

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 720 728**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/6893 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.11.2014 PCT/IB2014/002910**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.05.2015 WO15071759**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.11.2014 E 14833371 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.02.2019 EP 3068903**

54 Título: **Un marcador molecular de Plasmodium falciparum de resistencia a artemisinina**

30 Prioridad:

15.11.2013 US 201361904651 P
10.10.2014 US 201462062439 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
24.07.2019

73 Titular/es:

INSTITUT PASTEUR (33.3%)
25-28 Rue du Docteur Roux
75724 Paris Cedex 15, FR;
INSTITUT PASTEUR DU CAMBODGE (33.3%) y
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE (33.3%)

72 Inventor/es:

ARIEY, FRÉDÉRIC;
PUIJALON, ODILE;
MENARD, DIDIER;
BENOIT-VICAL, FRANÇOISE;
BEGHAIN, JOHANN;
WITKOWSKI, BENOIT;
BARALE, JEAN-CHRISTOPHE;
BOUCHIER, CHRISTIANE y
KHIM, NIMOL

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 720 728 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

Un marcador molecular de *Plasmodium falciparum* de resistencia a artemisinina

5 Antecedentes de la invención

La aparición de resistencia a derivados de artemisinina (ART) de *Plasmodium falciparum* en Camboya, supone una amenaza para los esfuerzos de control y eliminación del paludismo en todo el mundo^{1,2}. El riesgo de que los parásitos resistentes a ART se extiendan desde Camboya occidental a la subregión del Gran Mekong y a África, como sucedió anteriormente con parásitos resistentes a la cloroquina y la sulfadoxina/pirimetamina³⁻⁵, es extremadamente preocupante. La resistencia clínica a la ART se define como una tasa reducida de eliminación de parásitos^{1,6-10}, expresada como un aumento de la semivida de eliminación de parásitos^{11,12}, o como una persistencia de parásitos detectables al microscopio al tercer día de la terapia combinada basada en artemisinina (TCA)². El parámetro de semivida se correlaciona firmemente con los resultados del ensayo de supervivencia en la fase de anillo (RSA^{0-3h}, siglas del inglés *Ring-stage Survival Assay*) *in vitro* y con los del RSA *ex vivo*¹³, que miden la tasa de supervivencia de los parásitos jóvenes en la fase de anillo a una exposición farmacológicamente relevante (700 nM durante 6 h) a la dihidroartemisinina (DHA), el principal metabolito de todos los compuestos de la ART. Sin embargo, la falta actual de un marcador molecular dificulta la contención enfocada de parásitos resistentes a ART en zonas donde se han documentado y dificulta la detección rápida de estos parásitos en otros lugares, donde las TCA (terapias combinadas basadas en artemisinina) siguen siendo los antipalúdicos más asequibles y eficaces. Para detectar y comprobar la propagación de la resistencia a la ART, se necesita un marcador molecular de uso generalizado.

Análisis hologenómicos recientes de aislados de *P. falciparum*, han proporcionado pruebas de una selección positiva reciente en zonas geográficas de resistencia a la ART^{9,14-16}. Aunque la heredabilidad del fenotipo clínico del parásito es superior al 50%, aún no se ha identificado ningún marcador molecular fiable. Una posible explicación es que la semivida de eliminación del parásito no solo está determinada por la susceptibilidad intrínseca a la ART de un aislado del parásito, sino también por su fase de desarrollo en el momento del tratamiento con ART y por los parámetros relacionados con el hospedador, tales como la farmacocinética y la inmunidad¹⁷. Este problema se acentúa recientemente en pacientes que presentan datos discordantes entre la semivida de eliminación del parásito *in vivo* y la tasa de supervivencia de RSA^{0-3h} *in vitro*¹³. Asimismo, los estudios hologenómicos de asociación (GWAS, del inglés *genome-wide association studies*) son desconcertantes por las incertidumbres acerca de la estructura de la población del parásito. Las pruebas recientes de varias subpoblaciones muy diferenciadas de parásitos resistentes a ART en Camboya occidental¹⁵, sugieren que podrían estar ocurriendo distintos acontecimientos de aparición. Una estrategia alternativa para descubrir un marcador molecular es analizar las mutaciones adquiridas específicamente por clones de parásitos adaptados en el laboratorio seleccionados para sobrevivir a altas dosis de ART *in vitro*, y utilizar esta información para guiar el análisis del polimorfismo en aislados de parásitos clínicos de zonas donde la resistencia a las ART está bien documentada a nivel tanto temporal como geográfico. En el presente documento se utiliza esta estrategia para explorar las firmas moleculares de la resistencia clínica a la ART en Camboya, donde se comunicó por primera vez este fenotipo^{1,8}.

Las terapias combinadas basadas en artemisinina (TCA) son una faceta clave de los esfuerzos globales del control del paludismo. Nkhoma et al., *JID* 208:346-349 (2013). Sin embargo, la aparición de paludismo resistente a artemisinina ha supuesto una amenaza a estos esfuerzos. *Id.* Actualmente no hay ensayos fiables *in vitro* para medir la resistencia a la ART. *Id.* Por lo tanto, la sensibilidad a la ART se ha medido en pacientes a partir de la disminución de la parasitemia después del tratamiento con ART. *Id.* Esta estrategia es costosa, laboriosa y lenta. *Id.*

En la actualidad, la falta de un marcador molecular dificulta los esfuerzos de contención en los focos donde se ha documentado la resistencia y dificulta la detección rápida de la resistencia a la ART en otras zonas endémicas donde la ART sigue siendo el fármaco antipalúdico más asequible y eficaz. Para comprobar a gran escala la resistencia a la ART, se necesita urgentemente un marcador molecular asociado a la resistencia a la ART.

Sumario de la invención

La invención incluye métodos, composiciones y kits para detectar y genotipificar parásitos del género *Plasmodium*. En una realización, el método comprende proporcionar una muestra que contenga un parásito del género *Plasmodium*; y detectar, en la muestra, la presencia de un ácido nucleico o de una proteína de hélice K-13 mutado. Preferentemente, el parásito del género *Plasmodium* es *Plasmodium falciparum*.

En una realización, la presencia en la muestra de un ácido nucleico de hélice K-13 mutado, se detecta mediante secuenciación. En una realización, la presencia en la muestra de un ácido nucleico de hélice K-13 mutado, se detecta mediante PCR.

La invención incluye métodos, composiciones y kits para la detección de una infección causada por un parásito del género *Plasmodium* en un paciente infectado y se define en el conjunto de reivindicaciones adjuntas. En una realización, el método comprende proporcionar una muestra de sangre de un paciente y detectar, en la muestra de sangre, la presencia o la ausencia de un ácido nucleico o de una proteína de hélice K-13 de tipo silvestre o mutado.

ES 2 720 728 T3

El método puede comprender determinar si el parásito del género *Plasmodium* tiene una secuencia de proteína o de ácido nucleico de hélice K-13 de tipo silvestre o mutante.

Preferentemente, el parásito del género *Plasmodium* es *Plasmodium falciparum*.

5 En una realización, la presencia en la muestra de un ácido nucleico de hélice K-13 mutado, se detecta mediante secuenciación. En una realización, la presencia o la ausencia en la muestra de un ácido nucleico de hélice K-13 de tipo silvestre o mutado, se detecta mediante PCR.

10 En una realización, el kit para detectar una infección causada por un parásito del género *Plasmodium* comprende cebadores para la amplificación de un ácido nucleico de hélice K-13 y reactivos para la detección del producto amplificado.

15 En una realización, el kit contiene una sonda para detectar un ácido nucleico de hélice K-13 mutante. Preferentemente, la sonda está marcada con un marcador fluorescente o enzimático.

En diversas realizaciones, El kit detecta un ácido nucleico de hélice K-13 mutante que codifica un alelo Y493H, R539T, I543T y C580Y.

20 En una realización, el kit detecta un ácido nucleico de hélice K-13 mutante que codifica un alelo Y493H, R539T, I543T o C580Y.

En diversas realizaciones, el kit comprende al menos uno de los siguientes cebadores:

25 5'-cggagtgaccaaactctggga-3' (SEQ ID NO:9);
5'-gggaatctggtgtaacagc-3' (SEQ ID NO:10);
5'-cgccagcattgtgactaat-3' (SEQ ID NO:11); y
5'-gcggaagtagtagcgagaat-3' (SEQ ID NO:12);

30 o el kit comprende al menos uno de los siguientes cebadores:

35 5'-cggagtgaccaaactctggga-3' (SEQ ID NO:9);
5'-gggaatctggtgtaacagc-3' (SEQ ID NO:10);
5'-cgccagcattgtgactaat-3' (SEQ ID NO:11);
5'-gcggaagtagtagcgagaat-3' (SEQ ID NO:12);
5'-gccaagctgccattcatttg-3' (SEQ ID NO:13); y
5'-gccttgtgaagaagcaga-3' (SEQ ID NO:14).

40 En diversas realizaciones, el kit detecta un ácido nucleico de hélice K13 mutante que codifica un alelo F446I, N458Y, C469Y, Y493H, K503N, R539T, I543T, P553L, P574L, A578S, C580Y y D584V.

45 En diversas realizaciones, el kit detecta un ácido nucleico de hélice K13 mutante que codifica un alelo F446I, G449A, N458Y, C469Y, W470finalizador, A481V, Y493H, K503N, S522C, V534A, R539T, I543T, G548D, P553L, V555A, A557S, R561H, K563R, V568G, P574L, A578S, C580Y, F583L, D584V, V589I, Q613E y D641G.

En diversas realizaciones, el kit comprende al menos uno de los siguientes pares de cebadores:

Par PCR1

50 5' agtggattgatggttagaat 3' (directo) (SEQ ID NO:15)
5' catcacctcagttcaataaagc 3' (inverso) (SEQ ID NO:16)

Par PCR2

55 5' aatttctatagcttttgggtgtaa 3' (directo) (SEQ ID NO:17)
5' ctctaccatgcttcacatgcat 3' (inverso) (SEQ ID NO:18)

Par PCR3

60 5' ggatgatggctcttctattataccg 3' (directo) (SEQ ID NO:19)
5' actcaatagaattaatctctcacca 3' (inverso) (SEQ ID NO:20)

Par PCR4

65 5' atgctattggtggaactaatggt 3' (directo) (SEQ ID NO:21)
5' ttaaatggtgatattgtcaacg 3' (inverso) (SEQ ID NO:22)

ES 2 720 728 T3

Par PCR5

5' tcaggagcagctttaattacc 3' (directo) (SEQ ID NO:23)
5' ctgggaaaagaagaatgacatgaa 3' (inverso) (SEQ ID NO:24)

Par PCR6

5' ccttggtgaaagaagcagaattt 3' (directo) (SEQ ID NO:25)
5' attcaatacagcacttccaaaataa 3' (inverso) (SEQ ID NO:26)

En diversas realizaciones, el kit comprende al menos una sonda que se hibrida con uno de los siguientes SNP (por las siglas del inglés *single-nucleotide polymorphisms*, que significa polimorfismos mononucleotídicos):

F446I	ttt/att
G449A	ggt/gct
N458Y	aat/tat
C469Y	tgc/tac
W470finalizador	tgg/tga
A481V	gct/gtt
Y493H	tac/cac
K503N	aag/aat
S522C	agt/tgt
V534A	gtt/gct
R539T	aga/aca
I543T	att/act
G548D	ggc/gac
P553L	ccg/ctg
V555A	gta/gca
A557S	gca/tca
R561H	cgt/cat
K563R	aaa/aga
V568G	gtg/ggg
P574L	cct/ctt
A578S	gct/tct
C580Y	tgt/tat
F583L	ttt/tta/g
D584V	gat/gtt
V589I	gtc/atc
Q613E	caa/gaa
D641G	gat/ggt.

15 La divulgación incluye un método para detectar, en una muestra biológica que contiene un parásito del género *Plasmodium*, la presencia de un ácido nucleico de hélice K13 de tipo silvestre o de un ácido nucleico de hélice K13 mutante que comprende:

20 proporcionar una muestra biológica que contenga ADN un parásito del género *Plasmodium*;
opcionalmente extraer ADN de la muestra biológica;
poner en contacto el ADN de un parásito del género *Plasmodium* con al menos un par de cebadores que se hibridan específicamente con el ácido nucleico de hélice K13 a una distancia que varía de 100 a 300 pb y realizar una
25 reacción PCR en presencia de colorante intercalante;
someter los productos de amplificación a una etapa de fusión;
determinar la presencia de un alelo mutante o de un alelo de tipo silvestre analizando el perfil de fusión de los
productos de amplificación.

30 En algunas realizaciones, el método comprende detectar un ácido nucleico de hélice K13 mutante que codifica un alelo F446I, G449A, N458Y, C469Y, W470finalizador, A481V, Y493H, K503N, S522C, V534A, R539T, I543T, G548D, P553L, V555A, A557S, R561H, K563R, V568G, P574L, A578S, C580Y, F583L, D584V, V589I, Q613E y D641G.

La invención incluye un método para detectar, en una muestra biológica que contiene un parásito del género *Plasmodium*, la presencia de un ácido nucleico de hélice K13 mutante que comprende amplificar el ácido nucleico de hélice K13 mutante por reacción PCR, y poner en contacto el ácido nucleico amplificado con una sonda específica para un ácido nucleico de hélice K13 mutante.

En algunas realizaciones, la sonda está unida a una perla fluorescente o a biotina.

En algunas realizaciones, el método comprende unir la sonda al ácido nucleico del dominio de hélice K13 mutante y detectar el ácido nucleico del dominio de hélice K13 unido con una segunda sonda que se une al ácido nucleico del dominio de hélice K13 unido.

En algunas realizaciones, la presencia de un ácido nucleico o una proteína de hélice K13 mutado indica que el paciente está infectado con un parásito del género *Plasmodium* resistente a derivados de artemisinina.

En algunas realizaciones, el método comprende administrar a dicho paciente infectado con un parásito del género *Plasmodium* resistente a derivados de artemisinina, un tratamiento basado en derivados de artemisinina durante más tiempo que el protocolo habitual y/u otro fármaco antipalúdico, preferentemente quinina, cloroquinina o mefloquina.

En algunas realizaciones, el método comprende administrar a dicho paciente infectado con un parásito del género *Plasmodium* resistente a derivados de artemisinina, un tratamiento basado en un nuevo fármaco antipalúdico y repetir las etapas a) y b) después de administrar dicho tratamiento, en el que la ausencia de un ácido nucleico o proteína de hélice K13 mutado indica que el paciente ya no está infectado con un parásito del género *Plasmodium* resistente a derivados de artemisinina y dicho tratamiento es eficaz en un parásito del género *Plasmodium* resistente a derivados de artemisinina.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1 - Adquisición temporal de mutaciones en F32-ART5. Los parásitos F32-Tanzania expuestos a concentraciones crecientes de artemisinina durante 120 ciclos consecutivos¹⁸ se analizaron mediante secuenciación hologenómica (de todo el genoma) en cinco puntos temporales (flechas grises). Se muestran (recuadros) los locus mutados después de un número determinado de ciclos de presión farmacológica. Los primeros puntos temporales donde se detectaron tres mutaciones por PCR (flechas negras) se indican con \emptyset para PF3D7_1343700, con * para PF3D7_0213400 y con # para PF3D7_1115700. Los círculos indican las tasas de supervivencia de RSA^{0-3h} para los parásitos F32-ART5 y F32-TEM, respectivamente.

Figura 2 - Tasas de supervivencia de aislados de parásitos de Camboya en el RSA^{0-3h}, estratificadas por alelo de hélice K13. Los genotipos se obtuvieron extrayendo datos de la secuencia hologenómica (n = 21) o por secuenciación de los productos de PCR (n = 28). Los parásitos mutantes tienen tasas de supervivencia RSA^{0-3h} significativamente más altas que las de los parásitos de tipo silvestre: tipo silvestre (n=17, mediana 0,16 %, RIC (rango intercuartílico) 0,09-0,24, rango 0,04-0,51); C580Y (n=26, mediana 14,1 %, RIC 11,3-19,6, rango 3,8-27,3, P<10⁻⁶ para tipo silvestre frente a C580Y, prueba de la U de Mann-Whitney); R539T (n=5, mediana 24,2 %, RIC 12,6-29,5, rango 5,8-31,3, P<10⁻³ para tipo silvestre frente a R539T); Y493H (51,4 %); e I543T (58,0 %). La tasa de supervivencia RSA^{0-3h} (0,04 %) de parásitos 3D7 de control se indica con un asterisco.

Figura 3 - Frecuencia de alelos de hélice K13 en 886 aislados de parásitos en seis provincias de Camboya en 2001-2012. Los genotipos se obtuvieron por secuenciación de productos de PCR de muestras de sangre conservadas en archivo. Todos los alelos mutantes llevan un solo SNP no sinónimo (codificado con color, códigos de colores iguales a los de la Fig. 2 para el tipo silvestre, C580Y, R539T, Y493H e I543T). Se observaron reducciones significativas (prueba exacta de Fisher) en las frecuencias de alelos de tipo silvestre en Pailin, Battambang, Pursat y Kratie a lo largo del tiempo (véanse los Ejemplos).

Figura 4-A, Correlación de semividas de eliminación de parásitos y alelos de hélice K13 para aislados de parásitos en Pursat y Ratanakiri en 2009-2010. Los parásitos de tipo silvestre tienen semividas más cortas (mediana 3,30 h, RIC 2,59-3,95, n=72) que las de los parásitos C580Y (7,19 h, 6,47-8,31, n=51, P<10⁻⁶, prueba de la U de Mann-Whitney), R539T (6,64 h, 6,00-6,72, n=6, P<10⁻⁶) o Y493H (6,28 h, 5,37-7,14, n=21, P<10⁻⁶). La semivida de los parásitos C580Y es significativamente más larga que la de los parásitos Y493H (P=0,007). B, Correlación de semividas de eliminación de parasitarios, subpoblaciones de KH¹⁵ y alelos de hélice K13 para los mismos 150 aislados de parásitos. Se muestran semividas para los parásitos de Pursat (cuadrados) y Ratanakiri (triángulos), estratificadas por grupo de KH y alelo de hélice K13 (codificado con color como en el panel A). Las semividas medianas estratificadas por alelo de hélice K13 son: [KH1: tipo silvestre (2,88) e Y493H (6,77); KH2: C580Y (7,13) e Y493H (4,71); KH3: tipo silvestre (3,65), C580Y (8,73) y R539T (6,65); KH4: tipo silvestre Y493H (6,37); y KHA: tipo silvestre (4,01), C580Y (7,09), Y493H (6,18) y R539T (5,73)].

Figura 5: algoritmo de validación de SNP de la comparación de secuencias hologenómicas de F32-ART5 y F32-TEM (a) y la secuencia y cobertura de los SNP en 7 genes candidatos diferentes en F32-TEM y F-32 ART5 (b).

Figura 6 - Distribución geográfica de alelos de hélice K13 en Camboya en 2011-2012. Los gráficos circulares muestran las frecuencias de los alelos de hélice K13 entre 300 aislados de parásitos en diez provincias de Camboya. Los tamaños de los círculos son proporcionales al número de aislados y los diferentes alelos están codificados con color como en la Fig. 3. Las frecuencias (IC del 95 %) de los alelos de hélice K13 mutantes son:

Pailín (95 %, 88-99, n=84), Battambang (93 %, 87-99, n=71), Pursat (89 %, 67-99, n=19), Kampot (83 %, 52-98, n=12), Kampong Som (71 %, 29-96, n=7), Oddar Meanchey (76 %, 58-89, n=33), Preah Vihear (16 %, 3-40, n=19), Kratie (71 %, 44-90, n=17), Monduliri (67 %, 9-99, n=3) y Ratanakiri (6 %, 1-19, n=35).

Figura 7 - Correlación entre la frecuencia de alelos de hélice K13 de tipo silvestre y la prevalencia de positividad el día 3 después del tratamiento con TCA (terapia combinada basada en artemisina) en ocho provincias de Camboya. La frecuencia de positividad el día 3 se representa frente a la frecuencia de los alelos de hélice K13 de tipo silvestre. Los datos proceden de pacientes tratados con una TCA para el paludismo causado por *P. falciparum* en 2010-2012 en ocho provincias de Camboya (Fig. 4): Pailín ($n = 86$, estudio de eficacia terapéutica de la OMS del 2011, artesunato-mefloquina); Pursat ($n = 32$, estudio de eficacia terapéutica de la OMS del 2012, dihidroartemisina-piperacuina); Oddar Meanchey ($n=32$, estudio de eficacia terapéutica de la NAMRU-2 (Unidad de Investigación Médica Naval 2) del 2010, artesunato-mefloquina); Kampong Som/Speu ($n = 7$, estudio de eficacia terapéutica de la OMS del 2012, dihidroartemisina-piperacuina); Battambang ($n = 18$, estudio de eficacia terapéutica de la OMS del 2012, dihidroartemisina-piperacuina); Kratie ($n = 15$, estudio de eficacia terapéutica de la OMS del 2011, dihidroartemisina-piperacuina); Preah Vihear ($n = 19$, estudio de eficacia terapéutica de la OMS del 2011, dihidroartemisina-piperacuina); Ratanakiri ($n = 32$, estudio de eficacia terapéutica de la OMS del 2010, dihidroartemisina-piperacuina). Coeficiente de correlación de rango de Spearman (8 sitios): $r=-0,99$, IC del 95 % de $-0,99$ a $-0,96$, $P < 0,0001$.

Figura 8 - Representación esquemática de la homología entre proteínas de *P. falciparum* K13 y KEAP1 humanas (A) y modelo 3D estructural del dominio de hélice K13 (B).

A. Representación esquemática de la proteína PF3D7_1343700 predicha y homología con Keap1 humana. De manera similar a Keap1, PF3D7_1343700 contiene un dominio BTB/POZ y una hélice de 6 palas C-terminal, que ensambla motivos kelch que consisten en cuatro láminas beta anti-paralelas.

B. Modelo 3D estructural del dominio de hélice K13 que muestra las seis palas kelch numeradas del 1 al 6 desde el extremo N al C.

El nivel de identidad de aminoácidos entre los dominios de hélice K13 y kelch de proteínas con estructuras tridimensionales (3D) resueltas, incluyendo Keap1 humana^{46,47}, nos permitió modelar la estructura tridimensional de la hélice K13 y mapear las mutaciones seleccionadas con presión farmacológica de ART (Tabla 4). La precisión del modelo 3D de hélice K13 se confirmó por los criterios de fiabilidad del modelo/plegamiento específicos de Modeller (véanse los Ejemplos). Predecimos que la hélice K13 se pliega en una estructura de hélice β de seis palas⁴⁸ cerrada por la interacción entre una lámina beta C-terminal y la pala N-terminal^{46,48}. El primer dominio tiene tres láminas beta, el cuarto fue aportado por una lámina beta C-terminal extra denominada $\beta'1$ en la Figura 9.

El armazón de hélice kelch de la Keap1 humana se desestabiliza por una variedad de mutaciones que afectan a las interacciones intra o inter-palas en cáncer de pulmón humano⁴⁶ e hipertensión⁴⁷. Las posiciones de las diversas mutaciones se indican con una esfera. El resto M476 mutado en F32-ART5 se indica en gris oscuro. Al igual que las mutaciones observadas en la Keap humana^{146,47}, se predice que muchas mutaciones de la hélice K13 alteran la estructura de la hélice o modifican las cargas de la superficie y, como consecuencia, alteran la función biológica de la proteína. Cabe destacar que, las dos mutaciones principales C580Y y R539T observadas en Camboya son mutaciones no conservativas y se localizan en estructuras secundarias organizadas: en una lámina β de la pala 4 donde se predice que se alterará la integridad de este armazón y en la superficie de la pala 3, respectivamente. El dominio de la hélice kelch de Keap1 está implicado en las interacciones proteína-proteína al igual que la mayoría de los módulos que contienen kelch⁴³. Keap1 es un regulador negativo de la respuesta citoprotectora dependiente de Nrf2 inducible, que secuestra a Nrf2 en el citoplasma en estado estacionario. Después del estrés oxidativo, el complejo Nrf2/Keap1 se desestabiliza, Nrf2 se transloca al núcleo, donde induce la transcripción de genes dependientes de ARE citoprotectores^{49,50}. Especulamos que, en *P. falciparum*, se pueden dedicar funciones similares a PF3D7_1343700, de modo que las mutaciones de la hélice K13 influyan en sus interacciones con una proteína acompañante desconocida, dando como resultado una respuesta antioxidante/citoprotectora desregulada. La respuesta antioxidante de *P. falciparum* es máxima durante la etapa tardía de trofozoito, cuando la digestión y el metabolismo de la hemoglobina son más altos⁵¹. Su regulación aún es poco conocida y no se pudo identificar un ortólogo de Nrf2 en el genoma de *Plasmodium*.

Figuras 9A y B. - secuencias codificantes de ácido nucleico de referencia PF3D7_1343700 (SEQ ID NO:1) y de aminoácidos (SEQ ID NO: 2) (de tipo 3D7) y posiciones mutantes.

Figura 9A código de color: gris oscuro, posiciones específicas de *Plasmodium* (1-225) y específicas de apicomplejos (225-345); gris claro, dominio BTB/POZ. En la Figura 9B, las posiciones de los codones polimórficos comunicados en la versión 9.3 de PlasmoDB (<http://www.plasmodb.org/plasmo/>) y las observadas en el presente estudio están encuadradas en negro. Ha de observarse que la mayoría de los polimorfismos comunicados se localizan en el dominio N-terminal, con la excepción de E621D observado en un aislado de Gambia (ref. 44). Seis dominios kelch individuales se localizan desde el resto 443 a 473, 474 a 526, 527 a 573, 574 a 614, 615 a 666 y 667 a 726, respectivamente.

Figura 10A-C - alineación ClustalW de la secuencia de proteínas de los ortólogos PF3D7_1343700 de siete especies de *Plasmodium*.

Códigos:

F-XP_001350158 *P. falciparum* (PF3D7_1343700) (SEQ ID NO:2)
V-XP_001614215 *P. vivax* Sal1 (SEQ ID NO:3)

C-XP_004223579 *P. cynomolgi* (SEQ ID NO:4)
 K-XP_002259918 *P. knowlesi* (SEQ ID NO:5)
 B-XP_674094 *P. berghei* (SEQ ID NO:6)
 Y-XP_730901 *P. yoelii* (SEQ ID NO:7)
 PCHAS_136130 *P. chabaudi* (SEQ ID NO:8)

Los restos poliméricos de *P. falciparum* están sombreados en gris.

Figura 11 - PCR en tiempo real - HRM: detección de alelos de hélice K13 mutados frente a alelos de hélice K13 de tipo silvestre. La secuencia de ácido nucleico es nt 1261-2181 de SEC ID NO:1. La secuencia de aminoácidos es aa 421-726 de SEQ ID NO: 2.

Seis pares de cebadores diseñados en la secuencia del dominio de hélice del gen K13 para amplificar todo el dominio y se indican con flechas.

Figuras 12A-B-

A) Detección de alelos de hélice K13 mutados frente a alelos de hélice K13 de tipo silvestre mediante PCR en tiempo real - HRM (nt 1279-2127 de SEC ID NO:1).

B) Secuencia de los seis pares de cebadores, su localización en la secuencia de ácido nucleico del dominio de hélice K13 y tamaño de los productos de amplificación. (SEQ ID NO:27-38).

Figura 13 - Detección de 20 de los alelos de hélice K13 mutados mediante reacción PCR e hibridación de sonda mediante un ensayo múltiple Luminex® (ensayo múltiple de reacción de detección de ligasa con microesferas fluorescentes). La secuencia de ácido nucleico es nt 1261-2181 de SEC ID NO:1. La secuencia de aminoácidos es aa 421-726 de SEQ ID NO: 2.

Las flechas negras muestran los cebadores para la reacción PCR,

Cebador D(directo) 5' gccttggtgaaagaagcaga 3' (SEQ ID NO:14)

Cebador I (inverso) 5'-gccagctgccattcattg -3' (SEQ ID NO:13)

Las sondas específicas (gris claro y gris oscuro) están diseñadas para detectar polimorfismos mononucleotídicos (SNP) en el dominio de hélice K13. Las sondas de color gris claro son específicas de alelos y están unidas a perlas fluorescentes. Para cada posición en gris claro, hay dos sondas, una con el nucleótido mutado en el extremo 3' y otra con el nucleótido de tipo silvestre en el extremo 3'. Las sondas de color gris oscuro están diseñadas en regiones de secuencias conservadas y están unidas a biotina.

Listado de SNP:

- F446I ttt/att
- G449A ggt/gct
- N458Y aat/tat
- C469Y tgc/tac
- W470finaliz ador tgg/tga
- A481V gct/gtt
- Y493H tac/cac
- K503N aag/aat
- S522C agt/tgt
- V534A gtt/gct
- R539T aga/aca
- I543T att/act
- G548D ggc/gac
- P553L ccg/ctg
- V555A gta/gca
- A557S gca/tca
- R561H cgt/cat
- K563R aaa/aga
- V568G gtg/ggg
- P574L cct/ctt
- A578S gct/tct
- C580Y tgt/tat
- F583L ttt/tta/g

- D584V gat/gtt
- V589I gtc/atc
- Q613E caa/gaa
- D641G gat/ggt

SNP no sinónimo	codón de tipo silvestre frente a codón mutante	Posición del nucleótido en el extremo 3' de la sonda específica de alelo
F446I	ttt/att	1336
G449A	ggt/gct	1346
N458Y	aat/tat	1372
C469Y	tgc/tac	1406
W470finalizador	tgg/tga	1410
A481V	gct/gtt	1442
Y493H	tac/cac	1477
K503N	aag/aat	1509
S522C	agt/tgt	1564
V534A	gtt/gct	1601
R539T	aga/aca	1616
I543T	att/act	1628
G548D	ggc/gac	1643
P553L	ccg/ctg	1658
V555A	gta/gca	1664
A557S	gca/tca	1669
R561H	cgt/cat	1682
K563R	aaa/aga	1688
V568G	gtg/ggg	1703
P574L	cct/ctt	1721
A578S	gct/tct	1732
C580Y	tgt/tat	1739
F583L	ttt/tta/g	1749
D584V	gat/gtt	1751
V589I	gtc/atc	1765
Q613E	caa/gaa	1837
D641G	gat/ggt	1922

5 Tabla 1 - Secuencia de los cebadores utilizados para amplificar los genes que contienen polimorfismos mononucleotídicos no sinónimos en F32-ART5. Se muestran los cebadores directos (SEQ ID NO: 39-45) y los cebadores inversos (SEQ ID NO: 46-52).

10 Tabla 2 - Descripción de los ocho polimorfismos mononucleotídicos no sinónimos adquiridos en el linaje F32-ART5 en comparación con el linaje F32-TEM durante una exposición discontinua eficaz de 5 años a concentraciones crecientes de artemisinina.

secuencia de tipo 3D7; también se observa la misma secuencia de codones en la línea parental F32-Tanzania.

*Dosis de artemisinina (ART) utilizada para la selección durante el ciclo de presión farmacológica correspondiente.

^aGenes encontrados en la localización cromosómica de las firmas de selección mejor clasificadas en Takala-Harrison et al.¹⁶.

Tabla 3 - Características comunicadas de los genes mutados en parásitos F32-ART5.

Tabla 4 - Origen geográfico y año de recogida de las muestras de sangre conservadas en archivo estudiadas para el polimorfismo de hélice K13.

Tabla 5 - Polimorfismos observados en la hélice K13 en aislados de *P. falciparum* de Camboya recogidos en 2001-2012 y en Gambia (ref. 42).

* observados en F32-ART5, no observados en Camboya

** comunicados en Gambia (ref. 42), no observados en Camboya

Tabla 6 - Asociación entre polimorfismos observados en las hélices K13 y en las subpoblaciones KH (ref. 15) observados en 150 aislados de *P. falciparum* recogidos en 2009-2010 en las provincias de Pursat (n=103) y Ratanakiri (n = 47), Camboya.

Tabla 7 - Listado de las mutaciones más frecuentes identificadas en el dominio de hélice K13 en Asia y África.

Tabla 8: Cincuenta aislados clínicos de *P. falciparum* de Camboya (recogidos en 2010 y 2011) se adaptaron al cultivo *in vitro* según lo descrito por Witkowski et al.⁴⁵. Se indican los RSA (ensayos de supervivencia en la fase de anillo) y los polimorfismos.

Descripción detallada de la invención

La resistencia de *Plasmodium falciparum* a los derivados de artemisina en el sudeste asiático supone una amenaza a las actividades de control y eliminación del paludismo en todo el mundo. Para comprobar la propagación de la resistencia a la artemisina, se necesita urgentemente un marcador molecular. En este documento, utilizando secuenciación hologenómica de una línea de parásitos de África resistentes a artemisinina y de aislados de parásitos clínicos de Camboya, asociamos mutaciones en el dominio de hélice kelch PF3D7_1343700 ('hélice K13') con resistencia a artemisinina *in vitro* e *in vivo*. Los alelos de hélice K13 mutantes se agrupan en las provincias de Camboya, donde prevalece la resistencia, y el aumento de la frecuencia de un alelo de la hélice K13 mutante dominante se correlaciona con la reciente propagación de la resistencia en Camboya occidental. Las fuertes correlaciones entre la presencia de un alelo mutante, las tasas de supervivencia del parásito *in vitro* y las tasas de eliminación del parásito *in vivo*, indican que las mutaciones de la hélice K13 son determinantes importantes de la resistencia a la artemisinina. El polimorfismo de hélice K13 constituye un marcador molecular útil, en lo que respecta a esfuerzos de supervisión a gran escala, para contener la resistencia a la artemisinina en la subregión del Gran Mekong e impedir su propagación global.

Identificación de un marcador molecular candidato de resistencia a ART

La línea de parásitos F32-ART5 resistente a ART se seleccionó cultivando el clon F32-Tanzania sensible a ART en un régimen de 125 ciclos de artemisinina de dosis escalonada durante 5 años¹⁸. Se obtuvieron secuencias hologenómicas tanto para F32-ART5 como para F32-TEM (su clon hermano se cultivó sin artemisinina) a una cobertura de nucleótidos promedio de 460x y 500x, respectivamente. En comparación con F32-TEM, en F32-ART5 no se identificaron genes deletados. Los exomas de F32-ART5 y F32-TEM se compararon después de excluir (i) genes de familias multigénicas, muy variables (*var*, *rifin* y *stevor*), (ii) posiciones con cobertura inferior al 25 % de la cobertura media de la línea del parásito, (iii) polimorfismos mononucleotídicos (SNP) encontrados mezclados en F32-ART5, dado que se puede esperar que la mutación o mutaciones de resistencia a ART adquiridas se fijen en la muestra después de 5 años de presión continua, (iv) SNP compartidos entre F32-ART5 y la cepa del parásito 3D7 sensible a ART y (v) SNP sinónimos (Fig. 5).

Este análisis identificó ocho mutaciones en siete genes que se confirmaron posteriormente mediante secuenciación de Sanger de los productos de la PCR (Tabla 1). Cada gen lleva un codón mutante en F32-ART5 en comparación con F32-TEM, F32-Tanzania o 3D7 (Tabla 2). En la Tabla 3 se indica información sobre la expresión de los genes y la función biológica de las proteínas. Solo uno de estos genes, el de la cisteína proteasa falciparina 2a (PF3D7_1115700), se ha asociado previamente con respuestas *in vitro* a la ART¹⁹. Para determinar cuándo surgió cada mutación en el linaje F32-ART5, analizamos las secuencias hologenómicas de parásitos en varios ciclos de presión farmacológica (Fig. 1). Este análisis mostró que primero se adquirieron las mutaciones PF3D7_0110400 D56V y PF3D7_1343700 M476I, durante el pronunciado aumento de resistencia a ART, y se mantuvo estable a partir de entonces. Cabe destacar que, la aparición de estas dos mutaciones se asocia con un aumento en la tasa de supervivencia del ensayo de supervivencia en la fase de anillo (RSA^{0-3h}), de menos de 0,01 % a 12,8 %. El análisis de PCR posterior del locus PF3D7_1343700 detectó la mutación M476I después de 30 ciclos de presión farmacológica, lo que concuerda con el fuerte aumento en la tasa de supervivencia del RSA^{0-3h} observada a partir de entonces. Los otros SNP aparecieron gradualmente en una fase de selección posterior: PF3D7_0213400 (68 ciclos); PF3D7_1115700 (98 ciclos); PF3D7_1302100, PF3D7_1459600 y PF3D7_1464500 (120 ciclos) (Tabla 2). Estos datos sugieren que la mutación PF3D7_1343700 M476I aumentó la resistencia de F32-Tanzania a DHA en el RSA^{0-3h}.

Para explorar si estas mutaciones estaban asociadas con la resistencia a la ART en Camboya, investigamos el polimorfismo de secuencia en los siete genes extrayendo secuencias hologenómicas o Sanger de 49 aislados de parásitos adaptados al cultivo recogidos en 2010-2011 (véanse los Ejemplos). Elegimos estos aislados en función de sus tasas de supervivencia RSA^{0-3h} diferenciales (Tabla 8) y sus secuencias se compararon con las de líneas de parásitos de control 3D7, 89F5²⁰ y K1992 (véanse los Ejemplos). Tres genes (PF3D7_0110400, PF3D7_0213400 y PF3D7_1302100) codifican una secuencia de tipo silvestre para todos los aislados de parásitos. Los otros cuatro genes muestran diversidad intra-poblacional, con SNP nuevos o comunicados previamente (Tabla 8). PF3D7_1115700

tiene 11 SNP que no están asociados con tasas de supervivencia RSA^{0-3h} ($P=0,06$, prueba de Kruskal-Wallis). *PF3D7_1459600* tiene 6 SNP que no están asociados con tasas de supervivencia ($P=0,65$). *PF3D7_1464500* tiene 12 SNP previamente comunicados en aislados más antiguos del sudeste asiático, incluyendo la línea Dd2 susceptible a ART²¹, reflejando probablemente una firma geográfica. Estos SNP tampoco muestran una asociación significativa con tasas de supervivencia ($P=0,42$). Por lo tanto, estos seis genes no se estudiaron más a fondo.

Por el contrario, el polimorfismo *PF3D7_1343700* muestra una asociación significativa con tasas de supervivencia de RSA^{0-3h} (Fig. 2). De hecho, las tasas de supervivencia de RSA^{0-3h} difieren sustancialmente entre los aislados de parásitos con alelos de hélice K13 de tipo silvestre (mediana 0,17 %, intervalo 0,06-0,51 %, $n = 16$) o mutante (18,8 %, 3,8-58 %, $n = 33$) ($P<10^{-4}$, prueba de la U de Mann-Whitney)(Tabla 8). Se observan cuatro alelos mutantes, llevando cada uno de ellos un solo SNP no sinónimo dentro de una repetición kelch del dominio de hélice K13 C terminal, en concreto Y493H, R539T, I543T y C580Y localizados en las repeticiones n.º 2, n.º 3, n.º 3 y n.º 4, respectivamente. Tanto la línea K1992 como la 89F5, susceptibles a ART, llevan una hélice K13 de tipo silvestre. No hay asociaciones entre polimorfismos en la hélice K-13 y aquellos en los otros genes candidatos (Tabla 8). Basándose en estas observaciones y en la adquisición de M476I en la repetición n.º 2 de kelch por F32-ART5, investigamos si el polimorfismo de hélice K13 era una firma molecular de resistencia a ART en Camboya.

Aparición y propagación de alelos de hélice K13 mutantes en Camboya

En las últimas décadas, la prevalencia de la resistencia a la ART ha aumentado constantemente en las provincias occidentales de Camboya, aunque en ninguna otra parte del país². Para analizar si la distribución espaciotemporal de las mutaciones de hélice K13 se correlacionaba con la de la resistencia a la ART, secuenciamos la hélice K13 de aislados de parásitos conservados en archivo de pacientes camboyanos con paludismo en 2001-2012 (Tabla 4). Se compararon los datos de seis provincias ($n=886$): Pailin, Battambang y Pursat en el oeste donde se estableció la resistencia a ART^{1,6,8,22}, Kratie, en el sureste, donde la resistencia a ART se había incrementado en los últimos años², y Preah Vihear en el norte y Ratanakiri en el noreste, donde prácticamente no hubo constancia de resistencia a ART durante este período de tiempo². Este análisis reveló 17 alelos mutantes en general, incluidos tres alelos de alta frecuencia ($\geq 5\%$) (C580Y, R539T e Y493H). La frecuencia de la secuencia de tipo silvestre disminuyó significativamente con el tiempo en las tres provincias occidentales, pero no en Preah Vihear ni en Ratanakiri. La frecuencia del alelo C580Y aumentó significativamente de 2001-2002 a 2011-2012 en Pailin y Battambang, lo que indica su rápida invasión de la población y fijación próxima en estas zonas (Fig. 3).

Para investigar adicionalmente la diversidad geográfica del polimorfismo de hélice K13 en Camboya, ampliamos nuestro análisis de secuencia para incluir datos de cuatro provincias más ($n=55$, Kampong Som, Kampot, Mondulkiri y Oddar Meanchey) en 2011-2012 (Tabla 4). Aunque se observa un gran número de mutaciones (Fig. 9 y Tabla 5), el alelo C580Y representa el 85 % (189/222) de todos los alelos mutantes observados en 2011-2012 (Fig. 6). Este mapeo describe la frecuencia elevada (74 %, 222/300) de parásitos que llevan una sola mutación no sinónima en la hélice K13 y la disparidad geográfica de su distribución. Cabe destacar que, la distribución de frecuencia de alelos mutantes en las distintas provincias coincide con la de la positividad del día 3 en pacientes tratados por paludismo con una TCA (terapia combinada basada en artemisina) (ρ de Spearman = 0,99, IC del 95 % 0,96-0,99, $P<0,0001$) - se considera como un signo sugestivo de resistencia clínica a ART (Fig. 7).

Relaciones entre polimorfismos de hélice K13, subpoblaciones resistentes a ART y resistencia clínica a ART

Para confirmar que el polimorfismo de hélice K13 es un marcador molecular de resistencia clínica a ART, identificamos primero a 163 pacientes de Pursat y Ratanakiri en los que se midieron las semividas de eliminación del parásito (intervalo 1,58-11,53 h)⁶ en 2009-2010 y para los cuales los parásitos se asignaron previamente a una subpoblación KH (KH1, KH2, KH3, KH4 o KHA) en función del análisis de ascendencia de datos de secuencia hologenómica¹⁵. Se excluyeron trece pacientes con genotipos mixtos (un alelo de tipo silvestre y uno o más alelos de hélice K13 mutantes). De los 150 pacientes restantes, 72 llevaban parásitos con un alelo de tipo silvestre y los otros llevaban parásitos con un solo SNP no sinónimo en la hélice K13: C580Y ($n=51$), R539T ($n=6$) y Y493H ($n=21$) (Tabla 6). En pacientes con parásitos de tipo silvestre, la semivida de eliminación de los parásitos es significativamente más corta (mediana 3,30 h, RIC 2,59-3,95) que la de los que llevan parásitos C580Y (7,19 h, 6,47-8,31, $P<10^{-6}$, prueba de la U de Mann-Whitney), R539T (6,64 h, 6,00-6,72, $P<10^{-4}$) o Y493H (6,28 h, 5,37-7,14, $P<10^{-6}$) (Fig 4A). También, en pacientes que llevan parásitos C580Y, la semivida de eliminación de los parásitos es significativamente más larga que la de los que llevan parásitos Y493H ($P=0,007$, prueba de la U de Mann-Whitney). Estos datos indican que C580Y, R539T e Y493H identifican parásitos de eliminación lenta en pacientes con paludismo tratados con ART.

Dado que los parásitos KH2, KH3, KH4 y KHA tienen semividas más largas que los parásitos KH1¹⁵, supusimos que la variación alélica en la hélice K13 explicaba estas diferencias. Entre 150 parásitos, 55, 26, 14, 12 y 43 se clasifican como KH1, KH2, KH3, KH4 y KHA, respectivamente. Tres alelos de hélice K13 se asocian firmemente con grupos de KH: el 96 % (53/55) de los parásitos KH1, el 96 % (25/26) de KH2 y el 100 % (12/12) de KH4 lleva alelos de tipo silvestre, C580Y e Y493H, respectivamente (Tabla 6). Aunque los parásitos KH3 ($n=14$) llevan los alelos de tipo silvestre, C580Y y R539T, este último no se observa en parásitos KH1, KH2 o KH4. Como cabía esperar, Los parásitos KHA tienen una composición alélica mixta. Cabe destacar que, las mutaciones en la hélice K13 identifican con más precisión a parásitos de eliminación lenta que el grupo KH (Fig. 4B), lo que demuestra que la asociación del

polimorfismo de la hélice K13 con la resistencia clínica a ART en Camboya es parcialmente independiente del acervo genético de las subpoblaciones de KH. Dentro del grupo KH1 ($n=55$), en pacientes con parásitos de tipo silvestre, la semivida de eliminación de parásitos es significativamente más corta ($n=53$, mediana 2,88 h, RIC 2,52-3,79) que la de los pacientes con parásitos Y493H ($n = 2$, mediana 6,77 h, $P=0,02$, prueba de la U de Mann-Whitney). Dentro de la subpoblación KH3 ($n=14$), en pacientes con parásitos de tipo silvestre, la semivida es más corta ($n=3$, mediana 3,65 h) que la de los pacientes con los parásitos C580Y ($n=7$, mediana 8,73 h, RIC 7,35-9,06, $P=0,02$) o R539T ($n=4$, 6,65 h, 6,29-6,80, $P=0,03$).

El linaje F32-ART5 adquirió una mutación de hélice K13 al desarrollar resistencia a ART, como lo indica su capacidad para sobrevivir a una exposición farmacológicamente relevante al DHA en el RSA^{0-3h}. Genes supuestamente asociados con resistencia a ART (*Pfprt*^{23,24}, *Pfctcp*^{25,26}, *Pfmdr1*^{8,27,28}, *Pfmrp1*²⁷⁻²⁹ y transportadores de ABC³⁰) o que codifican supuestas dianas de ART (*PfATPasa*^{631,32} y *Pfubcth*- el ortólogo de *P. chabaudi* *ubp1*^{33,34}), no mutaron durante la selección de 5 años de F32-ART5, y no se observó amplificación de *Pfmdr1*³⁵⁻⁴⁰. Además, todos los genes candidatos de resistencia a ART identificados recientemente utilizando estrategias de genética poblacional^{14,40,41} permanecieron inalterados en el linaje F32-ART5, excepto *PF3D7_1343700* y *PF3D7_1459600* localizados en las ventanas de desequilibrio de enlace identificadas por Takala-Harrison et al.¹⁶. Estos hallazgos nos llevaron a identificar otras 17 mutaciones únicas de hélices K13 en parásitos de circulación natural en Camboya. Varias de estas mutaciones se asocian firmemente con la distribución espaciotemporal de la resistencia a ART en Camboya, con el aumento de las tasas de supervivencia del parásito en respuesta a DHA *in vitro* y prolongan la semivida de eliminación de parásitos en respuesta al tratamiento con ART *in vivo*. Ninguno de los otros seis genes mutados en F32-ART5 se asocian con tasas de supervivencia de RSA^{0-3h} en aislados de parásitos de Camboya.

El polimorfismo de hélice K13 cumple con la definición de un marcador molecular de resistencia a ART por diversas razones: (i) ha habido una pérdida progresiva de parásitos de tipo silvestre en el oeste de Camboya durante la década de la aparición de resistencia a ART en esta región; (ii) los parásitos mutantes se agrupan en las provincias de Camboya donde la resistencia a ART está bien establecida y son menos frecuentes donde la resistencia a ART es rara; (iii) *PF3D7_1343700* se localiza a 5,9 kb aguas arriba del locus de 35 kb identificado por Cheeseman et al.¹⁴ que está bajo una selección positiva reciente, y dentro de la región de firmas de selección mejor calificadas señaladas por Takala-Harrison et al.¹⁶; (iv) mutaciones múltiples, todas no sinónimas, están presentes en la hélice K13, reflejando una selección positiva en lugar de un efecto de autoestop o una deriva genética; (v) las mutaciones surgen en un dominio que está muy conservado en *P. falciparum*, con un solo SNP no sinónimo documentado en un solo aislado de parásito de África⁴²; (vi) todos los polimorfismos que observamos en Camboya son nuevos y todos menos uno (V568G) surgen en posiciones estrictamente conservadas entre las especies del género *Plasmodium* (Fig. 9 y Fig. 10), lo que sugiere fuertes restricciones estructurales y funcionales en la proteína; (vii) las tres mutaciones de hélice K13 más prevalentes se correlacionan firmemente con tasas de supervivencia *in vitro* de RSA^{0-3h} y semividas de eliminación de parásitos *in vivo* a nivel de aislados de parásitos individuales y de pacientes con paludismo, respectivamente; y (viii) la frecuencia de alelos mutantes se correlaciona firmemente con la prevalencia de positividad el día 3 después del tratamiento con TCA a nivel de poblaciones humanas en Camboya.

Basándose en la homología con otros dominios de hélice kelch, se espera que las mutaciones observadas en la hélice K13 desestabilicen el armazón del dominio y alteren su función. La parte C-terminal de *PF3D7_1343700* codifica seis motivos kelch, que se encuentran en un gran número de proteínas con diversas funciones celulares^{43,44}. Dado que la toxicidad de los derivados de ART depende principalmente de su actividad pro-oxidante, el papel comunicado de algunas proteínas que contienen kelch en la regulación de las respuestas citoprotectoras y de degradación de proteínas al estrés externo, es particularmente interesante. La hélice K13 muestra homología con la KLHL12 humana y la KLHL2 implicada en la degradación de proteínas basada en ubiquitina y KEAP1 implicada en la adaptación celular al estrés oxidativo (Fig. 8). Obviamente, se necesitan trabajos futuros para definir la función normal de K13 y el impacto de varias mutaciones. Los estudios de intercambio de alelos en parásitos mutantes y de tipo silvestre, pueden ayudar a definir la contribución de los polimorfismos de hélice K13 en diferentes acervos genéticos con respecto a la tasa de supervivencia RSA^{0-3h}. De hecho, es particularmente preocupante que tan solo dos mutaciones, es decir, M476I y *PF3D7_0110400* D56V de hélice K13, fueron suficientes para conferir resistencia a ART a F32-Tanzania, que tiene un acervo genético africano típico. Dado que los parásitos de Camboya con hélices K13 mutantes presentan un amplio intervalo de tasas de supervivencia RSA^{0-3h} (3,8 %-58 %) y de semividas de eliminación del parásito (4,5-11,5 h), se requieren estudios adicionales para identificar determinantes genéticos adicionales de resistencia a ART, que pueden residir en las regiones fuertemente seleccionadas recién identificadas^{16,14}. En este contexto, el análisis de las tasas de supervivencia de RSA^{0-3h} como rasgo cuantitativo entre parásitos que llevan la misma mutación de hélice K13, podría ayudar a identificar locus genéticos adicionales implicados en la resistencia a ART.

En resumen, el polimorfismo de la hélice K13 es un marcador molecular útil para rastrear la aparición y propagación de *P. falciparum* resistente a ART.

Métodos para genotipificar un plasmodio

La invención incluye métodos para genotipificar un parásito del género *Plasmodium*, particularmente *Plasmodium falciparum*. El método, realizado *in vitro*, comprende la etapa de detectar, en una muestra biológica, la presencia o la ausencia de un ácido nucleico o de una proteína de hélice K-13 de tipo silvestre o mutado. Dicha muestra se ha obtenido previamente de un paciente y es, en particular, una muestra de sangre. En una realización preferida, el

método comprende proporcionar una muestra biológica que contenga un parásito del género *Plasmodium* y detectar, en la muestra, la presencia o la ausencia de un ácido nucleico o de una proteína de hélice K-13 de tipo silvestre o mutado. El ácido nucleico o la proteína de hélice K-13 de tipo silvestre o mutado se detecta mediante técnicas habituales en la materia. Por ejemplo, pueden utilizarse las técnicas descritas en los Ejemplos, o en cualquier otro lugar del presente documento.

Favorablemente, la muestra biológica es una muestra de sangre.

El ácido nucleico de hélice K-13 de tipo silvestre o mutado puede detectarse mediante numerosas técnicas conocidas en la materia, tales como secuenciación, hibridación, o ensayos de amplificación.

En el contexto de la presente divulgación, un "ácido nucleico de hélice K-13 de *P. falciparum* de tipo silvestre" significa un ácido nucleico que tiene la secuencia de SEC ID NO:1 o una secuencia de ácido nucleico variante que codifica la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO:2. En el contexto de la presente divulgación, una "proteína de hélice K-13 de *P. falciparum* de tipo silvestre" significa una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO:2. En la figura 10 se muestran otras proteínas de hélice K-13 de un parásito del género *Plasmodium* de tipo silvestre.

En el contexto de la presente invención, un "ácido nucleico de hélice K-13 de *P. falciparum* mutante" es sinónimo de un "ácido nucleico de hélice K-13 de *P. falciparum* mutado" y significa una secuencia de ácido nucleico que tiene una o más diferencias con respecto a la secuencia de ácido nucleico de SEC ID NO:1 que da como resultado una diferencia de al menos un aminoácido con respecto a la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO:2. Preferentemente, un ácido nucleico de hélice K13 de *P. falciparum* mutante según la invención lleva un solo polimorfismo mononucleotídico (SNP) no sinónimo dentro de una repetición kelch del dominio de hélice K13 carboxilo terminal. Más preferentemente, el único SNP no sinónimo es uno de los siguientes SNP:

• F446I	ttt/att
• G449A	ggt/gct
• N458Y	aat/tat
• C469Y	tgc/tac
• W470finaliz ador	tgg/tga
• A481V	gct/gtt
• Y493H	tac/cac
• K503N	aag/aat
• S522C	agt/tgt
• V534A	gtt/gct
• R539T	aga/aca
• I543T	att/act
• G548D	ggc/gac
• P553L	ccg/ctg
• V555A	gta/gca
• A557S	gca/tca
• R561H	cgt/cat
• K563R	aaa/aga
• V568G	gtg/ggg
• P574L	cct/ctt
• A578S	gct/tct
• C580Y	tgt/tat
• F583L	ttt/tta/g
• D584V	gat/gtt
• V589I	gtc/atc
• Q613E	caa/gaaD641G gat/ggt

En el contexto de la presente invención, una "proteína de hélice K-13 de *P. falciparum* mutante" es sinónimo de una "proteína de hélice K-13 de *P. falciparum* mutada" y significa una secuencia de aminoácidos que tiene una o más diferencias con respecto a la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 2. La una o más diferencias con respecto a la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 2 es uno o más aminoácidos mutantes dentro de una repetición kelch del dominio de hélice K13 carboxilo terminal de la proteína de hélice K-13 de *P. falciparum*.

Las proteínas de hélice K-13 de *P. falciparum* mutantes preferidas tienen una o más de las mutaciones mostradas en la Figura 9 o 13.

5 Las proteínas de hélice K-13 de *P. falciparum* mutantes más preferidas tienen una sola mutación escogida entre las mutaciones mostradas en la Figura 9 o 13.

Estas mutaciones también se definen según el listado de SNP proporcionado anteriormente.

10 En diversas realizaciones, el método comprende la etapa de detectar, en una muestra biológica, la presencia o la ausencia de una proteína de hélice K-13 de tipo silvestre o mutado. Esto puede realizarse utilizando anticuerpos específicos que discriminan entre las proteínas de hélice K-13 de tipo silvestre y mutantes. Estos anticuerpos pueden ponerse en contacto con muestras de pacientes y la presencia o la ausencia de las proteínas de hélice K-13 de tipo silvestre o mutadas puede determinarse detectando la presencia o la ausencia de una reacción inmunológica. Preferentemente, el método comprende un ensayo ELISA.

15 En una realización preferida, el método comprende proporcionar una muestra que contenga un parásito del género *Plasmodium* y detectar, en la muestra, la presencia de un ácido nucleico o de una proteína de hélice K-13 mutado. Preferentemente, la presencia en la muestra de un ácido nucleico de hélice K-13 mutado, se detecta mediante secuenciación o por PCR.

20 Preferentemente, el parásito del género *Plasmodium* se selecciona de *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale curtisi*, *Plasmodium ovale wallikeri*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium knowlesi*, *Plasmodium brasilianum*, *Plasmodium cynomolgi*, *Plasmodium cynomolgi bastianellii*, *Plasmodium inui*, *Plasmodium rhodiani*, *Plasmodium schweitzii*, *Plasmodium semiovale*, *Plasmodium simium*, *Plasmodium berghei*, *Plasmodium yoelii* y *Plasmodium chabaudi*.

25 La invención incluye métodos para genotipificar un parásito del género *Plasmodium*. Preferentemente, el método discrimina entre un parásito del género *Plasmodium* susceptible a artemisinina (con un alelo K13 de tipo silvestre) y un parásito del género *Plasmodium* resistente a artemisinina (con un alelo K13 mutante).

30 La invención incluye métodos *in vitro* para detectar al menos una mutación en la secuencia de ácido nucleico del dominio de hélice K13. La invención incluye métodos para detectar, en una muestra biológica que contiene un parásito del género *Plasmodium*, la presencia de un ácido nucleico de hélice K13 mutante que comprende poner en contacto el ácido nucleico de hélice K13 con una sonda específica para una hélice K13 mutante y detectar la unión de la sonda con el ácido nucleico de hélice K13. La unión de la sonda con el ácido nucleico de hélice K13 puede detectarse mediante técnicas habituales en la materia. Por ejemplo, puede utilizarse cualquiera de las técnicas descritas en el presente documento. En el Ejemplo 15 y en la Figura 13 se muestran mutantes y sondas ejemplares. Preferentemente, las sondas tienen un tamaño de al menos 15, 20, 25 o 30 pb. Lo más preferentemente, tienen un tamaño de al menos 15-20, 15-25, 15-30, 20-25 o 25-30 nt.

35 En algunas realizaciones, la sonda está unida a una perla fluorescente. En algunas realizaciones, el método comprende unir la sonda al ácido nucleico del dominio de hélice K13 mutante y detectar el ácido nucleico del dominio de hélice K13 unido con una sonda que se une al ácido nucleico del dominio de hélice K13 unido. En algunas realizaciones, el ácido nucleico de hélice K13 se amplifica antes de la detección.

40 En una realización, los ácidos nucleicos de un parásito del género *Plasmodium* se someten a una amplificación de la secuencia del ácido nucleico del dominio de hélice K13. En diversas realizaciones, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más fragmentos de la secuencia de ácido nucleico del dominio de hélice K13 se amplifican. Los fragmentos amplificados pueden tener un tamaño de al menos 50, 75, 100, 125, 150, 175 o 200 nt a al menos 75, 100, 125, 150, 175, 200, 250 o 300 nt. Para esta amplificación, los cebadores pueden ser cualquiera de los cebadores expuestos en el presente documento.

45 Preferentemente, el método de amplificación es la PCR, lo más preferentemente PCR en tiempo real, PCR-HRM (del inglés *High-Resolution DNA Melting* que significa fusión de ADN de alta resolución) (véase Andriantsoanirina et al. Journal of Microbiological Methods, 78:165 (2009)) o PCR acoplada a una reacción de detección de ligasa basada en microesferas fluorescentes (microesferas Luminex®). Este último método permite realizar un ensayo múltiple para detectar varios alelos de hélice K13 mutados al mismo tiempo.

50 Otros métodos de amplificación preferidos incluyen la reacción en cadena de la ligasa (LCR, del inglés *ligase chain reaction*) (por ejemplo, Wu y Wallace, Genomics 4, 560 (1989), Landegren et al., Science 241, 1077 (1988) y Barringer et al. Gene 89:117 (1990)), amplificación de transcripción (Kwoh et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 1173 (1989) y documento WO88/10315), replicación de secuencia autosostenida (Guatelli et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 87, 1874 (1990) y documento WO90/06995), amplificación selectiva de secuencias polinucleotídicas diana (patente de Estados Unidos n.º 6.410.276) y amplificación de secuencias basada en ácido nucleico (NABSA, del inglés *nucleic acid based sequence amplification*) (patentes de Estados Unidos Nos. 5.130.238, 5.409.818, 5.554.517 y 6.063.603). Otros

métodos de amplificación que pueden utilizarse se describen en las patentes de Estados Unidos Nos. 5.242.794, 5.494.810, 4.988.617 y 6.582.938.

5 En una realización, el método comprende proporcionar un ácido nucleico de un parásito del género *Plasmodium*, amplificar por PCR al menos un fragmento de la secuencia de ácido nucleico del dominio de hélice K13 en el ácido nucleico de un parásito del género *Plasmodium*, y detectar al menos una mutación en la secuencia de ácido nucleico del dominio de hélice K13. La invención incluye métodos para detectar, en una muestra biológica que contiene un parásito del género *Plasmodium*, la presencia de un ácido nucleico de hélice K13 mutante que comprende, amplificar el ácido nucleico de hélice K13 mutante por reacción PCR y poner en contacto el ácido nucleico amplificado con una sonda específica para una hélice K13 mutante. En el Ejemplo 15 y en la Figura 13 se muestran mutantes y sondas ejemplares. Preferentemente, las sondas tienen un tamaño de al menos 15, 20, 25 o 30 pb.

15 En una realización, la mutación se detecta por fusión de ADN de alta resolución. En diversas realizaciones, para detectar la presencia de mutaciones, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más fragmentos de la secuencia de ácido nucleico del dominio de hélice K13 se amplifican y se analizan por fusión de ADN de alta resolución. Lo más preferentemente, para detectar la presencia de mutaciones, 6 fragmentos de la secuencia de ácido nucleico del dominio de hélice K13 se amplifican y se analizan por fusión de ADN de alta resolución.

20 En una realización, el método comprende proporcionar una muestra biológica que contenga ADN de un parásito del género *Plasmodium*; opcionalmente extraer ADN de la muestra biológica; poner en contacto el ADN del parásito del género *Plasmodium* con al menos un par de cebadores que se hibridan específicamente con el ácido nucleico de hélice K13, preferentemente a una distancia que varía de 100 a 300 pb, y realizar una reacción PCR, preferentemente en presencia de colorante intercalante. Preferentemente, los productos de amplificación se someten a una etapa de fusión y se genera un perfil de fusión de los productos de amplificación. La etapa de fusión puede permitir determinar la presencia de un alelo mutante o de un alelo de tipo silvestre analizando el perfil de fusión de los productos de amplificación.

30 En una realización, la mutación se detecta con sondas específicas que están diseñadas para detectar polimorfismos mononucleotídicos (SNP) en el dominio de hélice K13. En una realización, sondas específicas de alelo están unidas a un sustrato sólido, preferentemente perlas, lo más preferentemente perlas fluorescentes. Las sondas pueden ser específicas para una mutación en el dominio de hélice K13 o para el dominio de hélice K13 de tipo silvestre. Las sondas pueden unirse al (es decir, capturar el) ácido nucleico del dominio de hélice K13 mutante o de tipo silvestre. Después, el ácido nucleico del dominio de hélice K13 unido (es decir, capturado) puede detectarse con una sonda que se une al ácido nucleico del dominio de hélice K13 unido (es decir, capturado). Preferentemente, el ensayo se basa en microesferas fluorescentes (microesferas Luminex®). En el Ejemplo 15 y en la Figura 13 se muestran mutantes y sondas ejemplares. Preferentemente, las sondas tienen un tamaño de al menos 15, 20, 25 o 30 pb. Preferentemente, la sonda abarca una de las mutaciones enumeradas en el Ejemplo 15 y en la Figura 13.

40 En diversas realizaciones, al menos un fragmento de la secuencia de ácido nucleico del dominio de hélice K13 se amplifica utilizando al menos un cebador que tiene una secuencia de nucleótidos seleccionada de las SEC ID N°: 15-26. Preferentemente, uno o más conjuntos de cebadores utilizados para la amplificación se seleccionan de los siguientes pares de cebadores:

45 Par PCR1:

5' AGGTGGATTTGATGGTGTAGAAT 3' (directo) (SEQ ID NO:15)
5' CATACACCTCAGTTTCAAATAAAGC 3' (inverso) (SEQ ID NO:16)

50 Par PCR2:

5' AATTTCTTATACGTTTTTGGTGGTAA 3' (directo) (SEQ ID NO:17)
5' CTCTACCCATGCTTTCATACGAT 3' (inverso) (SEQ ID NO:18)

55 Par PCR3

5' GGATATGATGGCTCTTCTATTATACCG 3' (directo) (SEQ ID NO:19)
5' ACTTCAATAGAATTTAATCTCTCACCA 3' (inverso) (SEQ ID NO:20)

Par PCR4

60 5' ATGTCATTGGTGGAACTAATGGT 3' (directo) (SEQ ID NO:21)
5' TTAAATGGTTGATATTGTTCAACG 3' (inverso) (SEQ ID NO:22)

Par PCR5

65 5' TTCAGGAGCAGCTTTTAATTACC 3' (directo) (SEQ ID NO:23)
5' CTGGTGAAAAGAAATGACATGAA 3' (inverso) (SEQ ID NO:24)

ES 2 720 728 T3

Par PCR6

5 5' CCTTGTTGAAAGAAGCAGAATTT 3' (directo) (SEQ ID NO:25)
5' ATTCAATACAGCACTTCCAAAATAA 3' (inverso) (SEQ ID NO:26).

10 En diversas realizaciones, para detectar la presencia de mutaciones, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más fragmentos de la secuencia de ácido nucleico del dominio de hélice K13 se amplifican y se analizan. Lo más preferentemente, para detectar la presencia de mutaciones, 6 fragmentos de la secuencia de ácido nucleico del dominio de hélice K13 se amplifican y se analizan por fusión de ADN de alta resolución. Preferentemente, la mutación detectada se selecciona de las siguientes mutaciones (de/a):

- F446I ttt/att
- G449A ggt/gct
- N458Y aat/tat
- C469Y tgc/tac
- W470finali
zador tgg/tga
- A481V gct/gtt
- Y493H tac/cac
- K503N aag/aat
- S522C agt/tgt
- V534A gtt/gct
- R539T aga/aca
- I543T att/act
- G548D ggc/gac
- P553L ccg/ctg
- V555A gta/gca
- A557S gca/tca
- R561H cgt/cat
- K563R aaa/aga
- V568G gtg/ggg
- P574L cct/ctt
- A578S gct/tct
- C580Y tgt/tat
- F583L ttt/tta/g
- D584V gat/gtt
- V589I gtc/atc
- Q613E caa/gaa
- D641G gat/ggt.

15 Lo más preferentemente, la mutación detectada es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, o todas de las siguientes mutaciones:

- F446I ttt/att
- G449A ggt/gct
- N458Y aat/tat
- A481V gct/gtt
- Y493H tac/cac
- K503N aag/aat
- R539T aga/aca
- I543T att/act
- P553L ccg/ctg
- A557S gca/tca
- R561H cgt/cat
- V568G gtg/ggg

- P574L cct/ctt
- A578S gct/tct
- C580Y tgt/tat

Métodos de control de resistencia a ART

5 La invención incluye métodos para controlar la resistencia a ART de un parásito del género *Plasmodium*. En una realización preferida, el método comprende cultivar un parásito del género *Plasmodium*, poner en contacto el parásito del género *Plasmodium* con artemisina, y detectar una mutación en un ácido nucleico o una proteína de hélice K-13. Preferentemente, el parásito del género *Plasmodium* se cultiva *in vitro*, preferentemente como en van Schalkwyk et al. Malaria Journal 2013, 12: 320.

10 En una realización, el método comprende cultivar un parásito del género *Plasmodium*, poner en contacto el parásito del género *Plasmodium* con una artemisina, y secuenciar un ácido nucleico o una proteína de hélice K-13 en puntos temporales múltiples.

15 En una realización, el método comprende proporcionar muestras múltiples de un parásito del género *Plasmodium*, de una sola o de varias zonas geográficas, y detectar una mutación en un ácido nucleico o proteína de hélice K-13.

Métodos de detección de una infección causada por un parásito del género *Plasmodium*

20 La invención incluye métodos para la detección de una infección causada por un parásito del género *Plasmodium* y para el diagnóstico de la infección en un paciente infectado. Los pacientes pueden diagnosticarse proporcionando una muestra celular de un paciente. En una realización preferida, el método comprende proporcionar una muestra celular de un paciente y detectar, en la muestra celular, la presencia o la ausencia de un ácido nucleico o de una proteína de hélice K-13 de tipo silvestre o mutado.

25 El ácido nucleico o la proteína de hélice K-13 de tipo silvestre o mutado se detecta mediante técnicas habituales en la materia. Por ejemplo, puede utilizarse cualquiera de las técnicas descritas en el presente documento.

30 La muestra celular puede ser cualquier muestra celular obtenida de un paciente que contenga un parásito del género *Plasmodium*. Preferentemente, la muestra celular se genera extrayendo sangre. Preferentemente, la muestra celular es una muestra de sangre. La muestra de sangre puede procesarse adicionalmente para cultivar *in vitro* el parásito del género *Plasmodium* en la muestra. Por ejemplo, pueden utilizarse las técnicas descritas en van Schalkwyk et al. Malaria Journal 2013, 12:320.

35 En una realización, el método comprende proporcionar una muestra de sangre del paciente; opcionalmente cultivar *in vitro* el parásito del género *Plasmodium* en la muestra y detectar en la muestra celular la presencia o la ausencia de un ácido nucleico o de una proteína de hélice K-13 de tipo silvestre o mutado.

40 En una realización, el método comprende proporcionar una muestra de sangre de un paciente y detectar en la muestra la presencia o la ausencia de un ácido nucleico o de una proteína de hélice K-13 de tipo silvestre o mutado. Preferentemente, la presencia en la muestra de un ácido nucleico de hélice K-13 mutado, se detecta mediante secuenciación o por PCR.

45 Preferentemente, la secuenciación de ácido nucleico se utiliza para detectar en la muestra celular la presencia o la ausencia de un ácido nucleico de hélice K-13 de tipo silvestre o mutado. Puede emplearse cualquier método de secuenciación conocido en la técnica. Tal como se usa en el presente documento, el término "secuenciación" se utiliza en un sentido amplio y se refiere a cualquier técnica conocida por el experto en la materia, que incluye pero sin limitación, el método de Sanger de secuenciación por terminación cadena o didesoxi, secuenciación hologenómica, secuenciación por hibridación, pirosecuenciación, electroforesis capilar, secuenciación por ciclos, secuenciación por extensión de una sola base, secuenciación en fase sólida, secuenciación de alto rendimiento, secuenciación masiva de firmas paralelas (MPSS, del inglés *massively parallel signature sequencing*), secuenciación con terminador reversible marcado con colorante, secuenciación de extremos emparejados, secuenciación a medio plazo, secuenciación con exonucleasa, secuenciación mediante ligamiento, secuenciación de lectura corta, secuenciación de una sola molécula, secuenciación por síntesis, secuenciación en tiempo real, secuenciación con terminador inverso, secuenciación basada en nanoporos, secuenciación 454, secuenciación con analizador Solexa del genoma, 50 secuenciación SOLiD(R), secuenciación MS-PET, espectrometría de masas, y una combinación de las mismas. En realizaciones específicas, el método de la divulgación está adaptado para ejecutarse en el secuenciador de ADN ABI PRISM(R) 377, un analizador genético ABI PRISM(R) 310, 3100, 3100-Avant, 3730 o 3730x1, un analizador de ADN ABI PRISM(R) 3700, o un sistema SOLiD(TM) de Applied Biosystems (todos de Applied Biosystems), un sistema secuenciador de genoma 20 (Roche Applied Science).

60 Preferentemente, la hélice K-13 en el parásito del género *Plasmodium* de la muestra celular tiene una o más de las mutaciones mostradas en la figura 9 o 13 o en la Tabla 7.

En una realización, el método comprende detectar cualquiera de las secuencias de ácido nucleico que codifican cualquiera de las mutaciones mostradas en la figura 9 o 13 o en la Tabla 7. Estas secuencias pueden detectarse específicamente mediante numerosas técnicas conocidas en la materia, tales como secuenciación, hibridación, o ensayos de amplificación.

Por ejemplo, el método de amplificación puede ser RCA, MDA, NASBA, TMA, SDA, LCR, ADN-b, PCR (todas las formar incluyendo RT-PCR), RAM, LAMP, ICAN, SPIA, QB-replicasa o Invader. Un método de amplificación preferido es la amplificación mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR, del inglés *polymerase chain reaction*). Véase, por ejemplo, PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification (Ed. H. A. Erlich, Freeman Press, NY, N.Y., 1992); PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications (Eds. Inis, et al., Academic Press, San Diego, Calif., 1990); Mattila et al., Nucleic Acids Res. 19, 4967 (1991); Eckert et al., PCR Methods and Applications 1, 17 (1991); PCR (Eds. McPherson et al., IRL Press, Oxford); y las patentes de Estados Unidos Nos. 4.683.202, 4.683.195, 4.800.159, 4.965.188 y 5.333.675. Los métodos de PCR más preferidos son PCR en tiempo real, PCR-HRM (fusión de ADN de alta resolución) (véase Andriantsoanirina et al. Journal of Microbiological Methods, 78:165 (2009)) y PCR acoplada a una reacción de detección de ligasa basada en microesferas fluorescentes (microesferas Luminex®). Este último método permite realizar un ensayo múltiple para detectar varios alelos de hélice K13 mutados al mismo tiempo.

Otros métodos de amplificación preferidos incluyen la reacción en cadena de la ligasa (LCR) (por ejemplo, Wu y Wallace, Genomics 4, 560 (1989), Landegren et al., Science 241, 1077 (1988) y Barringer et al. Gene 89:117 (1990)), amplificación de transcripción (Kwoh et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 1173 (1989) y documento WO88/10315), replicación de secuencia autosostenida (Guatelli et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 87, 1874 (1990) y documento WO90/06995), amplificación selectiva de secuencias polinucleotídicas diana (patente de Estados Unidos n.º 6.410.276) y amplificación de secuencias basada en ácido nucleico (NABSA, del inglés *nucleic acid based sequence amplification*) (patentes de Estados Unidos Nos. 5.130.238, 5.409.818, 5.554.517 y 6.063.603). Otros métodos de amplificación que pueden utilizarse se describen en las patentes de Estados Unidos Nos. 5.242.794, 5.494.810, 4.988.617 y 6.582.938.

En una realización preferida, para la amplificación se utiliza al menos uno de los siguientes cebadores:

directo K13-1 5'-cggagtgaccaaactctggga-3' (SEQ ID NO:9);
 inverso K13-4 5'-gggaatctggtgtaacagc-3' (SEQ ID NO:10);
 directo K13-2 5'-cgccagcattgtgactaat-3' (SEQ ID NO:11);
 inverso K13-3 5'-gcggaagtagtagcgagaat-3' (SEQ ID NO:12);
 directo 5'-gccaagctgcattcatttg -3' (SEQ ID NO:13); e
 inverso 5'-gccttggtgaaagaagcaga -3' (SEQ ID NO:14).

El ácido nucleico puede ser ARN o ADN. En una realización, el ARN se extrae y se retrotranscribe en ADNc. Después, la amplificación o secuenciación se realiza en el ADNc.

Por tanto, el método puede comprender aislar ARN de una muestra de un paciente, retrotranscribir el ARN en ADNc, amplificar o secuenciar el ADNc, y determinar la presencia o la ausencia de un ácido nucleico de hélice K-13 de tipo silvestre o mutado.

En diversas realizaciones, el método comprende detectar, en una muestra celular, la presencia o la ausencia de una proteína de hélice K-13 de tipo silvestre o mutado. Esto puede realizarse utilizando anticuerpos específicos que discriminan entre las proteínas de hélice K-13 de tipo silvestre y mutantes. Estos anticuerpos pueden ponerse en contacto con muestras de pacientes y la presencia o la ausencia de las proteínas de hélice K-13 de tipo silvestre o mutadas puede determinarse detectando la presencia o la ausencia de una reacción inmunológica. Preferentemente, el método comprende un ensayo ELISA.

Los anticuerpos pueden ser sintéticos, monoclonales o policlonales y pueden producirse mediante técnicas muy conocidas en la materia. Dichos anticuerpos se unen específicamente a través de los sitios de unión a antígeno del anticuerpo (a diferencia de la unión inespecífica). Los polipéptidos de hélice K-13, fragmentos, variantes, proteínas de fusión, etc., pueden emplearse como inmunógenos para producir anticuerpos inmunorreactivos con los mismos. Más específicamente, los polipéptidos, fragmentos, variantes, proteínas de fusión, etc. contienen determinantes antigénicos o epítopos que suscitan la formación de anticuerpos.

Estos determinantes antigénicos o epítopos pueden ser lineales o conformacionales (discontinuos). Los epítopos lineales están compuestos por una sola sección de aminoácidos del polipéptido, mientras que los epítopos conformacionales o discontinuos están compuestos por secciones de aminoácidos de diferentes regiones de la cadena polipeptídica que, después del plegamiento de las proteínas, están muy próximos entre sí (C. A. Janeway, Jr. y P. Travers, Immuno Biology 3:9 (Garland Publishing Inc., 2ª ed. 1996)). Dado que las proteínas plegadas tienen superficies complejas, el número de epítopos disponibles es bastante numeroso; sin embargo, debido a la conformación de la proteína y a los impedimentos estéricos, el número de anticuerpos que realmente se unen a los epítopos es menor que el número de epítopos disponibles (C. A. Janeway, Jr. y P. Travers, Immuno Biology 2:14

(Garland Publishing Inc., 2ª ed. 1996)). Los epítomos pueden identificarse mediante cualquiera de los métodos conocidos en la técnica. Tanto los anticuerpos policlonales como los monoclonales pueden prepararse mediante técnicas convencionales.

5 Los péptidos de hélice K-13 basados en la secuencia de aminoácidos de las proteínas de hélice K-13 de tipo silvestre y mutante, pueden utilizarse para preparar anticuerpos que se unen específicamente a la hélice K-13 de tipo silvestre y/o mutante. El término "anticuerpos" pretende incluir anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales, fragmentos de los mismos, tales como fragmentos F(ab')₂ y Fab, fragmentos variables monocatenarios (scFv), fragmentos de anticuerpos de un solo dominio (VHHs o Nanocuerpos), fragmentos de anticuerpos bivalentes (diacuerpos), así como cualquier compañero de unión producido de forma recombinante y sintética.

10 Se define que los anticuerpos se unen específicamente si se unen a un polipéptido de hélice K-13 de tipo silvestre o mutante con un K_a mayor que o igual a aproximadamente 10⁷ M⁻¹. Las afinidades de los compañeros de unión o anticuerpos pueden determinarse fácilmente utilizando técnicas convencionales, por ejemplo, como las descritas en Scatchard et al., Ann. N. Y. Acad. Sci., 51:660 (1949).

15 Los anticuerpos policlonales pueden generarse fácilmente a partir de una variedad de fuentes, por ejemplo, caballos, vacas, cabras, ovejas, perros, pollos, conejos, ratones o ratas, utilizando procedimientos muy conocidos en la materia. En general, la hélice K-13 purificada o un péptido basado en la secuencia de aminoácidos de la hélice K-13 que está conjugado apropiadamente, se administra al animal hospedador típicamente a través de inyección parenteral. La inmunogenicidad de la hélice K-13 puede potenciarse utilizando un adyuvante, por ejemplo, adyuvante incompleto o incompleto de Freund. Después de las inmunizaciones de refuerzo, se recogen muestras pequeñas de suero y se analizan para determinar la reactividad al polipéptido de hélice K-13. Los ejemplos de varios ensayos útiles para dicha determinación incluyen los descritos en Antibodies: A Laboratory Manual, Harlow y Lane (eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988; así como procedimientos, tales como inmunolectroforesis de contracorriente (CIEP, del inglés *countercurrent immuno-electrophoresis*), radioinmunoensayo, radioinmunoprecipitación, ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzima (ELISA), ensayos de transferencia de puntos y ensayos de tipo sándwich. Véanse las patentes de Estados Unidos n.º 4.376.110 y 4.486.530.

20 Los anticuerpos monoclonales pueden prepararse fácilmente utilizando procedimientos muy conocidos. Véanse, por ejemplo, los procedimientos descritos en las patentes de Estados Unidos n.º RE 32.011, 4.902.614, 4.543.439 y 4.411.993; Monoclonal Antibodies, Hybridomas: A New Dimension in Biological Analyses, Plenum Press, Kennett, McKearn, y Bechtol (eds.), 1980.

25 Por ejemplo, los animales hospedadores, tales como ratones, pueden recibir, por vía intraperitoneal, al menos una vez y, preferentemente, al menos dos veces, a intervalos de aproximadamente 3 semanas, una inyección de una proteína de hélice K-13 de tipo silvestre o mutante, aislada y purificada o de un péptido de hélice K-13 conjugado, opcionalmente en presencia de adyuvante. Después, los sueros de los ratones se analizan mediante la técnica convencional de transferencia de puntos o captura de anticuerpos (ABC, del inglés *antibody capture*), para determinar cual es el mejor animal para realizar la fusión. Aproximadamente dos a tres semanas más tarde, los ratones reciben un refuerzo intravenoso de proteína o péptido. Posteriormente, los ratones se sacrifican y los esplenocitos (células de bazo) se fusionan con células de mieloma disponibles en el comercio, tales como Ag8.653 (ATCC), siguiendo protocolos establecidos. Resumiendo, las células de mieloma se lavan varias veces en medios y se fusionan con esplenocitos de ratón a una proporción de aproximadamente tres esplenocitos por una célula de mieloma. El agente de fusión puede ser cualquier agente adecuado utilizado en la técnica, por ejemplo, polietilenglicol (PEG). La fusión se coloca en placas que contienen medios que permiten el crecimiento selectivo de las células fusionadas. Después, las células fusionadas pueden crecer durante ocho días aproximadamente. Los sobrenadantes de los hibridomas resultantes se recogen y se añaden a una placa que se recubre primero con Ig de cabra antiratón. Después de lavar, un marcador, tal como un polipéptido de hélice K-13 marcado, se añade a cada pocillo seguido de incubación. Los pocillos positivos pueden detectarse posteriormente. Los clones positivos pueden crecer en un volumen de cultivo y los sobrenadantes se purifican posteriormente sobre una columna de Proteína A (Pharmacia).

30 Los anticuerpos monoclonales de la presente divulgación pueden producirse utilizando técnicas alternativas, tales como las descritas en Alting-Mees et al., "Monoclonal Antibody Expression Libraries: A Rapid Alternative to Hybridomas", Strategies in Molecular Biology 3:1-9 (1990). De manera similar, los compañeros de unión pueden construirse utilizando técnicas de ADN recombinante para incorporar las regiones variables de un gen que codifica un anticuerpo de unión específico. Dicha técnica se describe en Larrick et al., Biotechnology, 7:394 (1989).

35 En la presente invención también se incluyen fragmentos de unión a antígeno de dichos anticuerpos, que pueden producirse por técnicas convencionales. Ejemplos de dichos fragmentos incluyen, pero sin limitación, fragmentos Fab y F(ab')₂. También se proporcionan fragmentos y derivados de anticuerpos producidos por técnicas de ingeniería genética.

40 Los anticuerpos monoclonales de la presente divulgación incluyen anticuerpos quiméricos, por ejemplo, versiones humanizadas de anticuerpos monoclonales murinos. Dichos anticuerpos humanizados pueden prepararse mediante técnicas conocidas, y ofrecen la ventaja de una inmunogenicidad reducida cuando los anticuerpos se administran a

seres humanos. En una realización, un anticuerpo monoclonal humanizado comprende la región variable de un anticuerpo murino (o simplemente el sitio de unión al antígeno del mismo) y una región constante procedente de un anticuerpo humano. Como alternativa, un fragmento de anticuerpo humanizado puede comprender el sitio de unión a antígeno de un anticuerpo monoclonal murino y un fragmento de región variable (que carece del sitio de unión a antígeno) procedente de un anticuerpo humano. Los procedimientos para la producción de anticuerpos monoclonales quiméricos y modificados por ingeniería genética incluyen adicionalmente los descritos en Riechmann et al. (Nature 332:323, 1988), Liu et al. (PNAS 84:3439, 1987), Larrick et al. (Bio/Technology 7:934, 1989) y Winter y Harris (TIPS 14:139, mayo de 1993). En la patente GB 2.272.440 y en las patentes de Estados Unidos N.º 5.569.825 y 5.545.806, pueden encontrarse procedimientos para generar anticuerpos transgénicos.

Pueden utilizarse anticuerpos producidos por métodos de ingeniería genética, tales como anticuerpos monoclonales quiméricos y humanizados, que comprende partes tanto humanas como no humanas, que pueden crearse utilizando técnicas convencionales de ADN recombinante. Dichos anticuerpos monoclonales quiméricos y humanizados pueden producirse mediante ingeniería genética, utilizando técnicas convencionales de ADN conocidas en la materia, por ejemplo, utilizando los métodos descritos en Robinson et al., publicación internacional N.º WO 87/02671; Akira, et al., solicitud de patente Europea 0184187; Taniguchi, M., solicitud de patente Europea 0171496; Morrison et al., solicitud de patente Europea 0173494; Neuberger et al. publicación internacional PCT No. WO 86/01533; Cabilly et al. patente de Estados Unidos No. 4.816.567; Cabilly et al. solicitud de patente Europea 0125023; Better et al., Science 240:1041 1043, 1988; Liu et al., PNAS 84:3439 3443, 1987; Liu et al., J. Immunol. 139:3521 3526, 1987; Sun et al. PNAS 84:214 218, 1987; Nishimura et al., Canc. Res. 47:999 1005, 1987; Wood et al., Nature 314:446 449, 1985; y Shaw et al., J. Natl. Cancer Inst. 80:1553 1559, 1988); Morrison, S. L., Science 229:1202 1207, 1985; Oi et al., BioTechniques 4:214, 1986; patente de estados Unidos No. 5.225.539; Jones et al., Nature 321:552 525, 1986; Verhoeyan et al., Science 239:1534, 1988; y Beidler et al., J. Immunol. 141:4053 4060, 1988.

En relación con los anticuerpos sintéticos y semisintéticos, dichos términos pretender incluir, pero sin limitación, fragmentos de anticuerpos, anticuerpos con cambio de isotipo, anticuerpos humanizados (por ejemplo, de ratón y ser humano, de ser humano y de ratón), híbridos, anticuerpos que tienen muchas especificidades y moléculas similares a anticuerpos totalmente sintéticas.

Para aplicaciones terapéuticas, los anticuerpos monoclonales "humanos" que tienen regiones constantes y variables humanas a menudo se prefieren para minimizar la respuesta inmunitaria de un paciente contra el anticuerpo. Dichos anticuerpos pueden generarse inmunizando animales transgénicos que contienen genes de inmunoglobulina humana. véase Jakobovits et al. Ann NY Acad Sci 764:525-535 (1995).

También pueden prepararse anticuerpos monoclonales humanos contra polipéptidos de hélice K-13 construyendo una biblioteca combinatoria de inmunoglobulinas, como una biblioteca de presentación de fagos Fab o una biblioteca de presentación de fagos scFv, utilizando los ADNc de cadena ligera y cadena pesada de inmunoglobulina preparados a partir de ARNm procedente de linfocitos de un sujeto. Véanse, por ejemplo, McCafferty et al., publicación PCT WO 92/01047; Marks et al. (1991) J. Mol. Biol. 222:581 597; y Griffiths et al. (1993) EMBO J 12:725 734. Además, una biblioteca combinatoria de regiones variables de anticuerpo puede generarse mediante la mutación de un anticuerpo humano conocido. Por ejemplo, una región variable de un anticuerpo humano que se sabe que se une a la hélice K-13, puede mutarse, por ejemplo, utilizando oligonucleótidos mutagenizados alterados al azar, para generar una biblioteca de regiones variables mutadas que después puede explorarse con respecto a su unión con una hélice K-13. Métodos para inducir mutagénesis aleatoria en las regiones CDR de las cadenas pesada y/o ligera de inmunoglobina, métodos para cruzar las cadenas pesada y ligera aleatorizadas para formar emparejamientos y métodos de exploración, pueden encontrarse, por ejemplo, en Barbas et al. publicación PCT WO 96/07754; Barbas et al. (1992) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 89:4457 4461.

Para formar una biblioteca de presentación de anticuerpos, una población de paquetes de presentación, preferentemente procedente de fagos filamentosos, puede expresar una biblioteca de inmunoglobulina. Pueden encontrarse ejemplos de métodos y reactivos particularmente susceptibles de utilizarse para generar una biblioteca de presentación de anticuerpos, por ejemplo, en Ladner et al., patente de Estados Unidos No. 5,223,409; Kang et al., publicación PCT WO 92/18619; Dower et al., publicación PCT WO 91/17271; Winter et al., publicación PCT WO 92/20791; Markland et al., publicación PCT WO 92/15679; Breitling et al., publicación PCT WO 93/01288; McCafferty et al., publicación PCT WO 92/01047; Garrard et al., publicación PCT WO 92/09690; Ladner et al., publicación PCT WO 90/02809; Fuchs et al. (1991) Bio/Technology 9:1370 1372; Hay et al. (1992) Hum Antibod Hybridomas 3:81 85; Huse et al. (1989) Science 246:1275 1281; Griffiths et al. (1993) citado anteriormente; Hawkins et al. (1992) J Mol Biol 226:889 896; Clackson et al. (1991) Nature 352:624 628; Gram et al. (1992) PNAS 89:3576 3580; Garrard et al. (1991) Bio/Technology 9:1373 1377; Hoogenboom et al. (1991) Nuc Acid Res 19:4133 4137; y en Barbas et al. (1991) PNAS 88:7978 7982. Una vez presentado en la superficie de un paquete de presentación (por ejemplo, fago filamentosos), la biblioteca de anticuerpos se explora para identificar y aislar paquetes que expresan un anticuerpo que se une a un polipéptido de hélice K-13. En una realización preferida, la exploración primaria de la biblioteca implica la selección con un polipéptido de hélice K-13 inmovilizado y se seleccionan paquetes de presentación que expresan anticuerpos que se unen al polipéptido de hélice K-13 inmovilizado.

En una realización preferida, el método comprende detectar una infección causada por un parásito del género *Plasmodium*. Adicionalmente, el método puede comprender determinar si el parásito del género *Plasmodium* tiene una secuencia de proteína o de ácido nucleico de hélice K-13 de tipo silvestre o mutante.

5 Métodos de tratamiento de una infección causada por un parásito del género *Plasmodium*

La invención incluye métodos para tratar una infección causada por un parásito del género *Plasmodium*. En una realización, el método comprende determinar si un paciente está infectado con un parásito del género *Plasmodium* que contiene una secuencia de ácido nucleico o proteína de hélice K-13 de tipo silvestre o mutante y ajustar el tratamiento antiparasitario en función de si el paciente está infectado con un parásito del género *Plasmodium* que contiene una hélice K-13 de tipo silvestre o mutante.

En una realización preferida, si el paciente está infectado con un parásito del género *Plasmodium* que contiene una hélice K-13 de tipo silvestre, el paciente se trata con un derivado de artemisinina.

En una realización preferida, si el paciente está infectado con un parásito del género *Plasmodium* que contiene una hélice K-13 mutante, el paciente se trata con un tratamiento antiparasitario sin artemisinina, preferentemente con un fármaco antipalúdico seleccionado entre quinina, cloroquinina y mefloquina.

En otra realización, si el paciente está infectado con un parásito del género *Plasmodium* que contiene una hélice K-13 mutante, el paciente se trata con un derivado de artemisinina durante un período de tiempo más largo que el que se suele utilizar habitualmente.

Adicionalmente, la divulgación también se refiere a derivados de artemisinina para su uso en el tratamiento de pacientes infectados con un parásito del género *Plasmodium* que tiene una hélice K-13 de tipo silvestre, en donde en una muestra biológica previamente obtenida de dicho paciente, se realiza una etapa de detección *in vitro* si el parásito del género *Plasmodium* contiene una hélice K-13 de tipo silvestre.

Adicionalmente, la invención se refiere a un derivado de artemisinina para su uso en el tratamiento de pacientes infectados con un parásito del género *Plasmodium* que tiene una hélice K-13 mutada, en donde en una muestra biológica previamente obtenida de dicho paciente, se realiza una etapa de detección *in vitro* si el parásito del género *Plasmodium* contiene una hélice K-13 mutada y en donde el régimen de administración y/o las dosis administradas de artemisinina se extienden a lo largo del tiempo y/o las dosis son más altas con respecto al régimen, respectivamente, dosis aplicadas a la infección por un parásito del género *Plasmodium* que contiene una hélice K-13 de tipo silvestre.

La invención se refiere además a la quinina, a la cloroquinina o a la mefloquina, para su uso en el tratamiento de pacientes infectados con un parásito del género *Plasmodium* que tiene una hélice K-13 mutada, en donde en una muestra biológica previamente obtenida de dicho paciente, se realiza una etapa de detección *in vitro* si el parásito del género *Plasmodium* contiene una hélice K-13 mutada.

Por consiguiente, la utilización de dichos fármacos según el perfil de la infección incluye primero la etapa de detectar y genotipificar la infección causada por un parásito del género *Plasmodium* según lo dispuesto en la presente invención conforme a las diversas realizaciones, para determinar si el parásito del género *Plasmodium* lleva una hélice K-13 de tipo silvestre o en cambio una hélice K-13 mutada.

45 Kits para genotipificar un parásito del género *Plasmodium*

La invención incluye kits para genotipificar un parásito del género *Plasmodium* o para detectar una infección causada por un parásito del género *Plasmodium*. Preferentemente, el kit contiene cebadores para la amplificación de un ácido nucleico de hélice K-13. El kit puede contener reactivos para la detección del producto amplificado. El kit puede contener cualquier cebador o cualquier combinación de cebadores expuesta en el presente documento. El kit puede contener al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 o más de los cebadores expuestos en el presente documento. En una realización, el kit comprende al menos un par de cebadores que se hibridan específicamente con el ácido nucleico de hélice K13 a una distancia que varía de 100 a 300 pb. En una realización preferida del kit, el al menos un par de cebadores que se hibridan específicamente con el ácido nucleico de hélice K13 a una distancia que varía de 100 a 300 pb, rodea a al menos un polimorfismo mononucleotídico (SNP).

Preferentemente, el kit contiene una sonda para detectar un ácido nucleico de hélice K-13, particularmente un ácido nucleico de hélice K-13 amplificado. Preferentemente, la sonda está marcada con un marcador fluorescente o enzimático.

En una realización, el kit detecta específicamente un ácido nucleico de hélice K-13 mutante, particularmente uno que codifica un alelo Y493H, R539T, I543T o C580Y. En una realización, el kit detecta específicamente un ácido nucleico de hélice K-13 de tipo silvestre.

En una realización preferida, el kit comprende al menos uno de los siguientes cebadores:

ES 2 720 728 T3

5 5'-cggagtgaccaaactgggga-3' (SEQ ID NO:9);
5'-gggaatctggtgtaacagc-3' (SEQ ID NO:10);
5'-cgccagcattgtgactaat-3' (SEQ ID NO:11); y
5'-gccgaagtagtagcgagaat-3' (SEQ ID NO:12).
5'-gccaagctgccattcatttg -3' (SEQ ID NO:13); y
5'-gcctgttgaaagaagcaga -3' (SEQ ID NO:14).

10 En algunas realizaciones, el kit detecta un ácido nucleico de hélice K13 mutante que codifica un alelo F446I, N458Y, C469Y, Y493H, K503N, R539T, I543T, P553L, P574L, A578S, C580Y y D584V.

15 En algunas realizaciones, el kit detecta un ácido nucleico de hélice K13 mutante que codifica un alelo F446I, G449A, N458Y, C469Y, W470finalizador, A481V, Y493H, K503N, S522C, V534A, R539T, I543T, G548D, P553L, V555A, A557S, R561H, K563R, V568G, P574L, A578S, C580Y, F583L, D584V, V589I, Q613E y D641G.

En algunas realizaciones, el kit comprende al menos uno de los siguientes pares de cebadores:

Par PCR1:

20 5' AGGTGGATTTGATGGTGTAGAAT 3' (directo) (SEQ ID NO:15)
5' CATACACCTCAGTTTCAAATAAAGC 3' (inverso) (SEQ ID NO:16)

Par PCR2:

25 5' AATTTCTTATACGTTTTTGGTGGTAA 3' (directo) (SEQ ID NO:17)
5' CTCTACCCATGCTTTCATACGAT 3' (inverso) (SEQ ID NO:18)

Par PCR3

30 5' GGATATGATGGCTCTTCTATTATACCG 3' (directo) (SEQ ID NO:19)
5' ACTTCAATAGAATTTAATCTCTCACCA 3' (inverso) (SEQ ID NO:20)

Par PCR4

35 5' ATGTCATTGGTGGAACCTAATGGT 3' (directo) (SEQ ID NO:21)
5' TTAATGGTTGATATTGTTCAACG 3' (inverso) (SEQ ID NO:22)

Par PCR5

40 5' TTCAGGAGCAGCTTTTAATTACC 3' (directo) (SEQ ID NO:23)
5' CTGGTGAAAAGAAATGACATGAA 3' (inverso) (SEQ ID NO:24)

Par PCR6

45 5' CCTTGTTGAAAGAAGCAGAATTT 3' (directo) (SEQ ID NO:25)
5' ATTCAATACAGCACTTCCAAAATAA 3' (inverso) (SEQ ID NO:26). En algunas realizaciones, el kit comprende al menos una sonda que se hibrida con uno de los siguientes SNP:

- F446I ttt/att
- G449A ggt/gct
- N458Y aat/tat
- C469Y tgc/tac
- W470finalizador tgg/tga
- A481V gct/gtt
- Y493H tac/cac
- K503N aag/aat
- S522C agt/tgt
- V534A gtt/gct
- R539T aga/aca
- I543T att/act
- G548D ggc/gac
- P553L ccg/ctg

- V555A gta/gca
- A557S gca/tca
- R561H cgt/cat
- K563R aaa/aga
- V568G gtg/ggg
- P574L cct/ctt
- A578S gct/tct
- C580Y tgt/tat
- F583L ttt/tta/g
- D584V gat/gtt
- V589I gtc/atc
- Q613E caa/gaa
- D641G gat/ggt.

Métodos de detección de nuevos fármacos antipalúdicos

5 La invención incluye métodos para explorar nuevos fármacos contra el paludismo, eficaces para el tratamiento de pacientes infectados por un parásito del género *Plasmodium* resistente a ART. En una realización, el método comprende las siguientes etapas:

- genotipificar un parásito del género *Plasmodium* en una muestra biológica de un paciente infectado por un parásito del género *Plasmodium* según la invención;
- 10 • medir la semivida de eliminación del parásito y/o las tasas de supervivencia del parásito del género *Plasmodium*, si el parásito del género *Plasmodium* que infecta al paciente tiene un alelo de hélice K13 mutante;
- poner en contacto el nuevo fármaco que se va a analizar con la muestra biológica, si el parásito del género *Plasmodium* que infecta al paciente tiene un alelo de hélice K13 mutante;
- 15 • medir la semivida de eliminación del parásito y/o la tasa de supervivencia del parásito del género *Plasmodium* en el RSA^{0-3h} después de la administración del fármaco;

20 seleccionar el fármaco como un fármaco antipalúdico eficaz para el tratamiento de pacientes infectados con un parásito del género *Plasmodium* resistente a ART, si la semivida de eliminación del parásito y/o las tasas de supervivencia del parásito del género *Plasmodium* disminuyen después de la administración del fármaco.

En otra realización, el método comprende además administrar al paciente el fármaco que se va a analizar, si el parásito del género *Plasmodium* que infecta al paciente tiene un alelo de hélice K13 mutante.

25

Tabla 1

Gen diana	Secuencia del cebador directo	Secuencia del cebador inverso
PF3D7_0110400	5'-ttgagcttctttcccaataatggc-3'	5'-tgatatatgtttgtaggagctgtgag-3'
PF3D7_0213400	5'-gtgaaaaggataataaattctatgcc-3'	5'-tatctaccatataattctgattctcc-3'
PF3D7_1115700	5'-agcaagaacgtttgtgtaaa-3'	5'-gaattcttaatggtttgaagat-3'
PF3D7_1302100	5'-taatatgtaaagtgattatgtatcgc-3'	5'-atgctagagaagttaagagaagaagcg-3'
PF3D7_1343700	5'-agaagagccatcatatcccc-3'	5'-agtggaagacatcatgtaaccag-3'
PF3D7_1459600	5'-atatgagtaaaatgcaggtttgg-3'	5'-tgctgtgtgattcatgggg-3'
PF3D7_1464500	5'-aaatagttggcgtagctcag-3'	5'-tatacaattaagtgatcacaacg-3'

Tabla 2

ID Gen (Plasmodb 9.1)	Explicación	Cromosoma/posición mutada	Posición del nucleótido en la secuencia codificante	Codón F32- TEM#	Codón de linaje F32-ART5					
					Día 0	Ciclo de presión farmacológica n°				Codón mutante
					ART* 0,2 µM	ART* 1,8 µM	ART* 9 µM	ART* 9 µM	120	
PF3D7_0110400	supuesta subunidad RFB9 del complejo ARN polimerasa 2 dirigida por ADN	01/39452	173	gAt	gAt	gTg	gTg	gTg	gTg	D56V
PF3D7_1343700 ^a	proteína kelch, supuesta, denominada en este documento 'K13'	13/1725570	1428	atG	atG	atA	atA	atA	atA	M476I
PF3D7_0213400	proteína cinasa 7 (PK7)	02/542625 02/542627	310 312	GaA	GaA	GaA	GaA	GaA	TaG	E104finalizador
PF3D7_1115700	cisteína proteasa falcipaina 2a	11/593378	206	tCa	tCa	tCa	tCa	tCa	tGa	S69finalizador
PF3D7_1302100	antígeno de gameto 27/25 (Pfg27)	13/121689	601	Cca	Cca	Cca	Cca	Cca	Aca	P201T
PF3D7_1459600 ^a	proteína conservada de un parásito del género <i>Plasmodium</i> , función desconocida	14/2442240	896	aGt	aGt	aGt	aGt	aGt	aCt	S299T
PF3D7_1464500	proteína de membrana conservada de un parásito del género <i>Plasmodium</i> , función desconocida	14/2612177	4886	aAt	aAt	aAt	aAt	aAt	aGt	N1629S

secuencia de tipo 3D7; también se observa la misma secuencia de codones en la línea parental F32-Tanzania.

^aDosis de artemisinina (ART) utilizada para la selección durante el ciclo de presión farmacológica correspondiente.

^a genes encontrados en la localización cromosómica de las firmas de selección mejor clasificadas en Takala-Harrison et al.¹⁶

Tabla 3

5	<p>PF3D7_0110400 (PFA0505c) es un gen de dos exones que codifica la subunidad 9 de la ARN polimerasa II (RPB9), una subunidad pequeña integral Pol II, que está muy conservada entre los organismos eucariotas. Se ha observado que el ortólogo de levadura RPB9 tiene un papel garantizando la fidelidad de la transcripción <i>in vivo</i>. La delección de los resultados genéticos da lugar a transcripción propensa a errores⁵². La proteína tiene un dominio en cinta de zinc previsto similar al dominio en cinta de zinc de TFIIIS (factor de alargamiento de la ARN polimerasa II) que contiene el dipéptido Asp-Glu catalítico esencial⁵³. Se sabe muy poco acerca de la proteína en parásitos del género <i>Plasmodium</i>, aunque el gen se expresa y la proteína está presente en los parásitos en fase hemática (www.plasmodb.org). Es difícil hacer una predicción sobre las posibles consecuencias fenotípicas de la mutación D56V, que se localiza en un</p>
10	<p>dominio bien conservado específico de parásitos del género <i>Plasmodium</i>. PF3D7_1343700 (PF13_0238) es un gen de un exón (denominado K13 en el presente documento) que codifica una supuesta proteína kelch. K13 tiene una estructura prevista de 3 dominios, con un dominio N-terminal bien conservado, con una longitud de aproximadamente 225 restos, específico del género <i>Plasmodium</i>, seguido de un dominio BTB/POZ y un dominio de hélice C-terminal de 6 palas formado a partir de motivos kelch canónicos^{43,48}. Se sabe poco sobre la proteína en los parásitos del paludismo. Los datos de proteómica indican que se produce por las fases hemáticas asexuales (merozoítos, anillos, trofozoítos y esquizontes) y sexuales (gametocitos) de parásitos de la especie <i>P. falciparum</i>, y que posee restos fosforilados en el dominio N-terminal específico del género <i>Plasmodium</i> (www.plasmodb.org). La mutación M476I se localiza entre la primera y la segunda pala del dominio de la hélice.</p>
15	<p>PF3D7_0213400 (PFB0605w) es un gen de cuatro exones que codifica la proteína quinasa 7 (PK7) expresada en parásitos asexuales en fase hemática, gametocitos y oocinetos. La mutación de finalización E104 (dos SNP que afectan al mismo codón) observada en F32-ART5, interrumpe el gen dando como resultado un supuesto producto de traducción truncado que carece de más de 2/3 de su secuencia. Los estudios con parásitos 3D7 inactivados genéticamente han mostrado que los parásitos PK7-KO de <i>P. falciparum</i> tienen un defecto de crecimiento asexual debido a un número reducido de merozoítos por esquizonte⁵⁴. Adicionalmente, PK7 es importante para la transmisión de mosquitos, con un número colapsado de oocinetos en PK7-KO de <i>P. falciparum</i>⁵⁴ y en PK7-KO de <i>P. berghei</i>, donde no se forman esporoblastos y, por consiguiente, no se forman esporozoítos⁵⁵. Es poco probable que este fenotipo defectuoso en cuanto a transmisión sobreviva en el campo.</p>
20	<p>PF3D7_1115700 (PF11_0165) es un gen de un exón que codifica la falcipaina 2a, una cisteína proteasa producida por la maduración de parásitos en fase hemática (trofozoítos y esquizontes) e implicada en la degradación de la hemoglobina⁵⁶. La mutación de finalización S69 localizada en la región pro-enzima, impide la expresión de una enzima activa por parásitos F32-ART5. La inactivación de genes ha mostrado que induce una reducción transitoria de la degradación de la hemoglobina compensada por la expresión de otros miembros de la familia de las cisteína proteasas, con impacto mínimo en la tasa de crecimiento^{57,58}. Sin embargo, el gen <i>de falcipaina 2a</i> es el único gen del listado de siete locus afectados, que se ha asociado con la respuesta <i>in vitro</i> a la artemisinina. De hecho, se ha</p>
25	<p>mostrado de manera convincente que la inhibición de la digestión de hemoglobina dependiente de falcipaina 2a por inhibidores específicos o por inactivación de genes reduce la susceptibilidad de los parásitos a las artemisininas¹⁹. Asimismo, las fases de anillo de tipo silvestre 3D7 que no digieren masivamente la hemoglobina presentan una susceptibilidad reducida a las artemisininas⁵⁹. PF3D7_1302100 (PF13_0011) es un gen de un exón que codifica el antígeno de gameto 27/25 (Pfg27) producido al inicio de la gametocitogénesis. El gen es específico de <i>P. falciparum</i> y de sus parientes cercanos, tales como <i>P. reichenowi</i>. Es una abundante proteína citoplasmática fosforilada dimerica que se une al ARN. Las diversas líneas KO generadas presentan fenotipos conflictivos con algunas líneas pfg27KO 3D7 deficientes en gametocitogénesis⁶⁰ mientras que otras líneas 3D7 defectuosas con Pfg27 experimentan una gametocitogénesis inalterada hasta gametocitos en fase V madura y posteriormente producen oquistes, aunque la ausencia de Pfg27 se asocia con anomalías en la arquitectura intracelular de los gametocitos⁶¹. La estructura cristalina muestra que la proteína forma un dímero, presenta un plegamiento de unión a ARN particular y posee dos motivos Pro-X-X-Pro (ligandos conocidos para varios dominios, incluidos los módulos SH3), que se combinan para formar un receptáculo para los módulos SH3⁶². La mutación P201T se localiza en el motivo C-terminal Pro-X-X-Pro y se predice que alterará la estructura espacial del dominio de interacción y, por lo tanto, tendrá consecuencias funcionales.</p>
30	<p>PF3D7_1459600 (PF14_0569) es un gen de dos exones que codifica una proteína conservada, de función desconocida, de 806 restos de longitud. El ortólogo de <i>P. yoelli</i> ha sido anotado como la subunidad B de unión al ADN de la caja CAAT. Los ortólogos cercanos solo pueden encontrarse entre las especies del género <i>Plasmodium</i>. Los datos de proteómica indican que la proteína está presente en las fases hemáticas asexuales (merozoítos, anillos, trofozoítos y esquizontes) y sexuales (gametocitos) de parásitos de la especie <i>P. falciparum</i>. Un dominio Interpro previsto de 130 restos de longitud sugiere la presencia de un pliegue VHS estructural N-terminal, multi-helicoidal, con 2 capas alfa-alfa, posiblemente implicado en el tránsito de la membrana intracelular. El resto de la secuencia codificante no tiene firma de dominio específica. La mutación S299T se localiza en la región "desconocida".</p>
35	<p>PF3D7_1464500 (PF14_0603) es un gen de cinco exones que codifica una proteína de función desconocida de 3251 restos de longitud, con 4 dominios trans-membrana previstos, pero por lo demás sin firma de dominio específica. Aparte de los datos de proteómica que indican su expresión y fosforilación en esquizontes, con posible expresión en gametocitos y también en esporozoítos, se sabe poco acerca de su supuesta función. La mutación N1629S se localiza en el centro de la proteína, con un impacto fenotípico impredecible.</p>
40	
45	
50	
55	
60	

Tabla 4

Región	Provincia	Año de recogida								Total
		2001-2002	2003-2004	2005-2006	2007-2008	2009-2010	2011-2012			
Camboya occidental	Battambang	64	0	0	0	0	0	0	71	135
	Pailin	40	43	46	95	66	84			374
	Pursat	0	10	0	0	43	19			72
Sur de Camboya	Kampot	0	0	0	0	0	12			12
	Kampong Som	0	0	0	0	0	7			7
Norte de Camboya	Oddar Meanchey	0	0	0	0	0	33			33
	Preah Vihear	27	27	25	24	0	19			122
		15	0	0	0	0	17			32
Camboya oriental	Kratie	0	0	0	0	0	3			3
	Mondulkiri	56	30	22	0	8	35			151
	Ratanakiri									
Total		202	110	93	119	117	300			941

Tabla 5

Posición del codón	Referencia de aminoácido	Referencia de nucleótido	Mutación de aminoácido	Mutación de nucleótido
449	G	ggt	A	gct
458	N	aat	Y	tat
474	T	aca	I	aca
476*	H	atg	I	ata
481	A	gct	V	gtt
493	Y	tac	H	tac
508	T	act	N	act
527	P	cct	T	act
533	G	ggt	S	agt
537	N	aat	I	att
539	R	aga	T	aca
543	I	att	T	act
553	P	ccg	L	ctg
561	R	cgt	H	cat
568	V	gtg	G	ggg
574	P	cct	L	ctt
580	C	tgt	Y	tat
584	D	gat	V	gtt
612**	E	gaa	D	gat
623	S	agt	C	tgt

* observados en F32-ART5, no observados en Camboya

** comunicados en Gambia (ref. 44), no observados en Camboya

Grupo KH	Provincia	Mutaciones en la hélice K13				Total
		Tipo silvestre	C580Y	R539T	Y493H	
KH1	Pursat	7	0	0	2	9
	Ratanakiri	46	0	0	0	46
KH2	Pursat	0	25	0	1	26
	Ratanakiri	0	0	0	0	0
KH3	Pursat	3	7	4	0	14
	Ratanakiri	0	0	0	0	0
KH4	Pursat	0	0	0	12	12
	Ratanakiri	0	0	0	0	0
KHA	Pursat	15	19	2	6	42
	Ratanakiri	1	0	0	0	1
Total		72	51	6	21	150

Tabla 6

Tabla 7

Mut	SNP	ÁFRICA		ASIA		Total	
446	F446I		0,0 %	42	5,4 %	4,8 %	
449	G449A	1	1,00 %	1	0,13 %	0,23 %	
458	N458Y		0,0 %	7	0,9 %	0,8 %	
469	C469Y		0,0 %	4	0,5 %	0,5 %	
470	W470FINALIZADOR	1	1,00 %	1	0,13 %	0,23 %	

5

ES 2 720 728 T3

(continuación)

Mut	SNP	ÁFRICA		ASIA		Total	
481	A481V			1	0,13 %	0,20 %	Detectado en Sudamérica (N=1)
493	Y493H	1	1,1 %	32	4,1 %	3,8 %	
503	K503N		0,0 %	4	0,5 %	0,5 %	
522	S522C	5	5,3 %		0,0 %	0,6 %	
534	V534A	3	3,2 %		0,0 %	0,3 %	
539	R539T		0,0 %	35	4,5 %	4,0 %	
543	I543T		0,0 %	8	1,0 %	0,9 %	
548	G548D	2	2,1 %		0,0 %	0,2 %	
553	P553L		0,0 %	15	1,9 %	1,7 %	
555	V555A	3	3,2 %		0,0 %	0,3 %	
557	A557S	2	2,1 %		0,0 %	0,2 %	
561	RS61H	1	1,00 %	1	0,13 %	0,23 %	
563	K563R	2	2,1 %		0,0 %	0,2 %	
568	V568G			2	0,26 %	0,26 %	
574	P574L		0,0 %	11	1,4 %	1,3 %	
578	A578S	21	22,1 %	1	0,1 %	2,5 %	
580	C580Y	1	1,1 %	591	75,9 %	67,7 %	
583	F583L	2	2,1 %		0,0 %	0,2 %	
584	D584V		0,0 %	3	0,4 %	0,3 %	
589	V589I	2	2,1 %		0,0 %	0,2 %	
613	Q613E	2	2,1 %		0,0 %	0,2 %	
641	D641G	2	2,1 %		0,0 %	0,2 %	

Tabla 8A

Año	ID de aislado	Lugar de muestreo (provincia)	Secuencia hologenómica a	RSA ^{o-3h} b	PF3D7_1104010	PF3D7_1104011	PF3D7_1104012	PF3D7_1115700	PF3D7_13_P3D7_1459600_02100
N/D	3D7	N/D	Si	0,04	TS	TS	TS		TS
2011	4903	Rattanakiri	Si	58	TS	I543T	TS	15H/51I/59F/255R/257E/343P/345G/414E	TS
2011	5019	Oddar	Si	11,6	TS	C580Y	TS	228T/255R/257E/343P/345G/414E	TS
2011	5268	Meanchey	Si	27,2	TS	C580Y	TS	15H/51I/59F/255R/257E/353T/393I/400P/414E	TS
2010	3445	Pursat	Si	27,3	TS	C580Y	TS	15H/51I/59F/255R/257E/343P/345G/414E	TS
2011	4024	Pailin	Si	11,3	TS	C580Y	TS	228T/255R/257E/343P/345G	TS
2010	3630	Oddar	Si	0,2	TS	C580Y	TS	228T/255R/257E/343P/345G	TS
2010	3504	Pailin	Si	28,9	TS	R539T	TS	15H/51I/59F/197K/204K/255R/257E/343P/345G/414E	TS
2011	4507	Oddar	Si	5,8	TS	R539T	TS	228T/255R/257E/343P/345G/414E	TS
2011	4685	Meanchey	Si	31,3	TS	R539T	TS	228T/255R/257E/343P/345G/414E	TS
2011	4763	Oddar	Si	24,2	TS	R539T	TS	228T/255R/257E/343P/345G/414E	TS
2011	5333	Meanchey	Si	23,1	TS	C580Y	TS	228T/255R/257E/343P/345G	TS
2011	5457	Kratie	Si	13,5	TS	C580Y	TS	228T/255R/257E/343P/345G	TS
2011	5529	Kratie	Si	14,7	TS	C580Y	TS	228T/255R/257E/343P/345G	TS
2011	5540	Kratie	Si	13,6	TS	C580Y	TS	228T/255R/257E/343P/345G	TS
2011	5560	Kratie	Si	3,8	TS	C580Y	TS	228T/255R/257E/343P/345G	TS
2011	5693	Kratie	Si	7,5	TS	C580Y	TS	228T/255R/257E/343P/345G	TS
2010	3629	Pailin	Si	19,2	TS	C580Y	TS	228T/255R/257E/343P/345G	TS
2011	5680	Battambang	Si	12,6	TS	C580Y	TS	228T/255R/257E/343P/345G	TS
2011	5131	Pursat	Si	6,9	TS	C580Y	TS	228T/255R/257E/343P/345G	TS
2011	5269	Pursat	Si	8,1	TS	C580Y	TS	228T/255R/257E/343P/345G	TS
2010	3670	Pailin	Si	19,2	TS	C580Y	TS	15H/51I/59F/255R/257E/353T/393I/400P/414E	TS
1992	K1992	Pailin	Si	N/D	TS	TS	TS	15H/51I/59F/255R/257E/393I/400P/414E	TS
1978	89F5	Uganda	Si	N/D	TS	TS	TS	15H/51I/59F/255R/257E/343P/345G/414E	TS
2011	5188	Rattanakiri	No	0,09	N/D	TS	N/D		N/D
2011	4749	Oddar	No	0,15	N/D	TS	N/D		N/D
2011	5150	Meanchey	No	0,16	N/D	TS	N/D		N/D
2012	6138	Rattanakiri	No	0,24	N/D	TS	N/D		N/D
2011	5211	Pailin	No	0,5	N/D	TS	N/D		N/D
2011	4208	Mondolkiri	No	0,51	N/D	TS	N/D		N/D
2010	3663	Kampong Som	No	0,1	N/D	TS	N/D		N/D

(continuación)

Año	ID de aislado	Lugar de muestreo (provincia)	Secuencia hologenómica ^a	RSAC ^{b-3h} _b	PF3D7 ₀ 110400 ₁	PF3D7 ₁ 343700 ₁	PF3D7 ₀ 213400 ₁	PF3D7_1115700	PF3D7 13_PF3D7 1459600 02100
2011	4248	Pailin	No	13,5	N/D	C580Y	N/D	15H/255R/257E/343P/345G/414E	N/D
2010	3601	Pailin	No	14,9	N/D	R539T	N/D	15H/51/59F/197K/204K/255R/257E/343P/345G/414E	N/D
2011	4914	Rattanakiri	No	0,06	N/D	TS	N/D	15H/51/59F/228T/255R/257E/343P/345G/414E	N/D

ES 2 720 728 T3

Tabla 8B

PF3D7_1464500											
TS											
11N/479N/483N/490Y/768V/779D/1271N/2322Q/2399G/2418T/2571N/2825I											
11N/479N/483N/490Y/768V/779D/1271N/2322Q/2399G/2418T/2571N/2825I											
11N/179N/479N/483N/490Y/768V/779D/1271N/2322Q/2399G/2418T/2571N/2825I											
11N/179N/479N/483N/768V/779D/1271N/2322Q/2399G/2418T/2571N/2825I											
81H/179N/1271N/1650Y/1939D/1940D/1943D/1944D/2418T/2571N/2954R											
479N/483N/490Y/1271N/1373R/1939D/1940D/1943D/1944D/2322Q/2418T/2571N/2825I											
179N/479N/1271N/1705L/1939D/1940D/1943D/1944D/2418T/2571N/2617N/2637G											
179N/479N/1271N/1705L/1939D/1940D/1943D/1944D/2418T/2571N/2617N/2637G											
179N/479N/1271N/1705L/1939D/1940D/1943D/1944D/2418T/2571N/2617N/2637G											
179N/479N/1271N/1705L/1939D/1940D/1943D/1944D/2418T/2571N/2617N/2637G											
179N/479N/1271N/1705L/1939D/1940D/1943D/1944D/2418T/2571N/2617N/2637G											
179N/479N/1271N/1705L/1939D/1940D/1943D/1944D/2418T/2571N/2617N/2637G											
179N/479N/1271N/1705L/1939D/1940D/1943D/1944D/2418T/2571N/2617N/2637G											
179N/479N/1271N/1705L/1939D/1940D/1943D/1944D/2418T/2571N/2617N/2637G											
179N/479N/1271N/1705L/1939D/1940D/1943D/1944D/2418T/2571N/2617N/2637G											
179N/479N/1271N/1705L/1939D/1940D/1943D/1944D/2418T/2571N/2617N/2637G											
179N/479N/483N/1271N/1472Q/1519L/1939D/1940D/1943D/1944D/2571N											
179N/479N/483N/1271N/1472Q/1519L/1939D/1940D/1943D/1944D/2571N											
179N/479N/483N/490Y/1271N/1472Q/1519L/1939D/1940D/1943D/1944D/2571N											
179N/479N/483N/490Y/1271N/1472Q/1519L/1939D/1940D/1943D/1944D/2571N											
479N/483N/1271N/1280N/1284N/1286D/1928N/1930D/1931E/1932H/1942D/2418T/2571N/2637G/2825I											
11N/479N/483N/768V/779D/785N/1271N/1277D/2397G/2418T/2571N/2825I											
479N/483N/490Y/1271N/1277D/1472Q/1939D/1940D/2288H/2571N/2594I/3206I											
N/D											
N/D											
N/D											
N/D											
N/D											
N/D											
N/D											
N/D											
N/D											
N/D											
N/D											

Tabla 8C

2012	5207	Rattanakiri	No	0,15	N/D	TS	N/D	15H/51I/59F/255R/2 57E/343P/345G/414 E	N/D	N/D	N/D
2011	4974	Rattanakiri	No	0,18	N/D	TS	N/D	15H/51I/59F/255R/2 57E/343P/345G/414 E	N/D	N/D	N/D
2011	4880	Rattanakiri	No	0,21	N/D	TS	N/D	15H/51I/59F/255R/2 57E/343P/345G/414 E	N/D	N/D	N/D
2010	3592	Rattanakiri	No	0,32	N/D	TS	N/D	15H/51I/59F/255R/2 57E/343P/345G/414 E	N/D	N/D	N/D
2011	4971	Pailin	No	18,3	N/D	C580Y	N/D	15H/51I/59F/255R/2 57E/343P/345G/414 E	N/D	N/D	N/D
2010	3815	Pailin	No	23,6	N/D	C580Y	N/D	15H/51I/59F/255R/2 57E/393I/400P/414E	N/D	N/D	N/D
2011	5152	Rattanakiri	No	0,08	N/D	TS	N/D	15H/51I/59F/255R/2 57E/414E	N/D	N/D	N/D

(continuación)

2011	5055	Rattanakiri	No	0,12	N/D	TS	N/D	15H/51I/59F/255R/2 57E/414E	N/D	N/D	N/D
2011	5159	Rattanakiri	No	0,26	N/D	TS	N/D	15H/51I/59F/255R/2 57E/414E	N/D	N/D	N/D
2011	5208	Pailin	No	5,5	N/D	C580Y	N/D	228T/255R/257E/34 3P/345G	N/D	N/D	N/D
2011	5100	Pailin	No	8,6	N/D	C580Y	N/D	228T/255R/257E/34 3P/345G	N/D	N/D	N/D
2011	5035	Pailin	No	12,9	N/D	C580Y	N/D	228T/255R/257E/34 3P/345G	N/D	N/D	N/D
2011	5145	Pailin	No	18,9	N/D	C580Y	N/D	228T/255R/257E/34 3P/345G	N/D	N/D	N/D
2011	5168	Pailin	No	18,9	N/D	C580Y	N/D	228T/255R/257E/34 3P/345G	N/D	N/D	N/D
2011	4970	Pailin	No	19,6	N/D	C580Y	N/D	228T/255R/257E/34 3P/345G	N/D	N/D	N/D
2011	4992	Pailin	No	21,3	N/D	C580Y	N/D	228T/255R/257E/34 3P/345G	N/D	N/D	N/D
2011	5160	Pailin	No	26,3	N/D	C580Y	N/D	228T/255R/257E/34 3P/345G	N/D	N/D	N/D
2010	1009	Pursat	No	51,4	N/D	Y493H	N/D	255R/257E/343P/34 5G	N/D	N/D	N/D

^a Si (analizado mediante secuencia hologenómica), No (analizado mediante secuenciación de Sanger)

^b las tasas de supervivencia RSA^{0-3h} son como se describe en la ref 15

TS: tipo silvestre (secuencia 3D7)

N/D: No disponible

Referencias

- 5 1. Dondorp, A. M. et al. Artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* malaria. *N Engl J Med* 361, 455-67 (2009).
2. World Health Organization. in WHO publications (ed. Press, W.) (2011-2013).
- 10 3. Mita, T. et al. Limited geographical origin and global spread of sulfadoxine-resistant dhps alleles in *Plasmodium falciparum* populations. *J Infect Dis* 204, 1980-8 (2011).
4. Roper, C. et al. Intercontinental spread of pyrimethamine-resistant malaria. *Science* 305, 1124 (2004).
- 15 5. Wootton, J. C. et al. Genetic diversity and chloroquine selective sweeps in *Plasmodium falciparum*. *Nature* 418, 320-3 (2002).
6. Amaratunga, C. et al. Artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* in Pursat province, western Cambodia: a parasite clearance rate study. *J Infect Dis* 206, 851-8 (2012).
- 20 7. Kyaw, M. P. et al. Reduced susceptibility of *Plasmodium falciparum* to artesunate in southern Myanmar. *PLoS One* 8, e57689 (2013).
8. Noedl, H. et al. Evidence of artemisinin-resistant malaria in western Cambodia. *N Engl J Med* 359, 2619-20 (2008).
- 25 9. Phyo, A. P. et al. Emergence of artemisinin-resistant malaria on the western border of Thailand: a longitudinal study. *Lancet* 379, 1960-6 (2012).
- 30 10. Tran, T. H. et al. *In vivo* susceptibility of *Plasmodium falciparum* to artesunate in Binh Phuoc Province, Vietnam. *Malar J* 11, 355 (2012).
11. Flegg, J. A., et al. Standardizing the measurement of parasite clearance in *falciparum* malaria: the parasite clearance estimator. *Malar J* 10, 339 (2011).
12. White, N. J. The parasite clearance curve. *Malar J* 10, 278 (2011).

13. Witkowski, B. et al. Novel phenotypic assays for the detection of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* malaria in Cambodia: in-vitro and ex-vivo drug-response studies. *Lancet Infect Dis* 13 (2013).
- 5 14. Cheeseman, I. H. et al. A major genome region underlying artemisinin resistance in malaria. *Science* 336, 79-82 (2012).
15. Miotto, O. et al. Multiple populations of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* in Cambodia. *Nat Genet* 45, 648-55 (2013).
- 10 16. Takala-Harrison, S. et al. Genetic loci associated with delayed clearance of *Plasmodium falciparum* following artemisinin treatment in Southeast Asia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 240-5 (2012).
- 15 17. Lopera-Mesa, T. M. et al. *Plasmodium falciparum* clearance rates in response to artesunate in Malian children with malaria: effect of acquired immunity. *J Infect Dis* 207, 1655-63 (2013).
18. Witkowski, B. et al. Increased tolerance to artemisinin in *Plasmodium falciparum* is mediated by a quiescence mechanism. *Antimicrob Agents Chemother* 54, 1872-7 (2010).
- 20 19. Klonis, N. et al. Artemisinin activity against *Plasmodium falciparum* requires hemoglobin uptake and digestion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 11405-10 (2011).
- 25 20. Vigan-Womas, I. et al. An *in vivo* and *in vitro* model of *Plasmodium falciparum* rosetting and autoagglutination mediated by varO, a group A var gene encoding a frequent serotype. *Infect Immun* 76(12): 5565-80(2008)
21. Cui, L. et al. Mechanisms of *in vitro* resistance to dihydroartemisinin in *Plasmodium falciparum*. *Mol Microbiol* 86, 111-28 (2012).
- 30 22. Leang, R. et al. Efficacy of dihydroartemisinin-piperaquine for treatment of uncomplicated *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* in Cambodia, 2008 a 2010. *Antimicrob Agents Chemother* 57, 818-26 (2012).
23. Sidhu, A. B. et al. Chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum* malaria parasites conferred by *pfcr*t mutations. *Science* 298, 210-3 (2002).
- 35 24. Valderramos, S. G. et al. Identification of a mutant PfCRT-mediated chloroquine tolerance phenotype in *Plasmodium falciparum*. *PLoS Pathog* 6, e1000887 (2010).
- 40 25. Bhisutthibhan, J. et al. The *Plasmodium falciparum* translationally controlled tumor protein homolog and its reaction with the antimalarial drug artemisinin. *J Biol Chem* 273, 16192-8 (1998).
26. Eichhorn, T. et al. Molecular interaction of artemisinin with translationally controlled tumor protein (TCTP) of *Plasmodium falciparum*. *Biochem Pharmacol* 85, 38-45 (2013).
- 45 27. Sanchez, C. P. et al. Polymorphisms within PfMDR1 alter the substrate specificity for anti-malarial drugs in *Plasmodium falciparum*. *Mol Microbiol* 70, 786-98 (2008).
28. Veiga, M. I. et al. Novel polymorphisms in *Plasmodium falciparum* ABC transporter genes are associated with major ACT antimalarial drug resistance. *PLoS One* 6, e20212 (2011).
- 50 29. Raj, D. K. et al. Disruption of a *Plasmodium falciparum* multidrug resistance-associated protein (PfMRP) alters its fitness and transport of antimalarial drugs and glutathione. *J Biol Chem* 284, 7687-96 (2009).
- 55 30. Anderson, T. J. et al. Are transporter genes other than the chloroquine resistance locus (*pfcr*t) and multidrug resistance gene (*pfmdr*) associated with antimalarial drug resistance? *Antimicrob Agents Chemother* 49, 2180-8 (2005).
31. Jambou, R. et al. Resistance of *Plasmodium falciparum* field isolates to in-vitro artemether and point mutations of the SERCA-type PfATPase6. *Lancet* 366, 1960-3 (2005).
- 60 32. Krishna, S. et al. Artemisinins and the biological basis for the PfATP6/SERCA hypothesis. *Trends Parasitol* 26, 517-23 (2010).
33. Hunt, P. et al. Gene encoding a deubiquitinating enzyme is mutated in artesunate- and chloroquine-resistant rodent malaria parasites. *Mol Microbiol* 65, 27-40 (2007).
- 65

34. Hunt, P. et al. Experimental evolution, genetic analysis and genome re-sequencing reveal the mutation conferring artemisinin resistance in an isogenic lineage of malaria parasites. *BMC Genomics* 11, 499 (2010).
- 5 35. Borges, S. et al. Genome-wide scan reveals amplification of *mdr1* as a common denominator of resistance to mefloquine, lumefantrine, and artemisinin in *Plasmodium chabaudi* malaria parasites. *Antimicrob Agents Chemother* 55, 4858-65 (2011).
- 10 36. Chavchich, M. et al. Role of *pfmdr1* amplification and expression in induction of resistance to artemisinin derivatives in *Plasmodium falciparum*. *Antimicrob Agents Chemother* 54, 2455-64 (2010).
- 15 37. Chen, N. et al. Deamplification of *pfmdr1*-containing amplicon on chromosome 5 in *Plasmodium falciparum* is associated with reduced resistance to artemisinin *in vitro*. *Antimicrob Agents Chemother* 54, 3395-401 (2010).
38. Picot, S. et al. A systematic review and meta-analysis of evidence for correlation between molecular markers of parasite resistance and treatment outcome in *falciparum* malaria. *Malar J* 8, 89 (2009).
- 20 39. Price, R. N. et al. Mefloquine resistance in *Plasmodium falciparum* and increased *pfmdr1* gene copy number. *Lancet* 364, 438-47 (2004).
- 40 40. Sidhu, A. B. et al. Decreasing *pfmdr1* copy number in *Plasmodium falciparum* malaria heightens susceptibility to mefloquine, lumefantrine, halofantrine, quinine, and artemisinin. *J Infect Dis* 194, 528-35 (2006).
- 25 41. Yuan, J. et al. Chemical genomic profiling for antimalarial therapies, response signatures, and molecular targets. *Science* 333, 724-9 (2011).
42. Amambua-Ngwa, A. et al. Population genomic scan for candidate signatures of balancing selection to guide antigen characterization in malaria parasites. *PLoS Genet* 8, e1002992 (2012).
- 30 43. Adams, J. et al. The kelch repeat superfamily of proteins: propellers of cell function. *Trends Cell Biol* 10, 17-24 (2000).
44. Prag, S. & Adams, J. C. Molecular phylogeny of the kelch-repeat superfamily reveals an expansion of BTB/kelch proteins in animals. *BMC Bioinformatics* 4, 42 (2003).
- 35 45. Witkowski, B. et al. Reduced artemisinin susceptibility of *Plasmodium falciparum* ring stages in western Cambodia. *Antimicrob Agents Chemother* 57, 914-23 (2013).
- 40 46. B. Padmanabhan et al., Structural basis for defects of Keap1 activity provoked by its point mutations in lung cancer. *Mol Cell* 21, 689 (2006).
47. L. M. Boyden et al., Mutations in kelch-like 3 and cullin 3 cause hypertension and electrolyte abnormalities. *Nature* 482, 98 (2012).
- 45 48. X. Li, D. Zhang, M. Hannink, L. J. Beamer, Crystal structure of the Kelch domain of human Keap1. *J Biol Chem* 279, 54750 (2004).
49. K. Itoh et al., Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain. *Genes Dev* 13, 76 (1999).
- 50 50. D. Zhang, M. Hannink, Distinct cysteine residues in Keap1 are required for Keap1-dependent ubiquitination of Nrf2 and for stabilization of Nrf2 by chemopreventive agents and oxidative stress. *Mol Cell Biol* 23, 8137 (2003).
- 55 51. Z. Bozdech, H. Ginsburg, Antioxidant defense in *Plasmodium falciparum*--data mining of the transcriptome. *Malar J* 3, 23 (2004).
52. N. K. Nesser, D. O. Peterson, D. K. Hawley, RNA polymerase II subunit Rpb9 is important for transcriptional fidelity *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 3268 (2006).
- 60 53. H. Kettenberger, K. J. Armache, P. Cramer, Architecture of the RNA polymerase II-TFIIS complex and implications for mRNA cleavage. *Cell* 114, 347 (2003).
54. D. Dorin-Semblat, A. Sicard, C. Doerig, L. Ranford-Cartwright, C. Doerig, Disruption of the *PfPK7* gene impairs schizogony and sporogony in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Eukaryot Cell* 7, 279 (2008).
- 65 55. R. Tewari et al., The systematic functional analysis of *Plasmodium* protein kinases identifies essential regulators of mosquito transmission. *Cell Host Microbe* 8, 377 (2010).

56. P. J. Rosenthal, J. H. McKerrow, M. Aikawa, H. Nagasawa, J. H. Leech, A malarial cysteine proteinase is necessary for hemoglobin degradation by *Plasmodium falciparum*. *J Clin Invest* 82, 1560 (1988).

5 57. P. S. Sijwali et al., *Plasmodium falciparum* cysteine protease falcipain-1 is not essential in erythrocytic stage malaria parasites. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 8721 (2004).

58. P. S. Sijwali, J. Koo, N. Singh, P. J. Rosenthal, Gene disruptions demonstrate independent roles for the four falcipain cysteine proteases of *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol* 150, 96 (2006).

10 59. N. Klonis et al., Altered temporal response of malaria parasites determines differential sensitivity to artemisinin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 5157 (2013).

15 60. C. A. Lobo, H. Fujioka, M. Aikawa, N. Kumar, Disruption of the Pfg27 locus by homologous recombination leads to loss of the sexual phenotype in *P. falciparum*. *Mol Cell* 3, 793 (1999).

61. Olivieri et al., The *Plasmodium falciparum* protein Pfg27 is dispensable for gametocyte and gamete production, but contributes to cell integrity during gametocytogenesis. *Mol Microbiol* 73, 180 (2009).

20 62. Sharma, I. Sharma, D. Kogkasuriyachai, N. Kumar, Structure of a gametocyte protein essential for sexual development in *Plasmodium falciparum*. *Nat Struct Biol* 10, 197 (2003).

Ejemplos

25 Ejemplo 1. Linajes de *P. falciparum* F32 con presión farmacológica de artemisina y simulada

La línea de parásitos F32-ART5 resistente a ART se seleccionó cultivando el clon F32 de Tanzania sensible a ART en un régimen de dosis escalonada de artemisina durante 5 años. La línea F32-TEM se obtuvo cultivando F32-Tanzania en paralelo sin exposición a artemisinina. El ADN de referencia se extrajo de las líneas 3D7, 89F5 Palo Alto Uganda y K1992 de *P. falciparum*. El ensayo de supervivencia en fase de anillo (RSA^{0-3h}) se realizó como se describe¹³. Se realizó secuenciación hologenómica en F32-Tanzania, F32-TEM, F32-ART5 (4 puntos temporales), tres cepas de referencia (3D7, 89F5 y K1992) y 21 aislados de parásitos de Camboya, utilizando una tecnología de secuenciación de lecturas emparejadas de Illumina. Se recogió un conjunto de 1091 aislados clínicos de *P. falciparum* de pacientes que participaron en estudios de eficacia TCA (terapias combinadas basadas en artemisina) en 2001-2012. La hélice K13 se amplificó utilizando PCR anidada. La secuenciación de doble cadena de los productos de la PCR se realizó en Macrogen, Corea. Las secuencias se analizaron con el programa informático MEGA 5 versión 5.10 para identificar combinaciones específicas de SNP. Los datos se analizaron con Microsoft Excel y MedCalc versión 12 (Mariakerke, Bélgica). Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando los valores de *P* eran inferiores a 0,05. Las autorizaciones éticas para las colecciones de aislados de parásitos, se obtuvieron del Cambodian National Ethics Committee for Health Research, del Institutional Review Board of the Naval Medical Research Center, del Technical Review Group of the WHO Regional Office for the Western Pacific y del Institutional Review Board of the National Institute of Allergy and Infectious Diseases.

45 Los parásitos F32-Tanzania sin *Mycoplasma* se mantuvieron en glóbulos rojos (GR) humanos de tipo O (Etablissement Frangais du Sang) diluidos a un hematocrito de 2,5 % en medio RPMI-1640 (Invitrogen, San Diego, CA) complementado con suero humano al 5 %. Los cultivos de parásitos se mantuvieron a 37 °C en una atmósfera de CO₂ al 5%. La parasitemia se verificó diariamente y se mantuvo por debajo del 10 %. Para la selección de parásitos resistentes a ART, los cultivos asincrónicos se ajustaron a una parasitemia de 5-7 % y se hicieron crecer 24 h en presencia de dosis escalonadas de artemisinina (de 10 nM a 9 µM) durante los 3 primeros años de presión farmacológica¹⁸. En los 2 años siguientes, cada ciclo de presión farmacológica se realizó durante 48 h con dosis que variaban de 9 µM a 18 µM. Después de la exposición al fármaco, el medio se descartó y se reemplazó con medio sin fármaco complementado con suero humano (20 %). La parasitemia se controló diariamente hasta alcanzar el 5 %. En ese momento, volvió a aplicarse presión farmacológica. La línea de parásitos obtenida después de 5 años eficaces de presión discontinua de ART se denominó F32-ART5. En paralelo, la línea parental F32-Tanzania se mantuvo como un control en cultivo continuo durante el mismo tiempo y en las mismas condiciones (es decir, GR, suero y medios) pero sin tratamiento con artemisinina. La línea de control resultante se denominó F32-TEM.

Ejemplo 2. Líneas de *P. falciparum* adaptadas en laboratorio

60 Se extrajo ADN de referencia de las líneas de *P. falciparum* adaptadas en laboratorio 3D7 (MR4, Manassas, VA), 89F5 Palo Alto Uganda (un clon de la línea de Palo Alto, originario de Uganda en 1978, que mostró una alta susceptibilidad al tratamiento con arteméter en el hospedador experimental *Saimiri sciureus* [O. Mercereau-Puijalon, H. Contamin, y J.C. Barale, datos no publicados] y K1992, un aislado recogido en Pailín en 1992 antes de la implementación masiva de la ART en esa zona (proporcionada por el French National Reference Center of Malaria). El ADN del parásito se extrajo de alícuotas de sangre congelada (200 µl) utilizando el kit Mini para sangre (Qiagen, Valencia, CA) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Ejemplo 3. Aislados de *P. falciparum* adaptados a cultivo, procedentes de Camboya Cincuenta aislados clínicos de *P. falciparum* procedentes de Camboya (recogidos en 2010 y 2011) se adaptaron al cultivo *in vitro* según lo descrito por Witkowski et al.⁴⁵.

En la Tabla 8 se indica su origen geográfico. En estos aislados de pacientes, las tasas de eliminación de parásitos no se determinaron, ya que se recogieron durante las pruebas de campo que no incluyeron dichas mediciones. El ADN del parásito se extrajo de alícuotas de sangre congelada (200 µl) utilizando el kit Mini para sangre (Qiagen).

Ejemplo 4. Ensayo de Supervivencia en la fase de Anillo

El ensayo de supervivencia en la fase de anillo (RSA^{0-3h}) se llevó a cabo según lo descrito por Witkowski et al.¹³ utilizando cultivos de parásitos muy sincrónicos. En resumen, parásitos en fase de anillo, 0-3 h después de la invasión, se expusieron a DHA 700 nM [dihidroartemisinina, obtenida en WWARN (www.wwarn.org/research/tools/qaqc)] o a su disolvente DMSO, durante 6 h, se lavaron y después se cultivaron sin fármaco durante las 66 h siguientes. Las tasas de supervivencia se evaluaron al microscopio realizando un recuento en frotis finos teñidos con Giemsa de la proporción de parásitos viables que se desarrollaron en anillos de segunda generación o trofozoítos con morfología normal.

Ejemplo 5. Recogida temporal y geográfica de las muestras

Se recogió un conjunto de 941 aislados clínicos de *P. falciparum* de pacientes que participaron en estudios de eficacia terapéutica de TCA (terapias combinadas basadas en artemisina), realizados como parte del control habitual de la eficacia de los fármacos antipalúdicos del Programa Nacional de Control del Paludismo en Camboya de 2001 a 2012, y de estudios realizados por la NAMRU-2 (Tabla 4). Las muestras de sangre venosa (5 ml) recogidas en EDTA o ACD se transportaron 48 h después de su recogida a 4 °C, al Instituto Pasteur de Phnom Penh en Camboya y después se mantuvieron a -20 °C hasta la extracción del ADN. El ADN del parásito se extrajo de alícuotas de sangre congelada (200 µl) utilizando el kit Mini para sangre (Qiagen).

Ejemplo 6. Medición de la semivida de eliminación del parásito

Los pacientes con paludismo sin complicaciones o grave por *P. falciparum* y con una densidad inicial de parásitos >10.000/µl se inscribieron en las provincias de Pursat y Ratanakiri en 2009 y 2010 como se describe^{6,13}. Los pacientes se trataron con ART y su densidad de parásitos se midió cada 6 h desde la formación películas de sangre viscosa hasta que la parasitemia era indetectable. La semivida de eliminación de parásitos en 163 pacientes se obtuvo de estos recuentos de parásitos utilizando el Estimador de eliminación de parásitos en línea de WWARN (<http://www.wwarn.org/toolkit/data-management/parasite-clearance-estimator>). El estudio está registrado en ClinicalTrials.gov (número NCT00341003).

Ejemplo 7. Secuenciación hologenómica de ADN del parásito

La secuenciación hologenómica se realizó en F32-Tanzania, F32-TEM, en el linaje F32-ART5 (4 puntos temporales), en tres cepas de referencia (3D7, 89F5 y K1992) y en 21 aislados de parásitos de Camboya, utilizando una tecnología de secuenciación de lecturas emparejadas de Illumina. La preparación de la biblioteca de Illumina y la secuenciación siguieron los protocolos estándar desarrollados por el proveedor. Resumiendo, el ADN genómico se cortó mediante nebulización y los extremos de los fragmentos cortados se repararon y se fosforilaron. Los fragmentos de extremos romos tenían una cola A, y los adaptadores de secuenciación se ligaron a los fragmentos. Los insertos se dimensionaron utilizando perlas de Agencourt AMPure XP (± 500 pb; Beckman Coulter Genomics, Danvers, MA) y se enriquecieron utilizando 10 ciclos de PCR antes de la cuantificación y validación de la biblioteca. Para generar agrupaciones se realizó hibridación de la biblioteca con la célula de flujo y la amplificación del puente y se recogieron lecturas finales emparejadas de 100 ciclos en un instrumento HiSeq 2000 (Illumina, San Diego, CA). Después de finalizar la secuenciación, utilizando Illumina Analysis Pipeline versión 1.7, se realizó un análisis de imágenes, el nombramiento de bases y la estimación de errores.

Los archivos de secuencias sin procesar se filtraron utilizando la herramienta Fqquality, un programa informático de filtrado de calidad de lectura desarrollado por N. Joly (Biologie IT Center, Institut Pasteur, Paris), que permite recortar las primeras y últimas bases de baja calidad en lecturas. Las lecturas recortadas de los archivos Fastq controlados se mapearon en un genoma de referencia (*P. falciparum* 3D7) con el alineamiento de BurrowsWheeler (BWA), generando un archivo BAM (un archivo binario de formato SAM delimitado por tabulaciones). A continuación, utilizamos Samtools para preparar un archivo pileup, que se formateó utilizando el programa informático interno para implementar los datos en la base de datos de gestión de datos hologenómicos (*Wholegenome Data Manager* (WDM)) (Beghain et al, en preparación). El programa informático WDM está diseñado para comparar y/o alinear genomas parciales o completos de *P. falciparum*.

Ejemplo 8. Secuenciación de genes que contienen SNP no sinónimos en F32-ART5

La amplificación por PCR de genes seleccionados se realizó utilizando los cebadores enumerados en la Tabla 1. Se amplificaron dos μl de ADN con 1 μM de cada cebador, dNTP 0,2 mM (Solis Biodyne, Tartu, Estonia), MgCl_2 3 mM y 2 U de ADN polimerasa de *Taq* (Solis Biodyne), utilizando el siguiente programa de ciclado: 5 minutos a 94 °C, después, 40 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 90 segundos a 60 °C, 90 segundos a 72 °C y extensión final de 10 minutos a 72 °C. Los productos de la PCR se detectaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 2 % y tinción con bromuro de etidio. La secuenciación de doble cadena de los productos de la PCR se realizó en Beckman Coulter *Genomics*, Francia. Las secuencias se analizaron con el programa informático MEGA 5 versión 5.10 para identificar combinaciones específicas de SNP.

Ejemplo 9. Secuenciación del dominio de hélice K13

El dominio de hélice K13 se amplificó utilizando los siguientes cebadores: para la PCR primaria (K13-1 5'-cggagtgcacaaatctggga-3' (SEC ID NO:9) y K13-4 5'-gggaatctggtgtaacagc-3' (SEC ID NO:10)) y para la PCR anidada (K13-2 5'-gccaagctgccattcatttg-3' (SEC ID NO:13) y K13-3 5'-gccttggtgaaagaagcaga-3' (SEC ID NO: 14)). Se amplificó un μl de ADN con 1 μM de cada cebador, dNTP 0,2 mM (Solis Biodyne), MgCl_2 3 mM y 2 U de ADN polimerasa de *Taq* (Solis Biodyne), utilizando el siguiente programa de ciclado: 5 minutos a 94 °C, después, 40 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 90 segundos a 60 °C, 90 segundos a 72 °C y extensión final de 10 minutos a 72 °C. Para la PCR anidada, se amplificaron 2 μl de productos primarios de PCR en las mismas condiciones, excepto por la concentración de MgCl_2 (2,5 mM). Los productos de la PCR se detectaron utilizando electroforesis en gel de agarosa al 2 % y tinción con bromuro de etidio. La secuenciación de doble cadena de los productos de la PCR se realizó en Macrogen, Corea. Las secuencias se analizaron con el programa informático MEGA 5 versión 5.10 para identificar combinaciones específicas de SNP.

Ejemplo 10. Secuenciación profunda de aislados de parásitos clínicos y análisis estructural poblacional

La extracción de ADN, la secuenciación con Illumina® y la genotipificación de SNP de aislados clínicos de parásitos obtenidos de pacientes con paludismo en las provincias de Pursat y Ratanakiri, Camboya, se han descrito anteriormente¹⁵. El análisis estructural poblacional de estos parásitos identificó cuatro subpoblaciones: KH1, KH2, KH3 y KH4. Se consideró que los parásitos de cualquiera de estos cuatro grupos con <80 % de ascendencia estaban mezclados (KHA).

Ejemplo 11. Adquisición temporal de mutaciones en el linaje F32-ART5

El linaje F32-ART5 se exploró mediante secuenciación hologenómica utilizando muestras recogidas en el momento 0 (línea clonal F32-Tanzania original), Día 196 (ciclo de presión n° 23 con 0,2 μM), Día 385 (ciclo de presión n° 39 con 1,8 μM), Día 618 (ciclo de presión n° 56 con 9 μM) y Día 2250 (ciclo de presión n° 120 con 9 μM). La muestra F32-TEM se recogió el día 2250. Muestras adicionales recogidas en el momento de los ciclos de presión 30, 33, 34, 36, 68 y 98 se estudiaron mediante PCR. El ADN de los cultivos de parásitos se extrajo utilizando el kit de preparación de moldes de PCR de alta pureza (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Las muestras F32-ART5 analizadas en el ensayo de supervivencia en la fase de anillo ($\text{RSA}^{0-3\text{h}}$) se recogieron en el momento de los ciclos de presión 17, 48 y 122 (ART, 0,04, 2,7 y 9 μM), respectivamente. La muestra F32-TEM se recogió en el último ciclo de presión simulada. Las tasas de supervivencia de $\text{RSA}^{0-3\text{h}}$ se determinaron en experimentos por triplicado con diferentes lotes de glóbulos rojos, y se evaluaron como se indicó anteriormente utilizando frotis finos teñidos con Giemsa cuya lectura fue realizada por dos microscopistas independientes (B.W. y F. B.-V.). Las tasas de supervivencia se compararon utilizando la prueba de la U de Mann Whitney. Las tasas de supervivencia de $\text{RSA}^{0-3\text{h}}$ de las muestras F32-ART5 fueron las siguientes: a los ciclos de presión farmacológica: n° 17 ($n = 3$, mediana 0 %, RIC 0-0,07 %), n° 48 ($n = 3$, mediana 11,7 %, RIC 10,3-14,6; $P=0,04$ para n° 17 frente a n° 48, prueba de la U de Mann Whitney) y n° 122 ($n=3$, mediana 12,8 %, RIC 10,6-14,5, $P=0,04$ y $P=0,82$ para n° 17 frente a n° 122 y n° 48 frente a n° 122). La tasa de supervivencia $\text{RSA}^{0-3\text{h}}$ de la línea F32-TEM también se determinó en experimentos realizados por triplicado ($n=3$, mediana 0 %, RIC 0-0,05, $P=0,81$ para n° TEM frente a n° 17, prueba de la U de Mann-Whitney).

Ejemplo 12. Prevalencia de mutaciones de hélice K13 en 886 aislados clínicos de parásitos recogidos en seis provincias de Camboya en 2001-2012

La hélice K13 se genotipificó mediante la secuenciación de productos de PCR amplificados a partir de 886 muestras de sangre conservadas en archivo. En la Fig. 3 se indica el número de muestras analizadas de cada provincia cada año. Para comparar la frecuencia de aislados que llevaban una secuencia de hélice K13 de tipo silvestre en cada provincia a lo largo del tiempo, se utilizó la prueba exacta de Fisher. Durante la década se observó una disminución significativa de la frecuencia del alelo de hélice K13 de tipo silvestre en las provincias occidentales. En Pailin, disminuyó de 30,0 % en 2001-2002 (12/40) a 4,8 % en 2011-2012 (4/84), $P=0,0002$, prueba exacta de Fisher; en Battambang de 71,9 % en 2001-2002 (46/64) a 7,0 % en 2011-2012 (5/71), $P<10^{-6}$; en Pursat de 50,0 % en 2003-2004 (5/10) a 10,5 % en 2011-2012 (2/19), $P=0,03$; y en Battambang de 93,3 % en 2001-2002 (14/15) a 29,4 % en 2011-2012 (5/17), $P=0,0003$. No se observaron disminuciones significativas en la frecuencia de alelos de tipo silvestre en Preah Vihear

[de 92,6 % en 2001-2002 (25/27) a 84,2 % en 2011-2012 (16/19), $P=0,63$]; o en Ratanakiri de 96,4 % en 2001-2002 (54/56) a 94,3 % en 2011-2012 (33/35), $P=0,63$]. La frecuencia de C580Y aumentó en Pailín de 45,0 % (18/40) en 2001-2002 a 88,1 % (74/84) en 2011-2012 ($P < 10^{-6}$), y en Battambang de 7,8 % (5/64) en 2001-2002 a 87,3 % (62/71) en 2011-2012 ($P < 10^{-6}$), lo que indica su rápida invasión de la población y fijación próxima en estas provincias.

5

Ejemplo 13. Modelado tridimensional de la estructura de la hélice K13

El modelo estructural tridimensional del dominio de hélice kelch de *PF3D7_1343700* ('hélice K13') se obtuvo mediante un modelo de homología que satisface las restricciones espaciales utilizando Modeller v9.11 (Fiser A, Sali A (2003)). "Modeller: generation and refinement of homology-based protein structure models". Meth. Enzymol. 374: 461-91). Los 295 aminoácidos que componen la hélice K13 son 22 %, 25 % y 25 % idénticos a los del dominio de hélice kelch de las proteínas humanas Keap1 [Banco de Datos de Proteínas ((*Protein Data Bank*, PDB)) 2FLU], KLHL12 (PDB 2VPJ) y KLHL2 (PDB 2XN4), respectivamente, que se utilizaron como moldes para modelar la estructura tridimensional de la hélice K13. La fiabilidad del modelo obtenido se evaluó utilizando dos criterios clásicos. En primer lugar, la importancia de la alineación de secuencias entre el dominio kelch K13 y un molde se confirmó con un valor $E=0$, según lo calculado por Modeller utilizando el Built-Profile habitual. En segundo lugar, el modelo obtuvo una puntuación = 1 del modelo GA341 (una puntuación $\geq 0,7$ corresponde a modelos muy fiables). La localización de los mutantes en el modelo tridimensional de K13 se preparó utilizando el sistema Molecular Graphics de PyMOL, versión 1.5.0.4 (Schrödinger, Portland, OR).

10

15

20

Ejemplo 14. Análisis estadístico

Los datos se analizaron con Microsoft Excel y MedCalc versión 12 (Mariakerke, Bélgica). Los datos cuantitativos se expresaron como mediana, rango intercuartílico (RIC). La prueba de la *U* de Mann-Whitney (muestras independientes, bilaterales) se utilizó para comparar dos grupos, y la prueba de Kruskal-Wallis (prueba de la *H*, bilateral) se utilizó para comparar más de dos grupos. El coeficiente de correlación de rango *rho* de Spearman (y el intervalo de confianza del 95 % para el coeficiente de correlación) se utilizó para medir la fuerza de la relación entre la prevalencia del alelo de hélice K13 de tipo silvestre y la frecuencia de positividad del día 3 (definida como la persistencia de parásitos detectable al microscopio el tercer día de la terapia combinada basada en artemisinina)². La prueba exacta de Fisher se utilizó para comparar los datos de frecuencia y el método exacto de Clopper-Pearson basado en la distribución beta se utilizó para determinar los intervalos de confianza del 95 % para las proporciones. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando los valores de *P* eran inferiores a 0,05.

25

30

Ejemplo 15. SNP adicionales Después de la primera recogida de 941 aislados clínicos de *P. falciparum* de pacientes camboyanos, como se describe en el Ejemplo 5, se recogieron muestras de sangre adicionales de pacientes infectados con *P. falciparum* en varios países africanos como Benin, Angola y Camerún, y en Sudamérica, siguiendo el mismo procedimiento experimental que el del Ejemplo 5. Se recogió un total de 9523 muestras de sangre.

35

Continente	País	Total	NI	disponible	tasa
ÁFRICA	Benin	232	31	201	87 %
ÁFRICA	Camerún	593	4	589	99 %
ÁFRICA	República Centroafricana	400	46	354	89 %
ÁFRICA	Comoros	27	0	27	100 %
ÁFRICA	Comoros	309	2	307	99 %
ÁFRICA	República Democrática del Congo	92	0	92	100 %
ÁFRICA	República Democrática del Congo	924	58	866	94 %
ÁFRICA	Etiopía	146	20	126	86 %
ÁFRICA	Gabón	153	109	44	29 %
ÁFRICA	Gabón	56	7	49	88 %
ÁFRICA	Kenia	191	14	177	93 %
ÁFRICA	Madagascar	275	21	254	92 %
ÁFRICA	Mali	14	0	14	100 %

ES 2 720 728 T3

(continuación)

Continente	País	Total	NI	disponible	tasa
ÁFRICA	Níger	602	236	366	61 %
ÁFRICA	Níger	164	19	145	88 %
ÁFRICA	Nigeria	206	26	180	87 %
ÁFRICA	Ruanda	293	1	292	100 %
ÁFRICA	Senegal	108	67	41	38 %
ÁFRICA	Senegal	138	0	138	100 %
ÁFRICA	Tanzania	232	0	232	100 %
ÁFRICA	Togo	476	0	476	100 %
ÁFRICA	Uganda	279	11	268	96 %
ÁFRICA	Zambia	298	21	277	93 %
ASIA	Bangladesh	295	15	280	95 %
ASIA	Camboya	882	0	882	100 %
ASIA	China	180	1	179	99 %
ASIA	Indonesia	110	4	106	96 %
ASIA	Irán	78	2	76	97 %
ASIA	RDP de Laos	75	0	75	100 %
ASIA	RDP de Laos	47	2	45	96 %
ASIA	Filipinas	120	21	99	83 %
ASIA	Tailandia	150	2	148	99 %
ASIA	Tailandia	57	0	57	100 %
ASIA	Vietnam	177	1	176	99 %
OCEANÍA	Papúa Nueva Guinea	55	13	42	76 %
OCEANÍA	Islas Salomón	44	1	43	98 %
S. AMERICA	Brasil	237	0	237	100 %
S. AMERICA	Colombia	535	12	523	98 %
S. AMERICA	Guayana Francesa	198	20	178	90 %
S. AMERICA	Perú	75	6	69	92 %
TOTAL		9523	793	8730	
NI: muestra no interpretable					

El dominio de hélice K13 se genotipificó mediante secuenciación de productos de PCR amplificados a partir del ADN del parásito como se describe en el Ejemplo 9.

- 5 Se encontraron SNP no sinónimos adicionales en el dominio de hélice K13. Al final, los inventores identificaron 27 SNP enumerados a continuación:

F446I ttt/att
G449A ggt/gct
N458Y aat/tat
C469Y tgc/tac
W470finalizad or tgg/tga

ES 2 720 728 T3

A481V	gct/gtt
Y493H	tac/cac
K503N	aag/aat
S522C	agt/tgt
V534A	gtt/gct
R539T	aga/aca
I543T	att/act
G548D	ggc/gac
P553L	ccg/ctg
V555A	gta/gca
A557S	gca/tca
R561H	cgt/cat
K563R	aaa/aga
V568G	gtg/ggg
P574L	cct/ctt
A578S	gct/tct
C580Y	tgt/tat
F583L	ttt/tta/g
D584V	gat/gtt
V589I	gtc/atc
Q613E	caa/gaa
D641G	gat/ggt

Ejemplo 16: Método para detectar simultáneamente todas las mutaciones en el dominio de hélice K13 (Figura 13)

- 5 Este ejemplo describe detalles relacionados con el método para detectar simultáneamente todas las mutaciones en el dominio de hélice K13 (Figura 13). La detección de SNP se realiza en tres etapas: hibridación de todas las sondas con ADN amplificado (primera etapa); ligamiento de la sonda conservada con sonda específica de alelo (segunda etapa) y lectura de la fluorescencia emitida por biotina y por fluorescencia específica de alelo (tercera etapa)

10

Listado de mutaciones detectadas

- F446I ttt/att,
- G449A ggt/gct
- N458Y aat/tat
- C469Y tgc/tac
- W470finalizador tgg/tga
- A481V gct/gtt
- Y493H tac/cac
- K503N aag/aat
- S522C agt/tgt
- V534A gtt/gct
- R539T aga/aca
- I543T att/act
- G548D ggc/gac
- P553L ccg/ctg
- V555A gta/gca
- A557S gca/tca
- R561H cgt/cat
- K563R aaa/aga
- V568G gtg/ggg
- P574L cct/ctt
- A578S gct/tct
- C580Y tgt/tat
- F583L ttt/tta/g
- D584V gat/gtt
- V589I gtc/atc
- Q613E caa/gaa
- D641G gat/ggt.

Secuencia del dominio de hélice K13 con todas las mutaciones

GCCTTGTTGAAAGAAGCAGAATTTTATGGTATTAATTTTTACCATTCCCATTAGTATTTTGTATAGGT
 GGATTTGATGGTGTAGAATATTTAAATTTCGATGGAATTATTAGATATTAGTCAACAATGCTGGCGTAT
 GTGTACACCTATGTCTACCAAAAAAGCTTATTTTGGAAAGTGTGTATTGAATAATTTCTTATACGTTTTT
 GGTGGAATAACTATGATTATAAGGCTTTATTTGAAACTGAGGTGTATGATCGTTTAAAGAGATGTATG
 GTATGTTTCAAGTAATTTAAATATACTAGAAAGAAATAATTGTGGTGTACGTCAAATGGTAGAATTT
 ATTGTATTGGGGGATATGATGGCTCTTCTATTATACCGAATGTAGAAGCATATGATCATCGTATGAAA
 GCATGGGTAGAGGTGGCACCTTTGAATACCCCTAGATCATCAGCTATGTGTGTTGCTTTTGATAATAA
 AATTTATGTCATTGGTGGAACTAATGGTGAAGAGATTAATTTCTATTGAAGTATATGAAGAAAAAATGA
 ATAAATGGGAACAATTTCCATATGCCTTATTAGAAGCTAGAAGTTCAGGAGCAGCTTTTAATTACCTTA
 ATCAAATATATGTTGTTGGAGGTATTGATAATGAACATAACATATTAGATTCCGTTGAACAATATCAA
 CCATTTAATAAAAAGATGGCAATTTCTAAATGGTGTACCAGAGAAAAAATGAATTTTGGAGCTGCCAC
 ATTGTCAGATTCTTATATAATTACAGGAGGAGAAAAATGGCGAAGTTCTAAATTCATGTCATTTCTTTTC
 ACCAGATACAAATGAATGGCAGCTTGGC (nt 1279-2127 of SEQ ID NO:1).

5 Primera ETAPA: Amplificación por PCR de la secuencia del dominio de hélice K13

La amplificación por PCR se realizó según el Ejemplo 9. Para la PCR primaria, los cebadores son:

10 K13_1_F 5'-CGGAGTGACCAAATCTGGGA-3' (SEQ ID NO:9)
 K13_4_R 5'-GGGAATCTGGTGGTAACAGC-3' (SEQ ID NO:10)

Para la PCR anidada, los cebadores son:

15 K13_3_F 5'-GCCTTGTTGAAAGAAGCAGA-3' (SEQ ID NO:14)
 K13_2_R 5'-GCCAAGCTGCCATTCATTG-3' (SEQ ID NO:13)

Segunda ETAPA: Detección de SNP

20 Para cada SNP se utilizó una sonda conservada que se hibridaba con la secuencia conservada cadena abajo de la
 posición del nucleótido mutado. Esta sonda tiene un fosfato [Fos] en el extremo 5' para permitir el ligamiento y una
 etiqueta de Biotina [EtqBtn] en el extremo 3'; para cada SNP también se utilizaron dos sondas específicas de alelo
 que se hibridaban con el codón de tipo silvestre o con el codón mutante. Cada una de las sondas específicas de alelo
 tiene una etiqueta fluorescente específica (Etiqueta TS por etiqueta específica para el codón de tipo silvestre y Etiqueta
 25 MT por etiqueta específica para el codón mutante).

Listado de sondas:

30 F446I ttt/att
 [Fos]TTTGTATAGGTGGATTT[EtqBtn] (SEQ ID NO:53)
 Etiqueta_TS_T CCATTCCCATTAGTAT (SEQ ID NO:54)
 Etiqueta_MT_A CCATTCCCATTAGTAA (SEQ ID NO:55)

G449A ggt/gct
 35 [Fos]TGGATTTGATGGTGTAGAA[EtqBtn] (SEQ ID NO:56)
 Etiqueta_TS_G CATTAGTATTTTGTATAGG (SEQ ID NO:57)
 Etiqueta_MT_C CATTAGTATTTTGTATAGC (SEQ ID NO:58)

N458Y aat/tat
 40 [Fos]ATTCGATGGAATTATTAGATATTAGTCAACAA[EtqBtn] (SEQ ID NO:59)
 Etiqueta_TS_A GSTGGATTTGATGGTGTAGAATATTTAA (SEQ ID NO:60)
 Etiqueta_MT_C CATTAGTATTTTGTATAGC (SEQ ID NO:61)

C469Y tgc/tac
 45 [Fos]CTGGCGTATGTGTACAC[EtqBtn] (SEQ ID NO:62)
 Etiqueta_TS_G ATATTAGTCAACAATG (SEQ ID NO:63)
 Etiqueta_MT_A ATATTAGTCAACAATA (SEQ ID NO:64)

W470finalizador tgg/tga
 [Fos]CGTATGTGTACACCTATG[EtqBtn] (SEQ ID NO:65)

ES 2 720 728 T3

Etiqueta_TS_G ATTAGTCAACAATGCTGG (SEQ ID NO:66) Etiqueta_MT_A ATTAGTCAACAATGCTGA (SEQ ID NO:67)

A481V gct/gtt
 5 [Fos]TTATTTTGGAAAGTGCTGTA[EtqBtn] (SEQ ID NO:68)
 Etiqueta_TS_C TATGTCTACCAAAAAAGC (SEQ ID NO:69)
 Etiqueta_MT_T TATGTCTACCAAAAAAGT (SEQ ID NO:70)

Y493H tac/cac
 10 [Fos]ACGTTTTTGGTGGTAATAACTATGATT[EtqBtn] (SEQ ID NO:71)

Etiqueta_TS_T TGGAAGTGCTGTATTGAATAATTTCTTAT (SEQ ID NO:72)
 Etiqueta_MT_C TGGAAGTGCTGTATTGAATAATTTCTTAC (SEQ ID NO:73)

S522C agt/tgt
 15 [Fos]GTAATTTAAATATACCTAGA[EtqBtn] (SEQ ID NO:74)
 Etiqueta_TS_A GATGTATGGTATGTTTCAA (SEQ ID NO:75)
 Etiqueta_MT_T GATGTATGGTATGTTTCAT (SEQ ID NO:76)

V534A gtt/gct
 20 [Fos]TACGTCAAATGGTAGAAT[EtqBtn] (SEQ ID NO:77)
 Etiqueta_TS_T GAAGAAATAATTGTGGTGT (SEQ ID NO:78)
 Etiqueta_MT_C GAAGAAATAATTGTGGTGC (SEQ ID NO:79)

R539T aga/aca
 25 [Fos]AATTTATTGTAYTGGGGGATATGATG[BtnTg] (SEQ ID NO:80)
 Etiqueta_TS_G TGTGGTGTACGTCAAWTGGTAG (SEQ ID NO:81)
 Etiqueta_MT_C TGTGGTGTACGTCAAWTGGTAC (SEQ ID NO:82)

1543 aTt/aCt
 30 [Fos]TGGGGGATATGATGGCTCT [BtnTg] (SEQ ID NO:83)
 Etiqueta_TS_T TGTTACGTCAAWTGGTASAATTTATTGTAT (SEQ ID NO:84)
 Etiqueta_MT_C TGTTACGTCAAWTGGTASAATTTATTGTAC (SEQ ID NO:85)

G548D ggc/gac
 35 [Fos]CTCTTCTATTATACCGA[BtnTg] (SEQ ID NO:86)
 Etiqueta_TS_G ATTGGGGGATATGATGG (SEQ ID NO:87)
 Etiqueta_TS_A ATTGGGGGATATGATGA (SEQ ID NO:88)

P553L ccg/ctg
 [Fos]GAATGTAGAAGCATATGATCATCRTATG[BtnTg] (SEQ ID NO:89)

45 Etiqueta_TS_C GGGATATGATGGCTCTTCTATTATACC (SEQ ID NO:90) Etiqueta_MT_T
 GGGATATGATGGCTCTTCTATTATACT (SEQ ID NO:91)

V555A gta/gca
 50 [Fos]AGAAGCATATGATCATCG[EtqBtn] (SEQ ID NO:92)
 Etiqueta_TS_T CTTCTATTATACCGAATGT (SEQ ID NO:93)
 Etiqueta_MT_T GATGTATGGTATGTTTCAT (SEQ ID NO:94)

A557S gca/tca
 55 [Fos]CATATGATCATCGTATGA[EtqBtn] (SEQ ID NO:95)

Etiqueta_TS_G TTATACCGAATGTAGAAG (SEQ ID NO:96)
 Etiqueta_MT_T TTATACCGAATGTAGAAT (SEQ ID NO:97)

R561H cgt/cat
 60 [Fos]TATGAAAGCATGGGTAGA[EtqBtn] (SEQ ID NO:98)

Etiqueta_TS_G GAAGCATATGATCATCG (SEQ ID NO:99)
 Etiqueta_MT_A GAAGCATATGATCATCA (SEQ ID NO:100)

K563R aaa/aga
 65 [Fos]AGCATGGGTAGAGGTGG[EtqBtn] (SEQ ID NO:101)

ES 2 720 728 T3

Etiqueta_TS_A CATATGATCATCGTATGAA (SEQ ID NO:102)
Etiqueta_MT_G CATATGATCATCGTATGAG (SEQ ID NO:103)

5 V568G gtg/ggg
[Fos]GGCACCTTTGAATACCCYTAGAT[EtqBtn] (SEQ ID NO:104)
Etiqueta_TS_T CRTATGAAAGCATGGGTAGAGGT (SEQ ID NO:105)
Etiqueta_MT_G CRTATGAAAGCATGGGTAGAGGG (SEQ ID NO:106)

10 P574L cct/ctt
[Fos]TAGATCATCAGCTATGTG[EtqBtn] (SEQ ID NO:107)
Etiqueta_TS_C GCACCTTTGAATACCCC (SEQ ID NO:108)
Etiqueta_MT_T GCACCTTTGAATACCCT (SEQ ID NO:109)

15 A578S gct/tct
[Fos]CTATGTGTGTTGCTTTT[EtqBtn] (SEQ ID NO:110)

Etiqueta_TS_G GACCCCTAGATCATCAG (SEQ ID NO:111) Etiqueta_MT_T GACCCCTAGATCATCAT (SEQ ID NO:112)

20 C580Y tgt/tat

[Fos]TGTTGCTTTTGWTAATAAAATTTATGTC[EtqBtn] (SEQ ID NO:113)
Etiqueta_TS_G AATACCCYTAGATCATCAGCTATGTG (SEQ ID NO:114)
Etiqueta_MT_A AATACCCYTAGATCATCAGCTATGTA (SEQ ID NO:115)

25 F583L/F583S/F583Y ttt/ctt/tct/tat
[Fos]TGATAATAAAATTTATGTCATTG[EtqBtn] (SEQ ID NO:116)

30 Etiqueta_TS_T CTATGTGTGTTGCTTT (SEQ ID NO:117)
Etiqueta_MT_C1 CTATGTGTGTTGCTTC (SEQ ID NO:118)
Etiqueta_MT_A CTATGTGTGTTGCTTA (SEQ ID NO:119)
[Fos]HTGATAATAAAATTTATGTCATTG[EtqBtn] (SEQ ID NO:120)
Etiqueta_TS_T2 CTATGTGTGTTGCTT (SEQ ID NO:121)
Etiqueta_MT_C2 CTATGTGTGTTGCTC (SEQ ID NO:122)

35 D584V gat/gtt
[Fos]TAATAAAATTTATGTCATTGG[EtqBtn] (SEQ ID NO:123)
Etiqueta_TS_A ATGTGTGTTGCTTTTGA (SEQ ID NO:124)
Etiqueta_MT_T ATGTGTGTTGCTTTTGT (SEQ ID NO:125)

40 V589I gtc/atc
[Fos]TCATTGGTGGAACTAATGG[EtqBtn] (SEQ ID NO:126)
Etiqueta_TS_G GCTTTTGATAATAAAATTTATG (SEQ ID NO:127)
Etiqueta_MT_A GCTTTTGATAATAAAATTTATA (SEQ ID NO:128)

45 Q613E caa/gaa
[Fos]AATTTCCATATGCCTTAT[EtqBtn] (SEQ ID NO:129)
Etiqueta_TS_C AAAATGAATAAATGGGAAC (SEQ ID NO:130)
Etiqueta_MT_G AAAATGAATAAATGGGAAG (SEQ ID NO:131)

50 D641G gat/ggt.
[Fos]TAATGAACATAACATATTAG[EtqBtn] (SEQ ID NO:132)
Etiqueta_TS_A GTTGTTGGAGGTATTGA (SEQ ID NO:133)
Etiqueta_MT_G GTTGTTGGAGGTATTGG (SEQ ID NO:134)

LISTADO DE SECUENCIAS

60 <110> INSTITUT PASTEUR INSTITUT PASTEUR DU CAMBODGE CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

<120> Un marcador molecular de *Plasmodium falciparum* de resistencia a artemisinina

<130> B11017B - AD

65 <140> PCT/IB2014/XXXXXX
<141> 14/11/2014

ES 2 720 728 T3

<150> 61/904.651
<151> 15/11/2013

5 <150> 62/062.439
<151> 10/10/2014

<160> 134

10 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
<211> 2181
<212> ADN
<213> *Plasmodium falciparum*

15 <400> 1

atggaaggag	aaaaagtaa	aacaaaagca	aatagtatct	cgaatttttc	tatgacgtat	60
gatagggaat	ctggtggtaa	cagcaatagt	gatgataaaa	gcggaagtag	tagcgagaat	120
gattctaatt	catttatgaa	tctaactagt	gataaaaatg	agaaaacgga	aaataatagt	180
ttccttttaa	ataatagtag	ttatggaaat	gttaaagata	gcctattaga	atccattgat	240
atgagtgtat	tagattcgaa	ctttgatagt	aaaaaagatt	ttttaccaag	taatttatca	300
agaacattta	ataatatgtc	taaagataat	ataggaaata	aatatttaaa	taaattgtta	360
aataaaaaaa	aagatactat	tacaaatgaa	aataataata	ttaatcataa	taataataat	420
aataatctga	cagcaaataa	tataactaat	aatcttatta	ataataatat	gaattctcca	480
tcaattatga	ataccaacaa	aaaagagaat	tttttagatg	cagcaaatct	tataaatgat	540
gattctggat	taaacaattt	aaaaaattt	tcaactgtaa	ataatgtaa	tgatacttat	600
gaaaagaaaa	ttattgaaac	ggaattaagt	gatgctagtg	atthtgaaaa	tatggtaggt	660
gatttaagaa	ttacatttat	taattgggta	aaaaagacac	aatgaattt	tattcgagaa	720
aaagataaat	tatttaaaga	taagaaagaa	ctagaaatgg	aaagagtacg	attgtacaaa	780
gaattagaaa	accgtaaaaa	tattgaagaa	cagaaattac	atgatgaaag	aaagaaatta	840
gatattgata	tatctaattg	ttataaacaa	ataaaaaaag	aaaaagaaga	acataggaaa	900
cgatttgatg	aagaaagatt	aagattttta	caagaaatcg	ataaaattaa	attagtatta	960

ES 2 720 728 T3

tatttagaaa aagaaaaata ttatcaagaa tataaaaatt ttgagaatga taaaaaaaaa	1020
attgttgatg caaatattgc tactgaaact atgattgata ttaatgttgg tggagctatt	1080
tttgaaacat ctagacatac cttaacacaa caaaaagatt catttataga gaaattatta	1140
agtggaagac atcatgtaac cagagataaa caaggaagaa tattcttaga tagggatagt	1200
gagttattta gaattatact taacttctta agaaatccgt taactatacc catacaaaaa	1260
gatttaagtg aaagtgaagc cttgttgaaa gaagcagaat tttatggtat taaattttta	1320
ccattcccat tagtattttg tataggtgga tttgatggtg tagaatattt aaattcgatg	1380
gaattattag atattagtca acaatgctgg cgtatgtgta cacctatgtc taccaaaaaa	1440
gcttattttg gaagtgctgt attgaataat ttcttatacg tttttggtgg taataactat	1500
gattataagg ctttatttga aactgaggtg tatgatcgtt taagagatgt atggtatggt	1560
tcaagtaatt taaatatacc tagaagaaat aattgtggtg ttacgtcaaa tggtagaatt	1620
tattgtattg ggggatatga tggctcttct attataccga atgtagaagc atatgatcat	1680
cgtatgaaag catgggtaga ggtggcacct ttgaataccc ctagatcatc agctatgtgt	1740
gttgcttttg ataataaaat ttatgtcatt ggtggaacta atggtgagag attaaattct	1800
attgaagtat atgaagaaaa aatgaataaa tgggaacaat ttccatatgc cttattagaa	1860
gctagaagtt caggagcagc ttttaattac cttaatcaaa tatatgttgt tggaggtatt	1920
gataatgaac ataacatatt agattccgtt gaacaatatc aaccatttaa taaaagatgg	1980
caatttctaa atggtgtacc agagaaaaaa atgaattttg gagctgccac attgtcagat	2040
tcttatataa ttacaggagg agaaaatggc gaagtctaa attcatgtca tttcttttca	2100
ccagatacaa atgaatggca gcttgGCCCA tctttattag ttcccagatt tggctactcc	2160
gttttaatag caaatatata a	2181

<210> 2
 <211> 726
 <212> PRT
 <213> *Plasmodium falciparum*
 <400> 2

5

ES 2 720 728 T3

50						55										60
Asn 65	Ser	Ser	Tyr	Gly	Asn 70	Val	Lys	Asp	Ser	Leu 75	Leu	Glu	Ser	Ile	Asp 80	
Met	Ser	Val	Leu	Asp 85	Ser	Asn	Phe	Asp	Ser 90	Lys	Lys	Asp	Phe	Leu	Pro 95	
Ser	Asn	Leu	Ser 100	Arg	Thr	Phe	Asn	Asn 105	Met	Ser	Lys	Asp	Asn 110	Ile	Gly	
Asn	Lys	Tyr 115	Leu	Asn	Lys	Leu	Leu 120	Asn	Lys	Lys	Lys	Asp 125	Thr	Ile	Thr	
Asn 130	Glu	Asn	Asn	Asn	Ile	Asn 135	His	Asn	Asn	Asn	Asn 140	Asn	Asn	Leu	Thr	
Ala 145	Asn	Asn	Ile	Thr	Asn 150	Asn	Leu	Ile	Asn	Asn 155	Asn	Met	Asn	Ser	Pro 160	
Ser	Ile	Met	Asn	Thr 165	Asn	Lys	Lys	Glu	Asn 170	Phe	Leu	Asp	Ala	Ala	Asn 175	
Leu	Ile	Asn	Asp 180	Asp	Ser	Gly	Leu	Asn 185	Asn	Leu	Lys	Lys	Phe 190	Ser	Thr	
Val	Asn 195	Asn	Val	Asn	Asp	Thr	Tyr 200	Glu	Lys	Lys	Ile	Ile 205	Glu	Thr	Glu	
Leu 210	Ser	Asp	Ala	Ser	Asp	Phe 215	Glu	Asn	Met	Val	Gly 220	Asp	Leu	Arg	Ile	
Thr 225	Phe	Ile	Asn	Trp	Leu 230	Lys	Lys	Thr	Gln	Met 235	Asn	Phe	Ile	Arg	Glu 240	
Lys	Asp	Lys	Leu	Phe 245	Lys	Asp	Lys	Lys	Glu	Leu	Glu 250	Met	Glu	Arg	Val 255	
Arg	Leu	Tyr 260	Lys	Glu	Leu	Glu	Asn 265	Arg	Lys	Asn	Ile	Glu	Glu 270	Gln	Lys	
Leu	His 275	Asp	Glu	Arg	Lys	Lys	Leu 280	Asp	Ile	Asp	Ile	Ser 285	Asn	Gly	Tyr	
Lys 290	Gln	Ile	Lys	Lys	Glu	Lys 295	Glu	Glu	His	Arg	Lys 300	Arg	Phe	Asp	Glu	

ES 2 720 728 T3

Glu Arg Leu Arg Phe Leu Gln Glu Ile Asp Lys Ile Lys Leu Val Leu
 305 310 315 320
 Tyr Leu Glu Lys Glu Lys Tyr Tyr Gln Glu Tyr Lys Asn Phe Glu Asn
 325 330 335
 Asp Lys Lys Lys Ile Val Asp Ala Asn Ile Ala Thr Glu Thr Met Ile
 340 345 350
 Asp Ile Asn Val Gly Gly Ala Ile Phe Glu Thr Ser Arg His Thr Leu
 355 360 365
 Thr Gln Gln Lys Asp Ser Phe Ile Glu Lys Leu Leu Ser Gly Arg His
 370 375 380
 His Val Thr Arg Asp Lys Gln Gly Arg Ile Phe Leu Asp Arg Asp Ser
 385 390 395 400
 Glu Leu Phe Arg Ile Ile Leu Asn Phe Leu Arg Asn Pro Leu Thr Ile
 405 410 415
 Pro Ile Pro Lys Asp Leu Ser Glu Ser Glu Ala Leu Leu Lys Glu Ala
 420 425 430
 Glu Phe Tyr Gly Ile Lys Phe Leu Pro Phe Pro Leu Val Phe Cys Ile
 435 440 445
 Gly Gly Phe Asp Gly Val Glu Tyr Leu Asn Ser Met Glu Leu Leu Asp
 450 455 460
 Ile Ser Gln Gln Cys Trp Arg Met Cys Thr Pro Met Ser Thr Lys Lys
 465 470 475 480
 Ala Tyr Phe Gly Ser Ala Val Leu Asn Asn Phe Leu Tyr Val Phe Gly
 485 490 495
 Gly Asn Asn Tyr Asp Tyr Lys Ala Leu Phe Glu Thr Glu Val Tyr Asp
 500 505 510
 Arg Leu Arg Asp Val Trp Tyr Val Ser Ser Asn Leu Asn Ile Pro Arg
 515 520 525
 Arg Asn Asn Cys Gly Val Thr Ser Asn Gly Arg Ile Tyr Cys Ile Gly
 530 535 540
 Gly Tyr Asp Gly Ser Ser Ile Ile Pro Asn Val Glu Ala Tyr Asp His
 545 550 555 560

ES 2 720 728 T3

Arg Met Lys Ala Trp Val Glu Val Ala Pro Leu Asn Thr Pro Arg Ser
 565 570 575

Ser Ala Met Cys Val Ala Phe Asp Asn Lys Ile Tyr Val Ile Gly Gly
 580 585 590

Thr Asn Gly Glu Arg Leu Asn Ser Ile Glu Val Tyr Glu Glu Lys Met
 595 600 605

Asn Lys Trp Glu Gln Phe Pro Tyr Ala Leu Leu Glu Ala Arg Ser Ser
 610 615 620

Gly Ala Ala Phe Asn Tyr Leu Asn Gln Ile Tyr Val Val Gly Gly Ile
 625 630 635 640

Asp Asn Glu His Asn Ile Leu Asp Ser Val Glu Gln Tyr Gln Pro Phe
 645 650 655

Asn Lys Arg Trp Gln Phe Leu Asn Gly Val Pro Glu Lys Lys Met Asn
 660 665 670

Phe Gly Ala Ala Thr Leu Ser Asp Ser Tyr Ile Ile Thr Gly Gly Glu
 675 680 685

Asn Gly Glu Val Leu Asn Ser Cys His Phe Phe Ser Pro Asp Thr Asn
 690 695 700

Glu Trp Gln Leu Gly Pro Ser Leu Leu Val Pro Arg Phe Gly His Ser
 705 710 715 720

Val Leu Ile Ala Asn Ile
 725

<210> 3
 <211> 712
 <212> PRT
 <213> *Plasmodium vivax*
 <400> 3

Met Glu Gly Glu Lys Ile Lys Ser Asn Ser Ile Ser Asn Phe Ser Val
 1 5 10 15

Thr Tyr Glu Arg Glu Ser Gly Ala Asn Ser Asn Ser Asp Asp Lys Ser
 20 25 30

Val Ser Ser Ser Glu Asn Glu Ser Asn Ser Phe Met Asn Leu Thr Ser
 35 40 45

5

10

ES 2 720 728 T3

Asp Lys Asn Glu Lys Thr Glu Asn Asn Ser Phe Ile Leu Asn Asn Ser
 50 55 60
 Ser Phe Ala Asn Met Lys Asp Ser Leu Leu Glu Ser Ile Asp Leu Ser
 65 70 75 80
 Val Leu Asp Ser Asn Phe Asp Ser Lys Lys Asp Phe Leu Pro Ser Asn
 85 90 95
 Leu Ser Lys Asn Phe Asn Asn Leu Ser Lys Glu Asn Leu Gly Asn Lys
 100 105 110
 Tyr Leu Asn Lys Leu Leu Asn Lys Ser Asp Ser Met Phe Met Ser Lys
 115 120 125
 Gly Lys Asp Met Asn Leu Met Glu Asn Asn Leu Gly Ser Asn Asn Leu
 130 135 140
 Pro Val Lys Ser Ser Asn Lys Lys Glu Gly Phe Met Asp Ser Ser Thr
 145 150 155 160
 Pro Ile Asn Ala Asn Glu Asp Asn Ala Met Asn Asn Leu Lys Lys Tyr
 165 170 175
 Ser Asn Ala Asn Asn Ile Asn Asp Thr Tyr Glu Lys Lys Ile Ile Glu
 180 185 190
 Thr Glu Leu Ser Asp Ser Ser Asp Phe Glu Asn Met Val Gly Asp Leu
 195 200 205
 Arg Ile Thr Phe Ile Asn Trp Leu Lys Lys Thr Gln Met Asn Phe Ile
 210 215 220
 Arg Glu Lys Asp Lys Leu Phe Lys Asp Lys Lys Glu Leu Glu Met Glu
 225 230 235 240
 Arg Ile Arg Leu Tyr Lys Glu Ile Glu Asn Arg Lys Ser Ile Glu Glu
 245 250 255
 Gln Lys Leu His Asp Glu Arg Lys Lys Leu Asp Ile Asp Ile Ser Asn
 260 265 270
 Gly Tyr Lys Gln Ile Lys Lys Glu Lys Glu Glu His Arg Lys Arg Phe
 275 280 285
 Asp Glu Glu Arg Leu Arg Phe Leu Gln Glu Ile Asp Lys Ile Lys Leu
 290 295 300

ES 2 720 728 T3

Val Leu Tyr Leu Glu Lys Glu Lys Tyr Phe Gln Glu Tyr Lys Asn Phe
 305 310 315 320

Glu Asn Asp Lys Lys Lys Ile Val Asp Ala Asn Ile Ala Thr Glu Thr
 325 330 335

Met Ile Asp Ile Asn Val Gly Gly Ala Ile Phe Glu Thr Ser Arg His
 340 345 350

Thr Leu Thr Gln Gln Lys Asp Ser Phe Ile Glu Lys Leu Leu Ser Gly
 355 360 365

Arg Tyr His Val Thr Arg Asp Lys Gln Gly Arg Ile Phe Leu Asp Arg
 370 375 380

Asp Ser Glu Leu Phe Arg Ile Ile Leu Asn Phe Leu Arg Asn Pro Leu
 385 390 395 400

Thr Val Pro Ile Pro Lys Asp Leu Ser Glu Ser Glu Ala Leu Leu Lys
 405 410 415

Glu Ala Glu Phe Tyr Gly Ile Lys Phe Leu Pro Phe Pro Leu Val Phe
 420 425 430

Cys Met Gly Gly Phe Asp Gly Val Glu Tyr Leu Asn Ser Met Glu Leu
 435 440 445

Leu Asp Ile Ser Gln Gln Cys Trp Arg Met Cys Thr Pro Met Ser Thr
 450 455 460

Lys Lys Ala Tyr Phe Gly Ser Ala Val Leu Asn Asn Phe Leu Tyr Val
 465 470 475 480

Phe Gly Gly Asn Asn Tyr Asp Tyr Lys Ala Leu Phe Glu Thr Glu Val
 485 490 495

Tyr Asp Arg Leu Arg Asp Thr Trp Phe Val Ser Ser Asn Leu Asn Ile
 500 505 510

Pro Arg Arg Asn Asn Cys Gly Val Thr Ser Asn Gly Arg Ile Tyr Cys
 515 520 525

Ile Gly Gly Tyr Asp Gly Ser Ser Ile Ile Pro Asn Val Glu Ala Tyr
 530 535 540

Asp His Arg Met Lys Ala Trp Val Glu Ile Ala Pro Leu Asn Thr Pro

ES 2 720 728 T3

545					550						555				560
Arg	Ser	Ser	Ser	Met	Cys	Val	Ala	Phe	Asp	Asn	Lys	Ile	Tyr	Val	Ile
				565					570					575	
Gly	Gly	Thr	Asn	Gly	Glu	Arg	Leu	Asn	Ser	Ile	Glu	Val	Tyr	Asp	Glu
			580					585					590		
Lys	Met	Asn	Lys	Trp	Glu	Gln	Phe	Pro	Tyr	Ala	Leu	Leu	Glu	Ala	Arg
		595					600					605			
Ser	Ser	Gly	Ala	Ala	Phe	Asn	Tyr	Leu	Asn	Gln	Ile	Tyr	Val	Val	Gly
	610					615					620				
Gly	Ile	Asp	Asn	Glu	His	Asn	Ile	Leu	Asp	Ser	Val	Glu	Gln	Tyr	Gln
625					630					635					640
Pro	Phe	Asn	Lys	Arg	Trp	Gln	Phe	Leu	Asn	Gly	Val	Pro	Glu	Lys	Lys
				645					650					655	
Met	Asn	Phe	Gly	Ala	Ala	Thr	Leu	Ser	Asp	Ser	Tyr	Ile	Ile	Thr	Gly
			660					665					670		
Gly	Glu	Asn	Gly	Asp	Val	Leu	Asn	Ser	Cys	His	Phe	Phe	Ser	Pro	Asp
		675					680					685			
Thr	Asn	Glu	Trp	Gln	Ile	Gly	Pro	Ser	Leu	Leu	Val	Pro	Arg	Phe	Gly
	690					695					700				
His	Ser	Val	Leu	Ile	Ala	Asn	Ile								
705					710										

<210> 4
 <211> 703
 <212> PRT
 <213> *Plasmodium cynomolgi*
 <400> 4

5

ES 2 720 728 T3

Met Glu Gly Glu Lys Ile Lys Thr Asn Ser Ile Ser Asn Phe Ser Val
1 5 10 15

Thr Tyr Glu Arg Glu Ser Gly Ala Asn Ser Asn Ser Asp Asp Lys Ser
20 25 30

Val Ser Ser Ser Glu Asn Glu Ser Asn Ser Phe Met Asn Leu Thr Ser
35 40 45

Asp Lys Asn Glu Lys Thr Glu Asn Asn Ser Phe Ile Leu Asn Asn Ser

ES 2 720 728 T3

50	55	60																		
Ser 65	Phe	Ala	Asn	Met	Lys 70	Asp	Ser	Phe	Leu	Glu 75	Ser	Ile	Asp	Leu	Ser 80					
Val	Leu	Asp	Ser	Asn 85	Phe	Asp	Ser	Lys	Lys 90	Asp	Phe	Leu	Pro	Ser 95	Asn					
Leu	Ser	Lys	Asn 100	Phe	Asn	Asn	Leu	Ser 105	Lys	Glu	Asn	Leu	Gly 110	Asn	Lys					
Tyr	Leu	Asn 115	Lys	Leu	Leu	Asn	Lys 120	Ser	Asp	Ser	Ile	Phe	Met 125	Ser	Lys					
Ser	Lys 130	Asp	Met	Asn	Leu	Ile 135	Glu	Asn	Asn	Leu	Gly 140	Ser	Asn	Asn	Leu					
Pro 145	Val	Lys	Ser	Ser	Asn 150	Lys	Lys	Glu	Gly	Phe	Met 155	Asp	Ser	Ser	Thr 160					
Pro	Ile	Asn	Ala	Asn 165	Glu	Asp	Asn	Ala	Met 170	Asn	Asn	Arg	Lys	Lys 175	Tyr					
Ser	Asn	Ser	Asn 180	Asn	Ile	Asn	Asp	Thr 185	Tyr	Glu	Lys	Lys	Ile 190	Ile	Glu					
Thr	Glu	Leu 195	Ser	Asp	Ser	Ser	Asp 200	Phe	Glu	Asn	Met	Val 205	Gly	Asp	Leu					
Arg	Ile 210	Thr	Phe	Ile	Asn	Trp 215	Leu	Lys	Lys	Thr	Gln 220	Met	Asn	Phe	Ile					
Arg 225	Glu	Lys	Asp	Lys	Leu 230	Phe	Lys	Asp	Lys	Lys 235	Glu	Leu	Glu	Met	Glu 240					
Arg	Ile	Arg	Leu	Tyr 245	Lys	Glu	Ile	Glu	Asn 250	Arg	Lys	Ser	Ile 255	Glu	Glu					
Gln	Lys	Leu	His 260	Asp	Glu	Arg	Lys	Lys 265	Leu	Asp	Ile	Asp 270	Ile	Ser	Asn					
Gly	Tyr 275	Lys	Gln	Ile	Lys	Lys	Glu 280	Lys	Glu	Glu	His	Arg 285	Lys	Arg	Phe					
Asp 290	Glu	Glu	Arg	Leu	Arg	Phe 295	Leu	Gln	Glu	Ile	Asp 300	Lys	Ile	Lys	Leu					

ES 2 720 728 T3

Val Leu Tyr Leu Glu Lys Glu Lys Tyr Phe Gln Glu Tyr Lys Asn Phe
 305 310 315 320

Glu Asn Asp Lys Lys Lys Ile Val Asp Ala Asn Ile Ala Thr Glu Thr
 325 330 335

Met Ile Asp Ile Asn Val Gly Gly Ala Ile Phe Glu Thr Ser Arg His
 340 345 350

Thr Leu Thr Gln Gln Lys Asp Ser Phe Ile Glu Lys Leu Leu Ser Gly
 355 360 365

Arg Tyr His Val Thr Arg Asp Lys Gln Gly Arg Ile Phe Leu Asp Arg
 370 375 380

Asp Ser Glu Leu Phe Arg Ile Ile Leu Asn Phe Leu Arg Asn Pro Leu
 385 390 395 400

Thr Val Pro Ile Pro Lys Asp Leu Ser Glu Ser Glu Ala Leu Leu Lys
 405 410 415

Glu Ala Glu Phe Tyr Val Phe Cys Met Gly Gly Phe Asp Gly Val Glu
 420 425 430

Tyr Leu Asn Ser Met Glu Leu Leu Asp Ile Ser Gln Gln Cys Trp Arg
 435 440 445

Met Cys Thr Pro Met Ser Thr Lys Lys Ala Tyr Phe Gly Ser Ala Val
 450 455 460

Leu Asn Asn Phe Leu Tyr Val Phe Gly Gly Asn Asn Tyr Asp Tyr Lys
 465 470 475 480

Ala Leu Phe Glu Thr Glu Val Tyr Asp Arg Leu Arg Asp Thr Trp Phe
 485 490 495

Val Ser Ser Asn Leu Asn Ile Pro Arg Arg Asn Asn Cys Gly Val Thr
 500 505 510

Ser Asn Gly Arg Ile Tyr Cys Ile Gly Gly Tyr Asp Gly Ser Ser Ile
 515 520 525

Ile Pro Asn Val Glu Ala Tyr Asp His Arg Met Lys Ala Trp Val Glu
 530 535 540

Ile Ala Pro Leu Asn Thr Pro Arg Ser Ser Ser Met Cys Val Ala Phe
 545 550 555 560

ES 2 720 728 T3

Asp Asn Lys Ile Tyr Val Ile Gly Gly Thr Asn Gly Glu Arg Leu Asn
 565 570 575

Ser Ile Glu Val Tyr Asp Glu Lys Met Asn Lys Trp Glu Gln Phe Pro
 580 585 590

Tyr Ala Leu Leu Glu Ala Arg Ser Ser Gly Ala Ala Phe Asn Tyr Leu
 595 600 605

Asn Gln Ile Tyr Val Val Gly Gly Ile Asp Asn Glu His Asn Ile Leu
 610 615 620

Asp Ser Val Glu Gln Tyr Gln Pro Phe Asn Lys Arg Trp Gln Phe Leu
 625 630 635 640

Asn Gly Val Pro Glu Lys Lys Met Asn Phe Gly Ala Ala Thr Leu Ser
 645 650 655

Asp Ser Tyr Ile Ile Thr Gly Gly Glu Asn Gly Asp Val Leu Asn Ser
 660 665 670

Cys His Phe Phe Ser Pro Asp Thr Asn Glu Trp Gln Ile Gly Pro Ser
 675 680 685

Leu Leu Val Pro Arg Phe Gly His Ser Val Leu Ile Ala Asn Ile
 690 695 700

<210> 5
 <211> 712
 <212> PRT
 <213> *Plasmodium knowlesi*
 <400> 5

5

Met Glu Asp Glu Lys Ile Lys Ser Asn Ser Ile Ser Asn Phe Ser Val
 1 5 10 15

Thr Tyr Glu Arg Glu Ser Gly Ala Asn Ser Asn Ser Asp Asp Lys Ser
 20 25 30

Val Ser Ser Ser Glu Asn Glu Ser Asn Ser Phe Met Asn Leu Thr Ser
 35 40 45

Asp Lys Asn Glu Lys Thr Glu Asn Asn Ser Phe Ile Leu Asn Asn Ser
 50 55 60

Ser Phe Ala Asn Met Lys Asp Ser Phe Leu Glu Ser Ile Asp Leu Ser
 65 70 75 80

10

ES 2 720 728 T3

Ile Leu Asp Ser Asn Phe Asp Ser Lys Lys Asp Phe Leu Pro Ser Asn
85 90 95

Leu Ser Lys Asn Phe Asn Asn Leu Ser Lys Glu Asn Leu Gly Asn Lys
100 105 110

Tyr Leu Asn Lys Leu Leu Asn Lys Ser Asp Ser Leu Phe Met Ser Lys
115 120 125

Asn Lys Asp Met Asn Leu Met Asp Asn Asn Met Gly Ser Asn Asn Leu
130 135 140

Pro Val Lys Ser Ser Asn Arg Lys Glu Gly Phe Met Asp Ser Ser Thr
145 150 155 160

Pro Ile Asn Ala Asn Glu Asp Asn Ala Met Asn Asn Leu Lys Lys Tyr
165 170 175

Ser Asn Thr Asn Asn Ile Asn Asp Thr Tyr Glu Lys Lys Ile Ile Glu
180 185 190

Thr Glu Leu Ser Asp Ser Ser Asp Phe Glu Asn Met Val Gly Asp Leu
195 200 205

Arg Ile Thr Phe Ile Asn Trp Leu Lys Lys Thr Gln Met Asn Phe Ile
210 215 220

Arg Glu Lys Asp Lys Leu Phe Lys Asp Lys Lys Glu Leu Glu Met Glu
225 230 235 240

Arg Ile Arg Leu Tyr Lys Glu Ile Glu Asn Arg Lys Ser Ile Glu Glu
245 250 255

Gln Lys Leu His Asp Glu Arg Lys Lys Leu Asp Ile Asp Ile Ser Asn
260 265 270

Gly Tyr Lys Gln Ile Lys Lys Glu Lys Glu Glu His Arg Lys Arg Phe
275 280 285

Asp Glu Glu Arg Leu Arg Phe Leu Gln Glu Ile Asp Lys Ile Lys Leu
290 295 300

Val Leu Tyr Leu Glu Lys Glu Lys Tyr Phe Gln Glu Tyr Lys Asn Phe
305 310 315 320

Glu Asn Asp Lys Lys Lys Ile Val Asp Ala Asn Ile Ala Thr Glu Thr
325 330 335

ES 2 720 728 T3

Met Ile Asp Ile Asn Val Gly Gly Ala Ile Phe Glu Thr Ser Arg His
 340 345 350

Thr Leu Thr Gln Gln Lys Asp Ser Phe Ile Glu Lys Leu Leu Ser Gly
 355 360 365

Arg Tyr His Val Thr Arg Asp Lys Gln Gly Arg Ile Phe Leu Asp Arg
 370 375 380

Asp Ser Glu Leu Phe Arg Ile Ile Leu Asn Phe Leu Arg Asn Pro Leu
 385 390 395 400

Thr Val Pro Ile Pro Lys Asp Leu Ser Glu Ser Glu Ala Leu Leu Lys
 405 410 415

Glu Ala Glu Phe Tyr Gly Ile Lys Phe Leu Pro Phe Pro Leu Val Phe
 420 425 430

Cys Met Gly Gly Phe Asp Gly Val Glu Tyr Leu Asn Ser Met Glu Leu
 435 440 445

Leu Asp Ile Ser Gln Gln Cys Trp Arg Met Cys Thr Pro Met Ser Thr
 450 455 460

Lys Lys Ala Tyr Phe Gly Ser Ala Val Leu Asn Asn Phe Leu Tyr Val
 465 470 475 480

Phe Gly Gly Asn Asn Tyr Asp Tyr Lys Ala Leu Phe Glu Thr Glu Val
 485 490 495

Tyr Asp Arg Leu Arg Asp Thr Trp Phe Val Ser Ser Asn Leu Asn Ile
 500 505 510

Pro Arg Arg Asn Asn Cys Gly Val Thr Ser Asn Gly Arg Ile Tyr Cys
 515 520 525

Ile Gly Gly Tyr Asp Gly Ser Cys Ile Ile Pro Asn Val Glu Ala Tyr
 530 535 540

Asp His Arg Met Lys Ala Trp Val Glu Ile Ala Pro Leu Asn Thr Pro
 545 550 555 560

Arg Ser Ser Ser Met Cys Val Ala Phe Glu Asn Lys Ile Tyr Val Ile
 565 570 575

Gly Gly Thr Asn Gly Glu Arg Leu Asn Ser Ile Glu Val Tyr Asp Glu

ES 2 720 728 T3

580 585 590

Lys Met Asn Lys Trp Glu Gln Phe Pro Tyr Ala Leu Leu Glu Ala Arg
595 600 605

Ser Ser Gly Ala Ala Phe Asn Tyr Leu Asn Gln Ile Tyr Val Val Gly
610 615 620

Gly Ile Asp Asn Glu His Asn Ile Leu Asp Ser Val Glu Gln Tyr Gln
625 630 635 640

Pro Phe Asn Lys Arg Trp Gln Phe Leu Asn Gly Val Pro Glu Lys Lys
645 650 655

Met Asn Phe Gly Ala Ala Thr Leu Ser Asp Ser Tyr Ile Ile Thr Gly
660 665 670

Gly Glu Asn Gly Asp Val Leu Asn Ser Cys His Phe Phe Ser Pro Asp
675 680 685

Thr Asn Glu Trp Gln Ile Gly Pro Ser Leu Leu Val Pro Arg Phe Gly
690 695 700

His Ser Val Leu Ile Ala Asn Ile
705 710

<210> 6
 <211> 708
 <212> PRT
 <213> *Plasmodium berghei*

5

<400> 6

Met Glu Asp Asp Lys Ile Lys Ser Asn Ser Ile Ser Asn Phe Ser Val
1 5 10 15

Thr Tyr Glu Arg Glu Ser Gly Ser Asn Ser Asn Ser Glu Glu Arg Asp
20 25 30

Met Ser Ser Asp Glu Asn Glu Ser Asn Leu Tyr Met Asn Leu Thr Gly
35 40 45

Asp Lys Asn Glu Lys Ile Glu Asp Asn Ser Ser Phe Val Asn Ile Lys
50 55 60

Asp Ser Leu Leu Glu Ser Ile Asp Leu Ser Val Leu Asp Ser Asn Phe
65 70 75 80

Asp Ser Lys Asn Asp Phe Leu Pro Asn Asn Phe Ser Lys Asn Leu Asn

10

ES 2 720 728 T3

Asn Val Gly Gly Ala Leu Phe Glu Thr Ser Arg His Thr Leu Thr Gln
 340 345 350
 Gln Lys Asp Ser Phe Ile Glu Lys Leu Leu Ser Gly Arg Tyr His Ile
 355 360 365
 Thr Arg Asp Lys Gln Gly Arg Ile Phe Leu Asp Arg Asp Ser Glu Leu
 370 375 380
 Phe Arg Ile Ile Leu Asn Phe Leu Arg Asn Pro Leu Thr Ile Pro Ile
 385 390 395 400
 Pro Lys Asp Leu Gly Glu Ser Glu Ala Leu Leu Lys Glu Ala Glu Phe
 405 410 415
 Tyr Gly Ile Lys Phe Leu Pro Phe Pro Leu Val Phe Ser Ile Gly Gly
 420 425 430
 Phe Asp Gly Val Glu Tyr Leu Asn Ser Met Glu Leu Leu Asp Ile Ser
 435 440 445
 Gln Gln Cys Trp Arg Met Cys Thr Pro Met Ser Thr Lys Lys Ala Tyr
 450 455 460
 Phe Gly Ser Ala Val Leu Asn Asn Phe Leu Tyr Val Phe Gly Gly Asn
 465 470 475 480
 Asn Tyr Asp Tyr Lys Ala Leu Phe Glu Thr Glu Val Tyr Asp Arg Leu
 485 490 495
 Arg Asp Thr Trp Phe Leu Ser Ser Asn Leu Asn Ile Pro Arg Arg Asn
 500 505 510
 Asn Cys Gly Ile Thr Ser Asn Gly Arg Ile Tyr Cys Ile Gly Gly Tyr
 515 520 525
 Asp Gly Ser Ser Ile Ile Pro Asn Val Glu Ala Tyr Asp His Arg Met
 530 535 540
 Lys Ala Trp Ile Glu Val Ala Pro Leu Asn Thr Pro Arg Ser Ser Ala
 545 550 555 560
 Met Cys Val Ala Phe Asp Asn Lys Ile Tyr Val Val Gly Gly Ala Asn
 565 570 575
 Gly Glu Arg Leu Asn Ser Ile Glu Val Tyr Asp Glu Lys Met Asn Lys
 580 585 590

ES 2 720 728 T3

Trp Glu Asn Phe Pro Tyr Ala Leu Leu Glu Ala Arg Ser Ser Gly Ala
595 600 605

Ala Phe Asn Tyr Leu Asn Gln Ile Tyr Val Val Gly Gly Ile Asp Asn
610 615 620

Glu His Asn Ile Leu Glu Ser Val Glu Gln Tyr Gln Pro Phe Asn Lys
625 630 635 640

Arg Trp Gln Phe Leu Asn Gly Ile Pro Glu Lys Lys Met Asn Phe Gly
645 650 655

Ala Thr Thr Leu Ser Asp Ser Tyr Ile Ile Thr Gly Gly Glu Asn Gly
660 665 670

Asp Val Leu Asn Ser Cys His Phe Phe Ser Pro Asp Thr Asn Glu Trp
675 680 685

Gln Ile Gly Pro Pro Leu Leu Val Pro Arg Phe Gly His Ser Val Leu
690 695 700

Val Ala Asn Ile
705

<210> 7
<211> 708
<212> PRT
<213> *Plasmodium yoelii*

5

<400> 7

Met Glu Asp Asp Lys Ile Lys Ser Asn Ser Ile Ser Asn Phe Ser Val
1 5 10 15

Thr Tyr Glu Arg Glu Ser Gly Ser Asn Ser Asn Ser Glu Glu Arg Asp
20 25 30

Met Ser Ser Asp Glu Asn Glu Ser Asn Leu Phe Met Asn Leu Thr Gly
35 40 45

Asp Lys Asn Glu Lys Ile Glu Asp Asn Ser Ser Phe Val Asn Met Lys
50 55 60

Asp Ser Leu Leu Glu Ser Ile Asp Leu Ser Val Leu Asp Ser Asn Phe
65 70 75 80

Asp Ser Lys Asn Asp Phe Leu Pro Asn Asn Phe Ser Lys Asn Leu Asn
85 90 95

10

ES 2 720 728 T3

Asn Ile Thr Lys Asp Asn Ile Ser Asn Lys Tyr Leu Asn Lys Tyr Leu
 100 105 110

Asn Lys Asn Asp Ser Ala Phe Met Thr Met Ser Lys Asp Leu Asn Val
 115 120 125

Ser Asn Asn Asn Leu Asn Gly Asn Asn Ile Val Gly Ala Pro Thr Asn
 130 135 140

Lys Lys Glu Ile Phe Met Asp Ser Gly Ala Ser Ser Ile Asn Met Asn
 145 150 155 160

Glu Asp Asn Ser Thr Met His Asn Ile Arg Ile Tyr Lys Asn Thr Asn
 165 170 175

Asn Ile Asn Asp Thr Tyr Glu Lys Lys Ile Ile Glu Thr Glu Leu Ser
 180 185 190

Asp Ser Ser Asp Phe Glu Asn Met Val Gly Asp Leu Arg Ile Thr Phe
 195 200 205

Ile Asn Trp Leu Lys Lys Thr Gln Met Asn Phe Ile Arg Glu Lys Asp
 210 215 220

Lys Leu Phe Lys Asp Lys Lys Glu Leu Glu Met Glu Arg Ile Arg Leu
 225 230 235 240

Tyr Lys Glu Ile Glu Asn Arg Lys Ala Ile Glu Glu Gln Lys Leu Gln
 245 250 255

Asp Glu Arg Lys Lys Leu Asp Ile Asp Ile Ser Asn Gly Tyr Lys Gln
 260 265 270

Ile Lys Lys Glu Lys Glu Glu His Arg Lys Arg Phe Asp Asp Glu Arg
 275 280 285

Leu Arg Phe Leu Gln Glu Ile Asp Lys Ile Lys Leu Val Leu Tyr Leu
 290 295 300

Glu Lys Glu Lys Tyr Phe Gln Glu Tyr Lys Asn Phe Glu Asn Asp Lys
 305 310 315 320

Lys Lys Ile Val Asp Ala Asn Ile Ala Thr Glu Thr Met Ile Asp Ile
 325 330 335

Asn Val Gly Gly Ala Leu Phe Glu Thr Ser Arg His Thr Leu Thr Gln
 340 345 350

ES 2 720 728 T3

Gln Lys Asp Ser Phe Ile Glu Lys Leu Leu Ser Gly Arg Tyr His Ile
 355 360 365

Thr Arg Asp Lys Gln Gly Arg Ile Phe Leu Asp Arg Asp Ser Glu Leu
 370 375 380

Phe Arg Ile Ile Leu Asn Phe Leu Arg Asn Pro Leu Thr Ile Pro Ile
 385 390 395 400

Pro Lys Asp Leu Gly Glu Ser Glu Ala Leu Leu Lys Glu Ala Glu Phe
 405 410 415

Tyr Gly Ile Lys Phe Leu Pro Phe Pro Leu Val Phe Ser Ile Gly Gly
 420 425 430

Phe Asp Gly Val Glu Tyr Leu Asn Ser Met Glu Leu Leu Asp Ile Ser
 435 440 445

Gln Gln Cys Trp Arg Met Cys Thr Pro Met Ser Thr Lys Lys Ala Tyr
 450 455 460

Phe Gly Ser Ala Val Leu Asn Asn Phe Leu Tyr Val Phe Gly Gly Asn
 465 470 475 480

Asn Tyr Asp Tyr Lys Ala Leu Phe Glu Thr Glu Val Tyr Asp Arg Leu
 485 490 495

Arg Asp Thr Trp Phe Leu Ser Ser Asn Leu Asn Ile Pro Arg Arg Asn
 500 505 510

Asn Cys Gly Ile Thr Ser Asn Gly Arg Ile Tyr Cys Ile Gly Gly Tyr
 515 520 525

Asp Gly Ser Ser Ile Ile Pro Asn Val Glu Ala Tyr Asp His Arg Met
 530 535 540

Lys Ala Trp Ile Glu Val Ala Pro Leu Asn Thr Pro Arg Ser Ser Ala
 545 550 555 560

Met Cys Val Ala Phe Asp Asn Lys Ile Tyr Val Val Gly Gly Ala Asn
 565 570 575

Gly Glu Arg Leu Asn Ser Ile Glu Val Tyr Asp Glu Lys Met Asn Lys
 580 585 590

Trp Glu Asn Phe Pro Tyr Ala Leu Leu Glu Ala Arg Ser Ser Gly Ala

ES 2 720 728 T3

595 600 605

Ala Phe Asn Tyr Leu Asn Gln Ile Tyr Val Val Gly Gly Ile Asp Asn
610 615 620

Glu His Asn Ile Leu Glu Ser Val Glu Gln Tyr Gln Pro Phe Asn Lys
625 630 635 640

Arg Trp Gln Phe Leu Asn Gly Ile Pro Glu Lys Lys Met Asn Phe Gly
645 650 655

Ala Thr Thr Leu Ser Asp Ser Tyr Ile Ile Thr Gly Gly Glu Asn Gly
660 665 670

Asp Val Leu Asn Ser Cys His Phe Phe Ser Pro Asp Thr Asn Glu Trp
675 680 685

Gln Ile Gly Pro Ser Leu Leu Val Pro Arg Phe Gly His Ser Val Leu
690 695 700

Val Ala Asn Ile
705

<210> 8
 <211> 708
 <212> PRT
 <213> *Plasmodium chabaudi*

5

<400> 8

Met Glu Asp Asp Lys Ile Lys Ser Asn Ser Ile Ser Asn Phe Ser Val
1 5 10 15

Thr Tyr Glu Arg Glu Ser Gly Ser Asn Ser Asn Ser Glu Glu Arg Asp
20 25 30

Ile Ser Ser Asp Glu Asn Glu Ser Asn Leu Phe Met Asn Leu Thr Gly
35 40 45

Asp Lys Asn Glu Lys Ile Glu Asp Asn Ser Ser Phe Val Asn Met Lys
50 55 60

Asp Ser Leu Leu Glu Ser Ile Asp Leu Ser Val Leu Asp Ser Asn Phe
65 70 75 80

Asp Ser Lys Asn Asp Phe Leu Pro Asn Asn Phe Ser Lys Asn Leu Asn
85 90 95

Asn Leu Thr Lys Asp Thr Ile Gly Asn Lys Tyr Leu Ser Lys Tyr Leu

10

ES 2 720 728 T3

Gln Lys Asp Ser Phe Ile Glu Gln Leu Leu Ser Gly Arg Tyr His Ile
 355 360 365

Thr Arg Asp Lys Gln Gly Arg Ile Phe Leu Asp Arg Asp Ser Glu Leu
 370 375 380

Phe Arg Ile Ile Leu Asn Phe Leu Arg Asn Pro Leu Thr Ile Pro Ile
 385 390 395 400

Pro Lys Asp Leu Gly Glu Ser Glu Ala Leu Leu Lys Glu Ala Glu Tyr
 405 410 415

Tyr Gly Ile Lys Phe Leu Pro Phe Pro Leu Val Phe Cys Ile Gly Gly
 420 425 430

Phe Asp Gly Val Glu Tyr Leu Asn Ser Met Glu Leu Leu Asp Ile Ser
 435 440 445

Gln Gln Cys Trp Arg Met Cys Thr Pro Met Ser Thr Lys Lys Ala Tyr
 450 455 460

Phe Gly Ser Ala Val Leu Asn Asn Phe Leu Tyr Val Phe Gly Gly Asn
 465 470 475 480

Asn Tyr Asp Tyr Lys Ala Leu Phe Glu Thr Glu Val Tyr Asp Arg Leu
 485 490 495

Arg Asp Thr Trp Phe Leu Ser Ser Asn Leu Asn Ile Pro Arg Arg Asn
 500 505 510

Asn Cys Gly Ile Thr Ser Asn Gly Arg Ile Tyr Cys Ile Gly Gly Tyr
 515 520 525

Asp Gly Ser Ser Ile Ile Pro Asn Val Glu Ala Tyr Asp His Arg Met
 530 535 540

Lys Ala Trp Ile Glu Val Ala Pro Leu Asn Thr Pro Arg Ser Ser Ala
 545 550 555 560

Met Cys Val Ala Phe Asp Asn Lys Ile Tyr Val Ile Gly Gly Ala Asn
 565 570 575

Gly Glu Arg Leu Asn Ser Ile Glu Val Tyr Asp Glu Lys Met Asn Lys
 580 585 590

Trp Glu Lys Phe Pro Tyr Ala Leu Leu Glu Ala Arg Ser Ser Gly Ala
 595 600 605

ES 2 720 728 T3

Ala Phe Asn Tyr Leu Asn Gln Ile Tyr Val Val Gly Gly Ile Asp Asn
610 615 620

Glu His Asn Ile Leu Glu Ser Val Glu Gln Tyr Gln Pro Phe Asn Lys
625 630 635 640

Arg Trp Gln Phe Leu Asn Gly Ile Pro Glu Lys Lys Met Asn Phe Gly
645 650 655

Ala Thr Thr Leu Ser Asp Ser Tyr Ile Ile Thr Gly Gly Glu Asn Gly
660 665 670

Asp Val Leu Asn Ser Cys His Phe Phe Ser Pro Asp Thr Asn Glu Trp
675 680 685

Gln Ile Gly Pro Ser Leu Leu Val Pro Arg Phe Gly His Ser Val Leu
690 695 700

Ile Ala Asn Ile
705

- 5 <210> 9
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
- 10 <220>
<223> Cebador
- <400> 9
cggagtgacc aaatctggga 20
- 15 <210> 10
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
- 20 <220>
<223> Cebador
- <400> 10
gggaatctgg tggaacagc 20
- 25 <210> 11
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
- 30 <220>
<223> Cebador
- <400> 11
cgccagcatt gttgactaat 20
- 35 <210> 12
<211> 20
<212> ADN

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 5
 <400> 12
 gcggaagtag tagcgagaat 20
 <210> 13
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 10
 <220>
 <223> Cebador
 15
 <400> 13
 gccaaagctgc cattcattg 20
 <210> 14
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 20
 <220>
 <223> Cebador
 25
 <400> 14
 gccttgttga aagaagcaga 20
 <210> 15
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 30
 <220>
 <223> Cebador
 35
 <400> 15
 aggtggatt gatggtgtag aat 23
 <210> 16
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 40
 <220>
 <223> Cebador
 45
 <400> 16
 catacacctc aqtttcaaat aaagc 25
 <210> 17
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 50
 <220>
 <223> Cebador
 55
 <400> 17
 aatttctat acgttttgg tggtaa 26
 <210> 18
 <211> 23

ES 2 720 728 T3

<212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 5 <223> Cebador

 <400> 18
 ctctaccat gcttcatac gat 23

 10 <210> 19
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 15 <220>
 <223> Cebador

 <400> 19
 20 ggatatgatg gctctctat tataaccg 27

 <210> 20
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 25
 <220>
 <223> Cebador

 <400> 20
 30 actcaatag aatttaact ctacca 27

 <210> 21
 <211> 23
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador

 <400> 21
 40 atgcattgg tggactaat ggt 23

 <210> 22
 <211> 24
 45 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador

 <400> 22
 50 ttaatggtt gatattgtc aacg 24

 <210> 23
 <211> 23
 55 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador

 <400> 23
 60 ttcaggagca gctttaatt acc 23

 <210> 24
 65

ES 2 720 728 T3

<211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Cebador

<400> 24
 ctggtgaaaa gaaatgacat gaa 23

10

<210> 25
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15

<220>
 <223> Cebador

<400> 25
 cctgttgaa agaagcagaa ttt 23

20

<210> 26
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25

<220>
 <223> Cebador

<400> 26
 attcaatata gcactccaa aataa 25

30

<210> 27
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

35

<220>
 <223> Cebador

<400> 27
 aggtggattt gatggttag aat 23

40

<210> 28
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

45

<220>
 <223> Cebador

<400> 28
 catacacctc agtttcaaat aaagc 25

50

<210> 29
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

55

<220>
 <223> Cebador

<400> 29
 aatttcttat acgttttgg tggtaa 26

60

65

ES 2 720 728 T3

5 <210> 30
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 <400> 30
 10 ctctacccat gcttcatac gat 23
 <210> 31
 <211> 27
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 20 <400> 31
 ggatgatg gctctctat tataccg 27
 <210> 32
 <211> 27
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 30 <400> 32
 acttcaatag aatttaactc ctcacca 27
 <210> 33
 <211> 23
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 40 <400> 33
 atgtcattgg tggaactaat ggt 23
 <210> 34
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 50 <220>
 <223> Cebador
 <400> 34
 55 ttaaatggtt gatattgttc aacg 24
 <210> 35
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 60 <220>
 <223> Cebador
 <400> 35

ttcaggagca gctttaatt acc 23
 <210> 36
 <211> 23
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 10 <400> 36
 ctggtgaaaa gaaatgacat gaa 23
 <210> 37
 15 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 20 <223> Cebador
 <400> 37
 cctgttgaa agaagcagaa tttt 24
 25 <210> 38
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 30 <220>
 <223> Cebador
 <400> 38
 35 attcaataca gcagttccaa aataa 25
 <210> 39
 <211> 26
 <212> ADN
 40 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 <400> 39
 45 ttgagcttct ttttccaat aatggc 26
 <210> 40
 <211> 26
 <212> ADN
 50 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 55 <400> 40
 gtgaaaagga taataaattc tatgcc 26
 <210> 41
 <211> 21
 60 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 65 <223> Cebador

<400> 41
 agcaagaacg tttgtgtaa a 21

5
 <210> 42
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10
 <220>
 <223> Cebador

<400> 42
 taatatgtaa agtgattatg tatatcgc 28

15
 <210> 43
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20
 <220>
 <223> Cebador

<400> 43
 agaagagcca tcatatcccc c 21

25
 <210> 44
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30
 <220>
 <223> Cebador

<400> 44
 atatgagtaa aatgtcaggt tttgg 25

35
 <210> 45
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40
 <220>
 <223> Cebador

<400> 45
 aaatagttgg gcgtagctca g 21

45
 <210> 46
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

50
 <220>
 <223> Cebador

<400> 46
 tgatatatgt ttgtaggagc tgtgag 26

55
 <210> 47
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

60
 <220>
 <223> Cebador

65

	<400> 47	
	tatctacat atattctgat tctcc	25
5	<210> 48 <211> 24 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Cebador	
	<400> 48	
	gaattcttta atggttttga agat	24
15	<210> 49 <211> 28 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Cebador	
	<400> 49	
25	atgctagaga agttaaagag aagaagcg	28
	<210> 50 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> Cebador	
	<400> 50	
35	agtggaagac atcatgtaac cag	23
	<210> 51 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
40	<220> <223> Cebador	
	<400> 51	
45	tgcttggtg gattcatggg g	21
	<210> 52 <211> 25 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
50	<220> <223> Cebador	
55	<400> 52	
	tatcacaatt aagtgtatca caacg	25
60	<210> 53 <211> 17 <212> ADN <213> Secuencia artificial	

ES 2 720 728 T3

<220>
 <223> Sonda

 <400> 53
 5 ttgtatagg tggatt 17

 <210> 54
 <211> 16
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Sonda

 <400> 54
 15 ccattcccat tagtat 16

 <210> 55
 <211> 16
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Sonda

 <400> 55
 25 ccattcccat tagtaa 16

 <210> 56
 <211> 19
 <212> ADN
 30 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Sonda

 <400> 56
 35 tggattgat ggtgtagaa 19

 <210> 57
 <211> 19
 <212> ADN
 40 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Sonda

 <400> 57
 45 cattagtatt ttgtatagg 19

 <210> 58
 <211> 19
 <212> ADN
 50 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Sonda

 <400> 58
 55 cattagtatt ttgtatagc 19

 <210> 59
 <211> 32
 <212> ADN
 60 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Sonda

 <400> 59
 65 cattagtatt ttgtatagc 19

 <210> 60
 <211> 32
 <212> ADN
 70 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sonda

5 <400> 59
 attcgatgga attattagat attagtcaac aa 32

10 <210> 60
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Sonda

20 <400> 60
 gstggattg atggtgtaga atattaa 28

25 <210> 61
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Sonda

35 <400> 61
 gstggattg atggtgtaga atattat 28

40 <210> 62
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Sonda

50 <400> 62
 ctggcgtatg tgtacac 17

55 <210> 63
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

60 <220>
 <223> Sonda

65 <400> 63
 atattagtca acaatg 16

70 <210> 64
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

75 <220>
 <223> Sonda

80 <400> 64
 atattagtca acaata 16

85 <210> 65
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

ES 2 720 728 T3

<220>
 <223> Sonda

5 <400> 65
 cgtatgtgta cacctatg 18

10 <210> 66
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Sonda

20 <400> 66
 attagtcaac aatgctgg 18

25 <210> 67
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Sonda

35 <400> 67
 attagtcaac aatgctga 18

40 <210> 68
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Sonda

50 <400> 68
 ttattttgga agtgctgta 19

55 <210> 69
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

60 <220>
 <223> Sonda

65 <400> 69
 tatgtctacc aaaaaagc 18

70 <210> 70
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

75 <220>
 <223> Sonda

80 <400> 70
 tatgtctacc aaaaaagt 18

85 <210> 71
 <211> 27
 <212> ADN

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sonda
 5
 <400> 71
 acgttttgg tggaataac tatgatt 27
 <210> 72
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 10
 <220>
 <223> Sonda
 15
 <400> 72
 tggaagtgct gtattgaata atttctat 29
 <210> 73
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 20
 <220>
 <223> Sonda
 25
 <400> 73
 tggaagtgct gtattgaata atttctac 29
 <210> 74
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 30
 <220>
 <223> Sonda
 35
 <400> 74
 gtaatttaaa tatacctaga 20
 <210> 75
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 40
 <220>
 <223> Sonda
 45
 <400> 75
 gatgtatggt atgtttcaa 19
 <210> 76
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 50
 <220>
 <223> Sonda
 55
 <400> 76
 gatgtatggt atgtttcat 19
 <210> 77

ES 2 720 728 T3

<211> 18
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

5 <220>
<223> Sonda

<400> 77
tacgtcaaat ggtagaat 18

10 <210> 78
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> Sonda

<400> 78
gaagaaataa ttgtggtg 19

20 <210> 79
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> Sonda

<400> 79
gaagaaataa ttgtggtgc 19

30 <210> 80
<211> 26
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> Sonda

<400> 80
aatttattgt aytgggggat atgatg 26

40 <210> 81
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Sonda

<400> 81
tgtggtgta cgtcaawtgg tag 23

50 <210> 82
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

55 <220>
<223> Sonda

<400> 82
tgtggtgta cgtcaawtgg tac 23

60

65

ES 2 720 728 T3

5 <210> 83
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Sonda

 10 <400> 83
 tgggggatat gatggctct 19

 15 <210> 84
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Sonda

 20 <400> 84

 tgttacgtca awtggtaaa tttattgat 30

 25 <210> 85
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 30 <220>
 <223> Sonda

 <400> 85

 tgttacgtca awtggtaaa tttattgtac 30

 35 <210> 86
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 40 <220>
 <223> Sonda

 <400> 86
 45 ctctctatt ataccga 17

 <210> 87
 <211> 17
 <212> ADN
 50 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Sonda

 55 <400> 87
 attgggggat atgatgg 17

 60 <210> 88
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Sonda

 65

<400> 88
 attgggggat atgatga 17

 5 <210> 89
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 10 <220>
 <223> Sonda

 <400> 89
 gaatgtagaa gcatatgatc atcrtatg 28

 15 <210> 90
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 20 <220>
 <223> Sonda

 <400> 90
 gggatatgat ggctcttcta ttatacc 27
 25
 <210> 91
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 30
 <220>
 <223> Sonda

 <400> 91
 gggatatgat ggctcttcta ttatact 27
 35
 <210> 92
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 40
 <220>
 <223> Sonda

 <400> 92
 agaagcatat gatcatcg 18
 45
 <210> 93
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 50
 <220>
 <223> Sonda

 <400> 93
 cttctattat accgaatgt 19
 55
 <210> 94
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 60
 <220>
 <223> Sonda
 65

ES 2 720 728 T3

<400> 94
 ctctattat accgaatgc 19

5
 <210> 95
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10
 <220>
 <223> Sonda

<400> 95
 catatgatca togtatga 18

15
 <210> 96
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20
 <220>
 <223> Sonda

<400> 96
 ttataccgaa tgtagaag 18

25
 <210> 97
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30
 <220>
 <223> Sonda

<400> 97
 ttataccgaa tgtagaat 18

35
 <210> 98
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40
 <220>
 <223> Sonda

45
 <400> 98
 tatgaaagca tgggtaga 18

<210> 99
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

50
 <220>
 <223> Sonda

55
 <400> 99
 gaagcatatg atcatcg 17

60
 <210> 100
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sonda
 <400> 100
 gaagcatatg atcatca 17
 5
 <210> 101
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 10
 <220>
 <223> Sonda
 <400> 101
 agcatgggta gaggtgg 17
 15
 <210> 102
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 20
 <220>
 <223> Sonda
 <400> 102
 catatgatca tcgtatgaa 19
 25
 <210> 103
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 30
 <220>
 <223> Sonda
 <400> 103
 catatgatca tcgtatgag 19
 35
 <210> 104
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 40
 <220>
 <223> Sonda
 <400> 104
 ggcaccttg aataccyyta gat 23
 45
 <210> 105
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 50
 <220>
 <223> Sonda
 <400> 105
 crtatgaaag catgggtaga ggt 23
 55
 <210> 106
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 60
 65

ES 2 720 728 T3

<220>
 <223> Sonda

 <400> 106
 5 crtataaaag catgggtaga ggg 23

 <210> 107
 <211> 18
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Sonda

 <400> 107
 15 tagatcatca gctatgtg 18

 <210> 108
 <211> 17
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Sonda

 <400> 108
 25 gcaccttga atacccc 17

 <210> 109
 <211> 17
 <212> ADN
 30 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Sonda

 <400> 109
 35 gcaccttga ataccct 17

 <210> 110
 <211> 17
 <212> ADN
 40 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Sonda

 <400> 110
 45 ctatgtgtgt tgctttt 17

 <210> 111
 <211> 17
 <212> ADN
 50 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Sonda

 <400> 111
 55 gaccctaga tcatcag 17

 <210> 112
 <211> 17
 <212> ADN

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sonda
 5
 <400> 112
 gaccctaga tcacat 17
 <210> 113
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 10
 <220>
 <223> Sonda
 15
 <400> 113
 tgttgcttt gwaataaaa ttatgct 28
 <210> 114
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 20
 <220>
 <223> Sonda
 25
 <400> 114
 aatacccyta gatcatcagc tatgtg 26
 <210> 115
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 30
 <220>
 <223> Sonda
 35
 <400> 115
 aatacccyta gatcatcagc tatgta 26
 <210> 116
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 40
 <220>
 <223> Sonda
 45
 <400> 116
 tgataataaa atttatgca ttg 23
 <210> 117
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 50
 <220>
 <223> Sonda
 55
 <400> 117
 ctatgtgtg tgcttt 16
 <210> 118

ES 2 720 728 T3

<211> 16
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Sonda

<400> 118
 ctatgtgtg tgctc 16

10

<210> 119
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15

<220>
 <223> Sonda

<400> 119
 ctatgtgtg tgctta 16

20

<210> 120
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25

<220>
 <223> Sonda

<400> 120
 htgataataa aatttatgtc attg 24

30

<210> 121
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

35

<220>
 <223> Sonda

<400> 121
 ctatgtgtg tgctt 15

40

<210> 122
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

45

<220>
 <223> Sonda

<400> 122
 ctatgtgtg tgctc 15

50

<210> 123
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

55

<220>
 <223> Sonda

<400> 123
 taataaaatt tatgtcattg g 21

60

ES 2 720 728 T3

<210> 124
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> Sonda
 <400> 124
 10 atgtgtgttg ctttga 17
 <210> 125
 <211> 17
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sonda
 20 <400> 125
 atgtgtgttg ctttgt 17
 <210> 126
 <211> 19
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sonda
 30 <400> 126
 tcattggtgg aactaatgg 19
 <210> 127
 <211> 22
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sonda
 40 <400> 127
 gcttttgata ataaaattta tg 22
 <210> 128
 <211> 22
 45 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sonda
 50 <400> 128
 gcttttgata ataaaattta ta 22
 55 <210> 129
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 60 <220>
 <223> Sonda
 <400> 129

ES 2 720 728 T3

aattccata tgccttat 18
 <210> 130
 <211> 19
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sonda
 10
 <400> 130
 aaaatgaata aatgggaac 19
 <210> 131
 <211> 19
 15 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sonda
 20
 <400> 131
 aaaatgaata aatgggaag 19
 <210> 132
 <211> 20
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sonda
 30
 <400> 132
 taatgaacat aacatattag 20
 <210> 133
 <211> 17
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sonda
 40
 <400> 133
 gttgtggag gtattga 17
 <210> 134
 <211> 17
 45 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sonda
 50
 <400> 134
 gttgtggag gtattgg 17

REIVINDICACIONES

1. Un método para genotipificar un parásito del género *Plasmodium* que comprende:

- 5 a) proporcionar una muestra que contenga un parásito del género *Plasmodium*; y
 (b) detectar, en la muestra, la presencia o la ausencia de un SNP no sinónimo en un ácido nucleico de hélice K-13 o la presencia o la ausencia de una proteína de hélice K13 mutada, en el que la mutación es una diferencia en un resto de aminoácido resultante de dicho SNP no sinónimo y en el que el SNP no sinónimo es uno de los siguientes:

- F446I ttt/att
- G449A ggt/gct
- N458Y aat/tat
- C469Y tgc/tac
- W470finaliz tgg/tga
- ador
- A481V gct/gtt
- Y493H tac/cac
- K503N aag/aat
- S522C agt/tgt
- V534A gtt/gct
- R539T aga/aca
- I543T att/act
- G548D ggc/gac
- P553L ccg/ctg
- V555A gta/gca
- A557S gca/tca
- R561H cgt/cat
- K563R aaa/aga
- V568G gtg/ggg
- P574L cct/ctt
- A578S gct/tct
- C580Y tgt/tat
- F583L ttt/tta/g
- D584V gat/gtt
- V589I gtc/atc
- Q613E caa/gaa
- D641G gat/ggt..

10 2. Un método para la detección de una infección causada por un parásito del género *Plasmodium* en un paciente, que comprende:

- 15 (a) proporcionar una muestra de sangre obtenida de un paciente y
 (b) detectar en la muestra de sangre la presencia o la ausencia de un ácido nucleico o de una proteína de hélice K-13 mutado, en donde la mutación del ácido nucleico es un SNP no sinónimo dentro de un ácido nucleico de hélice K-13 mutado y en donde la mutación en la proteína es el resultado de un SNP no sinónimo dentro de dicho ácido nucleico de hélice K13 y en donde el SNP no sinónimo es uno de los siguientes:

- F446I ttt/att
- G449A ggt/gct
- N458Y aat/tat
- C469Y tgc/tac
- W470finaliz tgg/tga
- ador
- A481V gct/gtt
- Y493H tac/cac
- K503N aag/aat
- S522C agt/tgt

- V534A gtt/gct
- R539T aga/aca
- I543T att/act
- G548D ggc/gac
- P553L ccg/ctg
- V555A gta/gca
- A557S gca/tca
- R561H cgt/cat
- K563R aaa/aga
- V568G gtg/ggg
- P574L cct/ctt
- A578S gct/tct
- C580Y tgt/tat
- F583L ttt/tta/g
- D584V gat/gtt
- V589I gtc/atc
- Q613E caa/gaa
- D641G gat/ggt..

3. El método de la reivindicación 1 o 2, en el que el parásito del género *Plasmodium* es *Plasmodium falciparum*.

5 4. El método de la reivindicación 1 o 3, en el que la presencia o la ausencia en la muestra de un ácido nucleico de hélice K-13 mutado, se detecta mediante secuenciación y/o por PCR.

5. El método de la reivindicación 2 o 3, en el que la presencia o la ausencia en la muestra de un ácido nucleico de hélice K-13 mutado, se detecta mediante secuenciación o por PCR.

10 6. El método de cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5, que comprende determinar si el parásito del género *Plasmodium* tiene una secuencia de ácido nucleico o de proteína de hélice K-13 mutante.

15 7. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el SNP no sinónimo codifica cualquiera de un alelo F446I, N458Y, C469Y, Y493H, K503N, R539T, I543T, P553L, P574L, A578S, C580Y y D584V o un alelo F446I, G449A, N458Y, C469Y, W470finalizador, A481V, Y493H, K503N, S522C, V534A, R539T, I543T, G548D, P553L, V555A, A557S, R561H, K563R, V568G, P574L, A578S, C580Y, F583L, D584V, V589I, Q613E y D641G.

20 8. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el SNP no sinónimo es uno de los siguientes: Y493H, R539T, I543T, C580Y.

9. Un kit para detectar una infección causada por un parásito del género *Plasmodium* que comprende cebadores para la amplificación de un SNP no sinónimo en un ácido nucleico de hélice K-13 y reactivos para la detección del producto amplificado, en el que el SNP no sinónimo es uno de los siguientes:

- F446I ttt/att
- G449A ggt/gct
- N458Y aat/tat
- C469Y tgc/tac
- W470finaliz
ador tgg/tga
- A481V gct/gtt
- Y493H tac/cac
- K503N aag/aat
- S522C agt/tgt
- V534A gtt/gct
- R539T aga/aca
- I543T att/act
- G548D ggc/gac
- P553L ccg/ctg
- V555A gta/gca

ES 2 720 728 T3

A557S	gca/tca
R561H	cgt/cat
K563R	aaa/aga
V568G	gtg/ggg
P574L	cct/ctt
A578S	gct/tct
C580Y	tgt/tat
F583L	ttt/tta/g
D584V	gat/gtt
V589I	gtc/atc
Q613E	caa/gaa
D641G	gat/ggt.

10. El kit de reivindicación 9, en el que el kit contiene una sonda para detectar el ácido nucleico de hélice K-13 mutante, estando dicha sonda opcionalmente marcada con un marcador fluorescente, radioactivo o enzimático.

5 11. El kit de cualquiera de las reivindicaciones 9 o 10, en el que el kit detecta un ácido nucleico de hélice K-13 mutante que codifica un alelo Y493H, R539T, I543T y C580Y.

12. El kit de cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, en el que el kit comprende al menos uno de los siguientes cebadores:

10 5'-cggagtgaccaaactctggga-3' (SEQ ID NO:9);
 5'-gggaatctggtgtaacagc-3' (SEQ ID NO:10);
 5'-cgccagcattgttgactaat-3' (SEQ ID NO:11); y
 5'-gcggaagtagtagcgagaat-3' (SEQ ID NO:12).
 15 5'-gccaagctgccattcatttg -3' (SEQ ID NO:13); y
 5'-gcctgttgaagaagcaga -3' (SEQ ID NO:14).

13. El kit de cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12, en el que el kit detecta un ácido nucleico de hélice K13 mutante que codifica cualquiera de un alelo F446I, N458Y, C469Y, Y493H, K503N, R539T, I543T, P553L, P574L, A578S, C580Y y D584V o un alelo F446I, G449A, N458Y, C469Y, W470finalizador, A481V, Y493H, K503N, S522C, V534A, R539T, I543T, G548D, P553L, V555A, A557S, R561H, K563R, V568G, P574L, A578S, C580Y, F583L, D584V, V589I, Q613E y D641G.

14. El kit de cualquiera de las reivindicaciones 9 a 13, en el que el kit comprende al menos uno de los siguientes pares de cebadores:

Par PCR1:

30 5' AGGTGGATTTGATGGTGTAGAAT 3' (directo) (SEQ ID NO:15)
 5' CATACACCTCAGTTTCAAATAAAGC 3' (inverso) (SEQ ID NO:16)

Par PCR2:

35 5' AATTTCTTATACGTTTTTGGTGGTAA 3' (directo) (SEQ ID NO:17)
 5' CTCTACCCATGCTTTCATACGAT 3' (inverso) (SEQ ID NO:18)

Par PCR3:

40 5' GGATATGATGGCTCTTCTATTATACCG 3' (directo) (SEQ ID NO:19)
 5' ACTTCAATAGAAATTAATCTCTCACCA 3' (inverso) (SEQ ID NO:20)

Par PCR4:

45 5' ATGTCATTGGTGGAACTAATGGT 3' (directo) (SEQ ID NO:21)
 5' TTAAATGGTTGATATTGTTCAACG 3' (inverso) (SEQ ID NO:22)

Par PCR5:

50 5' TTCAGGAGCAGCTTTTAATTACC 3' (directo) (SEQ ID NO:23)
 5' CTGGTGAAAAGAAATGACATGAA 3' (inverso) (SEQ ID NO:24)

Par PCR6:

5' CCTTGGTTGAAAGAAGCAGAATTT 3' (directo) (SEQ ID NO:25)

5' ATTCAATACAGCACTTCCAAAATAA 3' (inverso) (SEQ ID NO:26)

5 15. El kit de cualquiera de las reivindicaciones 9 a 14, en el que el kit comprende al menos una sonda específica diseñada para detectar dicho SNP no sinónimo e hibridarse con uno de los siguientes SNP:

- F446I ttt/att
- G449A ggt/gct
- N458Y aat/tat
- C469Y tgc/tac
- W470finalizador tgg/tga
- A481V gct/gtt
- Y493H tac/cac
- K503N aag/aat
- S522C agt/tgt
- V534A gtt/gct
- R539T aga/aca
- I543T att/act
- G548D ggc/gac
- P553L ccg/ctg
- V555A gta/gca
- A557S gca/tca
- R561H cgt/cat
- K563R aaa/aga
- V568G gtg/ggg
- P574L cct/ctt
- A578S gct/tct
- C580Y tgt/tat
- F583L ttt/tta/g
- D584V gat/gtt
- V589I gtc/atc
- Q613E caa/gaa
- D641G gat/ggt.

10 16. Un método para detectar, en una muestra biológica que contiene un parásito del género *Plasmodium*, la presencia o la ausencia de un ácido nucleico de hélice K13 mutante de SNP no sinónimo, que comprende:

- a) proporcionar una muestra biológica que contenga ADN un parásito del género *Plasmodium*;
- b) opcionalmente extraer ADN de la muestra biológica;
- 15 c) poner en contacto el ADN del parásito del género *Plasmodium* con al menos un par de cebadores que se hibridan específicamente con el ácido nucleico de hélice K13 a una distancia que varía de 100 a 300 pb y que rodea a al menos un SNP no sinónimo y realizar una reacción de PCR en presencia de colorante intercalante

20 en el que el SNP no sinónimo es uno de los siguientes:

- F446I ttt/att
- G449A ggt/gct
- N458Y aat/tat
- C469Y tgc/tac
- W470finalizador tgg/tga
- A481V gct/gtt
- Y493H tac/cac
- K503N aag/aat
- S522C agt/tgt

•	V534A	gtt/gct
•	R539T	aga/aca
•	I543T	att/act
•	G548D	ggc/gac
•	P553L	ccg/ctg
•	V555A	gta/gca
•	A557S	gca/tca
•	R561H	cgt/cat
•	K563R	aaa/aga
•	V568G	gtg/ggg
•	P574L	cct/ctt
•	A578S	gct/tct
•	C580Y	tgt/tat
•	F583L	ttt/ta/g
•	D584V	gat/gtt
•	V589I	gtc/atc
•	Q613E	caa/gaa
•	D641G	gat/ggt.

d) someter los productos de amplificación a una etapa de fusión;

e) determinar la presencia o ausencia de un alelo mutante analizando el perfil de fusión de los productos de amplificación,

5 f) opcionalmente, detectar un ácido nucleico de hélice K13 mutante que codifica un alelo F446I, G449A, N458Y, C469Y, W470finalizador, A481V, Y493H, K503N, S522C, V534A, R539T, I543T, G548D, P553L, V555A, A557S, R561H, K563R, V568G, P574L, A578S, C580Y, F583L, D584V, V589I, Q613E y D641G.

10 17. Un método para detectar, en una muestra biológica que contiene un parásito del género *Plasmodium*, la presencia de un ácido nucleico de hélice K13 mutante de SNP no sinónimo según la reivindicación 1, que comprende amplificar el ácido nucleico de hélice K13 mutante por reacción PCR, y poner en contacto el ácido nucleico amplificado con una sonda específica diseñada para detectar dicha hélice K13 mutante de SNP no sinónimo.

15 18. El método según la reivindicación 17, en el que para la amplificación, se utiliza al menos uno de los siguientes cebadores:

20 5'-cggagtgaccaaactctggga-3' (SEQ ID NO:9);
 5'-gggaatctggtgtaacagc-3' (SEQ ID NO:10);
 5'-cgccagcattgtgactaat-3' (SEQ ID NO:11); y
 5'-gcggaagtagtagcgagaat-3' (SEQ ID NO:12).
 5'-gccaagctgccattcatttg -3' (SEQ ID NO:13); y
 5'-gcctgttgaagaagcaga -3' (SEQ ID NO:14).

25 19. El método según la reivindicación 17, en el que los conjuntos de cebadores utilizados para la amplificación se seleccionan de los siguientes pares de cebadores:

Par PCR1:

30 5' AGGTGGATTTGATGGTGTAGAAT 3' (directo) (SEQ ID NO:15)
 5' CATAACCTCAGTTTCAAATAAAGC 3' (inverso) (SEQ ID NO:16)

Par PCR2:

35 5' AATTTCTTATACGTTTTTGGTGGTAA 3' (directo) (SEQ ID NO:17)
 5' CTCTACCCATGCTTTCATACGAT 3' (inverso) (SEQ ID NO:18)

Par PCR3:

40 5' GGATATGATGGCTCTTCTATTATACCG 3' (directo) (SEQ ID NO:19)
 5' ACTTCAATAGAATTTAATCTCTCACCA 3' (inverso) (SEQ ID NO:20)

Par PCR4:

5' ATGTCATTGGTGGAACATAATGGT 3' (directo) (SEQ ID NO:21)
5' TTAAATGGTTGATATTGTTCAACG 3' (inverso) (SEQ ID NO:22)

Par PCR5:

5

5' TTCAGGAGCAGCTTTTAATTACC 3' (directo) (SEQ ID NO:23)
5' CTGGTGAAAAGAAATGACATGAA 3' (inverso) (SEQ ID NO:24)

Par PCR6:

10

5' CCTTGTTGAAAGAAGCAGAATTT 3' (directo) (SEQ ID NO:25)
5' ATTCAATACAGCACTTCCAAAATAA 3' (inverso) (SEQ ID NO:26).

15 20. El método de la reivindicación 2, en el que la presencia de un ácido nucleico o una proteína de hélice K13 mutado indica que el paciente está infectado con un parásito del género *Plasmodium* resistente a derivados de artemisinina.

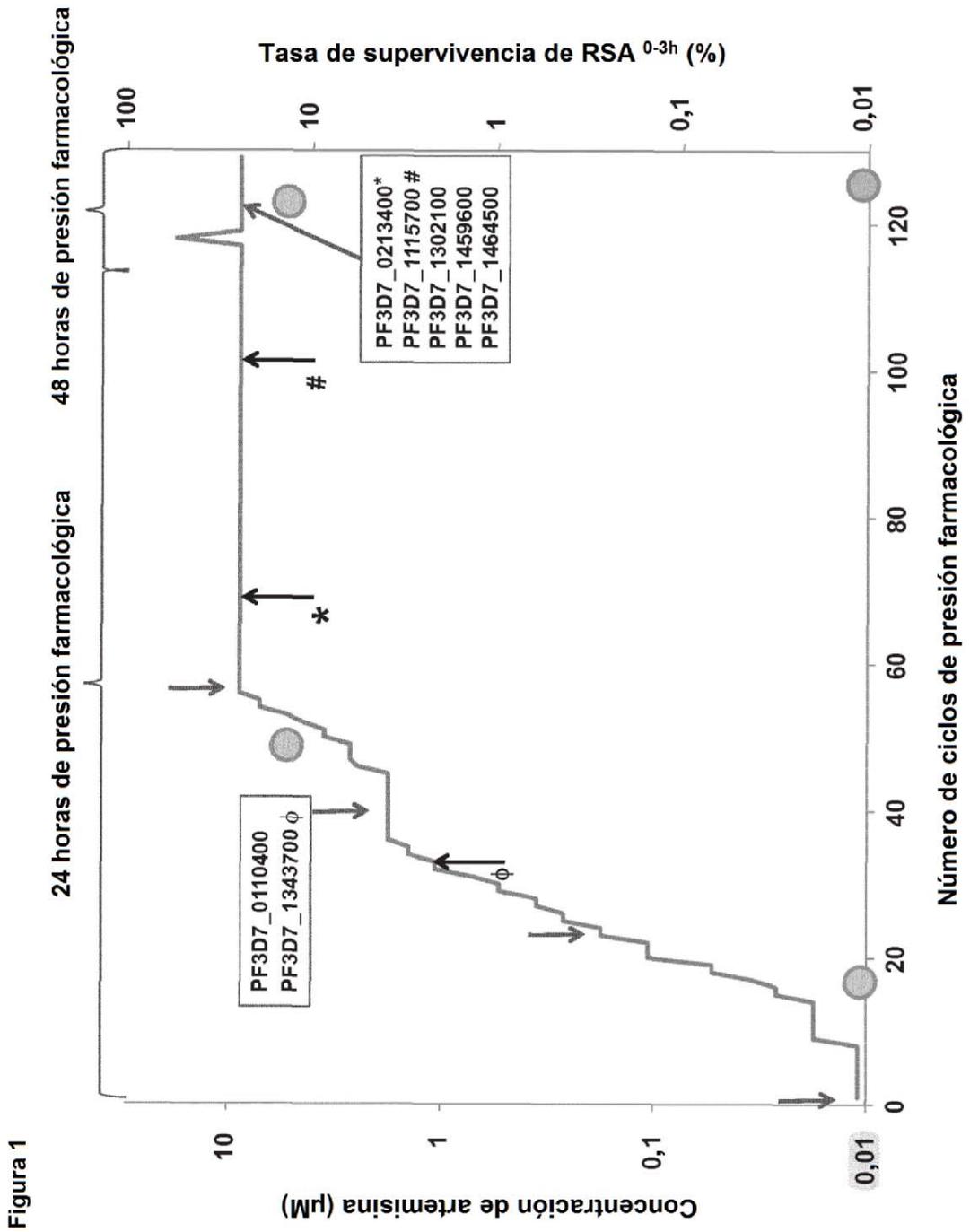
20 21. Derivados de artemisinina u otro fármaco antipalúdico, preferentemente quinina, cloroquinina o mefloquina, para el tratamiento de un paciente infectado con un parásito del género *Plasmodium*, en el que dicho paciente se ha detectado *in vitro* por la presencia de un parásito del género *Plasmodium* que contiene un ácido nucleico o una proteína de hélice K-13 de tipo silvestre o mutado de un SNP no sinónimo según el método de la reivindicación 20, y el tratamiento se ajusta en función de si el paciente está infectado con un parásito del género *Plasmodium* que contiene un ácido nucleico o una proteína de hélice K-13 mutante de SNP no sinónimo, y dicho derivado de artemisinina se administra al paciente durante un período de tiempo más largo que el que se suele utilizar habitualmente.

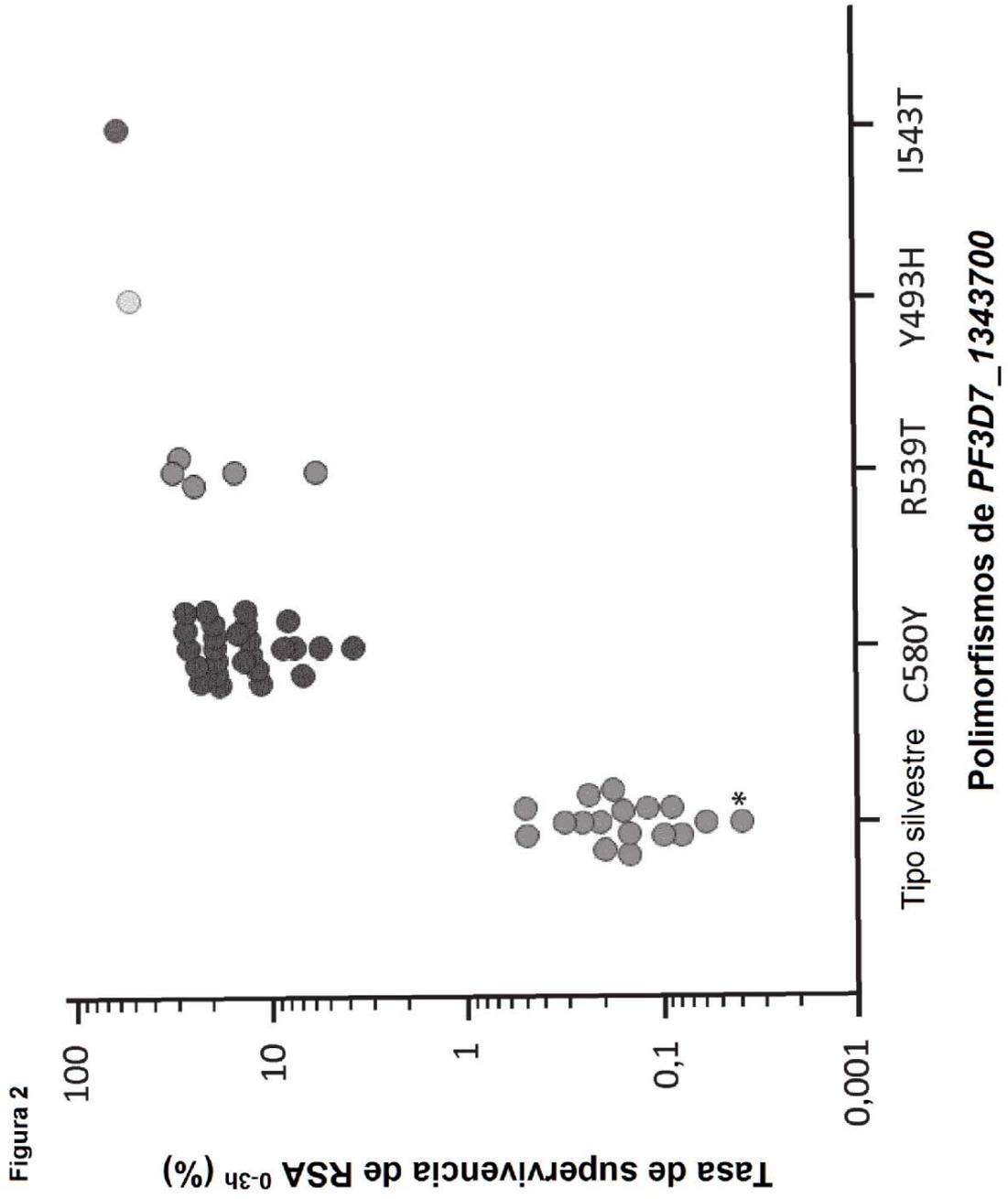
25 22. Derivados de artemisinina o quinina, cloroquinina o mefloquina, para el tratamiento de un paciente infectado con un parásito del género *Plasmodium* que tiene un ácido nucleico o una proteína de hélice K-13 mutado de SNP no sinónimo, en el que dicho paciente se ha detectado *in vitro* por la presencia de un parásito del género *Plasmodium* que contiene un ácido nucleico o una proteína de hélice K-13 mutado con SNP no sinónimo según el método de la reivindicación 17.

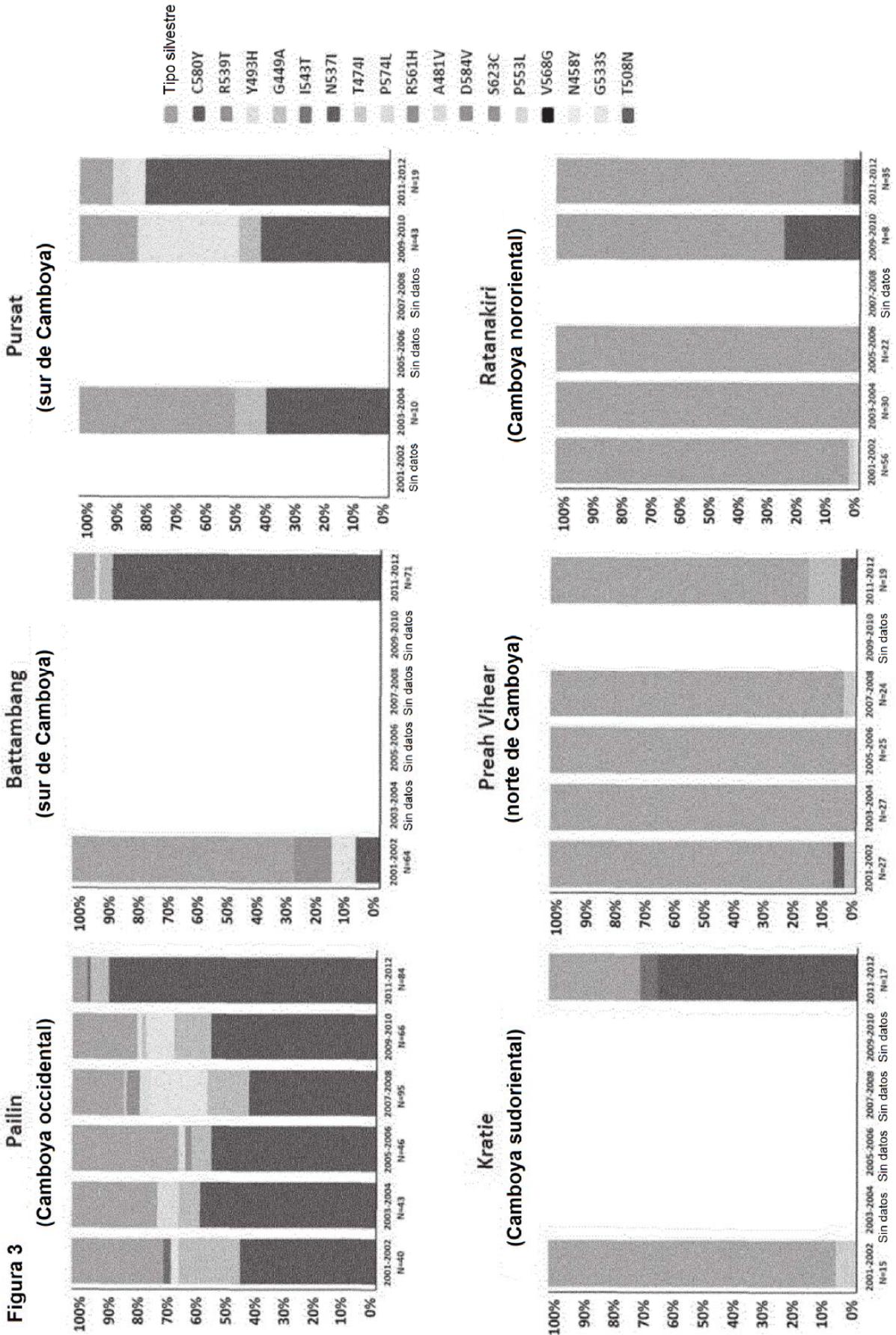
30

23. El método de la reivindicación 17, en el que la sonda está unida a una perla fluorescente y, opcionalmente, comprende además unir la sonda al ácido nucleico del dominio de hélice K13 mutante y detectar el ácido nucleico del dominio de hélice K13 unido con una segunda sonda que se une al ácido nucleico del dominio de hélice K13 unido.

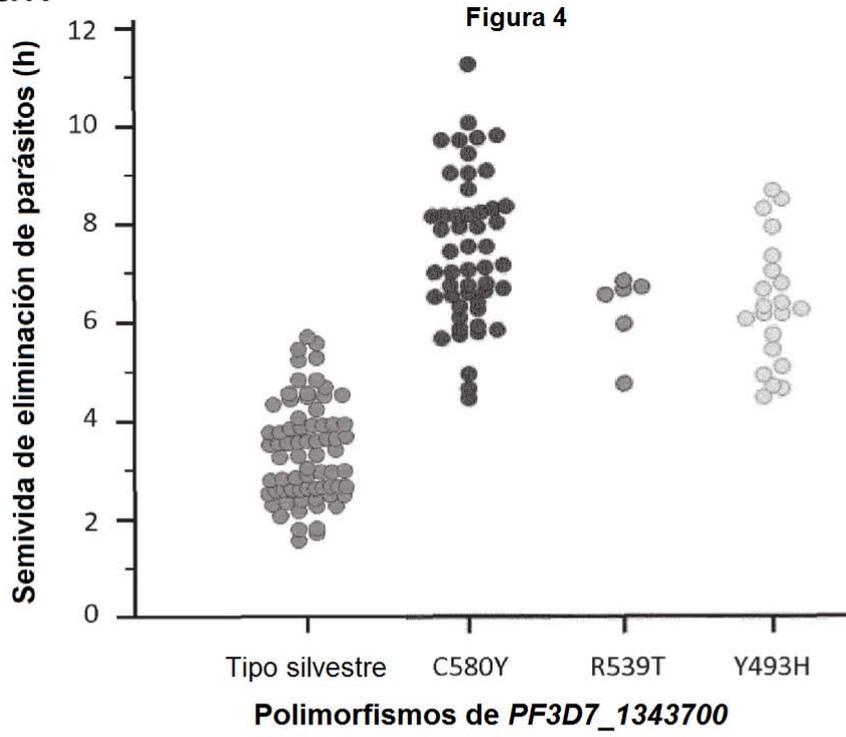
35







Panel A



Panel B

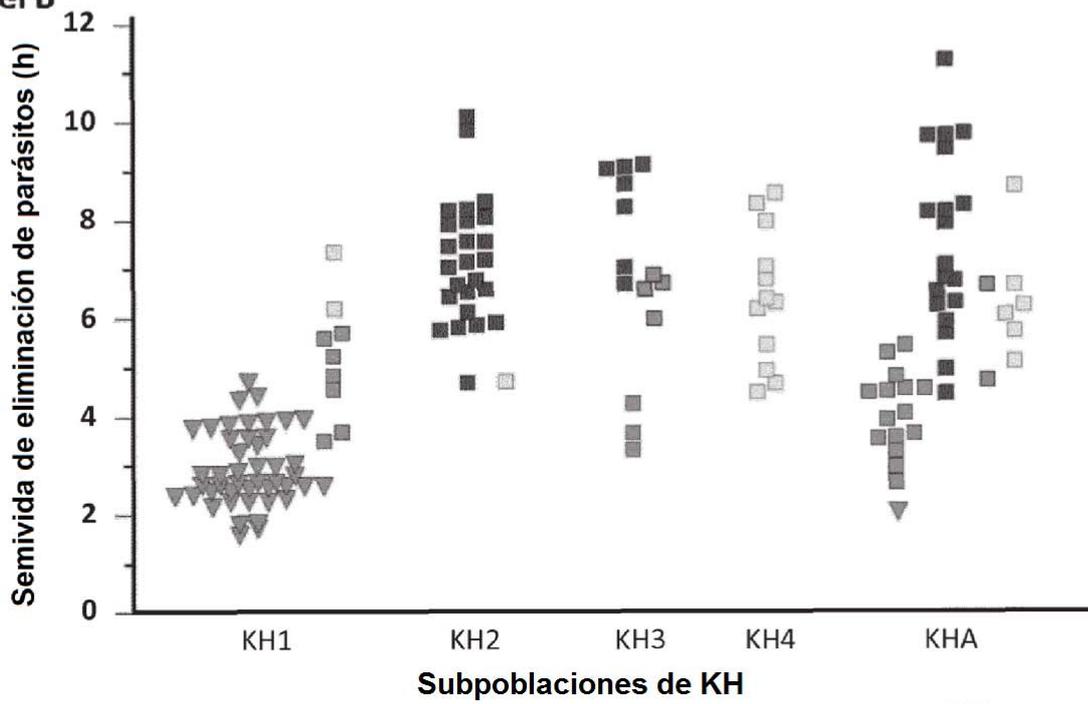
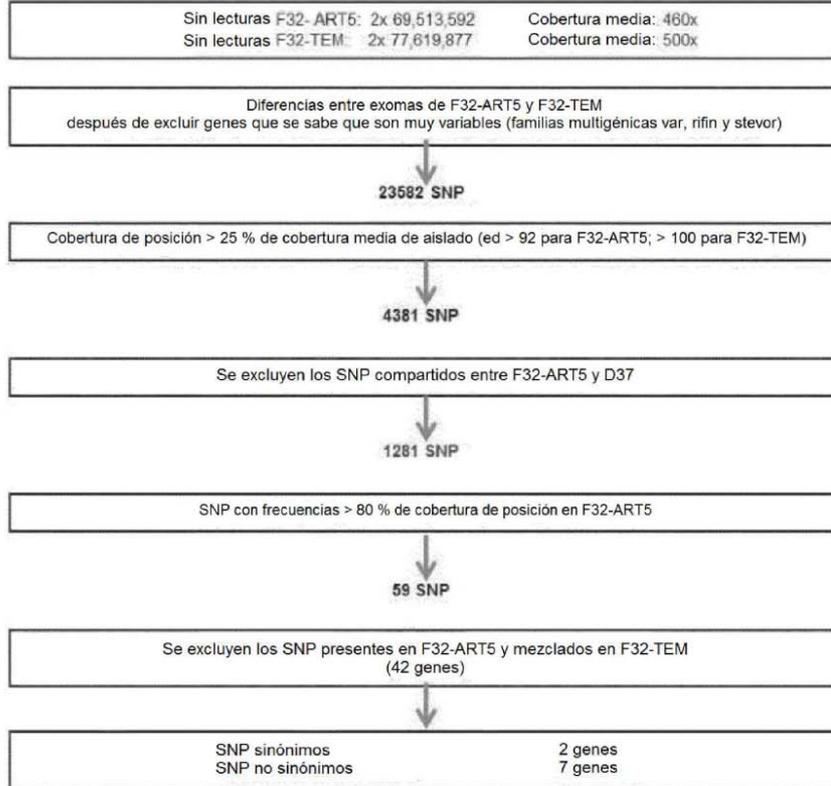


Figura 5

a



b

Cromosoma	Posición	Gen ID	Cobertura	F32-ART5		Cobertura	F32-TEM	
				No hay lecturas con SNP mutante	% de lecturas con SNP mutante		No hay lecturas con SNP mutante	% de lecturas con SNP mutante
1	394452	Supuesta ARN polimerasa 2 dirigida por ADN PF3D7_0110400	224	222	99,11	335	334	99,70
2	542625	Proteína cinasa 7 (PK7) de PF3D7_0213400	242	242	100,00	403	403	100,00
11	593379	Cisteína proteinasa falcipaina 2a de PF3D7_1115700	234	231	98,72	290	289	99,66
13	121689	Antígeno de gameto 27/25 (Pfg27) de PF3D7_1302100	261	259	99,23	343	342	99,71
13	1725570	Supuesta proteína kelch PF3D7_1343700	1004	1004	100,00	1161	1160	99,91
14	2442240	Proteína de <i>Plasmodium</i> conservada de PF3D7_1459600, desconocida	165	142	86,06	225	225	100,00
14	2612177	Proteína de membrana de <i>Plasmodium</i> conservada PF3D7_1464500, desconocida	401	399	99,50	428	428	100,00

RDP de Laos

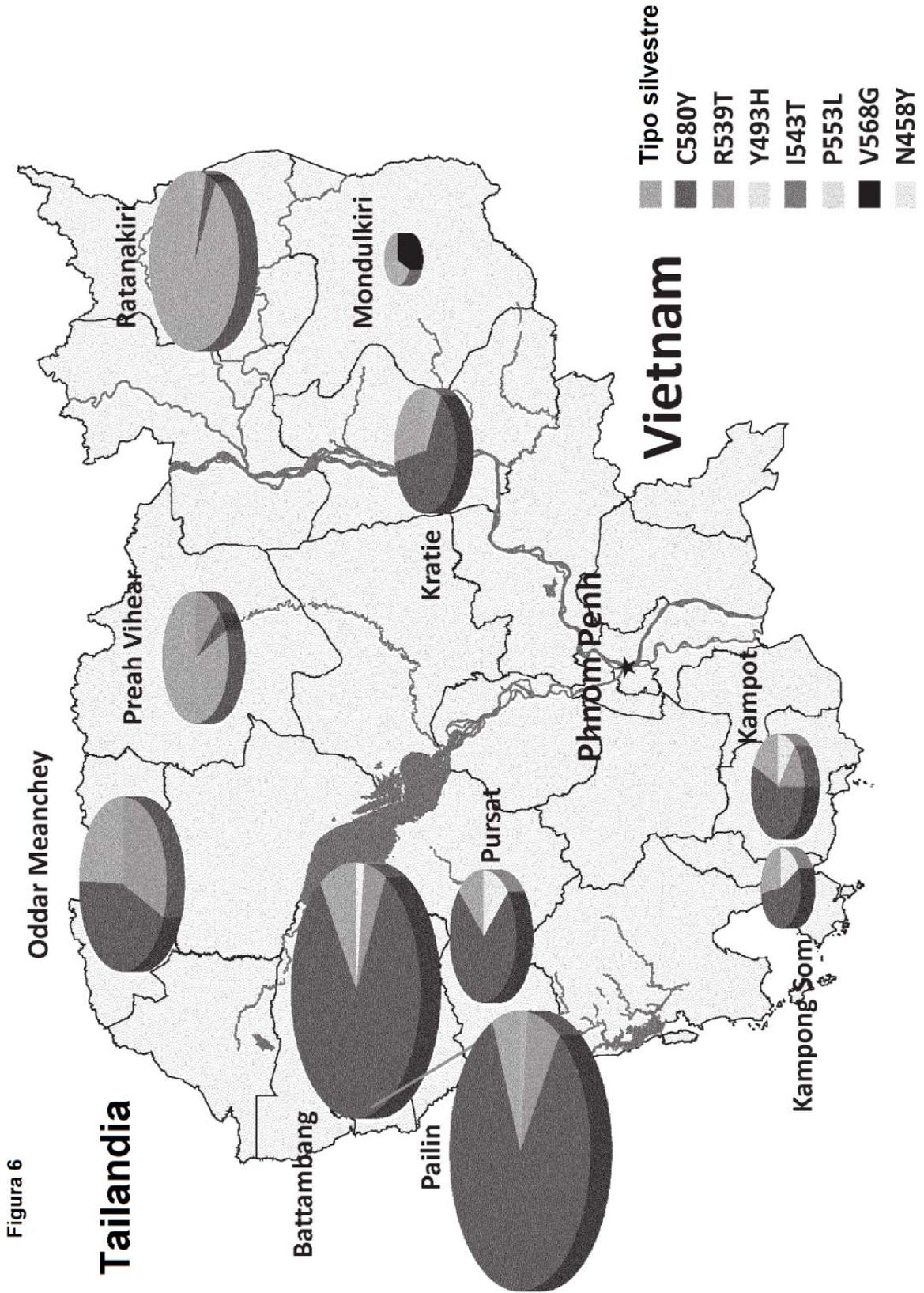


Figura 6

Tailandia

Vietnam

Figura 7

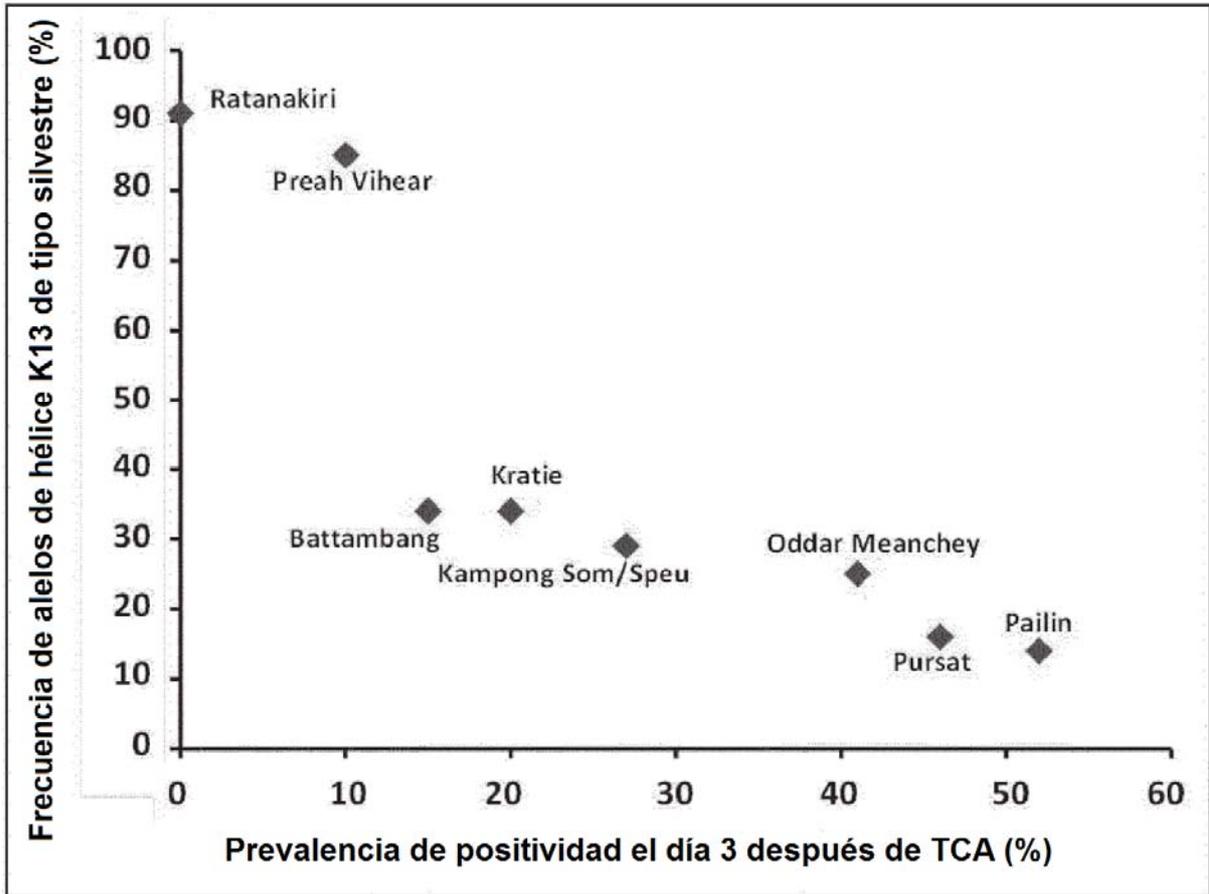
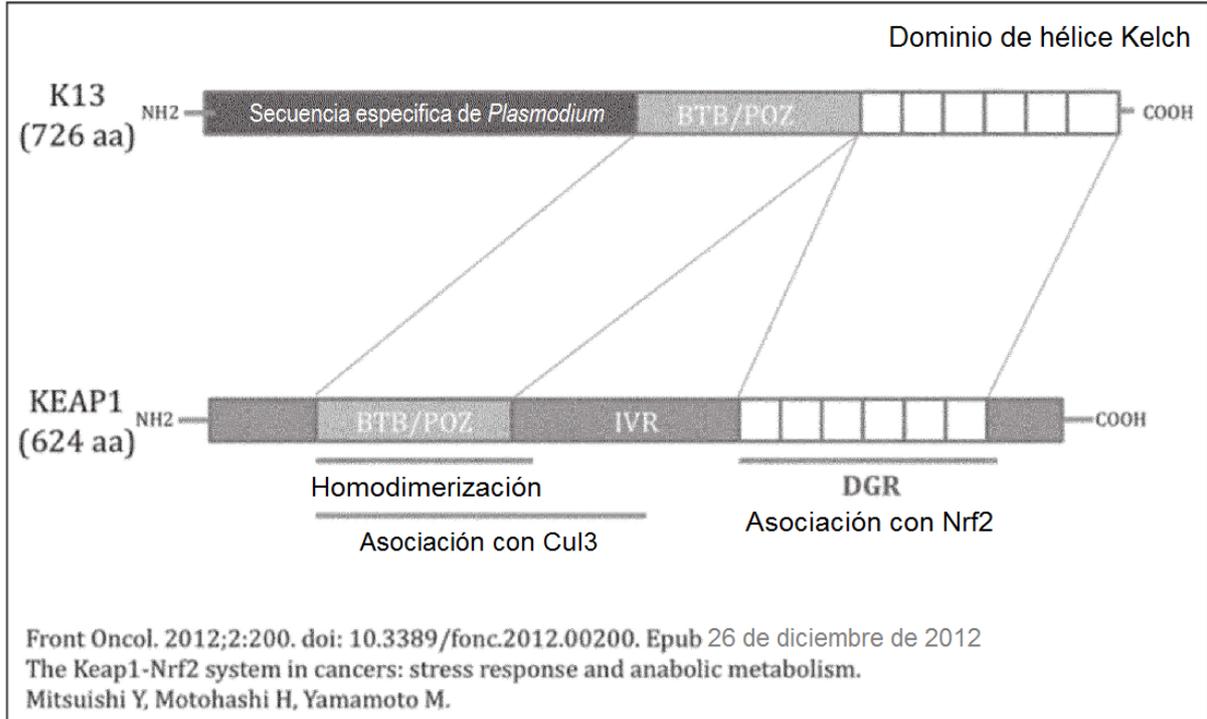


Figura 8

A



B

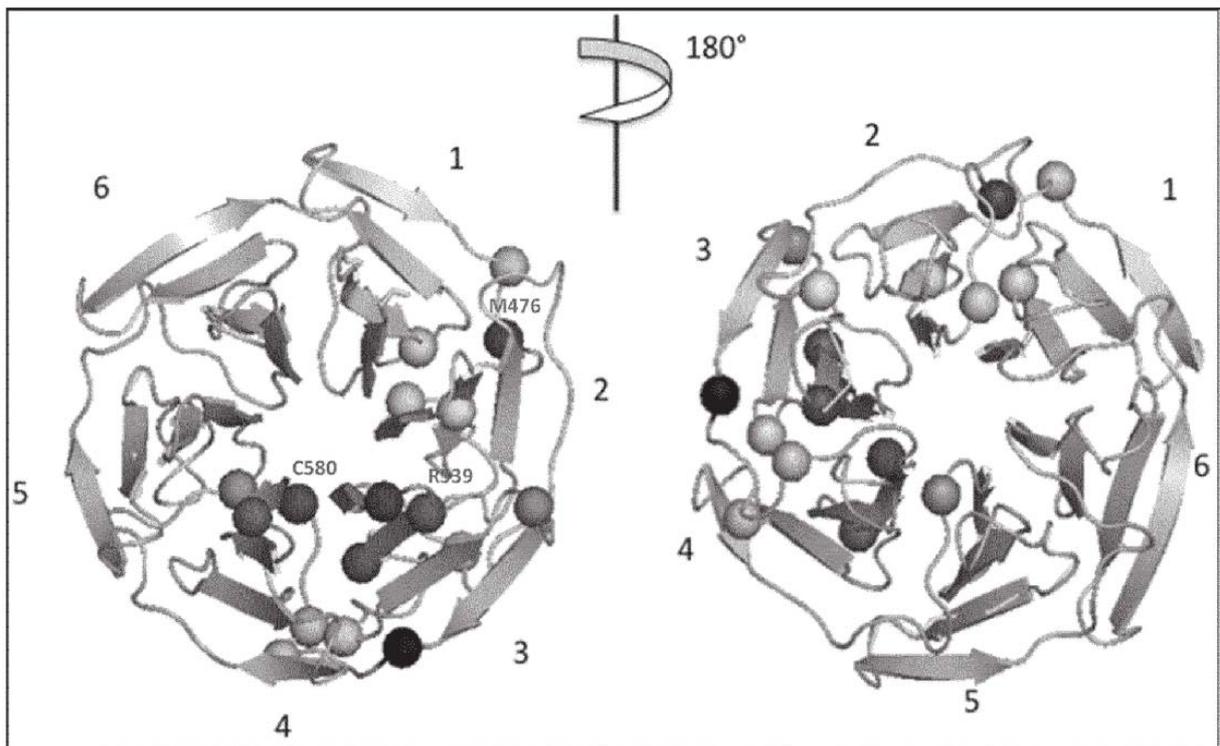


Figura 9A

1 ATG GAA GGA GAA AAA GTA AAA ACA AAA GCA AAT AGT ATC TCG AAT TTT TCT ATG ACG TAT GAT AGG GAA TCT GGT GGT AAC AGC AAT AGT 90
 1 M E G E K V K T K A N S I S N F S M T Y D R E S G G N S N S 30
 91 GAT GAT AAA AGC GGA AGT AGC GAG AAT GAT TCT AAT TCA TTT ATG AAT CTA ACT AGT GAT AAA AAT GAG AAA ACG GAA AAT AAT AGT 180
 31 D D K S G S S E N D S N S F M N L T S D K N E K T E N N S 60
 181 TTC CTT TTA AAT AGT AGT TAT GGA AAT GTT AAA GAT AGC CTA TTA GAA TCC AIT GAT ATG AGT GTA TTA GAT TCG AAC TTT GAT AGT 270
 61 F L L N N S S Y G N V K D S L L E S I D M S V L D S N F D S 90
 271 AAA AAA GAT TTT TTA CCA AGT AAT TTA TCA AGA ACA TTT AAT AAT ATG TCT AAA GAT AAT ATA GGA AAT AAA TAT TTA AAT AAA TTG TTA 360
 91 K K D F L P S N L S R T F N M S K D N I G N K Y L N K L L 120
 361 AAT AAA AAA GAT ACT ATT ACA AAT 450
 121 N K K K D T I T N E N N N I N H N N N N N N L T A N N I T N 150
 451 AAT CTT AAT AAT AAT ATG AAT TCT CCA ATT ATG AAT ACC AAC AAA AAA GAG AAT TTT TTA GAT GCA AAT CTT ATA AAT GAT 540
 151 N L I N N N M N S P S I M N T N K K E N F L D A A N L I N D 180
 541 GAT TCT GGA TTA AAC AAT TTA AAA AAA TTT TCA ACT GTA AAT AAT GTA AAT GAT ACT TAT GAA AAG AAA AAT ATT GAA ACG GAA TTA AGT 630
 181 D S G L N N L K K F S T V N N V N D T Y E K K I I E T E L S 210
 631 GAT GCT AGT GAT TTT GAA AAT ATG GTA GGT GAT TTA AGA ATT ACA TTT AAT TGG TTA AAA AAG ACA CAA ATG AAT TTT ATT CGA GAA 720
 211 D A S D F E N M V G D L R I T F I N W L K K T Q M N F I R E 240
 721 AAA GAT AAA TTA TTT AAA GAT AAG AAA GAA CTA GAA ATG GAA AGA GTA CGA TTG TAC AAA GAA TTA GAA AAC CGT AAA AAT ATT GAA GAA 810
 241 K D K L F K D K K E L E M E R V R L Y K E L E N R K N I E E 270
 811 CAG AAA TTA CAT GAT GAA AGA AAG AAA TTA GAT ATT GAT ATA TCT AAT GGT TAT AAA CAA ATA AAA GAA AAA GAA CAT AGG AAA 900
 271 Q K L H D E R K K L D I D I S N G Y K I K K E K E E H R K 300
 901 CGA TTT GAT GAA GAA AGA TTA AGA TTT TTA CAA GAA ATC GAT AAA ATT AAA TTA GTA TTA TAT TTA GAA AAA GAA AAA TAT TAT CAA GAA 990
 301 R F D E E R L R F L Q E I D K I K L V L Y L E K E K Y Y Q E 30
 991 TAT AAA AAT TTT GAG AAT GAT AAA AAA AAT GAT GCA AAT AAT GCT ACT GAA ACT ATG AAT GAT ATT AAT GTT GGT GGA GCT ATT 1080
 331 Y K N F E N D K K I V D A N I A T E T M I D I N V G G A I 360
 1081 TTT GAA ACA TCT AGA CAT ACC TTA ACA CAA AAA GAT TCA TTT ATA GAG AAA TTA TTA AGT GGA AGA CAT CAT GTA ACC AGA GAT AAA 1170
 361 F E T S R H T L T Q Q K D S F I E K L L S G R H H V T R D K 390
 1171 CAA GGA AGA ATA TTC TTA GAT AGG GAT AGT GAG TTA TTT AGA ATT ATA CTT AAC TTC TTA AGA AAT CCG TTA ACT ATA CCC ATA CCA AAA 1260
 391 Q G R I F L D R D S E L F R I I L N F L R N P L T I P I F K 420

Figura 9B

1261 GAT TTA AGT GAA ACT GAA GCC TTG TTT AAA GAA GAA GAA TTT TAT GGT ATT AAA TTT TTA CCA TTC CCA TTA GTA TTT TGT ATA GGT GGA 1350
 421 D L S E S E A L L K E A E F Y G I K F L P F P L V F C I G G 450

1351 TTT GAT GGT GTA GAA TAT TTA AAT TCG ATG GAA TTA TTA GAT ATT AGT CAA CAA TGC TGG CGT ATG TGT ACA CCT ATG TCT ACC AAA AAA 1440
 451 F D G V E Y L N S M E L L D I S Q C W R M C T P M S T K K 480

1441 GCT TAT TTT GGA AGT GCT GTA TTG AAT AAT TTC TTA TAC GTT TTT GGT AAT AAC TAT GAT TAT AAG GCT TTA TTT GAA ACT GAG GTG 1530
 481 A Y F G S A V L N N F L Y V F G G N N Y D Y K A L F E T E V 510

1531 TAT GAT CGT TTA AGA GAT GTA TGG TAT TTT TCA AGT AAT TTA AAT ATA CCT AGA AGA AAT AAT TGT GGT GFT ACG TCA AAT GGT AGA ATT 1620
 511 Y D R L R D V W Y V S S N L N I P R R N N C G V T S N G R I 540

1621 TAT TGT AAT GGG GGA TAT GAT GGC TCT TCT ATT ATA CCG AAT GTA GAA GCA TAT GAT CAT CCG ATG AAA GCA TGG GTA GAG CTG GCA CCT 1710
 541 Y C L G G Y D G S S I I P N V E A Y D H R M K A W V E V A P 570

1711 TTG AAT ACC CCT AGA TCA TCA GCT ATG TGT GGT TTT GAT AAT AAA ATT TAT GTC ATT GGT GGA ACT AAT GGT GAG AGA TTA AAT TCT 1800
 571 L N T P R S S A M C V A F D N K I Y V I G G T N G E R L N S 600

1801 ATT GAA GTA TAT GAA GAA AAA ATG AAT AAA TGG GAA CAA TTT CCA TAT GCC TTA TTA GAA GCT AGA AGT TCA GGA GCA GCT TTT AAT TAC 1890
 601 I E V Y E E K M N K W E Q F P Y A L L E A R S S G A A F N Y 630

1891 CTT AAT CAA ATA TAT GTT GGA GGT ATT GAT AAT GAA CAT AAC ATA TTA GAT TCC GTT GAA CAA TAT CAA CCA TTT AAT AAA AGA TGG 1980
 631 L N Q I Y V V G G I D N E H N I L D S V E Q Y Q P F N K R W 660

1981 CAA TTT CTA AAT GGT GTA CCA GAG AAA AAA ATG AAT TTT GGA GCT GCC ACA TTG TCA GAT TCT TAT ATA ATT ACA GGA GGA GAA AAT GGC 2070
 661 Q F L N G V P E K K M N F G A A T L S D S Y I I T G G E N G 690

2071 GAA GTT CTA AAT TCA TGT CAT TTC TTT TCA CCA GAT ACA AAT GAA TGG CAG CTT GGC CCA TCT TTA TTA GTT CCC AGA TTT GGT CAC TCC 2160
 691 E V L N S C H F F S P D T N E W Q L G P S L L V P R F G H S 720

2161 GTT TTA ATA GCA AAT ATA TAA 2181
 721 V L I A N I Fin

β1, β2, β3, β4 labels are placed above specific amino acid positions in the sequence.

Figura 10A

F-XP_001350158	1	MEGKVKTKANSISNFSMTYDRESGGNSDDKSGSSSEDSNSFMNLTSDKNEKTENNSSLNNSSYGNVKDSLLESID	80
V-XP_001614215	1	MEGKIKS--NSISNFSVTYERESGANSNSDDKSVSSSENESNSFMNLTSDKNEKTENNSSFILNNSFFANMKDSLLESID	78
C-XP_004223579	1	MEGKIKT--NSISNFSVTYERESGANSNSDDKSVSSSENESNSFMNLTSDKNEKTENNSSFILNNSFFANMKDSFLESID	78
K-XP_002259918	1	MEDEKIKS--NSISNFSVTYERESGANSNSDDKSVSSSENESNSFMNLTSDKNEKTENNSSFILNNSFFANMKDSFLESID	78
B-XP_674094	1	MEDDKIKS--NSISNFSVTYERESGNSNSEERDMSSENESNLYMNLTDGKNEKIEDNS-----SFVNIKDSLLESID	72
Y-XP_730901	1	MEDDKIKS--NSISNFSVTYERESGNSNSEERDMSSENESNLFMNLTDGKNEKIEDNS-----SFVNMKDSLLESID	72
PCHAS_136130	1	MEDDKIKS--NSISNFSVTYERESGNSNSEERDISSDENESNLFMNLTDGKNEKIEDNS-----SFVNMKDSLLESID	72
F-XP_001350158	81	MSVLDSNFDKDFLPSNLSRTPNMSKDNIGNKYLNLKLLNKKKDTITNENNN	165
V-XP_001614215	79	LSVLDSNFDKDFLPSNLSKNFNLSKENLGNKYLNKLLNKSDFMFSKDKD	149
C-XP_004223579	79	LSVLDSNFDKDFLPSNLSKNFNLSKENLGNKYLNKLLNKSDFSIFMSKSKD	149
K-XP_002259918	79	LSILDSNFDKDFLPSNLSKNFNLSKENLGNKYLNKLLNKSDFMFSKDKD	149
B-XP_674094	73	LSVLDSNFDKDFLPSNLSKNFNLSKENLGNKYLNKLLNKSDFMFSKDKD [8] LNVSNNN--LNGNNIV [22] GAP	173
Y-XP_730901	73	LSVLDSNFDKDFLPSNLSKNFNLSKENLGNKYLNKLLNKSDFMFSKDKD [8] LNVSNNN--LNGNNIV [22] GAP	173
PCHAS_136130	73	LSVLDSNFDKDFLPSNLSKNFNLSKENLGNKYLNKLLNKSDFMFSKDKD [8] LNVSNNN--LNGNNIV [22] GAPA	173
F-XP_001350158	166	NKKENFLDA-ANLIN--DDSG-LNNLKKFSTVNVNNDTYEKKIIETELSDASDFENMVGGDLRITFINWLKKTQMNFI	241
V-XP_001614215	150	NKKEGFMDSD-STPINANEDNA-MNNLKKYSNANNINDTYEKKIIETELSDDSDDFENMVGGDLRITFINWLKKTQMNFI	227
C-XP_004223579	150	NKKEGFMDSD-STPINANEDNA-MNNRKKYSNANNINDTYEKKIIETELSDDSDDFENMVGGDLRITFINWLKKTQMNFI	227
K-XP_002259918	150	NRKEGFMDSD-STPINANEDNA-MNNLKKYSNANNINDTYEKKIIETELSDDSDDFENMVGGDLRITFINWLKKTQMNFI	227
B-XP_674094	174	NKKEIFMDSGASSINMNEEDNSTMHNIRIYKNTNNDTYEKKIIETELSDDSDDFENMVGGDLRITFINWLKKTQMNFI	253
Y-XP_730901	174	NKKEIFMDSGASSINMNEEDNSTMHNIRIYKNTNNDTYEKKIIETELSDDSDDFENMVGGDLRITFINWLKKTQMNFI	253
PCHAS_136130	174	NKKEIFMDSGASSINMNDNDTMMHNVKYSNTNNDTYEKKIIETELSDDSDDFENMVGGDLRITFINWLKKTQMNFI	253
F-XP_001350158	242	DKLFDKKELEMERVRLYKELENRKNIEEQKLDHDERKKLDIDI SNGYKQIKKEKEEHRKRFDEERLRFQEIDKIKLIVLY	321
V-XP_001614215	228	DKLFDKKELEMERIRLYKELENRKSIEEQKLDHDERKKLDIDI SNGYKQIKKEKEEHRKRFDEERLRFQEIDKIKLIVLY	307
C-XP_004223579	228	DKLFDKKELEMERIRLYKELENRKSIEEQKLDHDERKKLDIDI SNGYKQIKKEKEEHRKRFDEERLRFQEIDKIKLIVLY	307
K-XP_002259918	228	DKLFDKKELEMERIRLYKELENRKSIEEQKLDHDERKKLDIDI SNGYKQIKKEKEEHRKRFDEERLRFQEIDKIKLIVLY	307
B-XP_674094	254	DKLFDKKELEMERIRLYKELENRKAIEEQKLDHDERKKLDIDI SNGYKQIKKEKEEHRKRFDEERLRFQEIDKIKLIVLY	333
Y-XP_730901	254	DKLFDKKELEMERIRLYKELENRKAIEEQKLDHDERKKLDIDI SNGYKQIKKEKEEHRKRFDEERLRFQEIDKIKLIVLY	333
PCHAS_136130	254	EKLFDKKELEMERIRLYKELENRKNIEEQKLDHDERKKLDIDI SNGYKQIKKEKEEHRKRFDEERLRFQEIDKIKLIVLY	333

Figura 10B

F-XP_001350158	322	LEKEYYQYKFNFDKKKIVDANIATETMIDINVGGAI FETSRHTLTQOKDSFIEKLLSGRHHVTRDKQGRIFLDRDSE	401
V-XP_001614215	308	LEKEYYQYKFNFDKKKIVDANIATETMIDINVGGAI FETSRHTLTQOKDSFIEKLLSGRYHVTRDKQGRIFLDRDSE	387
C-XP_004223579	308	LEKEYYQYKFNFDKKKIVDANIATETMIDINVGGAI FETSRHTLTQOKDSFIEKLLSGRYHVTRDKQGRIFLDRDSE	387
K-XP_002259918	308	LEKEYYQYKFNFDKKKIVDANIATETMIDINVGGAI FETSRHTLTQOKDSFIEKLLSGRYHVTRDKQGRIFLDRDSE	387
PBANKA_135670	334	LEKEYYQYKFNFDKKKIVDANIATETMIDINVGGALFETSRHTLTQOKDSFIEKLLSGRYHITRDKQGRIFLDRDSE	372
Y-XP_730901	334	LEKEYYQYKFNFDKKKIVDANIATETMIDINVGGALFETSRHTLTQOKDSFIEKLLSGRYHITRDKQGRIFLDRDSE	413
PCHAS_136130	334	LEKEYYQYKFNFDKKKIVDANIATETMIDINVGGALFETSRHTLTQOKDSFIEQLLSGRYHITRDKQGRIFLDRDSE	413
F-XP_001350158	402	LFRIILNFLRNPLTIPKDLSESEALLKEAEFYGIKFLPFPPLVFCIGGFDGVEYLN SMELLLDI SQQCWRMCTPMSTKKA	481
V-XP_001614215	388	LFRIILNFLRNPLTIPKDLSESEALLKEAEFYGIKFLPFPPLVFCMGGFDGVEYLN SMELLLDI SQQCWRMCTPMSTKKA	467
C-XP_004223579	388	LFRIILNFLRNPLTIPKDLSESEALLKEAEFY-----VFCMGGFDGVEYLN SMELLLDI SQQCWRMCTPMSTKKA	458
K-XP_002259918	388	LFRIILNFLRNPLTIPKDLSESEALLKEAEFYGIKFLPFPPLVFCMGGFDGVEYLN SMELLLDI SQQCWRMCTPMSTKKA	467
PBANKA_135670	414	LFRIILNFLRNPLTIPKDLGESEALLKEAEFYGIKFLPFPPLVFSIGGFDGVEYLN SMELLLDI SQQCWRMCTPMSTKKA	493
Y-XP_730901	414	LFRIILNFLRNPLTIPKDLGESEALLKEAEFYGIKFLPFPPLVFSIGGFDGVEYLN SMELLLDI SQQCWRMCTPMSTKKA	493
P CHAS_136130	414	LFRIILNFLRNPLTIPKDLGESEALLKEAEYYGIKFLPFPPLVFCIGGFDGVEYLN SMELLLDI SQQCWRMCTPMSTKKA	493
F-XP_001350158	482	YFGSAVLNNFLYVFGGNNYDYKALFETEYVDRLRDVWVSSNINI PRRNNCGVTSNGRIYCI GGYD GSSI IPNVEAYDHR	561
V-XP_001614215	468	YFGSAVLNNFLYVFGGNNYDYKALFETEYVDRLRDTWVSSNINI PRRNNCGVTSNGRIYCI GGYD GSSI IPNVEAYDHR	547
C-XP_004223579	459	YFGSAVLNNFLYVFGGNNYDYKALFETEYVDRLRDTWVSSNINI PRRNNCGVTSNGRIYCI GGYD GSSI IPNVEAYDHR	538
K-XP_002259918	468	YFGSAVLNNFLYVFGGNNYDYKALFETEYVDRLRDTWVSSNINI PRRNNCGVTSNGRIYCI GGYD GSSI IPNVEAYDHR	547
PBANKA_135670	494	YFGSAVLNNFLYVFGGNNYDYKALFETEYVDRLRDTWFLSSNINI PRRNNCGIT SN GRIYCI GGYD GSSI IPNVEAYDHR	573
Y-XP_730901	494	YFGSAVLNNFLYVFGGNNYDYKALFETEYVDRLRDTWFLSSNINI PRRNNCGIT SN GRIYCI GGYD GSSI IPNVEAYDHR	573
PCHAS_136130	494	YFGSAVLNNFLYVFGGNNYDYKALFETEYVDRLRDTWFLSSNINI PRRNNCGIT SN GRIYCI GGYD GSSI IPNVEAYDHR	573
F-XP_001350158	562	MKAWVEIAPLNT PRSSAMCVAFDNKI YVIGGTNGERLINSIEVYEEKMKN WEQ FPYALLEARSSGAAFNYLNQIYVVGID	641
V-XP_001614215	548	MKAWVEIAPLNT PRSSAMCVAFDNKI YVIGGTNGERLINSIEVYDEKMN WEQ FPYALLEARSSGAAFNYLNQIYVVGID	627
C-XP_004223579	539	MKAWVEIAPLNT PRSSAMCVAFDNKI YVIGGTNGERLINSIEVYDEKMN WEQ FPYALLEARSSGAAFNYLNQIYVVGID	618
K-XP_002259918	548	MKAWVEIAPLNT PRSSAMCVAFENKI YVIGGTNGERLINSIEVYDEKMN WEQ FPYALLEARSSGAAFNYLNQIYVVGID	627
PBANKA_135670	574	MKAWIEVAPLNT PRSSAMCVAFDNKI YVWGGANGERLINSIEVYDEKMN WEN FPYALLEARSSGAAFNYLNQIYVVGID	653
Y-XP_730901	574	MKAWIEVAPLNT PRSSAMCVAFDNKI YVWGGANGERLINSIEVYDEKMN WEN FPYALLEARSSGAAFNYLNQIYVVGID	653
PCHAS_136130	574	MKAWIEVAPLNT PRSSAMCVAFDNKI YVIGGANGERLINSIEVYDEKMN WEK FPYALLEARSSGAAFNYLNQIYVVGID	653

Figura 10C

F-XP_001350158	642	NEHNILDSVEQYQPFNKRWQFLNGVPEKKMNFGAATLSDSYIITGGENGVLNSCHFFSPDTNEWQLGPSLLVPRFGHSV	721
V-XP_001614215	628	NEHNILDSVEQYQPFNKRWQFLNGVPEKKMNFGAATLSDSYIITGGENGVLNSCHFFSPDTNEWQIGPSLLVPRFGHSV	707
C-XP_004223579	619	NEHNILDSVEQYQPFNKRWQFLNGVPEKKMNFGAATLSDSYIITGGENGVLNSCHFFSPDTNEWQIGPSLLVPRFGHSV	698
K-XP_002259918	628	NEHNILDSVEQYQPFNKRWQFLNGVPEKKMNFGAATLSDSYIITGGENGVLNSCHFFSPDTNEWQIGPSLLVPRFGHSV	707
PBANKA_135670	654	NEHNILESVEQYQPFNKRWQFLNGIPEKKMNFGATTLSDSYIITGGENGVLNSCHFFSPDTNEWQIGPPLLVPRFGHSV	733
Y-XP_730901	654	NEHNILESVEQYQPFNKRWQFLNGIPEKKMNFGATTLSDSYIITGGENGVLNSCHFFSPDTNEWQIGPSLLVPRFGHSV	733
PCHAS_136130	654	NEHNILESVEQYQPFNKRWQFLNGIPEKKMNFGATTLSDSYIITGGENGVLNSCHFFSPDTNEWQIGPSLLVPRFGHSV	733
F-XP_001350158	722	LIANI	726
V-XP_001614215	708	LIANI	712
C-XP_004223579	699	LIANI	703
K-XP_002259918	708	LIANI	712
PBANKA_135670	734	LVANI	738
Y-XP_730901	734	LVANI	738
PCHAS_136130	734	LVANI	738

Figura 11

1261 GAT TTA AGT GAA AGT GAA GCC TTG TTG AAA GAA GCA GAA TTT TAT GGT ATT AAA TTT TTA CCA TTC CCA TTA GTA TTT TGT ATA GGT GGA 1350
 421 D L S E S E A L L K E A E F Y G I K F L P F L V F C I G G 450

1351 TTT GAT GGT GTA GAA TAT TTA AAT TCG ATG GAA TTA TTA GAT AAT AGT CAA CAA TGC TGG CGT ATG TGT ACA CCT ATG TCT ACC AAA AAA 1440
 451 F D G V E Y L N S M E L L D I S Q Q C W R M C T P M S T K K 480

1441 GCT TAT TTT GGA ACT GCT GTA TTG AAT AAT TTC TTA TAC GTT TTT GGT GGT AAT AAC TAT GAT TAT AAG GCT TTA TTT GAA ACT GAG GTG 1530
 481 A Y F G S A V L N N F L Y V F G G N N Y D Y K A L F E T E V 510

1531 TAT GAT CGT TTA ACA GAT GTA TGG TAT GTT TCA AGT AAT TTA AAT ATA CCT AGA ACA AAT AAT TGT GGT GTT ACG TCA AAT GGT AGA ATT 1620
 511 Y D R L R D V W Y V S S N L N I P R R N N C G V T S N G R I 540

1621 TAT TGT ATT GGG GCA TAT GAT GGC TCT TCCT ATT ATA CCG AAT GTA GAA GCA TAT GAT CAT CAT CGT ATG AAA GCA TGG GTA GAG GTG GCA CCT 1710
 541 Y C I G G Y D G S S I I P N V E A Y D H R M K A W V E V A P 570

1711 TTG AAT ACC CCT ACA TCA TCA GCT ATG TGT GTT GCT TTT GAT AAT AAA ATT TAT GTC ATT GGT GCA ACT AAT GGT GAG ACA TTA AAT TCT 1800
 571 L N T P R S S A M C V A F D N K I Y V I G G T N G E R L N S 600

1801 AAT GAA GTA TAT GAA GAA AAA ATG AAT AAA TGG GAA CAA TTT CCA TAT GCC TTA TTA GAA GCT AGA AGT TCA GGA GCA GCT TTT AAT TAC 1890
 601 I E V Y E E K M N K W E Q F P Y A L L E A R S S G A A F N Y 630

1891 CTT AAT CAA ATA TAT GTT GGA GGT ATT GAT AAT GAA CAT AAC ATA TTA GAT TCC GTT GAA CAA TAT CAA CCA TTT AAT AAA AGA TGG 1980
 631 L N Q I Y V V G G I D N E H N I L D S V E Q Y Q P F N K R W 660

1981 CAA TTT CTA AAT GGT GTA CCA GAG AAA AAA ATG AAT TTT GGA GCT GCC ACA T L S D S Y I I T G G E N G 2070
 661 Q F L N G V P E K K M N F G A A T L S D S Y I I T G G E N G 690

2071 GAA GTT CTA AAT TCA TGT CAT TTC TTT TCA CCA GAT ACA AAT GAA TGG CAG CTT GGC CCA TCT TTA TTA GTT CCC AGA TTT GGT CAC TCC 2160
 691 E V L N S C H F F S P D T N E W Q L G P S L L V P R F G H S 720

2161 GTT TTA ATA GCA AAT ATA TAA 2181
 721 V L I A N I Fin

Fig. 12A

GCCTTGTTGAAAGAAGCAGAATTTATGGTATTAATAATTTTACCATTCCCATTAGTATTTTGTATAGGTTGGATTTGATGGTGAGAAATATTTAAAT
CGATGGAATTTATAGATATTAGTCAACAATGCTGGCGTATGTGTACACCTATGTCTACCAAAAAAGCTTATTTTGGAAAGTGTGATTTGAATAAATTT
CTTATACGTTTTTGGTGGTAAATAACTATGATTTATAAGGCTTTTATTTGAAACTGAGGTGTATGATCGTTTAAGAGATGTATGGTATGTTTCAAGTAAAT
 TTAATAATACCTAGAAAGAAATAATTTGGTGTACGTCAAATGGTAGAATTTTATTTGTAATGGGGGATATGATGGCTCTTCTATTATACCGAATGTAG
 AAGCATATGATCATCGTATGAAAGCATGGGTAGAGGTTGGCACCTTTGAATACCCCTAGATCATCAGCTATGTGTGTGCTTTTGGATAATAAAAAATTTA
TGTCATGGTGGAACTAATGGTGAGAGATTAAATTTCTATTGAAGTATATGAAGAAAAAATGAATAAATGGGAACAATTTCCATATGCCCTTATTAGAA
 GCTAGAAGTTTCAGGAGCAGCTTTTAAATTACCCTTAAATCAAATATATGTTGTTGGAGGTATTGATAAATGAACATAACATATTAGATTCCGTTGAACAAAT
ATCAACCAATTTAAATAAAGATGGCAATTTCTAAATGGTGTACCAGAAAAAATGAAATTTTGGAGCTGCCACATGTCAGATTCTTATATAAATTAC
 AGGAGGAGAAAAATGGCGAAGTTCTAAAATTCATGTCAATTTCTTTTACCAGATACAAAATGAATGGCAGCTTGGC

Fig. 12B

PCR1 (TAMAÑO DE LA SECUENCIA: 265)
AGGTGGATTTGATGGGTAGAAT
CATACACCTCAGTTTCAAATAAAGC

PCR2 (TAMAÑO DE LA SECUENCIA: 235)
AATTTCTTATACGTTTTTGGGTAA
CTCTACCCATGCTTTCATACGAT

PCR3 (TAMAÑO DE LA SECUENCIA: 204)
GGATATGATGGCTCTTCTATTATACCG
ACTTCAATAGAAATTTAATCTCTCACCA

PCR4 (TAMAÑO DE LA SECUENCIA: 231)
ATGTCATTTGGTGGAACATAATGGT
TTAAATGGTTGATATTGTTCAACG

PCR5 (TAMAÑO DE LA SECUENCIA: 279)
TTCAGGAGCAGCTTTTAAATTACC
CTGGTGAAAAGAAATGACATGAA

PCR6 (TAMAÑO DE LA SECUENCIA: 188)
CCTTGTTGAAAGAAGCAGAAATTTT
ATTCAATACAGCAGTTCCTCAAATAA

