMAPYSEPIFEGVFQSSSSFLGLSLLAALLIMFNLL* 1751

 = Péptido señal

☐ = Residuos de cisteína

Negrita = Residuos de MSP1-p33

Cursiva = Residuos de MSP1-p19

FIG. 2

SEQ ID NO:4 (Secuencia del gen PoMSP1)

1 AATCAAAAGGTTGGTATTGCGCTCTTTCATTTTTTATTGTGAACGTCAATGTGAAGCCTCGAAAAATTATAAAGAGCTTCTTCATA
 AGTTAAATAATTTGGAAGCTTAGTGGTTGATGGCTACAACTTATTTACAAAACTCCCTTAACCCCTACAAAAGTTAGAAGTGAAGTCACAACACTACG
 AAGAGTAGTGGTAGCAGTACTACTTCGTTTCCATCCAGTGTAGAGTGTATCTACCCGTGATCTACCCGTGATCTAATAGCAACATCAACAACCAA
 GTGGTAGCAAGTTAACAGCGGACATAGATTCCCTCTATCAAGATTTTGCAGTTAAATATCCAGGACATGGAGATTAAATGCATTTTCATAAGAGAAA
 TTTGGTTAGATACAAACGGACTAAAAATCTAATAGAAGGATAGAAGATTTAACGAGTTAATGTACATATTGAACTTTATTATGATCTGTTTCAGAGC
 TAACTACATGATATGTGCAATGATTTGTGAATACCAAGACCATCTTAAAAATTAGTGAATGGGAATGGACATGCTCAAAAAAGTTGATTAGGA
 TACAGAAAACCGTTAGAAAAATAAAAGACGATATTTCAAAAAATGGAGACATTTCTCAAAAAATCTCAACACAGTGGAAAAATATAAAGGGCTTTAATAG
 AGGCAGAGAAAAAAGGATATGGTGAGGTTGCAGTAAGTGAATACAGGAAGTCAGGAGCTGCCCTCAGGAACCTAATGCATCTGCAAGTTCAAGCCCA
 AGAAAAATCTTCTACTGAAGCGAACAGAAAAGTATAACAAAGCTAAGCTTTATATCAATCCATATATAAGCCCTTATTTACAAAAAGCAGTTAACA
 GAGCAGAAAAATTAATCGAAGTTTAAAAAGCGTGTCGAAGCTTAAAGAGCACAAAGAGATAAAAAATTAATCTCGAAGAAAATCCCGGAAAAAGGAAA
 GCAAGTTACCCACCGAGTAATACCGCTTCACAAACGCACTGCAGGAAGAAATTAACAAACTTAAACTCAAAATTAAGAACATCGCAAAAACTGTAAA
 ATTCGAAATGGAAGTCTGTTTACTGATCCCTGTTGAATTGGATTACTACTACGAGAAAAAGCACAAGGAAAGTAAAGTAGTAAAAACACAAAGTGGT
 TCAACAACTCGCGCTAAGCCTACGTATCCCAATGGTCTCATCTACCCCTTTCGAAAAAGAAAAACATCTCGAGTTGTTATCAAAAGCGGTGACAGAAACAA
 CTTTGGTGATTTACAAAAATGTAAGAAATGGAAAAAGCATTAATAAAGAAATTTTCAGGAATGATGATAAGAGAAATGAATTCATAGACAAACTTAAAAA
 TAAAAATAAACACAGAGAAGACTTTATCTAAACAAAAAGTGGACTATGATGCCAAACTTAAATTTGTACGAGGAGCAAAAAGAGAAAGCTATTCGCCCTA
 TTTGAGCAGTTTCACAATGGAAAACTTGACACACACACTTATCTCTAGTAAATTCGAAGAAATTAAGTAGAAGAGACACAAGTATATGCCAACTCAAGAACG
 AGTTAAAAAATGTCCATAGCAATAGCAAAAAAACACCGTGGATAAGTTAAATAACAACCTTGCATATTTGAAATGACTACTCATTTGAGAAAAAGAASTTTT
 TAATAAGAAAGTTAAACATTTACAGGATTAGAGTGGAAACTACAACCTGAAATTCGCAAAATAGCAAAAGTAAAGAAAAATGAAAAATATACTTATA
 ACAGCATCTACCTTACCATTATCTAATGTAGTAGAATTTACAAGTACAAAAAGTATTAGTACAAAAAAATTTGAACCTTTAAAAAAGTAGAAAAACTTTT
 TACACAAAGCACAGTTGAAAGATCAGCTTTACGTCCCTCAGGTTTATGGTACACAAGCGAAACCTGAAGCATACTATTATTGTCCTGAAAAAGGSAAT
 TGACAAACTGGGGAAATTAAGCCTAAAAATAAGGAGATGTTAGATAGGAGAGGCAAAACCCCTCCAGCGACAGCACAGGAGCCCTTCCAGTTGGA
 GGGGTTGATGAATACTAGTCAATGGGAATCAAAACGAAAGCTACAGCAGTAGATCAGCATCAACATCAACAGATCAATCCGAGGAGCAACACACACAG
 CAGCAACAGTACAGCCAGCGCAGGAGTACAACGGGAATACCAGTAGCACAGCAGGAGCATCAGCACAGGAGTACCAGAGCAGCAGCAGCAGCAGCAG
 AGCAACAGCAGCAGAGTACCAGCAATAGAAGCACAGCAGCTGTCGACCTACGCAAGGAGGAGTCCAGGAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAG
 AAATTACAATACTCGAGAAGTTATTTACTTTTGTATACCTCCTATGATGTCATTAAGTACATTTTAGTGAACAACCTCTACAAATGAACAAGATTGTT
 TGGCAAAATATAATCTTACACCAAGAGAGAAAAAAGACAAATAAAATGATCATGTTAGATTATTTGTTTAACCTTACAAAAACAATTTACCAGT
 CATGTTATCTCTCTTTGATAATATGAGCTCGACTTTGCAAAAGCAATTACATTCAAATTTATATGAAAAAGGAAATGCTGTACAATATATACAAGATGAAAAAC

FIG.3A

 = Códón de inicio

☐ = Codón de parada

Negrita = Secuencia que codifica MSP1 - p33

Cursiva = Secuencia que codifica MSP1 - p19

FIG. 3B

[illegible]

 = Péptido señal

☐ = Residuos de cisteína

Negrita = Residuos de MSP1-p33

Cursiva = Residuos de MSP1-p19

FIG. 4

Secuencia génica y traducción de PmMSP1

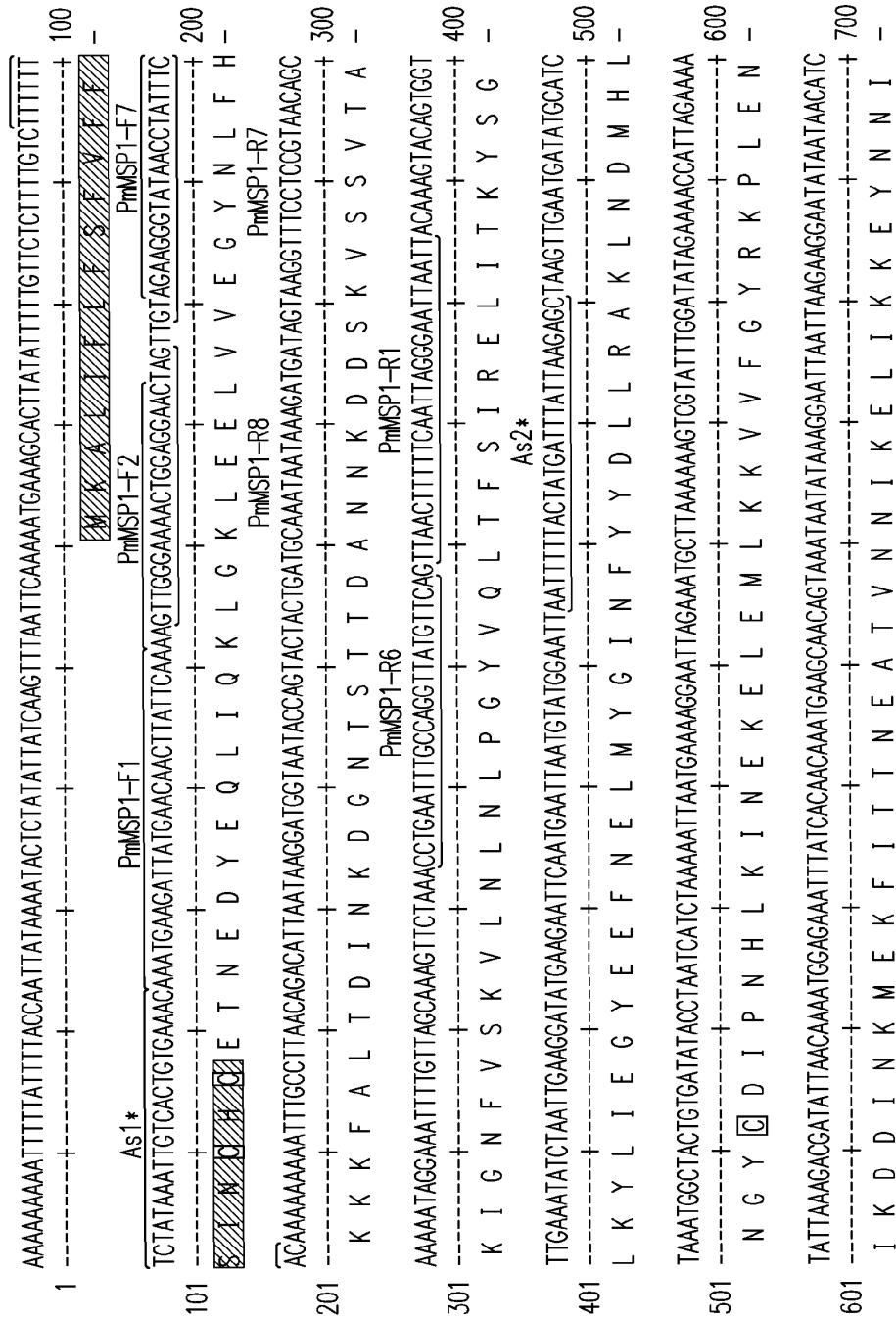


FIG.5A

FIG. 5B

1501 ACTTGATAATAGCATTACAACAGAGAATTTTGAAAAATTTTAAAGTAAAGAACAGAAATATTAAACGGAAGAAAGATTTGCTTGAAGCTCTTCTTACGAA
 L D N S I T T E N F E K F L S K R T E Y L T E K N L L E S S Y E -
 1601 TTGTCGAAAGCATTGGTAAAGAAATTTAAAAAGCAACTTATGCTATTAGAAGACIATTCATTAGAAAAGAGATTTTGATGAAGAGGTAAATCATTTCA
 L S K A L V K K L K K Q L M Y L E D Y S L R K E V F D E E V N H F N -
 1701 ACTGCTTAGACTTACAAITTAATGCTGATATTCATAAATTAGAAAGTGAAATTTAAAGAAAAAGAAATTTACTTACAGTAGTTGATACCTTAAAAATTTTC
 L D L Q L N A D I H K L E S E I K R K E N L L T V V D T L K F S -
 1801 AGATGCGTGGAAITTACAAGTACAAAAAGTATTATTAGGTAAGAAAAATAGGACAACTAAAAATCTAGAGCATTTTACAAAAAGCAAAATTTAAAGAA
 D V V E L Q V Q K V L L G K K I G Q L K N V E A F L Q K A K L K E -
 1901 ACGTTTCACATCCCCCAAGCATACGGAACAGGAGAACAAATCCGAACCATACTATTAAATTCGCACTAAAGAGGAAAAATTTGATAAAATTAATTTCTATTC
 T F H I P Q A Y G T G E Q S E P Y Y L I A L K R E I D K L N I S I P -
 2001 CAAAAATTGAGGAAATGTTAAAAATGAGAAAAAACTGGAGGAAGAAAAATCAAGGGCGGAGCAGCAAAAATGTAAGCGGCCATGTTCCGGAGCAGATGA
 K I E E M L K N E K K L E E E K I K A A A Q N V S G H V S G A D E -
 2101 AACATCAAACAGTCATGATCATCTGGAGGAGGAGGATCAACACAAACAGTAAGCACAACACCATCAACTACAAACAGCAACTACATCATCACAACAA
 T S N S H G S S G G G S T Q T V T T T P S T T T A T T S S Q T -
 2201 GTATCAGTAGGAGAAACAGGATCAGCACAGCACAAGCACAACCAACCAACCAACCAACCAACCAACCAACCAACCAACCAACCAACCAACCAACCAAC
 V S V G E T G S A Q A Q A Q P Q P Q P Q P Q T Q T Q T Q T Q P Q -
 2300

FIG.5C

2301 AAGCAGCAGGAGCAACGGGAACACACAGGACAAATCAGGACAATCAGGAGCTGAGGAAACAACAGAAACTACGGGAACAACAGG
 A A G A T G T P G Q S G Q S G Q S G Q S G A E G T T E T T G T T G -
 2401 ACAGGCAGGAACAACGGGAACACAGAACAAGCAGCCTGCAGGACCACAGCAGAAACTACGGCAACACCCAGGACAAGCAGGAGCTGCAGGAGCTGCA
 Q A G T T G T P E Q A A A A G P Q A E T T A T P G Q A G A A G A A -
 2501 GGACCACAGCAGAAACTACGGGAACACACAGGACAGCGGGAGCTGCAGGACCACACAGACAGACAGAAGTAGAAGAAACTCAGGAAATTCGAAATCGTTG
 G P Q A E T T G T P G Q A G A A G P Q T E T E V E E T Q E I G I V V -
 2601 TTCGACATTGTCCAAATTCGAAATATCTTGAAAAGCTATATGACITTTTGAAAACTCGTTATGTGTCATATCAGACATTTTGGTAAATAACTCAACCAT
 P T L S K L Q Y L E K L Y D F L K T A Y V C H I N I L V N N S T M -
 2701 GAATGAAACGTTACTACAGAATATAAACTGAAGATAGAAGATAAGAAATTTAGAGAAGTCGACCAATTAGATTGTTATTTAATGTTCAAAAT
 N E T L L Q Q Y K L K I E E D K K L L E K C D Q L D L L F N V Q N -
 2801 AACTACAAGTCATGTATTCAATGTATGACAGTGTGAGCAATGTTCTACAAAATCAGTACAAGAATTAACCCAAAAGGAATGATTTATAATATTATA
 N L Q V M Y S M Y D S V S N V L Q N Q Y K E L N Q K E M I Y N I Y K -
 2901 AACTGGTGAAGAAGAAATGACAAACTTAAACCTTAACCTGCAACAGTCGACGTGCATCTTCGGCATTTACCACTCCACCAATCAGTACCACC
 L V K K N D K L K N F L N L T A N S A A S A L P P P S V P P -
 3001 TGCAGTACCACGAGCATCACACAGCCCAACCTCAAGCAGCATTTACCAGCACAACTCAAGCAGCAGTACCAGCACAATCTCAAGCAACAGTACCAGCA
 A V P P A S Q Q P Q P Q A A L P A Q P Q A A V P A Q S Q A T V P A -

FIG.5D

```

3101 CAATCTCAGCAGCAGTACCAGCAACAACCAATCCTCATCGGTATCAGACCAACAGGTACAAAATGGTGCAATCCCGCAGCAACCTCTGTAGCTCCAGCTG
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
Q S Q A A V P A T T Q S S S V S A P T G T N G A S P A T P V A P A G - 3200

3201 GTAGTGAATAATCCGATTTCAGTTAAAAGCGAATGACAACGAGGAGCGATGCAAAATGAACCTAGATTTCACATTGACGATATTTATATAAAATACTTAGAACA
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
S E N A I Q L K A N D N E D D A N E L D F D I D D I Y I K Y L E Q - 3300

PmMSP1-R5
3301 AGTCAGCAAAATACGACGAGAACTTCAAAAATTTTATAGAGTCCAAAAAGAGATATAATAAATAGATGACGAAAGTGAATGGAAAAGAAATTAGGAGAAGAA
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
V S K Y D E N F K N F I E S K K D I I N K M S E S E W K E L G E E - 3400

3401 ATCAACACATTGAAACAGATATACAATCATCTTTGATAATTTTGGAAAAATATAAACTTAAATTCGAAAGATTATTAAGAAAGAAAAATAAAATTACAA
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
I N T L K Q D I Q S S F D N F G K Y K L K L E R L L K K K N K I T S - 3500

3501 GCAGTACTAATCATATAAGAATATAGTATTTTAAAGCACAAATTATTAGGAAAAAAAATATTCTAAATAACCCAGACATGTACTAGCAGCTTTTGT
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
S T N H I K E Y S I L K A Q L L R K K N I L N N P R H V L A A F V - 3600

3601 AGTATTCTTTAATAAAAAGATAGACGAGAAAAAGAAAGTTGAAAATGCTTTTAAAAAATACTGATATTATGTGAAAATATTATAAGGCAAGAACCCAAA
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
V F F N K K I E A E K K E V E N A L K N T D I M L K Y Y K A R T K - 3700

3701 TATTATATTAGTGAAGCATTCCTTTAAAAACAATAACTGAACAATCACTTCAAAAAGAAAATTAACATATTACATTTAGAAAAATTTAAGTATATAGTA
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
Y Y I S E A F P L K T I T E Q S L Q K E I N Y L H L E K F K V Y S R - 3800

3801 GATTAGAAGGAGCCATTAGAAAAATGTTGAATTTAGAAAAAGAAAAATATTACCTACTTATCTGGTGGATTACATCATGTACTACAGAAATTAAGAGAT
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
L E G R I K K M L N L E K E N I T Y L S G G L H H V L T E L K E I - 3900

```

FIG.5E

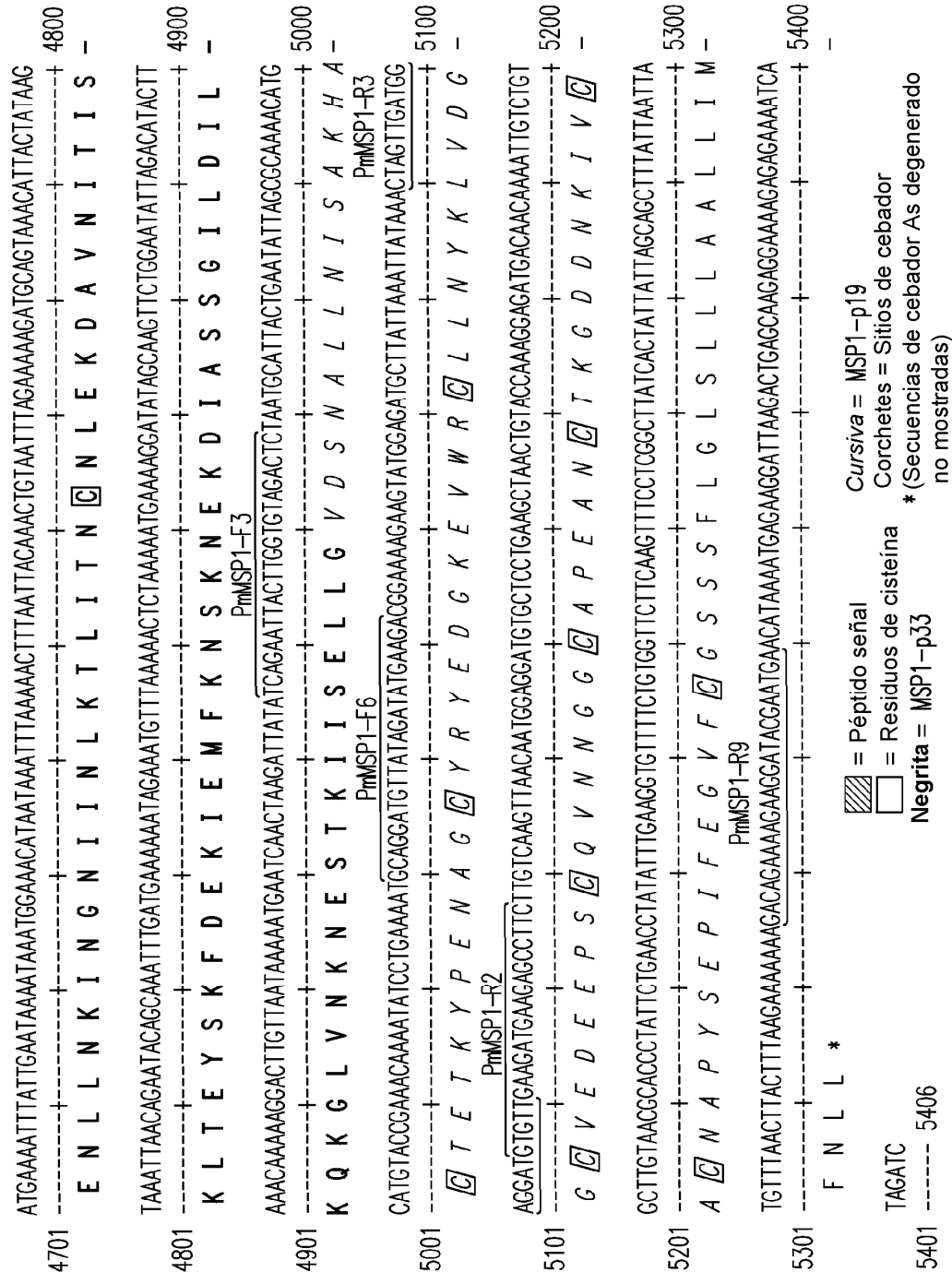


FIG.5G

[illegible]

FIG. 6A

FIG. 6B

1254 KMLNLEKENITYLSGGLHVLTELKEIINDKTYTYGTYHTKNNEEVNKALNVEELLPKQISTEE.....QPDNALA 1324
 1163 KDTELERSNI SYLSGGLHVLDRAEFIINDKKYSGKDHAKNIAEVKKALQAYQELIPKVTQSQESTSVAVTPGAVVPGVPTAAAAGSCASCAGVPPAAAAG 1262

1325 DGTE.....ATEG.....AEVRAATAESLVQGEDEYPEEVDVIFPVGKKEKENPLDQITKGQAEKQDDNLIKPTINEYEVLYIKPLAGVYR 1410
 1263 SGASCAGVPPAGGPPATGGVPGVGVESAEAQTKAAQD.YAEDYDKVIALPLFGNDDDDGEEQQVTTGAESEAPEILVPAGISDYDVWVYLKPLAGMYK 1361

1411 VLRKIQGQIDAFNSNLTNALDTRKKRRTYFLDVLSNLIQFKHATSDSYIIKOPYKLLDVKKAKLIGSYKYIVSAIEKDITSAENGVEYDKMTKLYK 1510
 1362 TIKKQLEHNHAFNTNITDMLDSRLKRNYLEVLSNLIQFKHATSDSYIIKOPYKLLDLEKKKLLGSKYKYGASIDKDLATANDGVTYYNKMGELYK 1461

1511 TQL.....EAVKSATAEAQEGD.....KKTENEKIYPLTNMOTLYENLLNKINGNIINLKTLITNMLEKDAWITISKLTETYS 1586
 1462 THLTAVNEEVKKVEADIKAEDDKIKKIGSDSTKTTEKTCMAKKALEKYLPLNSLQKEYSLVSKVNTYTDNLKKVINQGLEKKEAETVKKLQDYN 1561

1587 KFDEKIEFMKSNKEKDITASSGILDILKOKGLVNKNESIKITISELLGVDSNALLNISAKHATETETYPENACQRYEDGKEWMDLLNYKLVDGQGVDEDE 1686
 1562 KMDKLEEYKSEKKNEVKSGLLEKLMKSKL IKENESKEILSQLLNVQTL.TMSSEHTDIDTNVPDNAADRYLDGMEFWMDLTFKEEGGKQVPGS 1660

1687 EPSQVWNGGQAPAEANGITKGDDNKIVQVAPYSEPIFEGVFGSSSFGLSLLLAALLIMFN.L* 1752
 1661 NVTDKDMNGGQAPAEANGITKSDSNKIVQVITKEGSEPIFEGVFGSSSFGLSLLMLFLQLQML* 1727

▨ = Péptido señal
 □ = Residuos de cisteína
Negrita = MSP1-p33
Cursiva = MSP1-p19

FIG. 6C

Alineamiento de *P. malariae* (Camerún 0014) vs. secuencia GenBank de *P. malariae*
 AF138881 secuencia de ADN 5' de MSP1

0014	1	AAATGAAGATTATGAACAACCTTATTCAAAGTTGGGAAACTGGAGGAAC TAGTTGTAGA	60
AF138881	30	AAATGAAGATTATGAACAACCTCATTCAAAGTTGGGAAACTGGAGGAAC TAGTTGTAGA	89
0014	61	AGGGTATAACCTATTTCACAAAAAAATTTGCCCTTAACAGACATTAATAAGGATGGTAA	120
AF138881	90	AGGGTATAACCTATTTCACAAAAAAATTTGCCCTTAACAGACATTAATAAGGATGGTAA	149
0014	121	TACCAGTACTACTGATGCAAAATAATAAGATGATAGTAAGTTTCCTCCGTAACAGCAAA	180
AF138881	150	TACCAGTACTACTGATGCAAAATAATAAGATGATAGTAAGTTTCCTCCGTAACAGCAAA	209
0014	181	AATAGGAAATTTGTTAGCAAAGTTCTAAACCTGAATTTGCCAGGTTATGTTTCAGTTAAC	240
AF138881	210	AATAGGAAATTTGTCAGCAAAGTTCTAAACCTGAATTTGCCAGGTTATGTTTCAGTTAAC	269
0014	241	TTTTTCAATTAGGGAAATTAATTACAAAGTACAGTGGTTTGAAATATCTAATTGAAGGATA	300
AF138881	270	TTTTTCAATTAGGGAAATTAATTACAAAGTACAGTGGTTTGAAAAATCTAATTGAAGGATA	329
0014	301	TGAAGAAATTCAAATGAATTAATGATGGAATTAATTTTACTATGATTATTAAAG	354
AF138881	330	TGAAGAAATTCAAATGAATTAATGATGGAATTAATTTTACTATGATTATTAAAGGCA	383

FIG.7

[illegible]

FIG. 8A

```

AGGCAGAGAAAAAGGTATGGTGAGTTGCAGTAAGTGGAAATACAGGAAGTGCAGGAGCTGCCTCAGGAACATAATGCATCTGCAGTTTCAGGCCA
701  +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
A E E K K R Y G E V A V S G N T G S A G A A S G T N A S A S S G Q -
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+

AGAAAAATCTTCTACTGAAGCGAAACAGAAAAAGTATAACAAAGCTTAAGCTTTATATCAATCCATATATAAGCCCTTATTTTACAAAAAGCAGTTAACA
801  +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
E N S S T E S E T E K Y N K A K A L Y Q S I Y N A L F Y K K Q L T -
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+

GAAGCAGAAAAAATTAATCGAAGTTTAAAAAAGCGTGTGCAACGTTAAAGAGCACAAGAGATAAAAAAATTACTCGAAGAAATCGCGGAAAAAGGAAA
901  +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
E A E K L I E V L K K R V Q T L K E H K E I K K L L E E I A E K E S -
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+

GCAAAGTTACCCACCGAGTAATACCGCTTCACAAACGCAACTGCAGGAAGAAATTAACTAACTTAACTCAAAATTAAGAACATCGCAAAAACTGTAAA
1001 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
K V T P P S N T A S Q T Q L Q E E I N K L K T Q I K N I A K T V K -
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+

ATTGCAATGGAAGTCTGTTTACTGATCCGTTGAATTGGATTACTTACGAGAAAAAGCACAAAAAGGCAAGTAAAGTAGTAGAAAAACACAAGTGGT
1101 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
F E M E G L F T D P V E L D Y Y L R E K D K K A S K V V E T Q S G -
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+

TCAACAACCTCCGCCTAAGCCTACGCTATCCCAATGGTCTCATCTACCTTTTGGAAAAAGAAACATCTCTGAGTTGTTATCAAAAGCCGTGACAGAAACAA
1201 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
S T T P P K P T Y P N G L I Y P L E K E N I S E L L S K A V T E T T -
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+

CTTTTGGTGATTACAAAATGTAGAAATTCGAAAAGCATTAAATAAGAAATTTTCACCAATGATGATAGAGAAAATGCAATTTCATAGACAAACTTAAAAA
1301 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
F G D L Q N V E I G K A L N K E I F T N D D K R N E F I D K L K N -
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+

TAAAAATTAACAACAAGAGAAGCTTTTATCTAAACAAAAAGTGGACTATGATGCAAAACTTAAATTGTACGAGGAGCAAAAAGCAAGCAATTTCCCCCTA
1401 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
K I K Q Q E E L L S K K Q K V D Y D A K L K L Y E E Q K K K A I P L -
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+

```

FIG.8B

TTTGAGCAGTTTCACAATGGAAACTTGACAACACACTTATTCTCTAGTAAATTGSAAGAAATTTAAAGTAGAAGACAGACAAGTATATGCAACTCAAGAACG
 1501 F E Q F H N G K L D N T L I P S K F E E F K V E R D K Y M Q L K N E -
 AGTTAAAAAATTGTCATACGAAATGACAAAAACACGCTGGATAGTTAAATAAACAACTTGCCATATTTGAATGACTACTCATTTGAGAAAAAGAAGTTTT
 1601 L K N [C] P Y E M T K N T V D K L N K Q L A Y L N D Y S L R K E V F -
 TAATAAGAAGTTAAACATTTTACAGGATTAGAGTGGAAACTACAACTGAAATTGACAAATTAGCAAAAGCAAAATAAGAAAAATGAAAAATATACTTATA
 1701 N K E V K H F T G L E W K L Q T E I D K L A N E I K K N E N I L I -
 ACAGCATCTACCTTACCATTATCTAATGTAGTAGAATTACAAGTACAAAAAGTATTAGTAGCAAAAAAATTGAACTTTAAAAAAGTAGAAAAACTTT
 1801 T A S T L P L S N V V E L Q V Q K V L V A K K I E L L K K V E K L L -
 TACACAAAGCACAGTTGAAGATCACCTTTACGTCCTCCCTCAGGTTTATGGTACACAAGCGAAACCTGAAGCATACTATTATTGTCCTGAAAAAGGAAAT
 1901 H K A Q L K D H L Y V P Q V Y G T Q A K P E A Y Y L F V L K K E I -
 TGACAAACTGGGGGAATTTAAGCCTAAAAATAAGGAGATGTTAGATAAGGAGAGAGGCAAGCAACCCCACTCCAGCGACAGCACAGGGAGCCCTTCCAGTTCGA
 2001 D K L G E F K P K I K E M L D K E K A N P T P A T A Q G A L P V R -
 GGGTTGATGAATIACTAGTCATGGGAAATCAAAACGAAGCTACAGCAGTAACATCACCATCAACATCAACAGAAATCATCCGAGGAGGACACACAAACCAG
 2101 G V D E I L V M G N Q N E A T A V T S P S T S T E S S E G A T Q P A -
 CAGCAACAGTACAGCCAGGAGCCAGGAGTACAAACGGGAATACCACTAGCACAGCCAGGAGCATCAGCACCAGGAGTACCAGAACGACGACGACGACGAG
 2201 A T V Q P A A P G V Q T G I P V A Q P G A S A P G V P E A P A P E -
 2300

FIG.8C

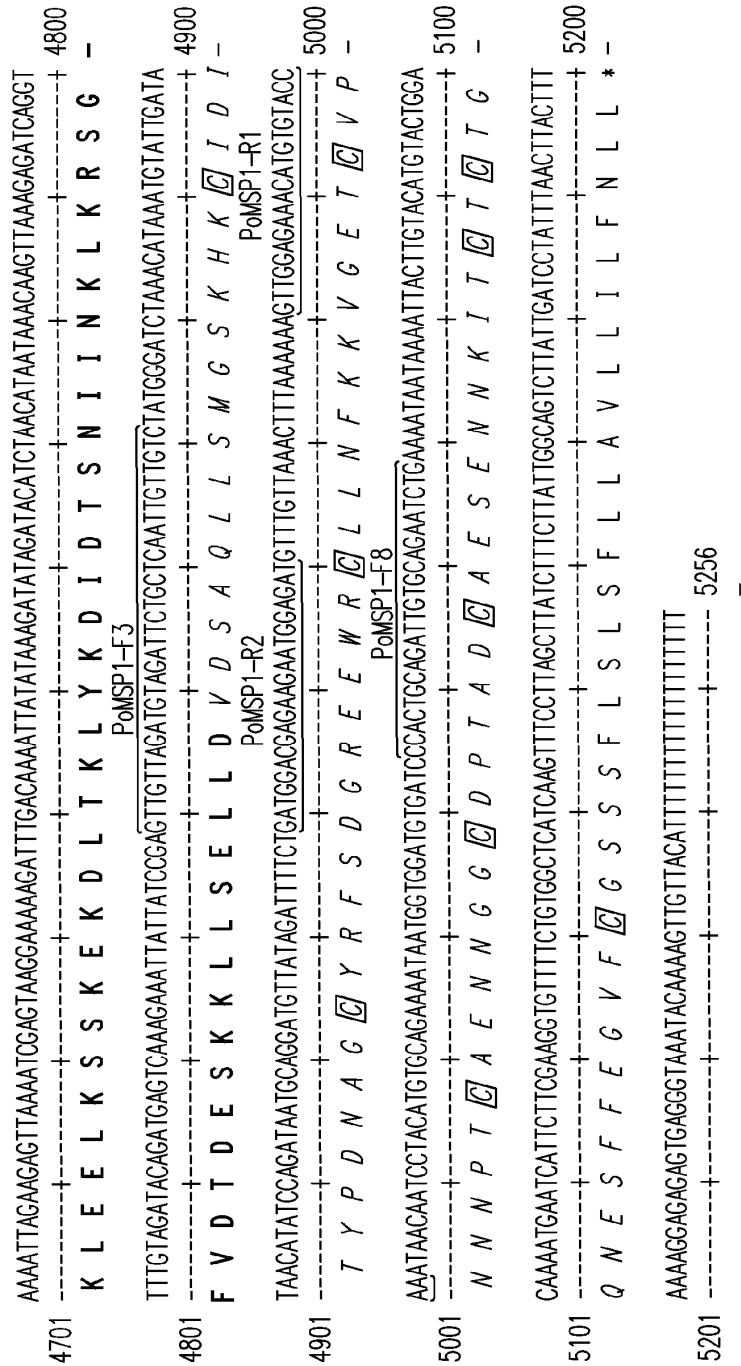
AGCAACAGCACCAGAGTACCAGCAATAGAAAGCACAAGCACCTGTGCAACCTAGCAAGGACAGGTCCAAGAGGCCACCCAAAAATGGCCCAACAATGACA
 2301 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 A T A P E V P A I E A Q A P V Q P T Q G Q V Q A A T Q N G P T M T -
 AAATTACAATATCTCGAGAAGTTATATTACTTTTTGTATACCTCCTATGTATGTCATAAGTACATTTTAGTGACAACTCTACAATGAACAAGATTGT
 2401 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 K L Q Y L E K L Y Y F L Y T S Y V C H K Y I L V T N S T M N K D L L -
 TGGCAAAATAATCTTACACCAGAGAAGAAAAAAGACAATAAAATGTGATCAGTTAGATTTATTGTTTAACTTACAAAACAATTTACCAGT
 2501 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 A K Y N L T P E E E K K T I K C D Q L D L L F N L Q N N L P V -
 CATGTATTCTCTTTGATAATATGAGCTCGACTTGGCAAGCAATTACATTCAATTATGAAAAGGAATGCTGTACAATATACAGATGAAAAAC
 2601 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 M Y S L F D N M S S T L Q S N Y I Q L Y E K E M L Y N I Y K M K N -
 AGTGATAAGGGATCAAAGAATTTCTAGAGACACAAGGTATACAGGTACAGCACCAGATGCTCTCTCTAGTCAATACAAAGCCACTACGCAAGCCG
 2701 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 S D K A I K E F L E T Q G I T G T A P D A T P L V N T Q A T T Q A A -
 CTACACAGTCACTAGCCAGCCGCTACACAAACCGCTACACAAACCGCTACACATGCCCTCTACACATGCCCTCTACACAGCCGCTACACAAGGTAATGT
 2801 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 T Q V T T Q A A T Q T A T Q T A T H A S T H A S T Q A A T Q G N V -
 TCCACAAGCCCTCTAATGATGAACATACACCTTTCAGCAACAACAGTTAATCCGGCAACGACACACCAGATAAATCTTTGAAAGAAAGCACATCTGAGGGA
 2901 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 P Q A S N D E H T P S A T T V N P A T T T P D K S L K E S T S E G -
 ACGTTGATGACACAGCGGAACGATGATGATCTGACGCTGAAAAAAGCAATAGAAAGTGAAGATTTTACAAAGTATTAGACGAAGTAG
 3001 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 T L M T Q G N A D D V S E P E K K E I E V E E F Y K Y L E E V D -

FIG.8D

FIG. 8E

CCAGCAGCACCAGCAGCATCAGCAGCAGCACCTGGAACTGCAAAATGGTGAACAGCAACGGTAGCAGACGGCAGAGACTATACGGAAGACGACAAATA
 3901 P A A P P A A S A A A P G T A N G E T A T V A H A E D Y T E D D N N - 4000
 ACGTCATTGTACTACCCCTTTTCGGAAGAAAGGAACACATGGCTTGACCAAGTCAGCCAGGGTGAAGCACAAAGACAGGACGACAAATATACTGAATGA
 4001 V I V L P L F G K K G T H A F D Q V T Q G E A Q D K D D N I L N E - 4100
 AATCACCACGAATACGAAGTTGTAGCTGAACCGTTAGCTGGTGATATAAAACGTTGAACAAGCAATTGGAAGCACATGTTACAGCATTTTCACAGT
 4101 I T N E Y E V V Y K P L A G V Y K T L N K Q L E A H V T A F H S - 4200
 ACGTAACAAACATGTTGGAATCTCGTTTCAAAAAACAAATATATTTTGGAGGTGTTAACTCTGATTGACTCAAAACAAACATGCAACTTCTGACA
 4201 N V T N M L E S R F K K T N Y F L E V L N S D L T Q N K H A T S D N - 4300
 ATTACGTTATTAGAGATCGTACAAATATTAGACTTTGAAAAAATAATTTGTTAAGTAGCTACAAATATATTAAAGATTCCTGTGAGAAGATGT
 4301 Y V I R D A Y K L L D F E K K K L L S S Y K Y I K D S V E K D V - 4400
 AGAAATTGCTACGGATGGAAATTGACTATTATGAAAAAATGGCTGCTCTGATAGACCGTACCTAGAAATCGGTTAATGCTCAGGTAGATGCAATAGATAAA
 4401 E I A T D G I D Y Y E K M A A L Y K T Y L E S V N A Q V D A I D K - 4500
 ACTGGGGATGCTACTAAGGCAACTAATAAAAAATTTCTCCCTTTTGGCTAGTATCAATGCTATGACGAAACCTTTGTTAGAAAAAGTGAACACCT
 4501 T G D D A T K A T N K K F L P F L A S I N A M Y E T L L E K V N T Y - 4600
 ACAATTCCTCAATTAAATCAAGTTAAACAGTTGCCAGTTGGAAAAAATTAGACTAGGTATTGTTGCGATAAACTGAATGACTATGTAATGTTTGATGA
 4601 N S Q L K S S L N S C Q L E K I R V G I V V D K L N D Y V M F D E - 4700

FIG.8F



 = Péptido Señal
 = Residuos de Cisteína

Negrita = MSP1-p33

Cursiva = MSP1-p19

Corchetes = Sitios del Cebador

* (Secuencias del cebador As degenerado no mostradas)

FIG.8G

FIG. 9A

|:: :|::||. :||||..|| || |::|::|| . | || |::|::|| |::| ::| | ..||::|::|| | || |::| |

570 KDIADDEIKHFSFMEWKLKSEIYDLAQEIRKNENKLTVENKFDFSGWEGVQKVLIKKIEALKNVQNLLKNAKVODLVPYKYNTGKEPEYYLMWL669

661 KKEIDKLGFEFKPKIKEMLDKEKANPTPATAGALPVRGVDEILVMGNONEATAVSPSTSTE.....SSEGATQPAATVQPAAPGVQTGIPVAQPASAPG756

670 KREIDKLDKDFIPKIESMIATEKAKPA.ASA.....PVTSQG...LLRGSSEAEIVTTNAVTSSEDQQQQQQQQQQQQQQQQQQSQVVAPACDAQV762

757 VPEAPEATEPVPATEAQAAPVOPTGGVQAATQNGPTMTKLQYLEKLYFLYTSVGHKHXYILVTNSTMVKDLLAKYNLTPEEEEEKKTIKGDDQLDRLF856

763 ISTQPTSOSAAPGVSATPARTPA.....AAAAPAPAMSKLEYLEKLLDFLKSAVAGCHKHIFVTNSTMDKLLKEYELNADEKITINQNKVQDELDRLF854

857 NLQNNLPVMYSLFDMSSTLQSNYIQLYEKEMLYNIYKMKNSDKAIKEFLETQGITGTAPDATPLVNTQATTQAATQVTTQAAATQTATQTATHASTHA856

855 NVQNNLPAMYSIYDSMSNELQNYIELYQKEMYNYIYKNKDTDKKIKAFLETSNKKAAAP.....AQSAAPSGQAEYSSNDNCG.CASHNNS941

957 QAATQGNVPQASNDEHTPSATTVPATTPDKSLKESTSEGLTMTQGNADDVSEPEKKEIEVEEFYKKYLEEVKYDYDFKAFLESSKDVAWNKITEKOW1056

942 YKS....PNISQNHK.....TSTP...QAEENORVG.....GNSEE...KPEATQAVEKFYDKHLSQLDKYNDYFKFLESKKEEIIMDDTKW1017

1057 KELEEEVKTLKSRDMSLDHYNKKYLKGRLFCKNEKVLSSKEHIKELSILKAQLMRQFMLNPBRVFIHFRVFNKKRETEKKEVENTLNKNTDALLKY1156

1018 NALGKEIEELKKLVSLDHGYKYLKERFLKKNWKITSNQDQIKKLTSLKNKLERQNLLNPSTSVLNKYTAFFNKKRETEKKEVENTLNKTEILLKY1117

1157 YKARVYYNGETFPKTTISEDILEKENNYNLNLEKFLYSRLGKLNKONJLEKENITYLSSALYHVELSGIHNKKYTGPNPHANMWENVNALNLKYG1256

1118 YKARAKYYIGEPPKLTISESMOKEDNYNLNLEKFLPSADWK.EIRKDTELERSNIYLSGGLHVLDRACEIINDKYSKGDHAKNIAEVKKALQAYQE1216

1257 LLPKCVETVAST.....GAATQTQGGEGASAAAAAPPAL.PAAPPAAPPA...APPASAAPAAGTA.NGETATVAHAEDYTEDDNVIVLPLFG1339

FIG. 9B

1217 LIPKVTQSSTSVAVTPGAVVPGVPTAAAGSGAGSAGVPPAAGSPATGGVPGWESAEAQTKAQADYAEDYDKVIALPLFG 1316
 1340 KKGTHA.FDQVTOGEAQKDDNILLNEI.TNEYVWYKPLAGVYKTLNKQLEAHVTAHSHWNTMLESFKNFYFLEVLNSDLTQNKHATSDNYVIRDA 1437
 1317 NDDGGEEDQVTTGEAESEAPEILVPAGISDYDVWYKPLAGMYKTIKKQLEHVNFAFTNI.TDMLDSRLKKRNYFLEVLNSDLNPFKYSPSGEYIHKDP 1416
 1438 YKLLDFEKKKLLSSKYTIKDSVEKOVEIATDGDYIEKMAALYKTYLESNAQV.....DAIDKTGDDATKATNK.....KFLPFLA 1515
 1417 YKLLDEKKKLLGSYKTYGASIDKDLATANDGVTYNNKAGELYKTHLTAVNEEVKKVEADIKAEDDKIKKIGSDSTKTEKTSMAKKALEKYLPLN 1516
 1516 SINAMYTELLEKVNYSQKSSLSQLEKIRVGIVDKLNDYMFDEKLEELKSSKEKDLTKLYKIDITSNIINKLKRSGFYDITDESCKLLSELLDID 1615
 1517 SLQKEYESLVSKVNTYTDNLKKVJNNQLEKEAEITVKKLQDYNKQDEKLEEKSEKKN.....EVKSSGELLEKMSKLIKENESEKILSQLLNIQ 1610
 1616 SAQLLSMGSKHWDITITYPDNACQYRFSDGREGIEWDQYFNNIPTDAENWGQDPTADDAESENWKITDITGQ.NESFFEGVFQSSSFL 1714
 1611 T.QLLTMSSEHTIDITNVPDAAQYRYLDGMEIEWDQLTFKEGGKQPGSWVTDKDNWGGAPEAEQKMITDSNKIVQDTKEGSEPLFEGVFQSSSFL 1709
 1715 SLSFLLAVLLILFNL.L* 1731
 1710 SLSFLLMLFLLDQEL* 1727

▨ = Péptido Señal
 □ = Residuos de Cisteína
Negrita = MSP1-p33
Cursiva = MSP1-p19

FIG.9C

Comparación de la secuencia de aminoácidos (% de Identidad)

	<i>P. falciparum</i>	<i>P. vivax</i>	<i>P. malariae</i>	<i>P. ovale</i>
<i>P. falciparum</i>	100,0			
<i>P. vivax</i>	42,7	100		
<i>P. malariae</i>	43,8	50,1	100	
<i>P. ovale</i>	44,1	52,5	51,7	100

Especie	Núm. Genbank
<i>P. falciparum</i>	BAF62278
<i>P. vivax</i>	AAA63427
<i>P. malariae</i>	(Camerún 0014)
<i>P. ovale</i>	(Camerún 510-10)

FIG.10

Localización de MSP1 y sub-regiones de MSP1 para *P. malariae* y *P. ovale*

Sub-región de MSP1	(Figura 1) ADN PmMSP1	(Figura 2) AA PmMSP1	(Figura 3) ADN PoMSP1	(Figura 4) AA PoMSP1
p19	4961-5260	1634-1733	4849-5145	1614-1712
p33	4181-4960	1374-1633	4048-4848	1347-1613
p42	4181-5260	1374-1733	4048-5145	1347-1712
MSP1	62-5314	1-1751	10-5199	1-1730

FIG.11

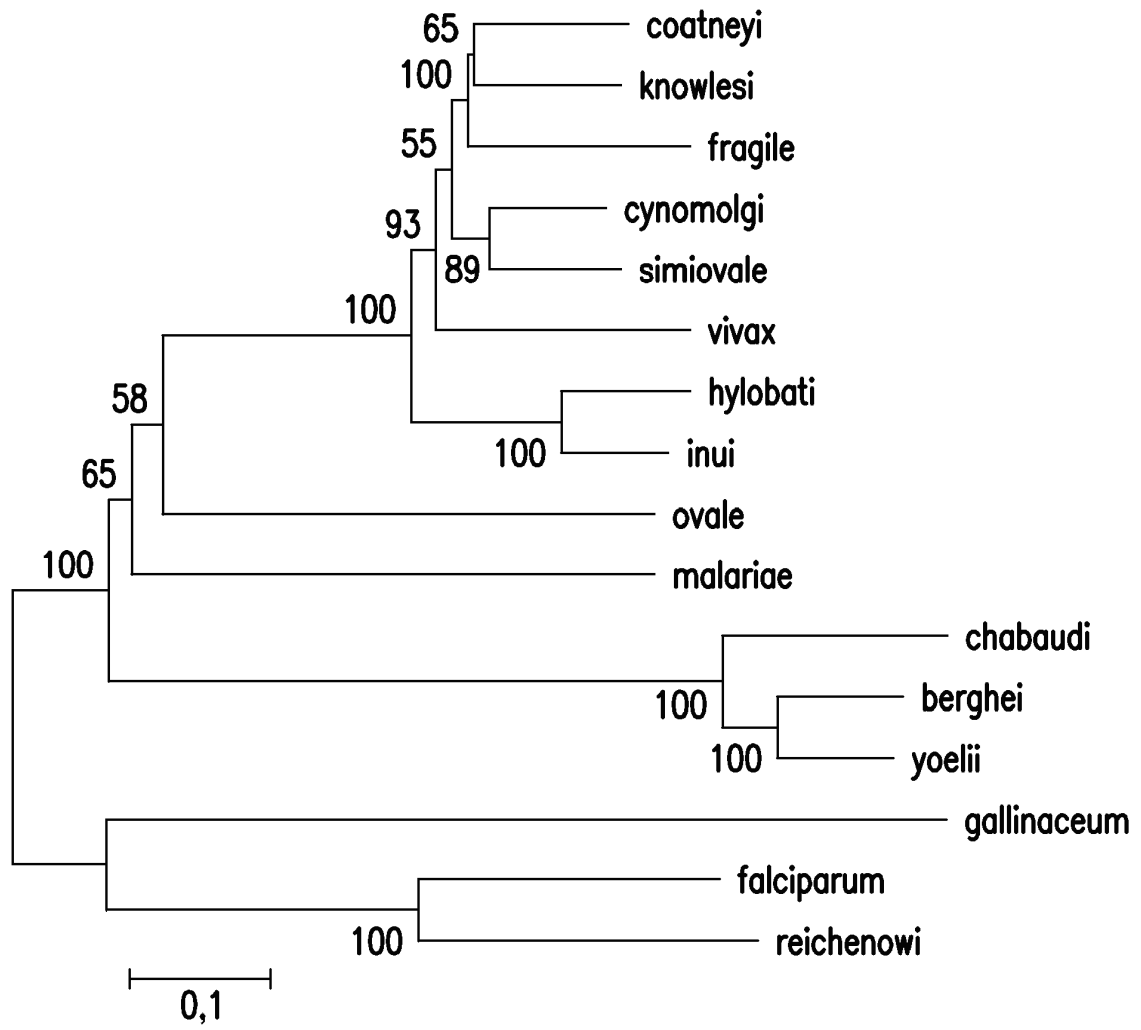


FIG.12

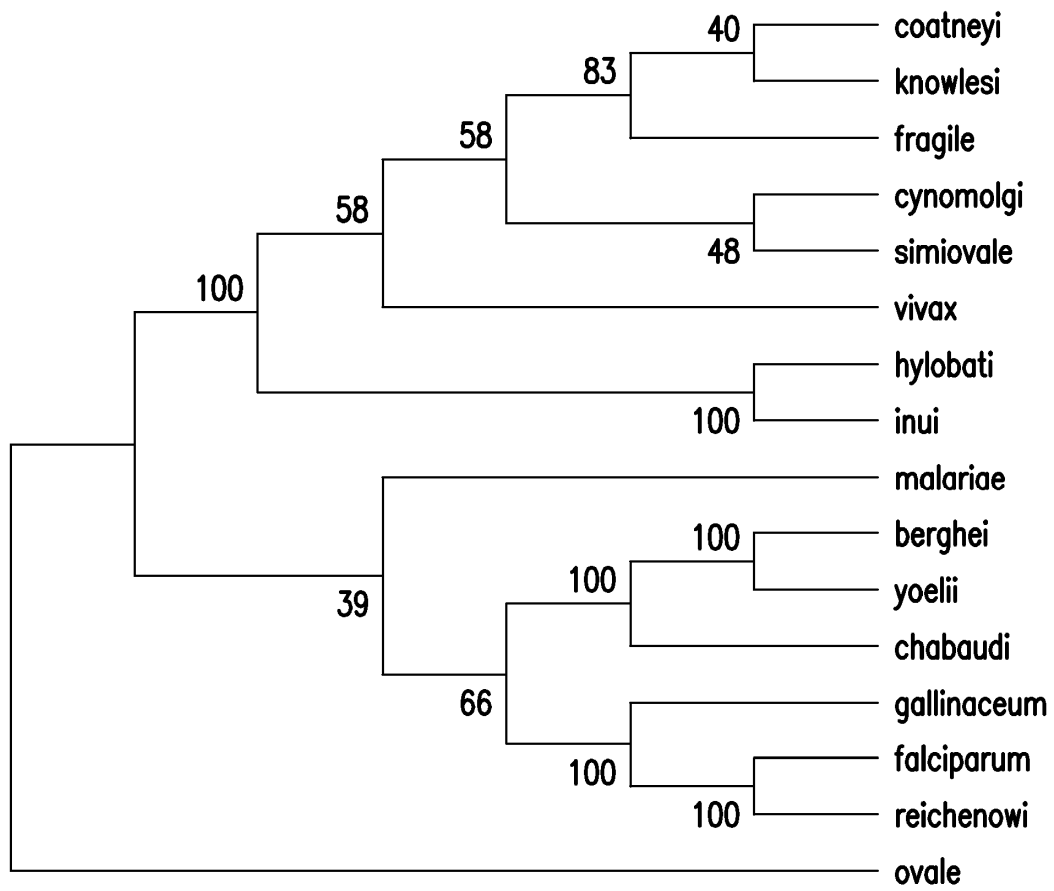


FIG.13

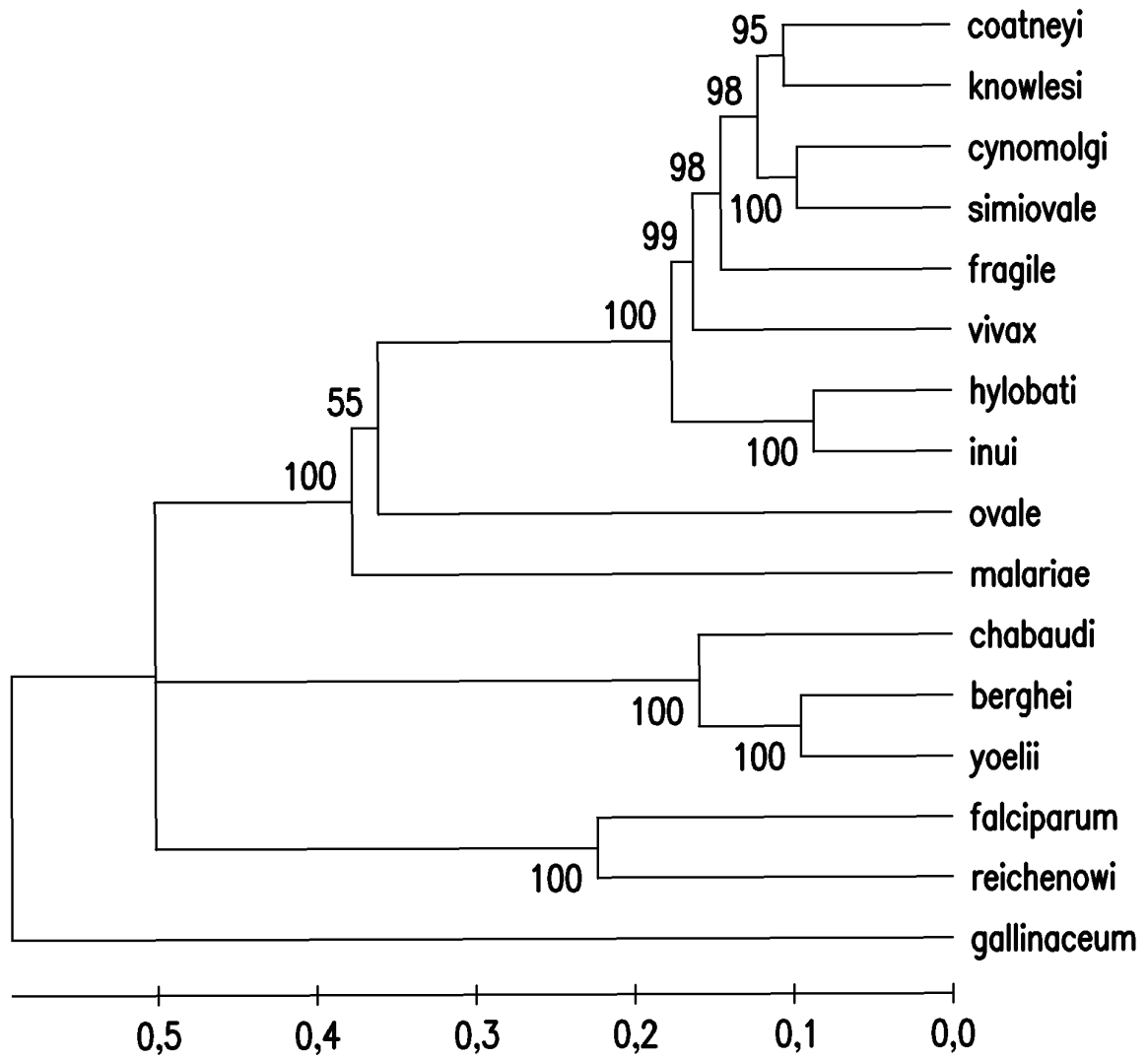
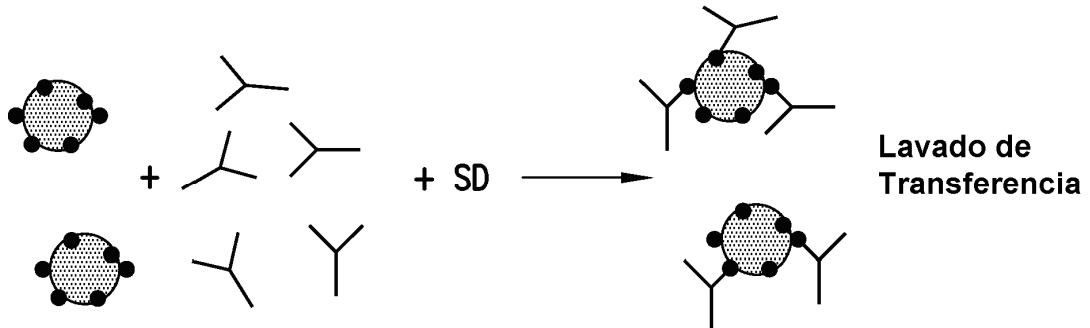


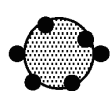
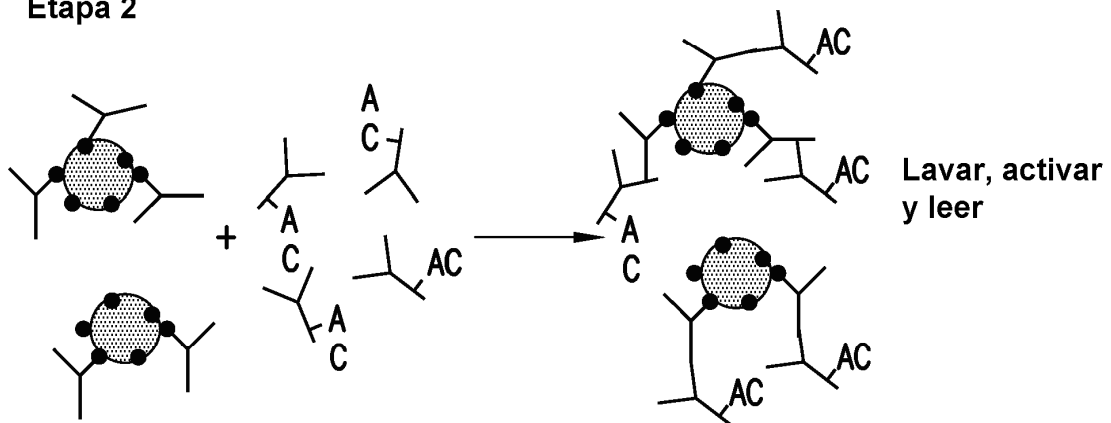
FIG. 14

Un Formato de Ensayo para Malaria Abbott PRISM® Prototipo

Etapla 1



Etapla 2



**Micropartícula
recubierta con
MSP1-19
recombinante**



**Anti-IgG humana
de ratón marcada
con acridinio**



**Muestra humana
con anticuerpos
anti-plasmodio**

SD

**Tampón diluyente
del espécimen**

FIG.15