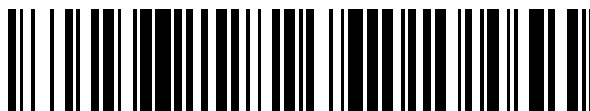


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 744 709**

51 Int. Cl.:

A61K 39/008 (2006.01)

C07K 1/113 (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.08.2013** **PCT/US2013/057430**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.03.2014** **WO14036349**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.08.2013** **E 13760212 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.04.2019** **EP 2890392**

54 Título: **Expresión de una proteína quimérica KSAC y procedimiento de producción de proteínas solubles a alta presión**

30 Prioridad:

30.08.2012 US 201261694968 P
03.06.2013 US 201361830425 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
26.02.2020

73 Titular/es:

BOEHRINGER INGELHEIM ANIMAL HEALTH USA INC. (100.0%)
3239 Satellite Boulevard, Bldg. 500
Duluth, GA 30096, US

72 Inventor/es:

FISCHER, LAURENT BERNARD;
CARBOULEC, NICOLAS PIERRE YVES y
LUX, FABIEN

74 Agente/Representante:

SALVÀ FERRER, Joan

ES 2 744 709 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

Expresión de una proteína quimérica KSAC y procedimiento de producción de proteínas solubles a alta presión

REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

[0001] Esta solicitud reivindica el beneficio de la solicitud provisional de Estados Unidos nº de serie 61/694.968, presentada el 30 de agosto de 2012 y la solicitud provisional de Estados Unidos nº de serie 61/830.425, presentada el 3 de junio de 2013.

CAMPO DE LA INVENCION

[0002] La presente invención se refiere a formulaciones para combatir las infecciones por *Leishmania* en animales o seres humanos. Específicamente, la presente descripción proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden un antígeno de *Leishmania* quimérico y un procedimiento de vacunación contra la *Leishmania*. La presente invención también se refiere a procedimientos para producir proteínas solubles o desagregadas utilizando alta presión.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

[0003] La leishmaniasis es una enfermedad parasitaria importante y grave que afecta a los humanos, caninos, y en menor grado, los felinos.

[0004] Los subgéneros *Leishmania* y *Viannia* se agrupan en complejos de especies y subespecies en base a similitudes moleculares, bioquímicas e inmunológicas. Hay varias formas de la enfermedad denominadas por su presentación clínica, incluyendo leishmaniasis cutánea, mucocutánea o visceral. Cada una de estas formas de la enfermedad es causada por diferentes especies de moscas de la arena que se encuentran en diferentes regiones del mundo. La leishmaniasis cutánea de los seres humanos se asocia con miembros de los complejos de *L. aethiopica*, *L. major* y *L. tropica* en el Viejo Mundo y los complejos de *L. mexicana* y *L. braziliensis* en el Nuevo Mundo. La leishmaniasis visceral es causada por *L. donovani* y *L. infantum* en las regiones del Viejo Mundo, mientras que *L. chagasi* es el principal responsable de la enfermedad visceral en el Nuevo Mundo. Debido a que *L. infantum* es el agente primario asociado con la leishmaniosis canina, las infecciones en perros a menudo son consideradas como viscerales, a pesar de que tienden a producir una enfermedad visceral y cutánea.

[0005] El agente de la leishmaniasis visceral es un parásito protozoario y pertenece al complejo *Leishmania donovani*. Este parásito se distribuye ampliamente en los países de clima temperado y subtropical del sur de Europa, África, Asia, América del Sur y América Central (Desjeux P. et al, 1984, Nucl Acids Res., 12: 387-395). La *Leishmania donovani infantum* (*L. infantum*) es responsable de la enfermedad felina y canina en el sur de Europa, África y Asia. En América del Sur y América Central, el agente es *Leishmania donovani chagasi* (*L. chagasi*), que está estrechamente relacionado con *L. infantum*. En los seres humanos, el agente es *Leishmania donovani donovani* (*L. donovani*), que también está relacionado con *L. infantum* y *L. chagasi*.

[0006] La leishmaniosis es una enfermedad lentamente progresiva que puede tomar hasta 7 años en resultar clínicamente evidente (McConkey SE et al, 2002, Vet Canine J. 43: 607-609). Incluso entonces, los signos son inespecíficos y con frecuencia un diagnóstico de *Leishmania* raramente se considera. Los perros se infectan con más frecuencia con *L. infantum* (complejo de *L. donovani*), que es responsable de la enfermedad viscerotrópica en personas. Sin embargo, hasta el 90% de los perros infectados presentes con lesiones viscerales y cutáneas (Slappendel RJ et al, 1998, en Greene CE: Infectious Diseases of the Dog and Cat, págs. 450-458). Por otro lado, muchos perros parecen resistentes a este parásito de forma natural y pueden permanecer asintomáticos a pesar de la infección conocida (Grosjean NL et al, 2002, Vet Rec. 150: 241-244). Se estima que sólo el 10% de los perros que residen en áreas endémicas en realidad desarrollan la enfermedad clínica (Lindsay DS et al, 2002, Compend Cont Educ Pract Vet. 24: 304-312). Esta menor incidencia de la enfermedad clínica se atribuye a una predisposición genética de ciertos perros de generar una respuesta inmunitaria mediada por células más protectora que una respuesta humoral (Lindsay DS et al., McConkey SE et al., Slappendel RJ, et al.). Además, se ha descrito que hasta el 20% de los perros infectados pueden generar una respuesta inmunitaria adecuada y recuperarse espontáneamente de la enfermedad clínica (McConkey SE et al.). En los animales que desarrollan una respuesta humoral, IgG1 parece correlacionarse con la enfermedad clínica, mientras que los perros asintomáticos tienen niveles de anticuerpos IgG2 más altos (Lindsay et al.).

[0007] Algunos de los signos clínicos descritos más frecuencia de la leishmaniasis incluyen apatía, fatiga e intolerancia al ejercicio junto con la anorexia y la pérdida de peso que finalmente culminan como enfermedad de desgaste (McConkey SE et al.). Estos signos pueden estar acompañados o no de fiebre, linfadenopatía local o generalizada (90%) y/o hepatoesplenomegalia (Grosjean NL et al, 2003, J Am Vet Med Assoc 222: 603-606; Lindsay DS et al, McConkey SE et al.; Martínez-Subiela S et al, 2002, Vet Rec 150: 241-244). La afectación articular también es bastante común y puede presentarse como cojera con articulaciones hinchadas o simplemente como un modo de andar rígido. Hallazgos menos comunes incluyen lesiones oculares (<5%), diarrea crónica (30%) y uñas quebradizas

deformadas largas (20%) que se refieren como onicogrifosis (Lindsay DS et al., Slappendel RJ et al.). Las lesiones cutáneas están presentes en hasta el 89% de los perros infectados, con o sin signos evidentes de afectación visceral. Las lesiones de la leishmaniasis cutánea pueden aparecer en cualquier parte del cuerpo, pero los sitios más comunes son los que están expuestos al medio ambiente y, por tanto, son más susceptibles a las picaduras de las moscas de la arena. La pápula inicial da lugar rápidamente a una úlcera. La leishmaniasis visceral es invariablemente fatal si no se trata rápidamente. La leishmaniasis visceral afecta a los órganos internos del cuerpo, específicamente el bazo y el hígado.

[0008] Los perros son considerados el principal reservorio de Leishmaniasis. La enfermedad se caracteriza por la evolución crónica de signos víscero-cutáneos que aparecen en menos del 50% de los animales infectados (Lanotte G. et al, 1979, Ann Parasitol Hum Comp. 54: 277-95). Tanto los perros asintomáticos como los sintomáticos con anticuerpos detectables pueden ser infecciosos (Molina R. et al, 1994, Trans R. Soc Med Hyg 88: 491-3; Courtenay O. et al, 2002, J. Infect. Dis., 186: 1314-1320). Los gatos también pueden ser portadores de los parásitos protozoos y por lo tanto se consideran reservorios secundarios potenciales.

[0009] Debido a una serie de factores, las opciones de tratamiento para la leishmaniasis en perros y respuesta a la terapia son, como mucho, limitadas. Por alguna razón no definida, la leishmaniasis visceral es más difícil de tratar en perros que en los seres humanos. Ninguna opción de tratamiento es 100% eficaz en la limpieza de la infección parasitaria y la enfermedad clínica a menudo vuelve a aparecer con el cese de la terapia (Lindsay DS et al.). En áreas endémicas, el régimen de tratamiento más común ha sido una combinación de alopurinol con un antimonial pentavalente, tal como antimoniato meglumina o estibogluconato de sodio (Lindsay DS et al., Slappendel RJ et al.). Sin embargo, en los últimos años este protocolo ha perdido popularidad debido a la creciente resistencia del parásito al fármaco, así como los efectos secundarios adversos asociados con estos compuestos (Lindsay DS et al.). Para limitar más las opciones de tratamiento, el PENTOSTAM® (estibogluconato de sodio) es el único antimonial disponible en los Estados Unidos y su distribución está regulada por los Centros para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC) en Atlanta, GA (DS Lindsay et al.). Otras investigaciones han buscado procedimientos de identidad de la prevención y el tratamiento de la leishmaniasis a través de, por ejemplo, la administración de polipéptidos de fusión antigénicos (véase el documento US 2009/0291099).

[0010] Se han intentado protocolos diferentes, pero no han demostrado ser más eficaces en la limpieza de la infección parasitaria o en la prevención de la recaída clínica. Además, cada protocolo se asocia con efectos adversos potenciales. La anfotericina B se une a esteroides y altera la permeabilidad de la membrana celular, pero es nefrotóxica (Lindsay DS et al.). Cuando se administra parenteralmente, la paramomicina actúa sinérgicamente con los antimoniales causando niveles más altos de antimonial durante períodos más largos de tiempo, pero también es nefrotóxica y actualmente no se recomienda para el uso clínico (Lindsay DS et al.). El isetionato de pentamidina es eficaz contra la leishmaniasis, pero requiere al menos 15 inyecciones intramusculares y es bastante doloroso (Lindsay DS et al.). Ketoconazol, miconazol, fluconazol e itraconazol son medicamentos orales que pueden ser útiles en contener la enfermedad, pero que tienen un coste prohibitivo y llevan el riesgo de resistencia a los medicamentos cuando se tratan pacientes sintomáticamente. En resumen, los diversos regímenes de tratamiento para la leishmaniasis en perros han sido investigados, pero no son 100% eficaces; las recaídas son la regla más que la excepción. En última instancia, el médico veterinario se enfrenta al dilema de tratar los brotes sintomáticos de la leishmaniasis en perros en riesgo de desarrollar cepas resistentes a los medicamentos de este parásito dentro de los Estados Unidos.

[0011] La detección masiva de perros seropositivos, seguido de sacrificio y/o tratamiento con fármacos, o la aplicación de masa de collares impregnados con deltametrina, demostró que tenía un impacto en la reducción de la prevalencia de leishmaniosis humana y canina en áreas endémicas del sur de Europa, África, y Asia (Maroli M. et al, 2001, Med Vet Entomol 15: 358-63; Mazloui Gavani AS et al, 2002, Lancet 360: 374-9), aunque se ha debatido la eficacia de la eliminación de caninos seropositivos (Dietze R. et al, 1997, Clin Infect Dis 25: 1240-2; Moreira Jr. ED et al, 2004, Vet Parasitol 122: 245-52). Estas medidas de control se consideran inaceptables, caras o no eficaces (Gradoni L. et al, 2005, Vaccine, 23: 5245-51).

[0012] Los modelos matemáticos utilizados para comparar la eficacia de diversas herramientas para el control de la Leishmaniasis sugieren que una vacuna canina puede ser el procedimiento más práctico y eficaz (Dye C., 1996, Am J. Trop Med Hyg 55: 125- 30). Por lo tanto, el desarrollo de vacunas capaces de proteger a los caninos de la leishmaniasis y/o para prevenir la progresión de la enfermedad en animales infectados es muy deseable para la implementación de programas de control de la leishmaniasis, así como para la comunidad veterinaria (Gradoni L. et al.).

[0013] Haynes et al. (Biotechnol. Prog., 2010, Vol. 26, No. 3, 743-749) describen el uso de alta presión hidrostática para lograr una alta solubilidad y altos rendimientos de replegamiento de la hormona del crecimiento (GH) producida en los cuerpos de inclusión de E. coli. Los documentos US 6,489,450, US7,064,192, US7,767,795 y US7,615,617 describen revertir la agregación y aumentar el replegamiento de proteínas desnaturalizadas mediante aplicación de alta presión.

[0014] Sigue existiendo la necesidad de procedimientos eficaces y eficientes para producir vacunas de subunidades

(proteína) para el tratamiento de Leishmania. La formulación de vacunas y el procedimiento de producir tal vacuna de la presente descripción satisfacen esta necesidad en el estado de la técnica.

CARACTERÍSTICAS DE LA INVENCION

[0015] La presente invención demostró por primera vez que una proteína KSAC quimérica expresada en cuerpos de inclusión de *E. coli* se solubilizó sustancialmente y se replegó después del tratamiento a alta presión.

[0016] La presente invención mostró el resultado sorprendente de que la aplicación de un incremento escalonado de la presión acoplado con el tratamiento prolongado de cuerpos de inclusión bajo alta presión produjo un alto rendimiento de proteínas solubles, disgregadas, replegadas y activas.

[0017] Se proporcionan composiciones y vacunas que comprenden la proteína KSAC quimérica. Tales vacunas o composiciones se pueden utilizar para vacunar un animal y proporcionar protección contra la leishmaniasis. La proteína KSAC puede expresarse en cuerpos de inclusión de *E. coli* y posteriormente se solubiliza mediante tratamiento a alta presión. La proteína KSAC posee propiedades inmunogénicas y protectoras.

[0018] Los procedimientos de la invención incluyen procedimientos para la fabricación y la producción de proteínas solubles expresadas en procariotas o eucariotas que comprenden las etapas de

(i) preparar cuerpos de inclusión en un tampón que no comprende o comprende una baja concentración de urea para formar una suspensión de cuerpos de inclusión, en el que la concentración de urea es de 0 M a 3 M;

(ii) someter la suspensión de cuerpos de inclusión a un incremento escalonado de la presión durante un período de tiempo; y

(iii) mantener una presión elevada aplicada a los cuerpos de inclusión durante un período de tiempo, preferiblemente en el que la alta presión está en el intervalo de aproximadamente 2000 bar a aproximadamente 5000 bar.

Los procedimientos descritos en el presente documento también incluyen los procedimientos de uso que incluyen administrar a un animal una cantidad eficaz de la proteína KSAC antigénica del mismo para provocar una respuesta inmunogénica protectora.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0019] La siguiente descripción detallada, proporcionada a modo de ejemplo, y que no pretende limitar la invención a realizaciones específicas descritas, puede entenderse conjuntamente con las figuras adjuntas, en las que:

La Figura 1 es una tabla que muestra la SEQ ID NO asignada a cada secuencia de ADN y proteína.

Las figuras 2A-2C muestran las secuencias de ADN y proteínas.

La Figura 3 es una representación gráfica de la presión y el tiempo de tratamiento de cuerpos de inclusión de KSAC.

La Figura 4 es una representación esquemática de la comparación entre el replegamiento con un tratamiento a alta presión y con cromatografía clásica.

La Figura 5 es la representación gráfica del procedimiento de replegamiento de KSAC.

La Figura 6 representa la SDS-PAGE de KSAC replegada mediante cromatografía de exclusión.

La Figura 7 representa el diagrama de HPLC de KSAC replegada mediante cromatografía de exclusión.

Las figuras 8A y 8B representan la dispersión de luz dinámica (DLS) de la proteína KSAC replegada usando cromatografía de exclusión.

La Figura 9 representa la transferencia Qdot de muestras de KSAC tratadas con 3000 bar.

La Figura 10 representa la SDS-PAGE de muestras de KSAC tratadas con 3000 bar.

La Figura 11 representa la HPLC de muestras de control y KSAC solubilizada después de un tratamiento con 3000 bar.

La Figura 12 representa el cromatograma de HPLC superpuesto del sobrenadante de las muestras de KSAC tratadas con 3000 bar de presión y la proteína KSAC obtenida con el procedimiento de replegamiento clásico.

La Figura 13 representa la superposición de los datos de DLS obtenidos con la proteína presurizada a 3000 bar en el tampón sin urea y la proteína obtenida con el procedimiento de replegamiento clásico.

La Figura 14 muestra el efecto de la presión y tampón en los tamaños de las proteínas.

La Figura 15 representa el cromatograma de HPLC de muestras tratadas con 4000 bar.

La Figura 16 muestra la distribución de tamaño por DLS en número de las muestras tratadas con 5000 bar sin urea.

La Figura 17 muestra la comparación del contenido de proteína soluble KSAC determinado mediante HPLC y transferencia Qdot.

Figuras 18A y 18B muestran el análisis SDS-PAGE de muestras de KSAC después de los tratamientos a alta presión.

Las figuras 19A-19D muestran el análisis de transferencia Q-Dot de muestras de KSAC después de los tratamientos a alta presión.

La Figura 20 representa el análisis HPLC de muestras de KSAC después del tratamiento con el procedimiento A.

La Figura 21 representa el análisis HPLC de muestras de KSAC después del tratamiento con el procedimiento B.

La Figura 22 representa el análisis HPLC de muestras KSAC después del tratamiento con el procedimiento A, procedimiento B y procedimiento clásico.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

[0020] Se observa que en esta descripción y particularmente en las reivindicaciones, términos, tales como "comprende", "comprendido", "que comprende" y similares pueden tener el significado que se le atribuye en la ley de Patentes de Estados Unidos; por ejemplo, pueden significar "incluye", "incluido", "que incluye", y similares; y que términos, tales como "que consiste esencialmente en" y "consiste esencialmente en" tienen el significado que se les atribuye en la ley de patentes de Estados Unidos, por ejemplo, permiten elementos no citados de manera explícita, pero excluyen elementos que se encuentran en la técnica anterior o que afectan una característica básica o novedosa de la invención.

[0021] A menos que se indique lo contrario, los términos técnicos se usan de acuerdo con el uso convencional. Las definiciones de términos comunes en biología molecular pueden encontrarse en Benjamin Lewin, Genes V. publicado por Oxford University Press, 1994 (ISBN 0-19-854287-9); Kendrew et al. (eds.), The Encyclopedia of Molecular Biology, publicado por Blackwell Science Ltd., 1994 (ISBN 0-632-02182-9); y Robert A. Meyers (ed.), Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference, publicado por VCH Publishers, Inc., 1995 (ISBN 1-56081-569-8). Los términos singulares "un", "una" y "el/la" incluyen los referentes plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Del mismo modo, la palabra "o" pretende incluir "y" a menos que el contexto indique claramente lo contrario. La palabra "o" significa cualquier miembro de una lista en particular y también incluye cualquier combinación de los miembros de esa lista.

[0022] El término "animal" se utiliza en el presente documento para incluir todos los mamíferos, aves y peces. El animal tal como se usa en el presente documento se puede seleccionar del grupo que consiste en equino (por ejemplo, caballo), canino (por ejemplo, perros, lobos, zorros, coyotes, chacales), felino (por ejemplo, leones, tigres, gatos domésticos, gatos salvajes, otros gatos grandes, y otros felinos incluyendo guepardos y lince), bovino (por ejemplo, ganado), porcino (por ejemplo, cerdo), ovino (por ejemplo, ovejas, cabras, llamas, bisontes), aviar (por ejemplo, pollo, pato, ganso, pavo, codorniz, faisán, loro, pinzones, halcón, cuervo, avestruz, emu y casuario), primate (por ejemplo, prosimio, tarsio, mono, gibbon, simio), seres humanos, y peces. El término "animal" también incluye un animal individual en todas las etapas del desarrollo, incluyendo etapas embrionarias y fetales.

[0023] Los términos "polipéptido" y "proteína" se utilizan indistintamente en este documento para referirse a un polímero de residuos de aminoácidos consecutivos.

[0024] Los términos "ácido nucleico", "nucleótido", y "polinucleótido" se usan indistintamente y se refieren a ARN, ADN, ADNc o ARNc y derivados de los mismos, tales como los que contienen cadenas principales modificadas. Se debe entender que la descripción proporciona polinucleótidos que comprenden secuencias complementarias a las descritas en el presente documento. El "polinucleótido" contemplado en la presente descripción incluye tanto la cadena directa (5' a 3') como la cadena complementaria inversa (3' a 5'). Los polinucleótidos según la descripción se pueden preparar de diferentes maneras (por ejemplo, mediante síntesis química, por clonación de genes, etc.) y pueden adoptar diversas formas (por ejemplo, lineal o ramificado, de cadena simple o doble, o un híbrido de las mismas, cebadores, sondas, etc.).

[0025] El término "ADN genómico" o "genoma" se usa de manera intercambiable y se refiere a la información genética heredable de un organismo huésped. El ADN genómico comprende el ADN del núcleo (también denominado ADN cromosómico), pero también el ADN de los plástidos (por ejemplo, cloroplastos) y otros orgánulos celulares (por ejemplo, las mitocondrias). El ADN genómico o genoma contemplado en la presente descripción también se refiere al ARN de un virus. El ARN puede ser un ARN de cadena positiva o de cadena negativa. El término "ADN genómico" contemplado en la presente descripción incluye el ADN genómico que contiene secuencias complementarias a las descritas en el presente documento. El término "ADN genómico" también se refiere a ARN mensajero (ARNm), ADN complementario (ADNc) y ARN complementario (ARNc).

[0026] El término "gen" se utiliza ampliamente para referirse a cualquier segmento de polinucleótido asociado con una función biológica. Por lo tanto, los genes o polinucleótidos incluyen intrones y exones como en la secuencia genómica, o sólo las secuencias de codificación como en los ADNc, tal como un marco de lectura abierto (ORF), empezando a partir del codón de iniciación (codón de metionina) y terminando con una señal de terminación (codón de parada). Los genes y polinucleótidos también pueden incluir regiones que regulan su expresión, tales como el inicio de la transcripción, traducción y terminación de la transcripción. Por lo tanto, también se incluyen promotores y regiones de unión a ribosomas (en general, estos elementos reguladores se encuentran aproximadamente entre 60 y 250 nucleótidos en dirección 5' del codón de inicio de la secuencia codificante o gen; Doree SM et al.; Pandher K et al.; Chung J Y et al), terminadores de la transcripción (en general el terminador se encuentra dentro de aproximadamente 50 nucleótidos en dirección 3' del codón de parada de la secuencia codificante o gen; Ward, C K et al). Un gen o polinucleótido también se refiere a un fragmento de ácido nucleico que expresa ARNm o ARN funcional, o codifica una proteína específica, y que incluye secuencias reguladoras.

[0027] El término "ADN heterólogo" tal como se utiliza en el presente documento se refiere al ADN derivado de un organismo diferente, tal como un tipo de célula diferente o de una especie diferente al receptor. El término también se refiere a un ADN o fragmento del mismo en el mismo genoma del ADN huésped en el que se inserta el ADN

heterólogo en una región del genoma que es diferente de su ubicación original.

[0028] Tal como se utiliza en el presente documento, el término "antígeno" o "inmunógeno" significa una sustancia que induce una respuesta inmune específica en un animal huésped. El antígeno puede comprender un organismo completo, muerto, atenuado o vivo; una subunidad o parte de un organismo; un vector recombinante que contiene un inserto con propiedades inmunogénicas; una pieza o fragmento de ADN capaz de inducir una respuesta inmune tras la presentación a un animal huésped; un polipéptido, un epítipo, un hapteno o cualquier combinación de los mismos. Alternativamente, el inmunógeno o antígeno puede comprender una toxina o antitoxina.

[0029] El término "proteína o péptido inmunogénico", tal como se usa en el presente documento incluye polipéptidos que son inmunológicamente activos en el sentido de que una vez administrados al huésped, son capaces de evocar una respuesta inmune de tipo humoral y/o celular dirigida contra la proteína. Preferiblemente, el fragmento de proteína es tal que tiene sustancialmente la misma actividad inmunológica que la proteína total. Por lo tanto, un fragmento de proteína según la descripción comprende o consiste esencialmente en o consiste en al menos un epítipo o determinante antigénico. Una proteína o polipéptido "inmunogénico", como se usa en el presente documento, incluye la secuencia de longitud completa de la proteína, análogos de la misma o fragmentos inmunogénicos de la misma. Por "fragmento inmunogénico" se entiende un fragmento de una proteína que incluye uno o más epítopos y de este modo provoca la respuesta inmunológica descrita anteriormente. Tales fragmentos pueden ser identificados usando cualquier número de técnicas de mapeo de epítopos bien conocidas en la técnica.

[0030] El término "proteína o péptido inmunogénico" contempla además delecciones, adiciones y sustituciones a la secuencia, siempre que el polipéptido funcione para producir una respuesta inmunológica tal como se define en el presente documento. El término "variación conservativa" se refiere a la sustitución de un residuo de aminoácido por otro residuo biológicamente similar, o la sustitución de un nucleótido en una secuencia de ácido nucleico de tal manera que el residuo de aminoácido codificado no cambia o es otro residuo biológicamente similar. A este respecto, las sustituciones particularmente preferidas serán generalmente de naturaleza conservativa, es decir, aquellas sustituciones que tienen lugar dentro de una familia de aminoácidos. Por ejemplo, los aminoácidos se dividen generalmente en cuatro familias: (1) ácidos - aspartato y glutamato; (2) básicos - lisina, arginina, histidina; (3) no polares - alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano; y (4) polares sin carga - glicina, asparagina, glutamina, cisteína, serina, treonina, tirosina. La fenilalanina, el triptófano y la tirosina se clasifican a veces como aminoácidos aromáticos. Los ejemplos de variaciones conservativas incluyen la sustitución de un resto hidrófobo tal como isoleucina, valina, leucina o metionina por otro residuo hidrófobo, o la sustitución de un residuo polar por otro residuo polar, tal como la sustitución de arginina por lisina, ácido glutámico por ácido aspártico, o glutamina por asparagina, y similares; o una sustitución conservativa similar de un aminoácido por un aminoácido estructuralmente relacionado que no tendrá un efecto importante sobre la actividad biológica. Las proteínas que tienen sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos que la molécula de referencia, pero que poseen sustituciones de aminoácidos menores que no afectan sustancialmente a la inmunogenicidad de la proteína están, por lo tanto, dentro de la definición del polipéptido de referencia. Todos los polipéptidos producidos mediante estas modificaciones se incluyen en el presente documento. El término "variación conservativa" también incluye el uso de un aminoácido sustituido en lugar de un aminoácido parental no sustituido siempre que los anticuerpos producidos contra el polipéptido sustituido también inmunorreacten con el polipéptido no sustituido.

[0031] El término "epítipo" se refiere al sitio en un antígeno o hapteno al cual responden células B y/o células T específicas. El término también se usa indistintamente con "determinante antigénico" o "sitio determinante antigénico". Los anticuerpos que reconocen el mismo epítipo pueden identificarse en un inmunoensayo simple que muestra la capacidad de un anticuerpo para bloquear la unión de otro anticuerpo a un antígeno diana.

[0032] Una "respuesta inmunológica" a una composición o vacuna es el desarrollo en el huésped de una respuesta inmune celular y/o mediada por anticuerpos a una composición o vacuna de interés. Por lo general, una "respuesta inmunológica" incluye, pero no se limita a, uno o más de los siguientes efectos: la producción de anticuerpos, células B, células T auxiliares, y/o células T citotóxicas, dirigidas específicamente a un antígeno o antígenos incluidos en la composición o vacuna de interés. Preferentemente, el huésped mostrará una respuesta inmunológica terapéutica o protectora tal que la resistencia a una nueva infección se verá reforzada y/o la gravedad clínica de la enfermedad se verá reducida. Dicha protección se demostrará por una reducción o falta de los síntomas normalmente mostrados por un huésped infectado, un tiempo de recuperación más rápido y/o un título viral disminuido en el huésped infectado.

[0033] Los términos "recombinante" y "genéticamente modificado" se utilizan indistintamente y se refieren a cualquier modificación, alteración o diseño de un polinucleótido o proteína en su forma o estructura nativa, o cualquier modificación, alteración o diseño de un polinucleótido o proteína en su entorno nativo o circundante. La modificación, alteración o diseño de un polinucleótido o proteína pueden incluir, pero no se limitan a, la delección de uno o más nucleótidos o aminoácidos, la delección de un gen completo, la optimización de codones de un gen, la sustitución conservativa de aminoácidos, la inserción de uno o más polinucleótidos heterólogos.

[0034] El término "cuerpos de inclusión", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a agregados inactivos de proteínas heterólogas expresadas en procariotas o eucariotas. Los términos "sustancialmente soluble",

"sustancialmente solubilizada", "sustancialmente disgregada" o "sustancialmente replegada" se usan indistintamente en este documento para referirse a proteínas agregadas en cuerpos de inclusión que son al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 90%, al menos 95%, o al menos 98% solubles en solución acuosa, o se disgregan, o se repliegan a una forma activa después de los tratamientos. El replegamiento significa que una proteína total o parcialmente desnaturalizada adopta una estructura secundaria, terciaria y cuaternaria como la de la molécula nativa.

[0035] En el presente documento se describe una composición o vacuna que comprende una proteína producida a partir de *E. coli*. La proteína puede ser una proteína de fusión que comprende dos o más partes inmunogénicas de la proteína de *Leishmania* seleccionadas entre proteína de membrana de kinetoplastidos 11 (KMP11), esteroil metiltransferasa (SMT), A2 y cisteína proteinasa (CP). La proteína puede ser una proteína de fusión que comprende KMP11, SMT, A2 y CP de *Leishmania* designada como proteína quimérica KSAC. La proteína KSAC puede solubilizarse a partir de los cuerpos de inclusión de *E. coli* mediante una alta presión. La proteína KSAC puede ser sustancialmente soluble en una solución acuosa o replegarse sustancialmente.

[0036] Además, en el presente documento se describen homólogos de proteínas o polinucleótidos mencionados anteriormente. Tal como se usa en el presente documento, el término "homólogos" incluye ortólogos, análogos y parálogos. El término "análogos" se refiere a dos polinucleótidos o polipéptidos que tienen la misma función o similar, pero que han evolucionado por separado en organismos no relacionados. El término "ortólogos" se refiere a dos polinucleótidos o polipéptidos de diferentes especies, pero que han evolucionado a partir de un gen ancestral común mediante especiación. Normalmente, los ortólogos codifican polipéptidos que tienen las mismas funciones o similares. El término "parálogos" se refiere a dos polinucleótidos o polipéptidos que están relacionados por duplicación dentro de un genoma. Los parálogos usualmente tienen diferentes funciones, pero estas funciones pueden estar relacionadas. Los análogos, ortólogos y parálogos de un polipéptido de tipo salvaje pueden diferir del polipéptido de tipo salvaje por modificaciones posteriores a la traducción, por diferencias en la secuencia de aminoácidos, o por ambos. En particular, los homólogos mostrarán generalmente al menos el 80-85%, 85-90%, 90-95%, o 95%, 96%, 97%, 98%, 99% de identidad de secuencia, con toda o parte de las secuencias de polinucleótido o polipéptido descritas anteriormente, y mostrarán una función similar.

[0037] La proteína KSAC quimérica puede tener al menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia con un polipéptido que tiene la secuencia tal como se expone en la SEQ ID NO: 2. El polinucleótido que codifica la proteína KSAC quimérica puede tener al menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia con un polipéptido que tiene la secuencia tal como se expone en la SEQ ID NO: 2. El polinucleótido que codifica KSAC puede tener al menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia con un polinucleótido que tiene la secuencia tal como se expone en la SEQ ID NO: 1.

[0038] El término "identidad" con respecto a secuencias puede referirse a, por ejemplo, el número de posiciones con nucleótidos o aminoácidos idénticos dividido por el número de nucleótidos o aminoácidos en la más corta de las dos secuencias, en el que la alineación de las dos secuencias se puede determinar de acuerdo con el algoritmo de Wilbur y Lipman (Wilbur y Lipman). La identidad de secuencia o similitud de secuencia de dos secuencias de aminoácidos, o la identidad de secuencia entre dos secuencias de nucleótidos se pueden determinar utilizando el paquete de software Vector NTI (Invitrogen, 1600 Faraday Ave., Carlsbad, CA). Cuando las secuencias de ARN se dice que son similares o tienen un grado de identidad u homología de secuencia con secuencias de ADN, la timidina (T) en la secuencia de ADN se considera igual a uracilo (U) en la secuencia de ARN. Por lo tanto, las secuencias de ARN están dentro del alcance de la descripción y pueden derivarse de secuencias de ADN, considerando la timidina (T) en la secuencia de ADN igual a uracilo (U) en las secuencias de ARN.

[0039] Los polinucleótidos de la descripción incluyen secuencias que son degeneradas como resultado del código genético, por ejemplo, el uso de codones optimizados para un huésped específico. Tal como se usa en el presente documento, "optimizado" se refiere a un polinucleótido que se modifica mediante ingeniería genética para incrementar su expresión en una especie determinada. Para proporcionar polinucleótidos optimizados que codifican polipéptidos KSAC, la secuencia de ADN del gen de la proteína KSAC se puede modificar para 1) comprender codones preferidos por genes altamente expresados en una especie particular; 2) comprender un contenido de A + T o G + C en la composición de bases de nucleótidos que sustancialmente se encuentra en dicha especie; 3) formar una secuencia de iniciación de dicha especie; o 4) eliminar secuencias que causan la desestabilización, poliadenilación inapropiada, degradación y terminación de ARN, o que forman horquillas de estructura secundaria o sitios de empalme de ARN. El aumento de expresión de la proteína KSAC en dicha especie se puede lograr mediante la utilización de la frecuencia de distribución de uso de codones en las células eucariotas y procariotas, o en una especie particular. El término "frecuencia de uso de codones preferidos" se refiere a la preferencia exhibida por una célula huésped específica en el uso de codones de nucleótidos para especificar un aminoácido determinado. Hay 20 aminoácidos naturales, la mayoría de los cuales son especificados por más de un codón. Por lo tanto, todas las secuencias de nucleótidos degeneradas están incluidas en la descripción, siempre que la secuencia de aminoácidos del polipéptido KSAC codificada por la secuencia de nucleótidos esté funcionalmente inalterada.

[0040] La presente descripción proporciona un procedimiento para producir una proteína soluble, disgregada,

replegado o activo expresada en procariotas o eucariotas que comprende las etapas de (i) preparar los cuerpos de inclusión en un tampón que no contiene o contiene una baja concentración de urea para formar una suspensión de cuerpos de inclusión; y (ii) someter la suspensión de cuerpos de inclusión a una alta presión durante un período de tiempo.

[0041] En aún otra realización, la presente invención proporciona un procedimiento para producir una proteína soluble expresada en procariotas o eucariotas que comprende las etapas de (i) preparar cuerpos de inclusión en un tampón que no contiene o contiene una baja concentración de urea para formar una suspensión de cuerpos de inclusión, en el que la concentración de urea es de 0 M a 3M; (ii) someter la suspensión de cuerpos de inclusión a un incremento escalonado de presión durante un período de tiempo; y (iii) mantener una alta presión aplicada a los cuerpos de inclusión durante un período de tiempo.

[0042] En un aspecto de la realización, el tampón puede contener ditio treitol (DTT). En otro aspecto, la concentración de DTT puede variar de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 100 mM, de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 90 mM, de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 70 mM, de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 60 mM, de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 50 mM, o aproximadamente 1 mM, 2 mM, 3 mM, 4 mM, 5 mM, 6 mM, 7 mM, 8 mM, 9 mM, 10 mM, 15 mM, 20 mM, 25 mM, 30 mM, 35 mM, 40 mM, 45 mM, 50 mM, 55 mM, 60 mM, 65 mM, 70 mM, 75 mM, 80 mM, 85 mM, 90 mM, 95 mM, 100 mM.

[0043] En un aspecto, la urea puede no estar presente en el tampón. En otro aspecto, la urea puede estar presente en el tampón a la concentración de aproximadamente 1 M, aproximadamente 2 M y aproximadamente 3M.

[0044] En otro aspecto de la realización, la alta presión puede estar en el intervalo de aproximadamente 1000 bar a aproximadamente 5000 bar, de aproximadamente 2000 bar a aproximadamente 4000 bar. La alta presión puede ser cualquier presión en el intervalo de aproximadamente 2000 bar hasta aproximadamente 4000 bar, por ejemplo, pero sin limitación, 2000 bar, 2100 bar, 2200 bar, 2300 bar, 2400 bar, 2500 bar, 2600 bar, 2700 bar, 2800 bar, 2900 bar, 3000 bar, 3100 bar, 3200 bar, 3300 bar, 3400 bar, 3500 bar, 3600 bar, 3700 bar, 3800 bar, 3900 bar y 4000 bar.

[0045] Puede aplicarse un aumento gradual de la presión a la suspensión de cuerpos de inclusión mediante el aumento continuo de la presión a una velocidad constante durante un período de tiempo para alcanzar la presión elevada final deseada. Por ejemplo, la presión puede aumentarse a una velocidad de aproximadamente 200 bar/min a aproximadamente 1000 bar/min de forma continua durante de aproximadamente 2 min a aproximadamente 10 minutos para llegar a 2000 bar, a una velocidad de aproximadamente 200 bar/min a aproximadamente 1000 bar/min de forma continua durante de aproximadamente 3 min a aproximadamente 15 minutos para llegar a 3000 bar, a una velocidad de aproximadamente 200 bar/min a aproximadamente 1000 bar/min de forma continua durante de aproximadamente 4 min a aproximadamente 20 minutos para llegar a 4000 bar, a una velocidad de aproximadamente 200 bar/min a aproximadamente 1000 bar/min de forma continua durante de aproximadamente 5 min a aproximadamente 25 minutos para llegar a 5000 bar. En otro aspecto, el aumento gradual de la presión se aplica de forma escalonada. Por ejemplo, la presión se aumenta a aproximadamente 1.000 bar/min durante aproximadamente un minuto para llegar a 1.000 bar, entonces se mantiene la presión de 1000 bar durante aproximadamente una hora para relajar la proteína, después del período de relajación, la presión se aumenta de nuevo a aproximadamente 1000 bar/min durante aproximadamente un minuto para llegar a la presión elevada final deseada de 2000 bar. La presión también se puede incrementar a aproximadamente 1.000 bar/min durante aproximadamente treinta segundos para llegar a 500 bar, la presión de 500 bar se mantiene durante aproximadamente una hora para relajar la proteína, a continuación, la presión se aumenta de nuevo a aproximadamente 1000 bar/min durante aproximadamente treinta segundos para llegar a 1.000 bar, la presión de 1000 bar se mantiene durante aproximadamente una hora para relajar la proteína, la presión se aumenta de nuevo a aproximadamente 1000 bar/min durante aproximadamente treinta segundos para llegar a 1.500 bar, la presión de 1500 bar se mantiene durante aproximadamente una hora para relajar la proteína, a continuación, la presión se aumenta de nuevo a aproximadamente 1000 bar/min para llegar a la presión final deseada de 2000 bar. Para llegar a la presión alta final deseada de 3000 bar, 4000 bar y 5000 bar, puede emplearse el mismo aumento escalonado de la presión a aproximadamente 1000 bar/min durante aproximadamente un minuto o aproximadamente 30 segundos con una relajación intermedia de proteína durante aproximadamente una hora. Por ejemplo, para llegar a la presión objetivo de 3.000 bar, la presión se aumenta a aproximadamente 1.000 bar/min durante aproximadamente un minuto para llegar a 1.000 bar, a continuación la presión de 1000 bar se mantiene durante aproximadamente una hora para relajar la proteína, la presión se aumenta de nuevo a aproximadamente 1000 bar/min durante aproximadamente un minuto para llegar a la presión de 2000 bar, a continuación la presión de 2000 bar se mantiene durante aproximadamente una hora para relajar la proteína por segunda vez, la presión se aumenta de nuevo a aproximadamente 1000 bar/min durante aproximadamente un minuto para llegar a la presión final deseada de 3000 bar. Para llegar a la presión objetivo de 3000 bar, la presión también se puede aumentar a aproximadamente 1.000 bar/min durante aproximadamente treinta segundos, con una zona invariable de 1 hora de duración cada 500 bar, y la presión objetivo de 3000 bar puede alcanzarse después de 5 horas. Para llegar a la presión final deseada de 4.000 bar, la presión se aumenta a aproximadamente 1.000 bar/min durante aproximadamente un minuto para llegar a 1.000 bar, a continuación la presión de 1000 bar se mantiene durante aproximadamente una hora para relajar la proteína, la presión se aumenta de nuevo a aproximadamente 1000 bar/min durante aproximadamente un minuto para llegar a la presión de 2000 bar, a continuación la presión de 2000 bar se mantiene durante aproximadamente

una hora para relajar la proteína una segunda vez, la presión se aumenta de nuevo a aproximadamente 1000 bar/min durante aproximadamente un minuto para llegar a la presión final deseada de 3000 bar, a continuación la presión de 3000 bar se mantiene durante aproximadamente una hora para relajar la proteína por tercera vez, la presión se aumenta de nuevo a 1000 bar/min durante aproximadamente un minuto para llegar a la presión final deseada de 4000 bar. Para llegar a la presión objetivo de 4000 bar, la presión también se puede aumentar a aproximadamente 1.000 bar/min durante aproximadamente treinta segundos, con una zona invariable de 1 hora de duración cada 500 bar, y la presión objetivo de 4000 bar puede alcanzarse después de 7 horas.

[0046] La suspensión de cuerpos de inclusión se puede tratar bajo la alta presión durante de aproximadamente 10 horas a aproximadamente 100 horas, de aproximadamente 20 horas a aproximadamente 100 horas. El tratamiento a alta presión es, preferentemente, durante más de 24 horas, por ejemplo, durante de aproximadamente 25 horas a aproximadamente 100 horas, de aproximadamente 25 horas a aproximadamente 80 horas, de aproximadamente 25 horas a aproximadamente 60 horas, de aproximadamente 25 horas a aproximadamente 50 horas, de aproximadamente 25 horas, de aproximadamente 26 horas, de aproximadamente 27 horas, de aproximadamente 28 horas, de aproximadamente 29 horas, de aproximadamente 30 horas, aproximadamente 31 horas, de aproximadamente 32 horas, de aproximadamente 33 horas, de aproximadamente 34 horas, de aproximadamente 35 horas, aproximadamente 36 horas, de aproximadamente 37 horas, de aproximadamente 38 horas, aproximadamente 39 horas, aproximadamente 40 horas, de aproximadamente 41 horas, de aproximadamente 42 horas, aproximadamente 43 horas, aproximadamente 44 horas, de aproximadamente 45 horas, de aproximadamente 46 horas, de aproximadamente 47 horas, de aproximadamente 48 horas, de aproximadamente 49 horas, de aproximadamente 50 horas.

[0047] En otra realización, la presente invención proporciona un procedimiento para producir una proteína soluble expresada en procariotas o eucariotas que comprende las etapas de (i) preparar cuerpos de inclusión en un tampón que no contiene o contiene una baja concentración de urea para formar una suspensión de cuerpos de inclusión en el que la concentración de urea es de 0 M a 3M; (ii) someter la suspensión de cuerpos de inclusión a un incremento escalonado de la presión durante un período de tiempo; (iii) mantener una presión elevada aplicada a los cuerpos de inclusión durante un período de tiempo; y (iv) recuperar la proteína mediante despresurización.

[0048] La despresurización se puede realizar a la velocidad de aproximadamente 83 bar/hr - 200 bar/hr.

[0049] Los procariotas contemplados en la presente invención pueden incluir *Avibacterium*, *Brucella*, *Escherichia coli*, *Haemophilus* (por ejemplo, *Haemophilus suis*), *Salmonella* (por ejemplo, *Salmonella Enteridis*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella infantis*), *Shigella*, *Pasteurella*, y *Rimeirella*.

[0050] En los sistemas procariotas, pueden seleccionarse un conjunto de vectores de expresión. Tales vectores incluyen, pero no se limitan a, los vectores de de clonación y expresión de *E. coli* multifuncionales, tales como PBLUESCRIPT (Stratagene); vectores pIN (Van Heeke & Schuster, J. Biol Chern 264: 5503-5509 (1989)); y similares; vectores PGEX (Promega, Madison, Wis.); en los sistemas eucariotas, las líneas celulares pueden ser de levadura (tal como *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*), células de baculovirus, células de mamífero, células de plantas. Los vectores de expresión de los sistemas eucariotas incluyen, pero no se limitan a, vectores pVR1020 o pVT1012 (Vical Inc., San Diego, CA), vector PichiaPink (Invitrogen, CA, EE.UU.), vector pFasBac TOPO (Invitrogen).

[0051] El procedimiento para producir una proteína soluble expresada en procariotas o eucariotas proporcionada en la presente invención puede usarse para solubilizar cualquier proteína. Las proteínas pueden incluir anticuerpos y la insulina.

[0052] La presente descripción proporciona una composición o vacuna que comprende la proteína quimérica KSAC mencionada anteriormente y un portador, excipiente, vehículo o adyuvante farmacéutica o veterinariamente aceptable.

[0053] Los portadores o adyuvante o vehículos o excipientes aceptables farmacéutica o veterinariamente son bien conocidos por los expertos en la técnica. El portador o adyuvante o vehículo o excipientes farmacéutica o veterinariamente aceptables que pueden ser utilizados para los procedimientos de esta descripción incluyen, pero no se limitan a, solución al 0,9% de NaCl (por ejemplo, solución salina) o un tampón de fosfato, poli-(L-glutamato) o polivinilpirrolidona. El portador o vehículo o excipientes farmacéutica o veterinariamente aceptables pueden ser cualquier compuesto o combinación de compuestos que facilitan la administración del vector (o proteína expresada a partir de un vector de la invención in vitro), o facilitan la transfección o infección y/o mejoran la conservación del vector (o proteína). Las dosis y volúmenes de dosis en el presente documento descritas en la descripción general también pueden ser determinadas por el experto en la materia a partir de esta descripción en relación con el conocimiento en la técnica, sin gran experimentación.

[0054] Opcionalmente pueden añadirse otros compuestos como portadores o adyuvantes o vehículos o excipientes farmacéutica o veterinariamente aceptables, incluyendo, pero no limitados a, alumbre; Oligonucleótidos CpG (ODN), en particular ODN 2006, 2007, 2059, o 2135 (Pontarollo RA et al, Vet Immunol Immunopath, 2002, 84: 43-59; Wernette CM et al, Vet Immunol Immunopath, 2002, 84: 223-236; Mutwiri G. et al, Vet Immunol Immunopath, 2003,

91: 89-103); poliA-poliU, bromuro de dimetildioctadecilamonio (DDA) ("Vaccine Design, The subunit and Adjuvant Approach", editado por Michael F. Powell y Mark J. Newman, Pharmaceutical Biotechnology, 6: p. 03, p. 157); N, N-dioctadecil-N',N'-bis(2-hidroxiethyl)propandiamina (tal como AVRIDINE®) (Ibid, p 148.); carbómero, quitosano (véase la Patente de Estados Unidos N° 5.980.912, por ejemplo).

[0055] Las composiciones farmacéuticas y vacunas según la descripción pueden comprender o consistir esencialmente en uno o más adyuvantes. Los adyuvantes adecuados son (1) polímeros de ácido acrílico o metacrílico, anhídrido maleico y polímeros de derivados de alqueno, (2) secuencias inmunoestimulantes (ISS), tales como secuencias de oligodesoxirribonucleótidos que tienen una o más unidades de CpG no metiladas (Klinman et al., 1996; WO98/16247), (3) una emulsión de aceite en agua, tal como la emulsión SPT descrita en la pág 147 de "Vaccine Design, The subunit and Adjuvant Approach", publicado por M. Powell, M. Newman, Plenum Press 1995, y la emulsión MF59 descrita en la pág. 183 del mismo trabajo, (4) lípidos catiónicos que contienen una sal de amonio cuaternario, por ejemplo, DDA (5) citocinas, (6) hidróxido de aluminio o fosfato de aluminio, (7) saponina u (8) otros adyuvantes descritos en cualquier documento citado en la presente solicitud, o (9) cualquier combinación o mezclas de los mismos.

[0056] Se puede preparar una solución de adyuvante, especialmente de carbómero (Pharmeuropa, vol. 8, N° 2, junio de 1996) en agua destilada, de manera ventajosa en presencia de cloruro de sodio, teniendo la solución obtenida un pH ácido. Esta solución madre se diluye mediante su adición a la cantidad deseada (para obtener la concentración final deseada), o una parte sustancial de la misma, de agua cargada con NaCl, ventajosamente solución salina fisiológica (NaCl 9 g/l) a la vez en varias porciones con neutralización concomitante o subsiguiente (pH 7,3 a 7,4), ventajosamente con NaOH. Esta solución a pH fisiológico se utiliza para la mezcla con la vacuna, que puede almacenarse especialmente en forma liofilizada, líquida o congelada. La concentración de polímero en la composición de vacuna final puede ser de 0,01% al 2% p/v, de 0,06 al 1% p/v, o de 0,1 al 0,6% p/v.

[0057] La vacuna de subunidades (proteína) se puede combinar con adyuvantes, como emulsiones de aceite-en-agua, agua-en-aceite-en-agua a base de aceite mineral y/o aceite vegetal y tensioactivos no iónicos, tales como copolímeros de bloque, TWEEN®, SPAN®. Dichas emulsiones son en particular las descritas en la página 147 de "Vaccine Design – The subunit and Adjuvant Approach", Pharmaceutical Biotechnology, 1995, o emulsiones TS, en particular la emulsión TS6, y emulsiones LF, especialmente emulsión LF2 (para emulsiones TS y LF, véase el documento WO 04/024027). Otros adyuvantes adecuados son, por ejemplo vitamina E, saponinas, y CARBOPOL® (Noveon; véanse los documentos WO 99/51269; WO 99/44633), hidróxido de aluminio o fosfato de aluminio ("Vaccine Design, The Subunit and adjuvant approach", Pharmaceutical Biotechnology, vol. 6, 1995), adyuvantes biológicos (es decir, C4b, especialmente C4b murino (Ogata R T et al.) o C4b equino, GM-CSF, en particular GM-CSF equino (US 6645740)), toxinas (es decir, toxinas del cólera CTA o CTB, toxinas termolábiles de *Escherichia coli* LTA o LTB (Olsen CW et al.; Fingerut E et al.; Zurbriggen R et al. Peppoloni S et al.), y CpG (es decir CpG # 2395 (ver Jurk M et al.), CpG # 2142 (ver SEQ ID NO: 890 en el documento EP 1221955)).

[0058] Otro aspecto de la descripción se refiere a un procedimiento para inducir una respuesta inmunológica en un animal frente a uno o más antígenos o una respuesta protectora en un animal frente a uno o más patógenos, procedimiento que comprende inocular al animal al menos una vez con la vacuna o la composición farmacéutica de la presente descripción. Sin embargo, otro aspecto de la descripción se refiere a un procedimiento para inducir una respuesta inmunológica en un animal para uno o más antígenos o una respuesta protectora en un animal frente a uno o más patógenos de *Leishmania* en un régimen de administración de sensibilización-refuerzo, que se compone de al menos una administración primaria y al menos una administración de refuerzo usando al menos un polipéptido, antígeno, epítipo o inmunógeno común. La composición inmunológica o vacuna utilizada en la administración primaria puede ser la misma, pueden ser de naturaleza diferente de las utilizadas como refuerzo. La administración de sensibilización puede comprender una o más administraciones. Del mismo modo, la administración de refuerzo puede comprender una o más administraciones. Las administraciones de sensibilización-refuerzo pueden llevarse a cabo con 2 a 6 semanas de diferencia, por ejemplo, con aproximadamente 3 semanas de diferencia. También se contempla un refuerzo semianual o un refuerzo anual de forma ventajosa utilizando la vacuna de subunidades (proteína).

[0059] La administración de sensibilización-refuerzo puede incluir la vacuna o composición de subunidades que comprende la proteína quimérica KSAC mencionada anteriormente. La administración de sensibilización-refuerzo también puede incluir vectores virales y vectores plasmídicos recombinantes que expresan antígenos de *Leishmania* (ver, por ejemplo, US2009/0324649). En un aspecto del régimen de sensibilización-refuerzo, la composición o vacuna que comprende la proteína KSAC se administra seguido por la administración de la vacuna o la composición que comprende un vector viral recombinante que contiene y expresa cualquier antígeno de *Leishmania*, o una vacuna o composición de ADN plasmídico que contiene y expresa cualquier antígeno de *Leishmania*, o una vacuna viral o composición inactivada que comprende los antígenos de *Leishmania*.

[0060] Por lo general, una administración de la vacuna se lleva a cabo a las 10 a 15 semanas de edad por vía subcutánea o intramuscular. Una segunda o tercera administración puede realizarse dentro de las 2-6 semanas de la primera administración. Los animales tienen preferiblemente al menos 4 semanas de edad en el momento de la primera administración.

[0061] Se puede utilizar una variedad de rutas de administración, además de por vía subcutánea o por vía intramuscular, tal como por vía intradérmica o transdérmica.

[0062] La composición o vacuna de acuerdo con la descripción comprenden o consisten esencialmente en o consisten en una cantidad eficaz para provocar una respuesta terapéutica de uno o más polipéptidos, tal como se describe en el presente documento; y puede determinarse una cantidad eficaz a partir de esta descripción y el conocimiento en la técnica, sin gran experimentación.

[0063] Para la composición o vacuna que comprende la proteína KSAC expresada de la presente descripción, una dosis puede incluir, de aproximadamente 1 µg a aproximadamente 2000 µg, de aproximadamente 5 µg a aproximadamente 1000 µg, de aproximadamente 10 µg a aproximadamente 100 µg, de aproximadamente 20 µg a aproximadamente 1000 µg, de aproximadamente 30 µg a aproximadamente 500 µg, o de aproximadamente 50 µg a aproximadamente 500 µg. Los volúmenes de dosis pueden estar entre aproximadamente 0,1 ml y aproximadamente 10 ml, o entre aproximadamente 0,2 ml y aproximadamente 5 ml.

[0064] La invención se describirá ahora adicionalmente mediante los siguientes ejemplos no limitativos.

EJEMPLOS

[0065] La construcción de insertos de ADN, plásmidos y vectores virales o vegetales recombinantes se llevó a cabo utilizando las técnicas estándar de biología molecular descritas por J. Sambrook et al. (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1989).

Ejemplo 1 Solubilización de la proteína KSAC expresada en cuerpos de inclusión de E. coli

[0066] Los cuerpos de inclusión con KSAC producidos a partir de E. coli se prepararon en los siguientes tres tampones: 1) Tris 20 mM, ditio treitol (DTT) 50 mM, pH 8; 2) Tris 20 mM, diitio treitol (DTT) 50 mM, pH 8, urea 1 M; 3) Tris 20 mM, ditio treitol (DTT) 50 mM, pH 8, urea 2 M. Los cuerpos de inclusión con KSAC preparados en los mismos tampones a temperatura ambiente sin presión durante toda la duración del tratamiento se utilizaron como controles.

[0067] La Figura 3 muestra las etapas de los niveles de presión para la relajación de proteínas durante el aumento de la presión (incremento escalonado de la presión). La presurización a una presión objetivo se aplicó durante 48 horas, a continuación, se despresurizaron las muestras durante 24 horas.

[0068] La Figura 4 muestra la comparación esquemática entre la solubilización a alta presión y el plegamiento de proteínas recombinantes a partir de cuerpos de inclusión y la solubilización clásica y el plegamiento de proteínas recombinantes a partir de cuerpos de inclusión.

[0069] La Figura 5 muestra la gráfica esquemática del replegamiento de KSAC. La Figura 6 muestra el patrón de SDS-PAGE típico de la proteína KSAC después de solubilizar la proteína KSAC en urea 7 M, DTT 20 mM y replegarse mediante cromatografía de exclusión. La Figura 7 muestra la representación de HPLC típica de la proteína KSAC. El cromatograma de HPLC identifica el trímero de la proteína KSAC por su masa. Se estimaron la concentración de proteínas y la pureza relativa frente al contenido total de proteína. La Figura 8 muestra la dispersión dinámica de luz (DLS) de proteína KSAC replegada usando cromatografía de exclusión. La figura 8A muestra la distribución en número que indica que la mayoría de la población tiene un tamaño de 12 a 18 nm. La figura 8B muestra el intervalo exhaustivo de tamaños detectado que no está vinculado a la población relativa. Se detectaron objetos entre 10 y 800 nm.

[0070] El análisis por transferencia Qdot (Figura 9) y SDS-PAGE (Figura 10) de los cuerpos de inclusión presurizados a 3000 bares y las muestras de control mostraron que todas las proteínas están en la fase de sobrenadante de la muestra tratada en los tres tampones, lo que indica que las proteínas están solubilizadas.

[0071] La superposición de los cromatogramas de HPLC del sobrenadante de los controles (Figura 11 panel superior) y todas las muestras tratadas con 3000 bar (Figura 11 panel inferior) mostró que ninguna proteína se detecta en los controles, mientras que la proteína KSAC y todas las otras proteínas presentes en los cuerpos de inclusión se detectan después de tratamiento a presión, lo que significa que todas las proteínas se solubilizan después del tratamiento a presión.

[0072] La Figura 12 es el cromatograma de HPLC superpuesto del sobrenadante de las muestras de KSAC tratadas con 3000 bar de presión y la proteína KSAC obtenida con el procedimiento de replegamiento clásico. Los resultados muestran que los picos son similares, de manera que la proteína soluble obtenida mediante tratamiento a alta presión se organiza en trímero.

[0073] La Tabla 1 a continuación muestra la cuantificación de proteína KSAC después de un tratamiento con 3000

bar mediante transferencia Qdot y HPLC.

Tabla 1

	Urea 2 M		
	Control	Residuo del ensayo	Sobrenadante del ensayo
Transferencia dot (puntos)	347	10	797
HPLC $\mu\text{g/ml}$	-	-	723
	Urea 1 M		
	Control	Residuo del ensayo	Sobrenadante del ensayo
Transferencia dot $\mu\text{g/ml}$	328	10	750
HPLC $\mu\text{g/ml}$	-	-	746
	Sin urea		
	Control	Residuo del ensayo	Sobrenadante del ensayo
Transferencia dot $\mu\text{g/ml}$	123	15	649
HPLC $\mu\text{g/ml}$	-	-	825

5

[0074] La cantidad de proteína solubilizada fue de aproximadamente 800 $\mu\text{g/ml}$. Esto estaba muy cerca de la cantidad estimada de proteína KSAC inicial como cuerpos de inclusión (1000 $\mu\text{g/ml}$). El rendimiento de solubilización es muy alto (75-100%).

10

[0075] La Figura 13 muestra la superposición de los datos de DLS obtenidos con la proteína presurizado a 3000 bar (línea más clara) en el tampón sin urea y la proteína obtenida con el procedimiento de replegamiento clásico (línea más oscura). El intervalo exhaustivo de tamaños (panel superior) muestra que se detectan menos objetos de mayor tamaño en muestras presurizadas. La distribución en número (panel inferior) muestra que la mayoría de la población replegada por presión tiene un tamaño similar con respecto a la población replegada por el procedimiento clásico y el plegado parece muy similar.

15

[0076] La Figura 14 muestra que los tamaños de proteína obtenidos a 3000 bar son idénticos a los tamaños de proteínas obtenidos a partir de replegamiento con cromatografía clásica para los tres tampones utilizados (en el círculo). Cuando se trataron a 2000 bar, los tamaños de proteína son idénticos a los tamaños de proteínas de replegamiento por cromatografía clásica cuando se utiliza urea en el tampón. A una presión más alta que 3000 bar, aparecen agregados a alta presión cuando no se utiliza urea. Con urea presente en el tampón, la proteína parece deshacerse (10 nm de tamaño), lo que indica que se ha producido la desnaturalización.

20

[0077] La Figura 15 muestra el cromatograma de HPLC de muestras tratadas con 4000 bar. Los resultados muestran que las proteínas con tamaños más grandes que la proteína KSAC aparecieron cuando la urea no estaba presente en el tampón, o solamente se añadió urea 1 M en el tampón. El tamaño de proteína fue como se esperaba cuando se añadió 2 M en el tampón.

25

[0078] La Figura 16 muestra la distribución de tamaño de DLS en número de las muestras tratadas con 5.000 bar sin urea. Los resultados indican que se detectaron tres poblaciones de proteínas con grandes tamaños de hasta 90 nm. La población cuyo tamaño es similar a KSAC replegada por cromatografía es una minoría.

30

[0079] La Figura 17 muestra la comparación del contenido de proteína soluble KSAC determinado mediante HPLC y transferencia Qdot. Los resultados indican que las concentraciones máximas de proteínas solubilizadas se obtienen con muestras tratadas con 3000 bar con una buena consistencia entre las tecnologías de HPLC y transferencia Qdot. Para las muestras tratadas con 2000 bar, la presencia de urea ayuda a aumentar el rendimiento de solubilización. Para las muestras tratadas con 4000 bar, HPLC proporciona un rendimiento más alto que transferencia Qdot, lo que indica una pérdida de reconocimiento de los antígenos.

35

Ejemplo 2 Vacunación de perros utilizando la vacuna de KSAC

40

[0080] En este estudio, cuarenta y nueve perros Beagle de 15 semanas de edad fueron vacunados de acuerdo con el siguiente protocolo.

45

Tabla 2

Grupo	Vacunación 1 ml (10 μg) SC a D0, D21, D42 y M12 (refuerzo)	Estudio después de la vacuna***	Muestreo de la sangre para el estudio inmunológico
Vacunado (n = 24)	KSAC*/GLA-SE**	- D0 + 4/6 h, D1, D2	D0, D28, D35, D50, D56
Controles (n = 25)	Placebo	- D21 + 4/6 h, D22 y D23 - D42 + 4/6 h, D43 y D44	

		- M12 + 1 día + 3 días	
*KSAC: proteína KSAC purificada en tampón Tris (20 mM, pH = 8), 10 µg/ml			
** GLA-SE: emulsión de aceite-en-agua (4% de aceite)			
*** el estudio después de la vacuna se realizó siempre que se detectó algún signo			

[0081] Después de la vacunación (en D77), los perros fueron trasladados al sur de Italia, en una zona altamente endémica de leishmaniasis canina para pruebas de hasta 15 meses (M15). El estudio después de la vacuna incluyó la evaluación de la temperatura rectal, la condición general (véase la Tabla 3), dolor a la palpación (presencia/ausencia), calor cutáneo (presencia/ausencia), picazón (presencia/ausencia) e hinchazón. Las hinchazones se calificaron de la siguiente manera; 0 = sin hinchazón, 1 = hinchazón leve (sólo detectable), 2 = hinchazón, pero < 2 cm, 3 = hinchazón > 2 cm.

[0082] El estudio después de la vacuna mostró que no se detectó un signo importante (dolor persistente, picazón importante) durante el período de observación.

Tabla 3 Los signos clínicos evaluados durante el estudio de la Leishmaniasis canina y el cálculo de la puntuación clínica general (OCS)

Signos clínicos	Medición	Puntuación
Condición del cuerpo (ver anexo 3)	Moderado, corpulento, obeso	0
	Delgado	1
	Esquelético	3
Condición general	Buena = animal con buena salud que juega y atento	0
	Apatía = Animal con falta de energía (cuando se compara con su comportamiento normal) o animal que permanece acostado, pero responde a los estímulos	1
	Depresión = animal que permanece acostado sin responder a los estímulos	3
Signos cutáneos	Ausencia	0
	Alopecia simétrica bilateral	1
	Úlceras/Nódulos	2
	Dermatitis exfoliante	3
Signos oculares	Ausencia	0
	Blefaritis y/o conjuntivitis y/o queratitis	1
	Uveitis	2
Epistaxis	Ausencia	0
	Presencia	3
Artritis	Ausencia	0
	Presencia	1
Agrandamiento de nódulo linfático y/o bazo	Ausencia	0
	Agrandamiento bilateral de nódulos linfáticos preescapulares o nódulos linfáticos retromandibulares y de nódulos linfáticos popliteales -3 y/o agrandamiento del bazo -3	3

[0083] Para cada categoría, sólo se consideró la puntuación más alta en el cálculo de la puntuación clínica general (OCS). Las puntuaciones de las siete categorías se suman para determinar el OCS.

[0084] Los datos de OCS indicaron que no se detectó ninguna anomalía importante de la OCS antes de M15.

[0085] Los patrones de infección se clasificaron en 4 categorías (Oliva et al 2006, J Clin Microbiol de 44: 1318-1322) y se reagruparon en infecciones no establecidas (alias no activas) y las infecciones activas en función de si el análisis basado en el cultivo era positivo o negativo.

Tabla 4 Terminología usada para la clasificación de los perros de acuerdo a sus signos parasitológicos, serológicos y clínicos

	Sano	PCR negativa Cult negativo Sero negativa
Infección no establecida	Subpatente	PCR negativa Cult negativo Sero negativa
Infección activa	Asintomática	PCR positiva Cult positivo Sero positiva Sano
	Sintomática	PCR positiva Cult positivo Sero positiva Signo o signos clínicos y/o biológicos
PCR = qPCR en aspirado de bazo Cult = Cultivo en aspirado de nódulos linfáticos o LDA en aspirado de bazo Sero = serología mediante IFAT Signo o signos clínicos y/o biológicos = OCS no nula		

- 5 **[0086]** Se realizaron los ensayos parasitológicos y serológicos para evaluar el estado de los perros, tal como se define por Oliva et al (2006). Se realizaron PCR anidada en médula ósea, cultivo en nódulos linfáticos aspirados según Gradoni et al (2005, Vaccine, 23: 5.245-5.251). Se realizó la prueba de títulos en suero IFAT (prueba de anticuerpos inmunofluorescentes) de acuerdo con una técnica derivada de OIE (2004, Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals, quinta edición OIE, París). Se realizaron PCR cuantitativa y LDA (ensayo de dilución
- 10 limitante) en aspirado de bazo utilizando procedimientos derivados de Bretagne et al (2001, Clin Diagn Lab Immunol 8: 828-831) y Hill et al. (1983, Infect Immun 39: 1087-1094), respectivamente.

Tabla 5 Resultados del cultivo en aspirados de nódulos linfáticos y LDA realizados en muestras recogidas en M8, M12 y M15 que indican infecciones activas

15

	M8		M12		M15	
Grupo vacunado (24 perros)	Cultivo LN	LDA bazo	Cultivo LN	LDA bazo	Cultivo LN	LDA bazo
Neg	23	21 (2 NT*)	23	22	21	22
Pos	1	1	1	2	3	2
Grupo de control (25 perros)						
Neg	24	24	23	19	16	15
Pos	1	1	3	6	9	10

*NT: no probado

Tabla 6 Resultados de ensayos serológicos (IFAT) y parasitológicos (nPCR es aspirados de médula ósea y PCR cuantitativa en aspirados de bazos) realizados en muestras recogidas en M8, M12 y M15

	M8			M12			M15		
Grupo vacunado (24 perros)	IFAT	nPCR médula ósea	Q-PCR bazo	IFAT	nPCR médula ósea	Q-PCR bazo	IFAT	nPCR médula ósea	Q-PCR bazo
Neg	23	23	33 (1 NT)	21	21	21	20	16	21
Pos	1	1	1	3	3	3	4	8	3
Grupo de control (25 perros)									
Neg	24	24	23	21	15	17	28	10	15
Pos	1	1	2	4	10	8	7	15	10

- 20 **[0087]** Además de las pruebas realizadas en la Tabla 6, los títulos de IFAT también se midieron en las muestras recogidas en M0 (tiempo correspondiente al pico de la respuesta de anticuerpos inducida por la vacuna) en perros

vacunados y de control, y todas las muestras dieron negativo.

Tabla 7 Repartición de los perros de acuerdo con las clases definidas en la Tabla 4

		M8		M12		M15	
		Con*	Vac**	Con*	Vac**	Con*	Vac**
	Sano	23	23	16	21	15	21
Infección no establecida	Subpatente	1	0	3	1	0	0
Infección activa	Asintomático	1	1	6	2	8	1
	Sintomático	0	0	0	0	2	2
Con*: Controles Vac**: Vacunado							

[0088] Los resultados indicaron una alta proporción de perros con infecciones activas entre los perros de control (a M15, 40%, 10/25) y una menor proporción de perros con infecciones activas entre los perros vacunados (a M15, 12,5%, 3/24).

[0089] El estudio muestra que después de 15 meses en el área endémica, se observó una reducción de la proporción de perros con infección activa de Leishmania en perros vacunados frente a los perros de control (es decir, eficacia de la vacuna). La eficacia de la vacuna se evaluó en un 69%. Estos resultados son consistentes con un control significativo de la infección por parásitos en perros vacunados.

[0090] El resultado también demostró que la vacunación con la vacuna de subunidades de KSAC no interfiere con la prueba de serología IFAT. Esto apoya la posibilidad de vacunar en las zonas endémicas sin interferir con los estudios de epidemiología en curso y la evaluación clínica de los perros.

Ejemplo 3 Comparación de diferentes procedimientos de solubilización de la proteína KSAC

[0091] El objetivo del estudio es comparar la eficacia de la solubilización de la proteína a partir de los cuerpos de inclusiones mediante diferentes procedimientos.

[0092] Los cuerpos de inclusión de KSAC producidos a partir de E. coli se prepararon en los siguientes tampones para formar una suspensión de cuerpos: a) tampón Tris 20 mM, ditiotretol (DTT) 50 mM, pH = 8,0; b) tampón Tris de 20 mM, pH = 8,0.

[0093] Las suspensiones de cuerpos de inclusión se almacenaron en tubos Quick Seal para los tratamientos a alta presión, tal como se describe a continuación.

[0094] En el procedimiento A, se aplicó una presurización escalonada a las suspensiones de cuerpos de inclusión aumentando la presión de 0 bar a 3.000 bar a 1.000 bar/min, con una zona invariable de 1 hora de duración cada 500 bar (presión objetivo de 3000 bar alcanzada después de 5 h). La presión de 3000 bar se mantuvo durante 48 horas. Las muestras se despresurizaron a continuación desde 3000 bar a 0 bar a una velocidad constante de 125 bar/h durante 24 horas.

[0095] En el procedimiento B, las suspensiones de cuerpos inclusiones fueron tratadas de acuerdo con el procedimiento descrito en el documento US 6.489.450. Las muestras se sometieron a presurización a una velocidad constante de hasta 2500 bar en 1 hora. La presión de 2500 bar se mantuvo durante 6 horas. La despresurización se realizó a una velocidad constante durante 1 h reduciendo la presión de 2500 bar a 0 bar.

[0096] Las muestras se prepararon tal como se muestra en la Tabla 8 a continuación.

Tabla 8 Tratamiento de suspensiones de cuerpos de inclusión

Muestra (cuerpos de inclusión de KSAC 1 mg/ml)	Tampón	Procedimiento de tratamiento a alta presión
1	Tris 20 mM	Procedimiento A
2	Tris 20 mM + DTT 50 mM	Procedimiento A
3	Tris 20 mM	Control*
4	Tris 20 mM + DTT 50 mM	Control
5	Tris 20 mM	Procedimiento B
6	Tris 20 mM + DTT 50 mM	Procedimiento B
7	Tris 20 mM	Control
8	Tris 20 mM + DTT 50 mM	Control

Control*: sin tratamiento a alta presión, almacenada a temperatura ambiente

Análisis mediante SDS-PAGE

[0097] Después de los tratamientos a alta presión, las muestras se centrifugaron para separar el sobrenadante y los residuos, y se procesaron para el análisis de proteínas en SDS-PAGE. El análisis de SDS-PAGE se muestra en las Figuras 18A y 18B. Cada pocillo se cargó con 5 µl de muestra (crudo), 5 µl de sobrenadante, 5 µl de sedimento resuspendidos en tampón Tris.

[0098] Las cantidades de proteínas KSAC calculadas a partir de la intensidad de la banda en la SDS-PAGE se presentan en la Tabla 9 a continuación.

Tabla 9 Integración comparativa de las intensidades de las bandas medidas en geles de SDS

		Procedimiento A				Procedimiento B			
muestra		I.I. banda de KSAC	I.I. proteína total	%KSAC /total	%KSAC-S/%KSA C-P*	I.I. banda de KSAC	I.I. proteína total	%KSAC/total	%KSA C-S/%KSA C-P*
KSAC de referencia		36	49	73%		29	47	62%	
Control - sin DTT	S ¹	0	0	0%	-	0	0	0%	-
	P ²	13	26	50%		4	5	80%	
	C ³	3	21	14%		6	16	38%	
Procedimiento - sin DTT	S	0	9	0%	0%	0	2	0%	0%
	P	43	76	57%		28	39	72%	
	C	27	86	31%		14	41	34%	
Control - sin DTT	S	1	8	13%	-	0	0	0%	-
	P	20	40	50%		24	36	67%	
	C	16	31	52%		22	37	59%	
Procedimiento - sin DTT	S	55	127	43%	75%	18	29	62%	69%
	P	8	14	57%		8	9	89%	
	C	45	106	42%		28	47	60%	
KSAC de referencia		38	52	73%		29	45	64%	
S ¹ : sobrenadante P ² : residuo C ³ : crudo, antes de la centrifugación %KSAC-S/%KSAC-P* : [%KSAC/total en sobrenadante]/[%KSAC/total en residuo]									

[0099] Los resultados muestran que no existe una cantidad significativa de KSAC detectada en el sobrenadante de los controles o las muestras tratadas con los procedimientos A y B cuando se usó tampón que no contenía DTT. Se encontró proteína KSAC soluble en el sobrenadante de las muestras tratadas con alta presión (ambos procedimientos A y B) cuando se usó con tampón que contenía TDT. Sorprendentemente, los resultados de la cuantificación de proteínas a partir de SAS-PAGE también indican que el procedimiento A proporcionó una mejor solubilización en comparación con el procedimiento B. Este sorprendente resultado se confirmó además por el cálculo más preciso del rendimiento de solubilización para cada procedimiento a alta presión usando transferencia Q-Dot y HPLC.

Transferencia Q-Dot

[0100] Los sobrenadantes de las muestras se analizaron mediante transferencia Q-Dot para estimar la cantidad de proteína KSAC solubilizada mediante los tratamientos. Los resultados se muestran en las Figuras 19A-19D y en la Tabla 10.

Tabla 10 Concentraciones de KSAC solubilizada hallada en los sobrenadantes para los controles y las muestras procesadas a alta presión

Identificación	Procedimiento A	Procedimiento B
Tratamiento sin DTT	26,0 g/ml	12,7 g/ml
Control sin DTT	0	9,9 g/ml
Tratamiento con DTT	632,1 g/ml	368,9 g/ml
Control con DTT	61,7 g/ml	63,9 g/ml

[0101] No se observó ninguna diferencia significativa entre las muestras de control (sin tratamiento de alta presión) con y sin DTT. No se halló KSAC soluble en el sobrenadante. El resultado de la transferencia Q-Dot confirmó el resultado de SDS-PAGE.

[0102] El tratamiento realizado usando el procedimiento A con DTT permitió la solubilización y el replegamiento de la proteína KSAC (detectada mediante transferencia Q-Dot). Se encontró que la concentración de proteína KSAC soluble fue de 632 µg/ml usando el procedimiento A, mientras que la concentración de proteína KSAC obtenida utilizando el procedimiento B fue de aproximadamente 369 g/ml. Los rendimientos de solubilización obtenidos son del 63% para el procedimiento A y del 37% para el procedimiento B. Los resultados de la transferencia Q-Dot demuestran además que el procedimiento A es más eficiente en la producción de proteínas solubles y replegadas.

Análisis mediante HPLC

[0103] La Figura 20 muestra la superposición de los cromatogramas de HPLC del sobrenadante del control y la muestra tratada con el procedimiento A. El tiempo de retención, el volumen de retención y la pureza estimada obtenida para la muestra tratada con el procedimiento A se muestran en la Tabla 11 a continuación.

Tabla 11 Tiempo de retención, volumen de retención y pureza estimada obtenida para la muestra tratada mediante el procedimiento A

Detección	Información	Control – sin procesar	Después del procedimiento A
UV	RT (tiempo de retención - min)	12,7	12,4
	VR (volumen de retención - ml)	6,64	6,46
	Pureza estimada (%)	17,3	85,5

[0104] La Figura 21 muestra la superposición de los cromatogramas de HPLC del sobrenadante de la muestra tratada con el procedimiento A y la muestra tratada con el procedimiento B. El tiempo de retención, volumen de retención y la pureza estimada obtenidas para la muestra tratada con el procedimiento A se muestran en la Tabla 12 a continuación.

Tabla 12 Tiempo de retención, volumen de retención y pureza estimada obtenida para las muestras tratadas mediante el procedimiento A y el procedimiento B

Detección	Información	Procedimiento A	Procedimiento B
UV	RT (tiempo de retención - min)	12,4	12,4
	VR (volumen de retención - ml)	6,46	6,47
	Pureza estimada (%)	85,5	74,2

[0105] La Figura 22 muestra la superposición de los cromatogramas de HPLC del sobrenadante de la muestra tratada con el procedimiento A, la muestra tratada con el procedimiento B y la muestra tratada con el procedimiento clásico (desnaturalización y replegamiento obtenidos mediante tratamiento con urea y DTT). El tiempo de retención, el volumen de retención y la pureza estimada obtenidos para la muestra tratada con el procedimiento A se muestran en la Tabla 13 a continuación.

Tabla 13 Tiempo de retención, volumen de retención y pureza estimada obtenida para las muestras tratadas mediante el procedimiento A, el procedimiento B y el procedimiento clásico

Detección	Información	Proceso clásico	Procedimiento A	Procedimiento B
UV	RT (tiempo de retención - min)	12,5	12,4	12,4
	VR (volumen de retención - ml)	6,50	6,47	6,47
	Área de pico (mAU)	8628	25251	10506
	Pureza estimada (%)	94,7	85,5	74,2

[0106] Los resultados de HPLC confirmaron adicionalmente que el procedimiento A proporcionó una mejor solubilización de la proteína KSAC que el procedimiento B a juzgar por las áreas de los picos (25251 mAU para el procedimiento A vs 10506 mAU para el procedimiento B). Tanto el procedimiento A como el B permiten la obtención de un replegamiento de la proteína KSAC muy cerca de la obtenida mediante el procedimiento clásico (solubilización utilizando tratamiento con urea + DTT y replegamiento mediante cromatografía SEC).

[0107] Los ensayos realizados con los procedimientos A y B no produjeron una proteína KSAC soluble significativa en ausencia de DTT. Los resultados confirmaron que se necesita un agente reductor durante el tratamiento a alta presión para romper los enlaces disulfuro. Sin embargo, el sorprendente descubrimiento inesperado es que no hay necesidad de eliminación de DTT con el fin de obtener un replegamiento correcto de la proteína. Contrariamente al

conocimiento general de que debe eliminarse el DTT del tampón a fin de que las proteínas se replieguen correctamente, sorprendentemente se ha descubierto por los solicitantes que la presencia de DTT no interfiere con el procedimiento de replegamiento en el tratamiento a alta presión del presente invento. Las proteínas solubles KSAC obtenidas a partir del procedimiento a alta presión de presente invención se replegaron correctamente para formar trímeros en presencia de DTT.

LISTADO DE SECUENCIAS

[0108]

<110> Meria1, Inc.

<120> PROTEÍNA QUIMÉRICA KSAC Y USOS DE LA MISMA

<130> MER 12-196

<150> 61/694,968

<151> 2012-08-30

<150> 61/830,425

<151> 2013-06-03

<160> 6

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 3012

<212> ADN

<213> secuencia artificial

<220>

<223> AND de KSAC

<400> 1

atggccacca	cgtacgagga	gttttcggcg	aagctggacc	gcctggatga	ggagttcaac	60
aggaagatgc	aggagcagaa	cgccaagttc	tttgcgagaca	agccggatga	gtcgacgctg	120
tcgcccagaga	tgaaggagca	ctacgagaag	ttcgagcgca	tgatcaagga	acacacagag	180
aagttcaaca	agaagatgca	cgagcactcg	gagcacttca	agcagaagtt	cgccgagctg	240
ctcgagcagc	agaaggctgc	gcagtacccg	tccaagacta	gttccgcccg	tggccgtgag	300
accgcgccga	cgaacctgat	tcgtcgccgc	aacaaggacg	agacaaacgg	ggatgtcagc	360
gccgccgccg	accgcttccg	cgaccgcttc	gagaaggcaa	ccctcgagga	gcgcaaggcc	420
gccaccacga	cgatgggtcaa	cgagtactac	gacctggtga	cggacttcta	cgagtacggc	480
tggggccaga	acttccattt	cgcgccgcgc	tacgccggcg	agaccttctt	cgagtccctc	540
gcgcgccacg	agtacttcct	ggccgctcgc	ggcggcttca	tggagggcga	ccacatcgtc	600
gacgtgggct	gcggcgctcg	cggtccggcg	cgcaacatgg	ttcgccctcac	gcgctgcaac	660
gtcatcgggc	tcaacaacaa	cgattaccag	atcagccgcg	ctcgccgtca	tgacgcgctc	720
gccggtatga	gctccaagat	cgactacgtc	aagaccgact	tctgcaacat	gagcttagcc	780
gacaacacct	tcgacggcgc	ctacgccatc	gaggccacct	gccacgcaaa	ggacaaggtc	840
aagtgtctata	gcgaggtctt	ccgtgtcatc	aagcccggca	cctgctttgt	cctgtacgag	900
tggtgcatga	ccgacaagta	caaccccaat	gacgagtacc	accgcacaat	caagcaccgc	960
atcgagctgg	gcgacggcct	gccggagatg	gagacgtgca	aacaggtgat	cgagtacatg	1020

ES 2 744 709 T3

	aagcaggccg	gcttcgtggt	ggaggaggcc	atagacgtca	tcagtcagtt	cgagtccagc	1080
5	cccatcaaga	gtatcccgtg	gtaccagccg	ctggtcggcg	actattcgtc	cctgcagggc	1140
	ctgcgctcta	ccccgattgg	ccgcatcctc	acgaacgtca	tgtgtcgcgt	gctggagttc	1200
	gtgcgccctag	ctccgaaggg	cacgtacaag	gcgacggaga	ttttggagga	ggctgcggaa	1260
10	agcctggttg	tgggcggtca	gctcggcatc	ttcacgccgt	ccttctacat	ccgcgctcgc	1320
	aagccgtcca	agcaggctgg	atccaagatc	cgcagcgtgc	gtccgcttgt	ggtgttgctg	1380
15	gtgtgcgtcg	cggcggtgct	cgcactcagc	gcctccgctg	agccgcacaa	ggcggccggt	1440
	gacgtcggcc	cgctgagcgt	tggcccgcag	agcgtcggcc	cgctgagcgt	tggcccgcag	1500
	gcggttggcc	cgctgagcgt	tggcccgcag	agcgtcggcc	cgctgagcgt	tggcccgcag	1560
20	gcggttggcc	cgctgagcgt	tggcccgcag	agcgttggcc	cgctgagcgt	tggcccgcgtg	1620
	agcgttggcc	cgcagagcgt	tggcccgcgtg	agcgttgcca	gccagagcgt	cggcccgcgtg	1680
25	agcgttggtc	cgcagagcgt	cggcccgcgtg	agcgttggcc	cgcaggcggt	tggcccgcgtg	1740
	agcgttggcc	cgcagagcgt	cggcccgcgtg	agcgttggcc	cgcaggcggt	tggcccgcgtg	1800
	agcgttggcc	cgcagagcgt	tggcccgcgtg	agcgttggcc	cgcagagcgt	tggcccgcgtg	1860
30	agcgttgcca	gccagagcgt	cggcccgcgtg	agcgttggtc	cgcagagcgt	cggcccgcgtg	1920
	agcgttggcc	cgcagagcgt	cggcccgcgtg	agcgttggcc	cgcagagcgt	cggcccgcgtg	1980
35	agcgttggtc	cgcagagcgt	tggcccgcgtg	agcgttggcc	cgcagagcgt	tgacgttagc	2040
	ccggtgagcg	gatccgaatt	cgatgcggtg	gactggcgcg	agaagggcgc	cgtgacgccg	2100
	gtgaagaatc	aaggcgcggtg	cgggtcgtgc	tgggcttct	cggcggtcgg	caacatcgag	2160
40	tcgcagtggg	cccgtgccgg	ccacggcttg	gtgagcctgt	cggagcagca	gctggtgagc	2220
	tgcgatgaca	aagacaatgg	ctgcaacggc	gggctgatgc	tgcaggcggt	cgagtggctg	2280
45	ctgcgacaca	tgtacgggat	cgtgttcacg	gagaagagct	acccttacac	gtccggcaac	2340
	ggtgatgttg	ccgagtgcct	gaacagcagt	aaactcgttc	ccggcgcgca	aatcgacggc	2400
	tacgtgatga	tcccagacaa	cgaaacgggt	atggctgcgt	ggcttgcgga	gaatggcccc	2460
50	atcgcgattg	cggtcgacgc	cagctccttc	atgtcttacc	agagcggcgt	gctgaccagc	2520
	tgcgctggcg	atgcactgaa	ccacggcggtg	ctgctcgtcg	ggtacaacaa	gaccggtggg	2580
55	gttccgtact	gggtgatcaa	gaactcgtgg	ggtgaggact	ggggcgagaa	gggctacgtg	2640
	cgcgtggtca	tggggctgaa	cgcgtgcctg	ctcagtgaat	accccggtgc	cgcgcatgtg	2700
	ccgcgagatc	tcacccctgg	cccgggcacg	gagagcgagg	agcgcgcccc	taaacgggtg	2760
60	acggtggagc	agatgatgtg	caccgatatg	tactgcaggg	aggggtgcaa	gaagagtctt	2820
	ctcaccgcga	acgtgtgcta	caagaacggg	ggaggcggt	cctctatgac	gaagtgcggt	2880
65	ccgcagaagg	tgctgatgtg	ctcgtactcg	aaccctcatt	gctttggtcc	tgggctgtgc	2940
	ctcgagactc	ctgatggcaa	gtgcgcgccg	tacttcttgg	gctcgatcat	gaacacctgc	3000
	cagtacacgt	aa					3012

5 <210> 2
 <211> 1003
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

 10 <220>
 <223> proteína KSAC
 <400> 2

 15 Met Ala Thr Thr Tyr Glu Glu Phe Ser Ala Lys Leu Asp Arg Leu Asp
 1 5 10 15

 20 Glu Glu Phe Asn Arg Lys Met Gln Glu Gln Asn Ala Lys Phe Phe Ala
 20 25 30

 25 Asp Lys Pro Asp Glu Ser Thr Leu Ser Pro Glu Met Lys Glu His Tyr
 35 40 45

 30 Glu Lys Phe Glu Arg Met Ile Lys Glu His Thr Glu Lys Phe Asn Lys
 50 55 60

 35 Lys Met His Glu His Ser Glu His Phe Lys Gln Lys Phe Ala Glu Leu
 65 70 75 80

 40 Leu Glu Gln Gln Lys Ala Ala Gln Tyr Pro Ser Lys Thr Ser Ser Ala
 85 90 95

 45 Gly Gly Arg Glu Thr Ala Pro Thr Asn Leu Ile Arg Arg Arg Asn Lys
 100 105 110

 50 Asp Glu Thr Asn Gly Asp Val Ser Ala Ala Ala Asp Arg Phe Arg Asp
 115 120 125

 55 Arg Phe Glu Lys Ala Thr Leu Glu Glu Arg Lys Ala Ala Thr Thr Thr
 130 135 140

 60 Met Val Asn Glu Tyr Tyr Asp Leu Val Thr Asp Phe Tyr Glu Tyr Gly
 145 150 155 160

 65 Trp Gly Gln Asn Phe His Phe Ala Pro Arg Tyr Ala Gly Glu Thr Phe
 165 170 175

 70 Phe Glu Ser Leu Ala Arg His Glu Tyr Phe Leu Ala Ala Arg Gly Gly
 180 185 190

 75 Phe Met Glu Gly Asp His Ile Val Asp Val Gly Cys Gly Val Gly Gly
 195 200 205

 80 Pro Ala Arg Asn Met Val Arg Leu Thr Arg Cys Asn Val Ile Gly Val
 210 215 220

ES 2 744 709 T3

	Asn	Asn	Asn	Asp	Tyr	Gln	Ile	Ser	Arg	Ala	Arg	Arg	His	Asp	Ala	Leu
	225					230					235					240
5	Ala	Gly	Met	Ser	Ser	Lys	Ile	Asp	Tyr	Val	Lys	Thr	Asp	Phe	Cys	Asn
					245					250					255	
10	Met	Ser	Leu	Ala	Asp	Asn	Thr	Phe	Asp	Gly	Ala	Tyr	Ala	Ile	Glu	Ala
				260					265					270		
15	Thr	Cys	His	Ala	Lys	Asp	Lys	Val	Lys	Cys	Tyr	Ser	Glu	Val	Phe	Arg
			275					280					285			
20	Val	Ile	Lys	Pro	Gly	Thr	Cys	Phe	Val	Leu	Tyr	Glu	Trp	Cys	Met	Thr
		290					295					300				
25	Asp	Lys	Tyr	Asn	Pro	Asn	Asp	Glu	Tyr	His	Arg	Thr	Ile	Lys	His	Arg
	305					310					315					320
30	Ile	Glu	Leu	Gly	Asp	Gly	Leu	Pro	Glu	Met	Glu	Thr	Cys	Lys	Gln	Val
					325					330					335	
35	Ile	Glu	Tyr	Met	Lys	Gln	Ala	Gly	Phe	Val	Val	Glu	Glu	Ala	Ile	Asp
				340					345					350		
40	Val	Ile	Ser	Gln	Phe	Glu	Ser	Ser	Pro	Ile	Lys	Ser	Ile	Pro	Trp	Tyr
			355					360					365			
45	Gln	Pro	Leu	Val	Gly	Asp	Tyr	Ser	Ser	Leu	Gln	Gly	Leu	Arg	Ser	Thr
		370					375					380				
50	Pro	Ile	Gly	Arg	Ile	Leu	Thr	Asn	Val	Met	Cys	Arg	Val	Leu	Glu	Phe
	385					390					395					400
55	Val	Arg	Leu	Ala	Pro	Lys	Gly	Thr	Tyr	Lys	Ala	Thr	Glu	Ile	Leu	Glu
					405					410					415	
60	Glu	Ala	Ala	Glu	Ser	Leu	Val	Val	Gly	Gly	Gln	Leu	Gly	Ile	Phe	Thr
				420					425					430		
65	Pro	Ser	Phe	Tyr	Ile	Arg	Ala	Arg	Lys	Pro	Ser	Lys	Gln	Ala	Gly	Ser
			435					440					445			
70	Lys	Ile	Arg	Ser	Val	Arg	Pro	Leu	Val	Val	Leu	Leu	Val	Cys	Val	Ala
		450					455					460				
75	Ala	Val	Leu	Ala	Leu	Ser	Ala	Ser	Ala	Glu	Pro	His	Lys	Ala	Ala	Val
	465					470					475					480
80	Asp	Val	Gly	Pro	Leu	Ser	Val	Gly	Pro	Gln	Ser	Val	Gly	Pro	Leu	Ser
					485					490					495	

ES 2 744 709 T3

	Val	Gly	Pro	Gln	Ala	Val	Gly	Pro	Leu	Ser	Val	Gly	Pro	Gln	Ser	Val
				500					505					510		
5	Gly	Pro	Leu	Ser	Val	Gly	Pro	Gln	Ala	Val	Gly	Pro	Leu	Ser	Val	Gly
			515					520					525			
10	Pro	Gln	Ser	Val	Gly	Pro	Leu	Ser	Val	Gly	Pro	Leu	Ser	Val	Gly	Pro
		530					535					540				
15	Gln	Ser	Val	Gly	Pro	Leu	Ser	Val	Gly	Ser	Gln	Ser	Val	Gly	Pro	Leu
	545					550					555					560
20	Ser	Val	Gly	Pro	Gln	Ser	Val	Gly	Pro	Leu	Ser	Val	Gly	Pro	Gln	Ala
					565					570					575	
25	Val	Gly	Pro	Leu	Ser	Val	Gly	Pro	Gln	Ser	Val	Gly	Pro	Leu	Ser	Val
				580					585					590		
30	Gly	Pro	Gln	Ala	Val	Gly	Pro	Leu	Ser	Val	Gly	Pro	Gln	Ser	Val	Gly
			595					600					605			
35	Pro	Leu	Ser	Val	Gly	Pro	Gln	Ser	Val	Gly	Pro	Leu	Ser	Val	Gly	Ser
		610					615					620				
40	Gln	Ser	Val	Gly	Pro	Leu	Ser	Val	Gly	Pro	Gln	Ser	Val	Gly	Pro	Leu
	625					630					635					640
45	Ser	Val	Gly	Pro	Gln	Ser	Val	Gly	Pro	Leu	Ser	Val	Gly	Pro	Gln	Ser
					645					650					655	
50	Val	Gly	Pro	Leu	Ser	Val	Gly	Pro	Gln	Ser	Val	Gly	Pro	Leu	Ser	Val
				660					665					670		
55	Gly	Pro	Gln	Ser	Val	Asp	Val	Ser	Pro	Val	Ser	Gly	Ser	Glu	Phe	Asp
			675					680					685			
60	Ala	Val	Asp	Trp	Arg	Glu	Lys	Gly	Ala	Val	Thr	Pro	Val	Lys	Asn	Gln
	690						695					700				
65	Gly	Ala	Cys	Gly	Ser	Cys	Trp	Ala	Phe	Ser	Ala	Val	Gly	Asn	Ile	Glu
	705					710					715					720
70	Ser	Gln	Trp	Ala	Arg	Ala	Gly	His	Gly	Leu	Val	Ser	Leu	Ser	Glu	Gln
				725						730					735	
75	Gln	Leu	Val	Ser	Cys	Asp	Asp	Lys	Asp	Asn	Gly	Cys	Asn	Gly	Gly	Leu
				740					745					750		
80	Met	Leu	Gln	Ala	Phe	Glu	Trp	Leu	Leu	Arg	His	Met	Tyr	Gly	Ile	Val
		755						760					765			

ES 2 744 709 T3

Phe Thr Glu Lys Ser Tyr Pro Tyr Thr Ser Gly Asn Gly Asp Val Ala
 770 775 780
 5 Glu Cys Leu Asn Ser Ser Lys Leu Val Pro Gly Ala Gln Ile Asp Gly
 785 790 795 800
 10 Tyr Val Met Ile Pro Ser Asn Glu Thr Val Met Ala Ala Trp Leu Ala
 805 810 815
 15 Glu Asn Gly Pro Ile Ala Ile Ala Val Asp Ala Ser Ser Phe Met Ser
 820 825 830
 20 Tyr Gln Ser Gly Val Leu Thr Ser Cys Ala Gly Asp Ala Leu Asn His
 835 840 845
 25 Gly Val Leu Leu Val Gly Tyr Asn Lys Thr Gly Gly Val Pro Tyr Trp
 850 855 860
 30 Val Ile Lys Asn Ser Trp Gly Glu Asp Trp Gly Glu Lys Gly Tyr Val
 865 870 875 880
 35 Arg Val Val Met Gly Leu Asn Ala Cys Leu Leu Ser Glu Tyr Pro Val
 885 890 895
 40 Ser Ala His Val Pro Arg Ser Leu Thr Pro Gly Pro Gly Thr Glu Ser
 900 905 910
 45 Glu Glu Arg Ala Pro Lys Arg Val Thr Val Glu Gln Met Met Cys Thr
 915 920 925
 50 Asp Met Tyr Cys Arg Glu Gly Cys Lys Lys Ser Leu Leu Thr Ala Asn
 930 935 940
 55 Val Cys Tyr Lys Asn Gly Gly Gly Gly Ser Ser Met Thr Lys Cys Gly
 945 950 955 960
 60 Pro Gln Lys Val Leu Met Cys Ser Tyr Ser Asn Pro His Cys Phe Gly
 965 970 975
 65 Pro Gly Leu Cys Leu Glu Thr Pro Asp Gly Lys Cys Ala Pro Tyr Phe
 980 985 990
 70 Leu Gly Ser Ile Met Asn Thr Cys Gln Tyr Thr
 995 1000
 75 <210> 3
 <211> 92
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial
 80 <220>
 <223> proteína KMP11

ES 2 744 709 T3

<400> 3

Met Ala Thr Thr Tyr Glu Glu Phe Ser Ala Lys Leu Asp Arg Leu Asp
1 5 10 15

Glu Glu Phe Asn Arg Lys Met Gln Glu Gln Asn Ala Lys Phe Phe Ala
20 25 30

Asp Lys Pro Asp Glu Ser Thr Leu Ser Pro Glu Met Lys Glu His Tyr
35 40 45

Glu Lys Phe Glu Arg Met Ile Lys Glu His Thr Glu Lys Phe Asn Lys
50 55 60

Lys Met His Glu His Ser Glu His Phe Lys Gln Lys Phe Ala Glu Leu
65 70 75 80

Leu Glu Gln Gln Lys Ala Ala Gln Tyr Pro Ser Lys
85 90

<210> 4

<211> 352

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> proteína SMT

<400> 4

Ser Ala Gly Gly Arg Glu Thr Ala Pro Thr Asn Leu Ile Arg Arg Arg
1 5 10 15

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

Arg Asp Arg Phe Glu Lys Ala Thr Leu Glu Glu Arg Lys Ala Ala Thr
35 40 45

Thr Thr Met Val Asn Glu Tyr Tyr Asp Leu Val Thr Asp Phe Tyr Glu
50 55 60

Tyr Gly Trp Gly Gln Asn Phe His Phe Ala Pro Arg Tyr Ala Gly Glu
65 70 75 80

Thr Phe Phe Glu Ser Leu Ala Arg His Glu Tyr Phe Leu Ala Ala Arg
85 90 95

Gly Gly Phe Met Glu Gly Asp His Ile Val Asp Val Gly Cys Gly Val
100 105 110

Gly Gly Pro Ala Arg Asn Met Val Arg Leu Thr Arg Cys Asn Val Ile
115 120 125

ES 2 744 709 T3

Gly Val Asn Asn Asn Asp Tyr Gln Ile Ser Arg Ala Arg Arg His Asp
 130 135 140
 5 Ala Leu Ala Gly Met Ser Ser Lys Ile Asp Tyr Val Lys Thr Asp Phe
 145 150 155 160
 10 Cys Asn Met Ser Leu Ala Asp Asn Thr Phe Asp Gly Ala Tyr Ala Ile
 165 170 175
 15 Glu Ala Thr Cys His Ala Lys Asp Lys Val Lys Cys Tyr Ser Glu Val
 180 185 190
 Phe Arg Val Ile Lys Pro Gly Thr Cys Phe Val Leu Tyr Glu Trp Cys
 195 200 205
 20 Met Thr Asp Lys Tyr Asn Pro Asn Asp Glu Tyr His Arg Thr Ile Lys
 210 215 220
 25 His Arg Ile Glu Leu Gly Asp Gly Leu Pro Glu Met Glu Thr Cys Lys
 225 230 235 240
 30 Gln Val Ile Glu Tyr Met Lys Gln Ala Gly Phe Val Val Glu Glu Ala
 245 250 255
 35 Ile Asp Val Ile Ser Gln Phe Glu Ser Ser Pro Ile Lys Ser Ile Pro
 260 265 270
 Trp Tyr Gln Pro Leu Val Gly Asp Tyr Ser Ser Leu Gln Gly Leu Arg
 275 280 285
 40 Ser Thr Pro Ile Gly Arg Ile Leu Thr Asn Val Met Cys Arg Val Leu
 290 295 300
 45 Glu Phe Val Arg Leu Ala Pro Lys Gly Thr Tyr Lys Ala Thr Glu Ile
 305 310 315 320
 50 Leu Glu Glu Ala Ala Glu Ser Leu Val Val Gly Gly Gln Leu Gly Ile
 325 330 335
 55 Phe Thr Pro Ser Phe Tyr Ile Arg Ala Arg Lys Pro Ser Lys Gln Ala
 340 345 350
 <210> 5
 <211> 235
 <212> PRT
 60 <213> secuencia artificial
 <220>
 <223> proteína A2
 65 <400> 5
 Lys Ile Arg Ser Val Arg Pro Leu Val Val Leu Leu Val Cys Val Ala
 1 5 10 15

ES 2 744 709 T3

[illegible]

ES 2 744 709 T3

	Asp	Ala	Val	Asp	Trp	Arg	Glu	Lys	Gly	Ala	Val	Thr	Pro	Val	Lys	Asn
	1				5					10					15	
5	Gln	Gly	Ala	Cys	Gly	Ser	Cys	Trp	Ala	Phe	Ser	Ala	Val	Gly	Asn	Ile
				20					25					30		
10	Glu	Ser	Gln	Trp	Ala	Arg	Ala	Gly	His	Gly	Leu	Val	Ser	Leu	Ser	Glu
			35					40					45			
15	Gln	Gln	Leu	Val	Ser	Cys	Asp	Asp	Lys	Asp	Asn	Gly	Cys	Asn	Gly	Gly
		50					55					60				
20	Leu	Met	Leu	Gln	Ala	Phe	Glu	Trp	Leu	Leu	Arg	His	Met	Tyr	Gly	Ile
	65					70					75					80
25	Val	Phe	Thr	Glu	Lys	Ser	Tyr	Pro	Tyr	Thr	Ser	Gly	Asn	Gly	Asp	Val
					85					90					95	
30	Ala	Glu	Cys	Leu	Asn	Ser	Ser	Lys	Leu	Val	Pro	Gly	Ala	Gln	Ile	Asp
				100					105					110		
35	Gly	Tyr	Val	Met	Ile	Pro	Ser	Asn	Glu	Thr	Val	Met	Ala	Ala	Trp	Leu
			115					120					125			
40	Ala	Glu	Asn	Gly	Pro	Ile	Ala	Ile	Ala	Val	Asp	Ala	Ser	Ser	Phe	Met
		130					135					140				
45	Ser	Tyr	Gln	Ser	Gly	Val	Leu	Thr	Ser	Cys	Ala	Gly	Asp	Ala	Leu	Asn
	145					150					155					160
50	His	Gly	Val	Leu	Leu	Val	Gly	Tyr	Asn	Lys	Thr	Gly	Gly	Val	Pro	Tyr
				165						170					175	
55	Trp	Val	Ile	Lys	Asn	Ser	Trp	Gly	Glu	Asp	Trp	Gly	Glu	Lys	Gly	Tyr
				180					185					190		
60	Val	Arg	Val	Val	Met	Gly	Leu	Asn	Ala	Cys	Leu	Leu	Ser	Glu	Tyr	Pro
			195					200					205			
65	Val	Ser	Ala	His	Val	Pro	Arg	Ser	Leu	Thr	Pro	Gly	Pro	Gly	Thr	Glu
		210					215					220				
70	Ser	Glu	Glu	Arg	Ala	Pro	Lys	Arg	Val	Thr	Val	Glu	Gln	Met	Met	Cys
	225					230					235					240
75	Thr	Asp	Met	Tyr	Cys	Arg	Glu	Gly	Cys	Lys	Lys	Ser	Leu	Leu	Thr	Ala
					245					250					255	
80	Asn	Val	Cys	Tyr	Lys	Asn	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Ser	Met	Thr	Lys	Cys
				260					265					270		

ES 2 744 709 T3

	Gly	Pro	Gln	Lys	Val	Leu	Met	Cys	Ser	Tyr	Ser	Asn	Pro	His	Cys	Phe
			275					280					285			
5	Gly	Pro	Gly	Leu	Cys	Leu	Glu	Thr	Pro	Asp	Gly	Lys	Cys	Ala	Pro	Tyr
		290					295					300				
10	Phe	Leu	Gly	Ser	Ile	Met	Asn	Thr	Cys	Gln	Tyr	Thr				
	305					310					315					

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para producir una proteína soluble expresada en procariotas o eucariotas que comprende las etapas de:
 - (i) preparar cuerpos de inclusión en un tampón que no comprende o comprende una baja concentración de urea para formar una suspensión de cuerpos de inclusión, en el que la concentración de urea es de 0 M a 3 M;
 - (ii) someter la suspensión de cuerpos de inclusión a un incremento escalonado de la presión durante un período de tiempo; y
 - (iii) mantener una presión elevada aplicada a los cuerpos de inclusión durante un período de tiempo, preferiblemente en el que la alta presión está en el intervalo de aproximadamente 2000 bar a aproximadamente 5000 bar.
2. Procedimiento, según la reivindicación 1, en el que el tampón comprende, además, DTT, preferiblemente en el que la concentración de DTT es de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 100 mM.
3. Procedimiento, según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que en la etapa (ii) se aumenta la presión a aproximadamente 1000 bar/min durante aproximadamente 30 segundos con la relajación intermedia de la proteína durante aproximadamente una hora cada 500 bar.
4. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que en la etapa (iii) la alta presión es de aproximadamente 3000 bar.
5. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que en la etapa (iii) el período de tiempo es de aproximadamente 20 horas a aproximadamente 100 horas.
6. Procedimiento, según la reivindicación 5, en el que el período de tiempo es de aproximadamente 48 horas.
7. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el procedimiento comprende además la etapa de despresurización, preferiblemente en el que la despresurización es a la velocidad de aproximadamente 83 bar/h – 125 bar/h.
8. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que la proteína soluble es una proteína de fusión que consiste en antígenos de Leishmania proteína de membrana de kinetoplástidos 11 (KMP11), esteroil metiltransferasa (SMT), A2 y cisteína proteinasa (CP).

Figura 1

SEQ ID NO:	Tipo	Descripción del gen
1	ADN	ADN de KSAC
2	Proteína	Proteína quimérica KSAC
3	Proteína	Proteína KMP11 de Leishmania
4	Proteína	Proteína SMT de Leishmania
5	Proteína	Proteína A2 de Leishmania
6	Proteína	Proteína CBP de Leishmania

Figura 2A

Secuencia de ADN de KSAC (SEQ ID NO:1)

ATGGCCACCACGTACGAGGAGTTTTCGGCGAAGCTGGACCGCCTGGATGAGGAGTTCAAC
 AGGAAGATGCAGGAGCAGAACGCCAAGTTCTTTGCGGACAAGCCGGATGAGTCGACGCTG
 TCGCCCGAGATGAAGGAGCACTACGAGAAGTTTCGAGCGCATGATCAAGGAACACACAGAG
 AAGTTCAACAAGAAGATGCACGAGCACTCGGAGCACTTCAAGCAGAAGTTCGCCGAGCTG
 CTCGAGCAGCAGAAGGCTGCGCAGTACCCGTCCAAGACTAGTTCCGCCGGTGGCCGTGAG
 ACCGCGCCGACGAACCTGATTTCGTCGCCGCAACAAGGACGAGACAAACGGGGATGTCAGC
 GCCGCCGCCGACCGCTTCCGCGACCGCTTCGAGAAGGCAACCCTCGAGGAGCGCAAGGCC
 GCCACCACGACGATGGTCAACGAGTACTACGACCTGGTGACGGACTTCTACGAGTACGGC
 TGGGGCCAGAACTTCCATTTTCGCGCCGCGCTACGCCGGCGAGACCTTCTTCGAGTCCCTC
 GCGCGCCACGAGTACTTCTGGCCGCTCGCGGCGGCTTCATGGAGGGCGACCACATCGTC
 GACGTGGGCTGCGGCGTTCGGCGGTCCGGCGCGCAACATGGTTTCGCTCACGCGCTGCAAC
 GTCATCGGCGTCAACAACAACGATTACCAGATCAGCCGCGCTCGCCGTCATGACGCGCTC
 GCCGGTATGAGCTCCAAGATCGACTACGTCAAGACCGACTTCTGCAACATGAGCTTAGCC
 GACAACACCTTCGACGGCGCCTACGCCATCGAGGCCACCTGCCACGCAAAGGACAAGGTC
 AAGTGCTATAGCGAGGTCTTCCGTGTCATCAAGCCCGGCACCTGCTTTGTCTGTACGAG
 TGGTGCATGACCGACAAGTACAACCCCAATGACGAGTACCACCGCACAATCAAGCACCGC
 ATCGAGCTGGGCGACGGCCTGCCGGAGATGGAGACGTGCAAACAGGTGATCGAGTACATG
 AAGCAGGCCGGCTTCGTGGTGGAGGAGGCCATAGACGTTCATCAGTCAGTTCGAGTCCAGC
 CCCATCAAGAGTATCCCGTGGTACCAGCCGCTGGTTCGGCGACTATTCGTCCCTGCAGGGC
 CTGCGCTCTACCCCGATTGGCCGCATCCTCACGAACGTTCATGTGTGCGGTGCTGGAGTTC
 GTGCGCCTAGCTCCGAAGGGCACGTACAAGGCGACGGAGATTTTGGAGGAGGCTGCGGAA
 AGCCTGGTGGTGGGCGGTGAGCTCGGCATCTTCACGCCGTCTTCTACATCCGCGCTCGC
 AAGCCGTCCAAGCAGGCTGGATCCAAGATCCGCAGCGTTCGCTCCGCTTGTGGTGTGCTG
 GTGTGCGTTCGCGGCGGTGCTCGCACTCAGCGCCTCCGCTGAGCCGCACAAGGCGGCCGTT
 GACGTTCGGCCCGCTGAGCGTTGGCCCGCAGAGCGTCGGCCCGCTGAGCGTTGGCCCGCAG
 GCGGTTGGCCCGCTGAGCGTTGGCCCGCAGAGCGTTGGCCCGCTGAGCGTTGGCCCGCTG
 AGCGTTGGCCCGCAGAGCGTTGGCCCGCTGAGCGTTGGCAGCCAGAGCGTCGGCCCGCTG
 AGCGTTGGTCCGCAGAGCGTCGGCCCGCTGAGCGTTGGCCCGCAGGCGGTTGGCCCGCTG
 AGCGTTGGCCCGCAGAGCGTCGGCCCGCTGAGCGTTGGCCCGCAGGCGGTTGGCCCGCTG
 AGCGTTGGCCCGCAGAGCGTTGGCCCGCTGAGCGTTGGCCCGCAGAGCGTTGGCCCGCTG
 AGCGTTGGCCCGCAGAGCGTCGGCCCGCTGAGCGTTGGTCCGCAGAGCGTCGGCCCGCTG
 AGCGTTGGCCCGCAGAGCGTCGGCCCGCTGAGCGTTGGCCCGCAGAGCGTCGGCCCGCTG
 AGCGTTGGTCCGCAGAGCGTTGGCCCGCTGAGCGTTGGCCCGCAGAGCGTTGACGTTAGC
 CCGGTGAGCGGATCCGAATTCGATGCGGTGGACTGGCGCGAGAAGGGCGCCGTGACGCCG
 GTGAAGAATCAAGGCGCGTGCGGGTCTGCTGGGCGTTCTCGGCGGTGCGCAACATCGAG
 TCGCAGTGGGCCCCGTGCCGGCCACGGCTTGGTGAGCCTGTGCGAGCAGCAGCTGGTGAGC
 TGCATGACAAAGACAATGGCTGCAACGGCGGGCTGATGCTGCAGGCGTTTCGAGTGGCTG
 CTGCGACACATGTACGGGATCGTGTTACCGGAGAAGAGCTACCCCTACACGTCCGGCAAC
 GGTGATGTGGCCGAGTGCTTGAACAGCAGTAACTCGTTCCCGGCGCGCAAATCGACGGC
 TACGTGATGATCCCGAGCAACGAAACGGTTATGGCTGCGTGGCTTGCGGAGAATGGCCCC
 ATCGCGATTGCGGTTCGAC

Figura 2B

GCCAGCTCCTTCATGTCTTACCAGAGCGGCGTGCTGACCAGCTGCGCTGGCGATGCACTG
AACCACGGCGTGCTGCTCGTCCGGTACAACAAGACCGGTGGGGTCCGTACTGGGTGATC
AAGAACTCGTGGGGTGAGGACTGGGGCGAGAAGGGCTACGTGCGCGTGGTTCATGGGGCTG
AACGCGTGCTGCTCAGTGAATACCCCGTGTCCGCGCATGTGCCGCGGAGTCTCACCCT
GGCCCGGGCACGGAGAGCGAGGAGCGCGCCCCCTAAACGGGTGACGGTGGAGCAGATGATG
TGCACCGATATGTACTGCAGGGAGGGGTGCAAGAAGAGTCTTCTCACC CGGAACGTGTGC
TACAAGAACGGGGGAGGCGGCTCCTCTATGACGAAGTGCGGTCCGCAGAAGGTGCTGATG
TGCTCGTACTCGAACCTCATTGCTTTGGTCTGGGCTGTGCCTCGAGACTCCTGATGGC
AAGTGCGCGCCGTACTTCTTGGGCTCGATCATGAACACCTGCCAGTACACGTAA

Secuencia de proteína KSAC (SEQ ID NO:2)

MATTYEEFSAKLDRLEEFNRKMQE QNAKFFADKPDESTLSPEMKEHYEKF
ERMKEHTEKFNKKMHEHSEHFKQKFAELLEQQKAAQYPSK ***TSS***AGGRET
APTNLIRRRNKDETNGDVSAAADRFDRFEKATLEERKAATTTMVNEYDDL
VTDIFYEYGWGQNFHIFAPRYAGETFFESLARHEYFLAARGGFMEGDHUVDV
GCGVGGPARNMVRLTRCNVIGVNNNDYQISRARRHIDALAGMSSKIDYVKT
DFCNMSLADNTFDGAYAIEATCHAKDKVKCYSEVFRVIKPGTFCVLYEWC
TDKYNPNDEYHRTIKHRIELGDGLPEMETCKQVIEYMKQAGFVVEEAIDVIS
QFESSPIKSIPWYQPLVGDYSSLQGLRSTPIGRILTVMCRVLEFVRLAPKGT
YKATEILEEAAESLVVGGQLGIFTSPFYIRARKPSKQA ***GSKIRSVRPLVLLV***
CVAAVLALSASAE***PHKA***AVDVGP***PLSVGPQSVGPLSVGPQAVGPLSVGPQSVG***
PLSVGPQAVGPLSVGPQSVGPLSVGPQSVGPLSVGSQSVGPLSVGPQSVG
PLSVGPQAVGPLSVGPQSVGPLSVGPQAVGPLSVGPQSVGPLSVGPQSVG
PLSVGSQSVGPLSVGPQSVGPLSVGPQSVGPLSVGPQSVGPLSVGPQSVGPLS
VGPQSVDVSPV***SGSEF***DAVDWREKGA VTPVKNQGACGSCWAFSAVGNIESQ
WARAGHGLVSLSEQQLVSCDDKDNCGCNGGLMLQAFEWLLRHMYGIVFTE
KSYPYTSGNGDVAECLNSSKLVPGAQIDGYVMIPSNETVMAAWLAENGPIAI
AVDASSEFMSYQSGVLTSCAGDALNHGVLLVGYNKTGGVPYVWIKNSWGED
WGEKGYVRVVMGLNACLLSEYPVSAHVPRSLTPGPGTESEERAPKRVTVEQ
MMCTDMYCREGCKKSLLTANVCYKNGGGGSSMTKCGPQKVL MCSYSNPH
CFGPGLCLETDPDGKCAPYFLGSIMNTCQYT

- KPM11 (en rojo)
- Esterol metiltransferasa (en verde)
- A2 (en azul)
- Cisteína proteinasa (en marrón)
- **Enlazadores (en cursiva y negrita)**

Figura 2C

Proteina KMP11 (SEQ ID NO:3)

MATTYEEFSAKLDRLDEEFNRKMQEQNAKFFADKPDESTLSPEMKEHYEKF
ERMKEHTEKFNKKMHEHSEHFKQKFAELLEQQKAAQYPSK

Proteina SMT (SEQ ID NO:4)

SAGGRETAPTNLIRRRNKDETNGDVSAADRFRDRFEKATLEERKAATTTM
VNEYDDLVTDFYEWGQNFHFAPRYAGETFFESLARHEYFLAARGGFME
GDHIVDVGCGVGGPARNMVRLTRCNVIGVNNNDYQISRARRHDALAGMSS
KIDYVKTDFCNMSLADNTFDGAYAIEATCHAKDKVKCYSEVFRVIKPGTCF
VLYEWCMTDKYNPNDEYHRTIKHRIELGDGLPEMETCKQVIEYMKQAGFV
VEEAIDVISQFESSPIKSIPWYQPLVGDYSSLQGLRSTPIGRILTVMCRVLEF
VRLAPKGTYKATEILEEAAESLVVGGQLGIFTSPFYIRARKPSKQA

Proteina A2 (SEQ ID NO:5)

KIRSVRPLVVLLVCVA AVLALSASAEPHKAAVDVGPLSVGPQSVGPLSVGPQ
AVGPLSVGPQSVGPLSVGPQAVGPLSVGPQSVGPLSVGPLSVGPQSVGPLSV
GSQSVGPLSVGPQSVGPLSVGPQAVGPLSVGPQSVGPLSVGPQAVGPLSVGP
QSVGPLSVGPQSVGPLSVGSQSVGPLSVGPQSVGPLSVGPQSVGPLSVGPQSV
GPLSVGPQSVGPLSVGPQSVSDVSPVS

Proteina CBP (SEQ ID NO:6)

DAYDWREKGA VTPVKNQGACGSCWAFSAVGNIESQWARAGHGLVSLSEQQ
LVSCDDKDNGCNGGLMLQAFEWLLRHMYGIVFTEKSYPYTSNGNDVAECL
NSSKLPGAQIDGYVMIPSNETYMAAWLAENGPIAIAVDASSEMSYQSGVLT
SCAGDALNHGVLLVGYNKTGGVPYWYIKNSWGEDWGEKGYVRVVMGLN
ACLLSEYPVSAHVPRSLTPGPGTESEERAPKRVTYEQMMCTDMYCREGCK
KSLLTANVCYKNGGGGSSMTKCGPQKVL MCSYSNPHCFGPGLCLETPDGK
CAPYFLGSIMNTCQYT

Figura 3

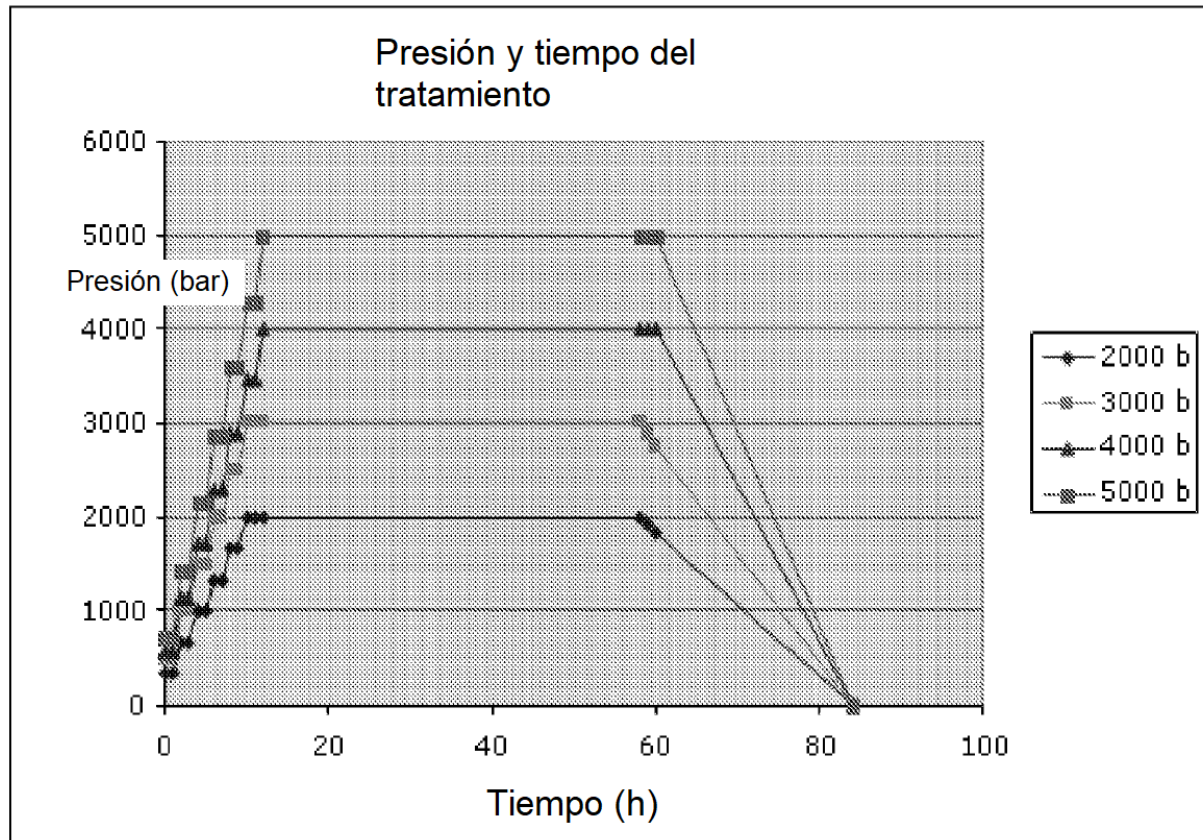


Figura 4

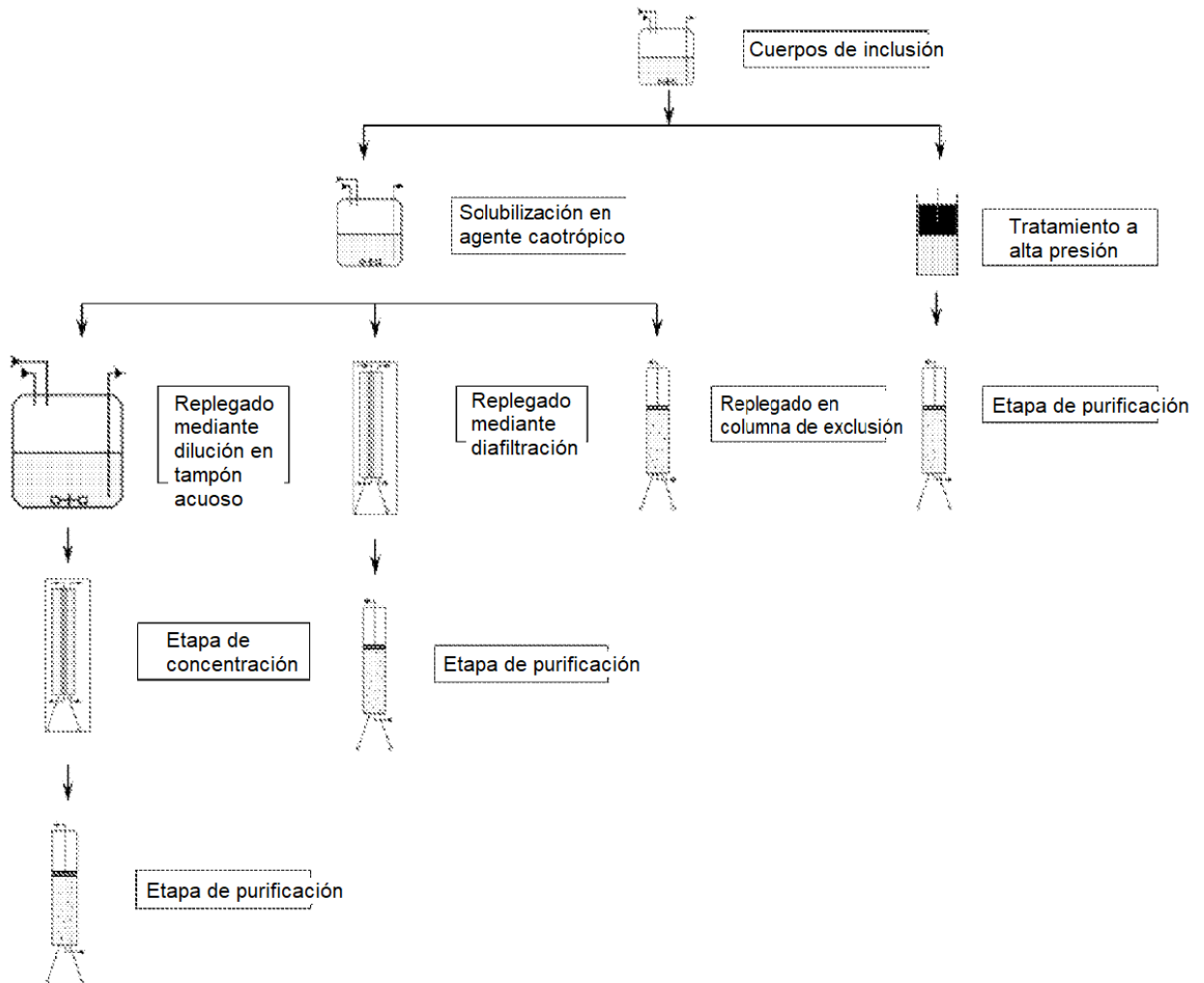


Figura 5

Replegado de KSAC

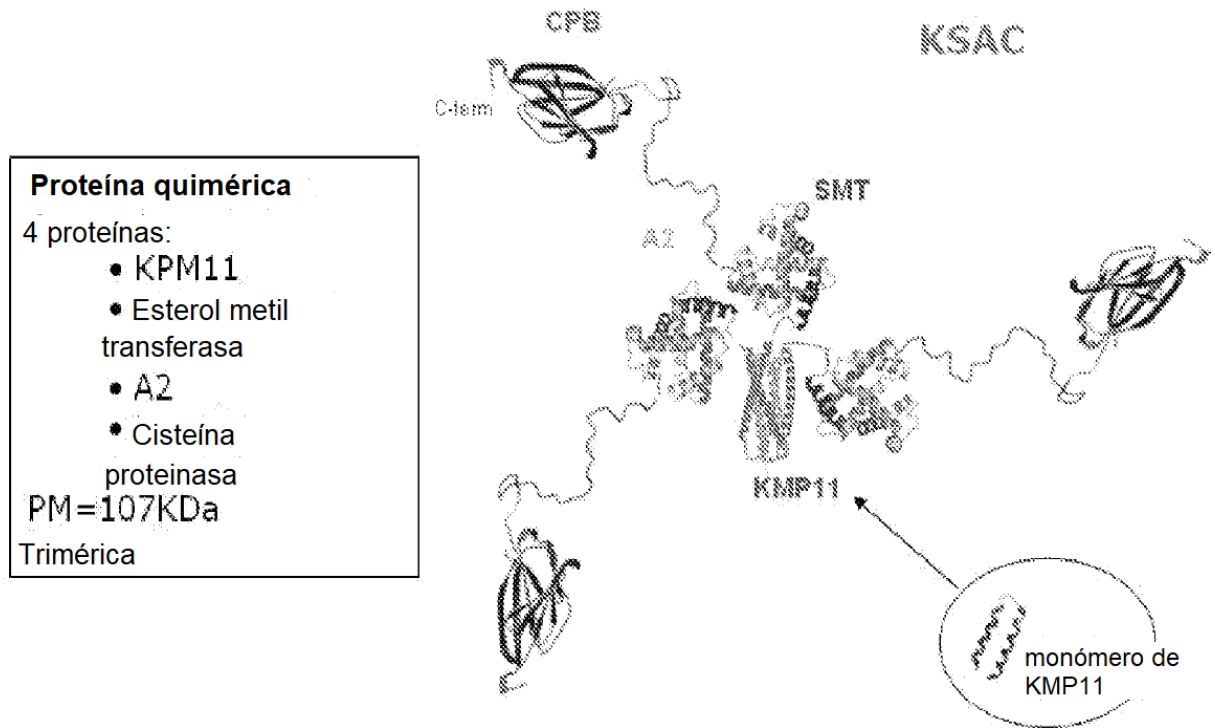


Figura 6

Patrón de SDS-PAGE de la proteína KSAC
replegada mediante cromatografía de exclusión

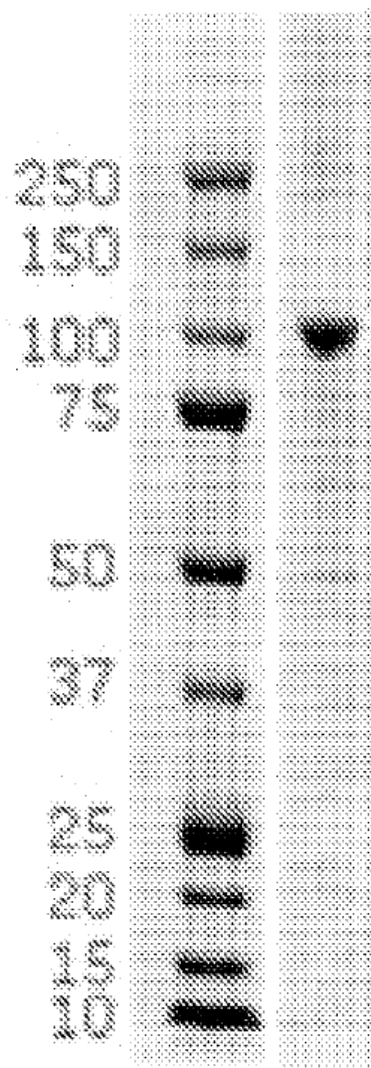


Figura 7

Representación de HPLC de KSAC replegada mediante cromatografía de exclusión

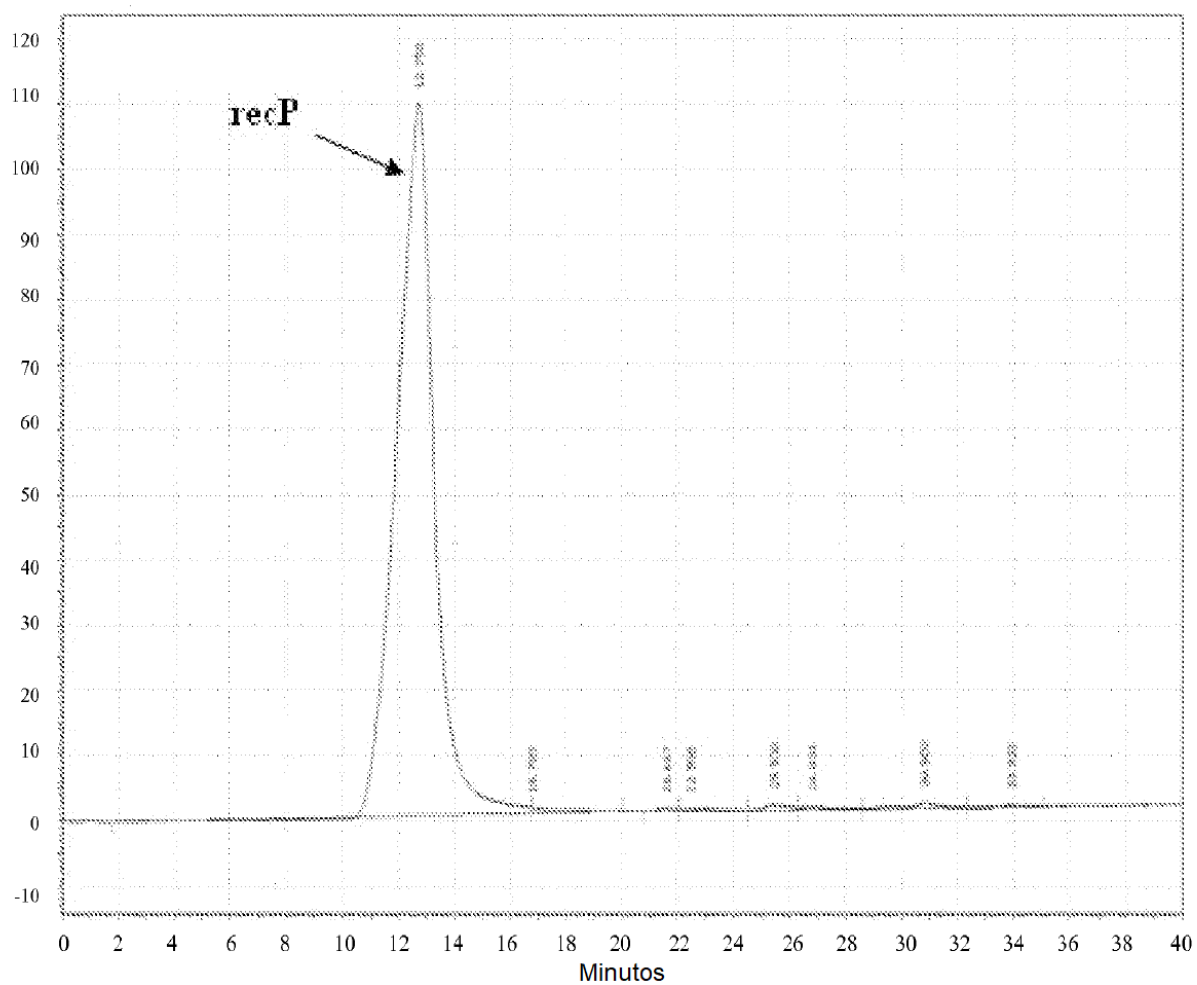


Figura 8A

Dispersión dinámica de luz (DLS) de proteína KSAC
replegada utilizando cromatografía de exclusión

Fig. 8A

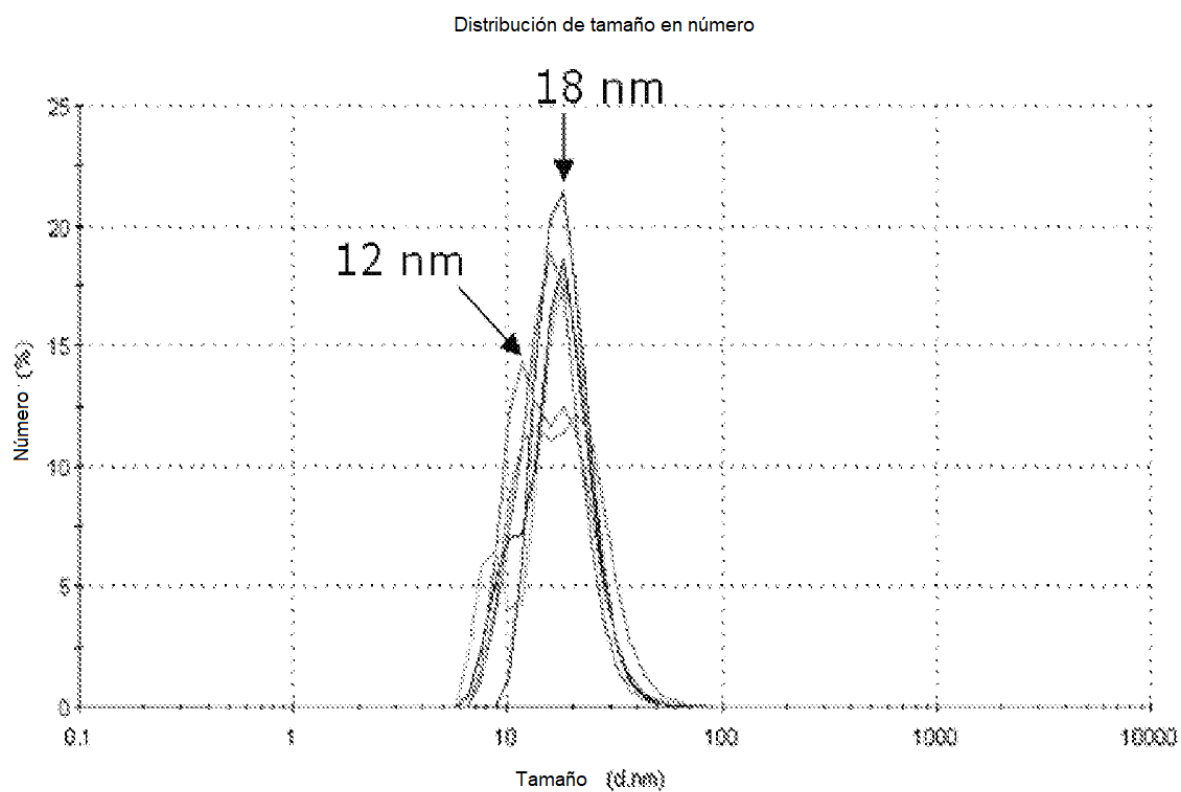


Figura 8B

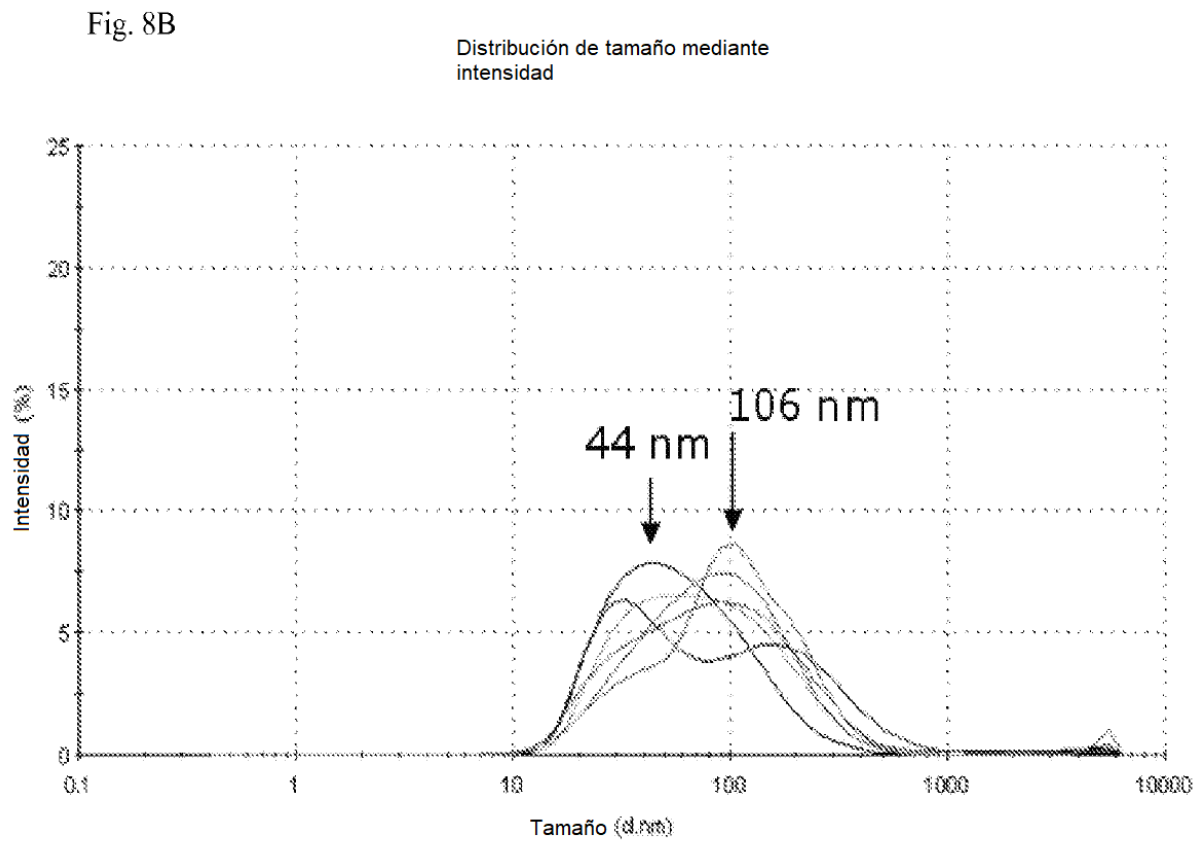


Figura 9

Transferencia qDot

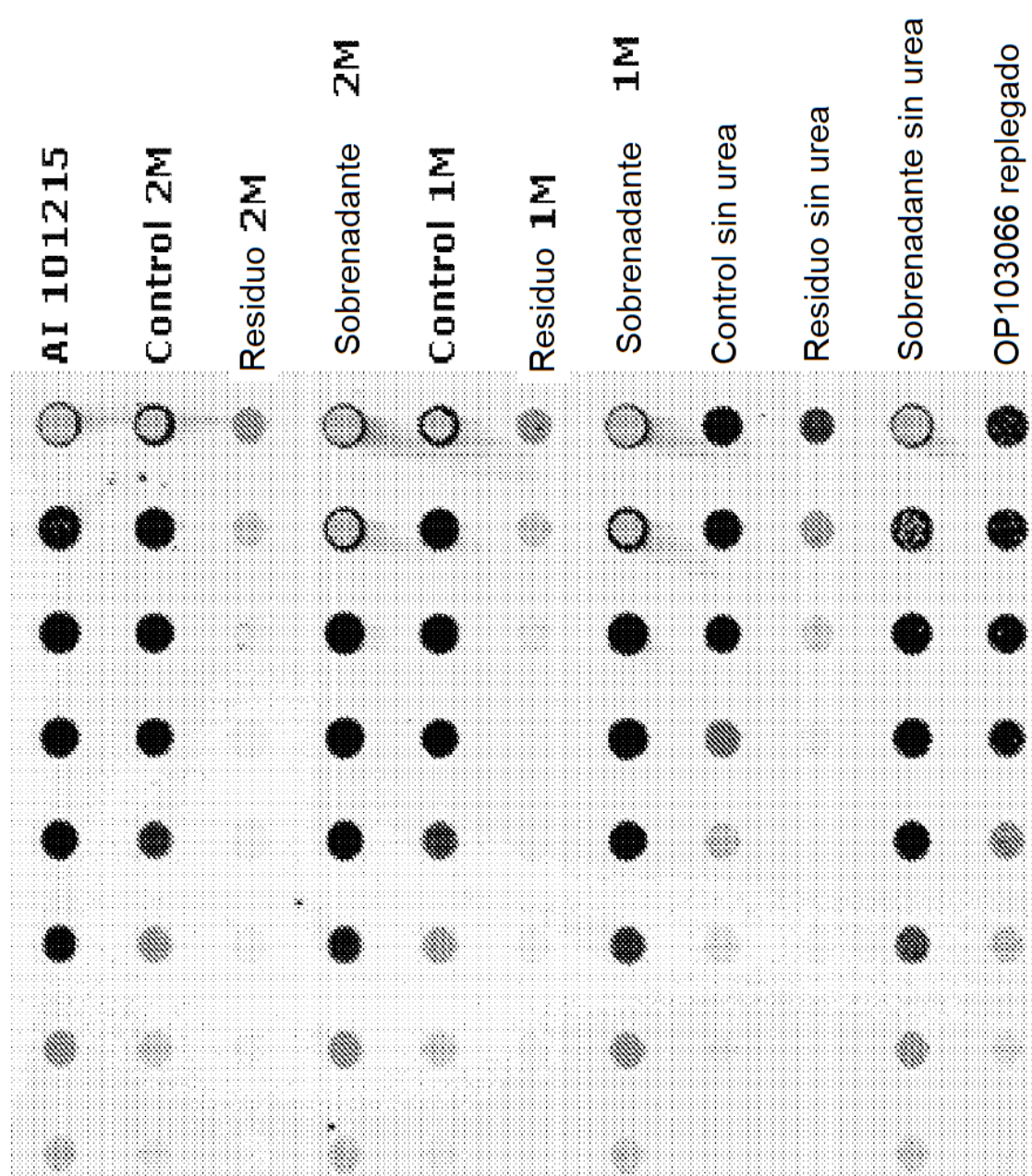


Figura 10

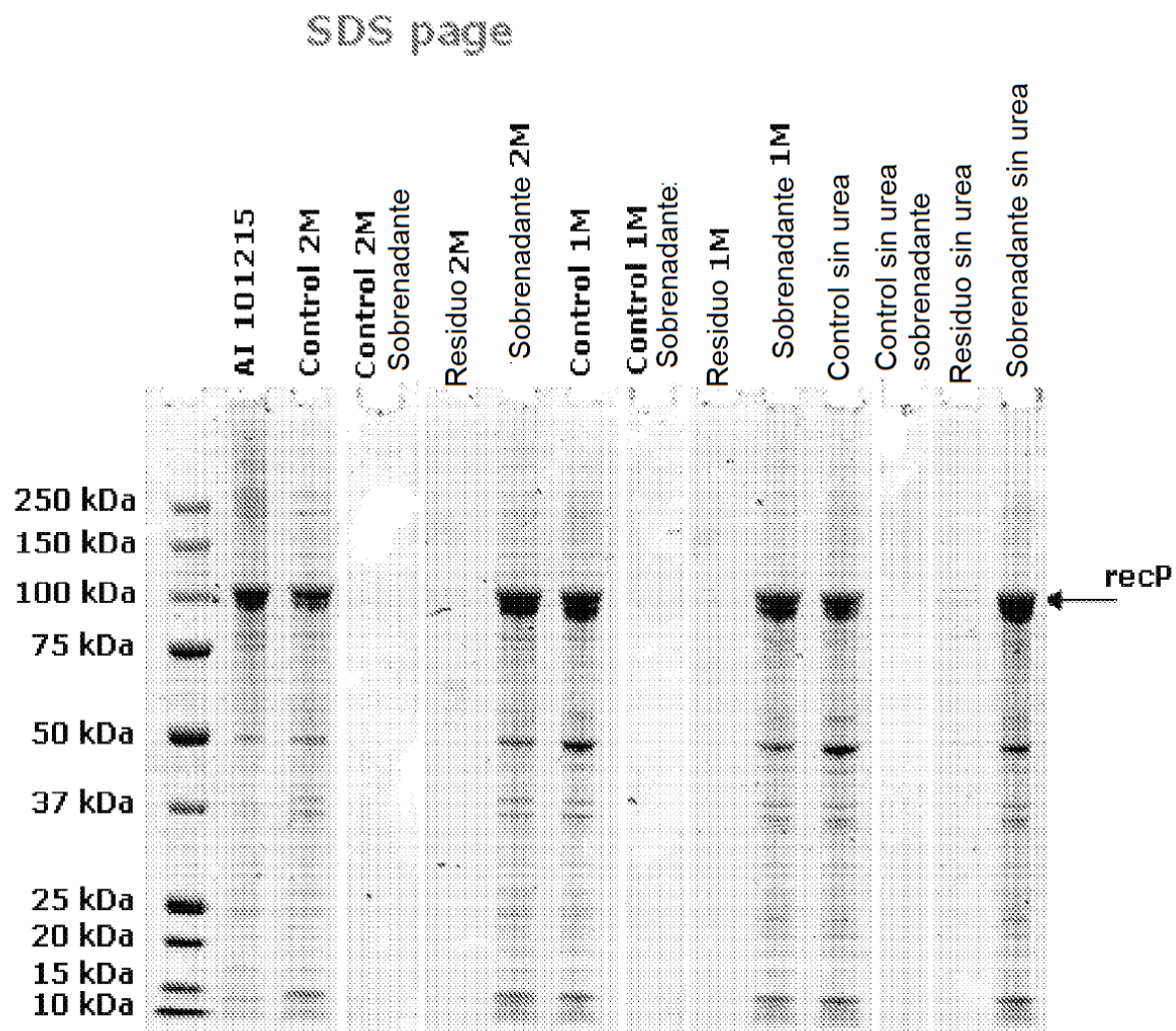


Figura 11

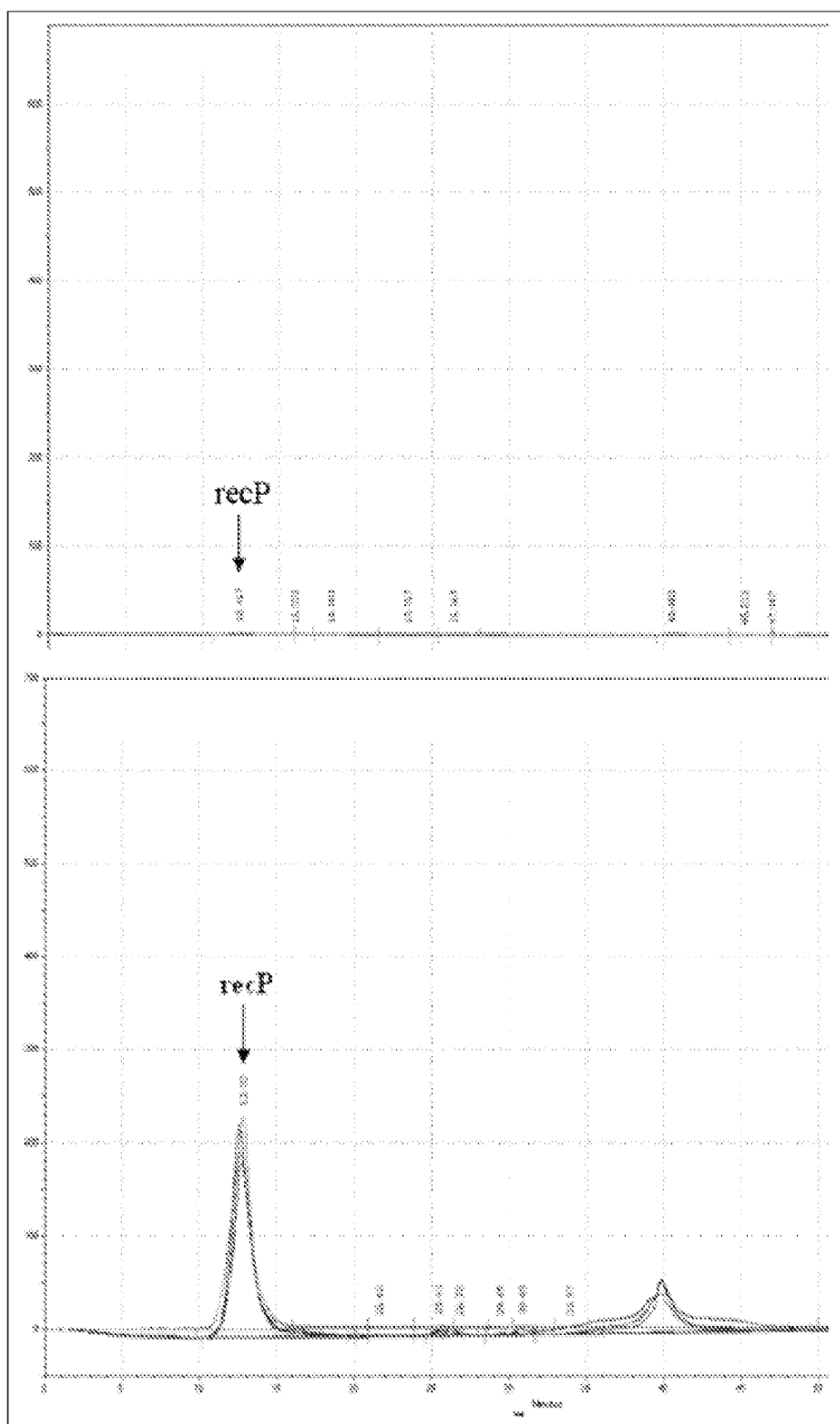


Figura 12

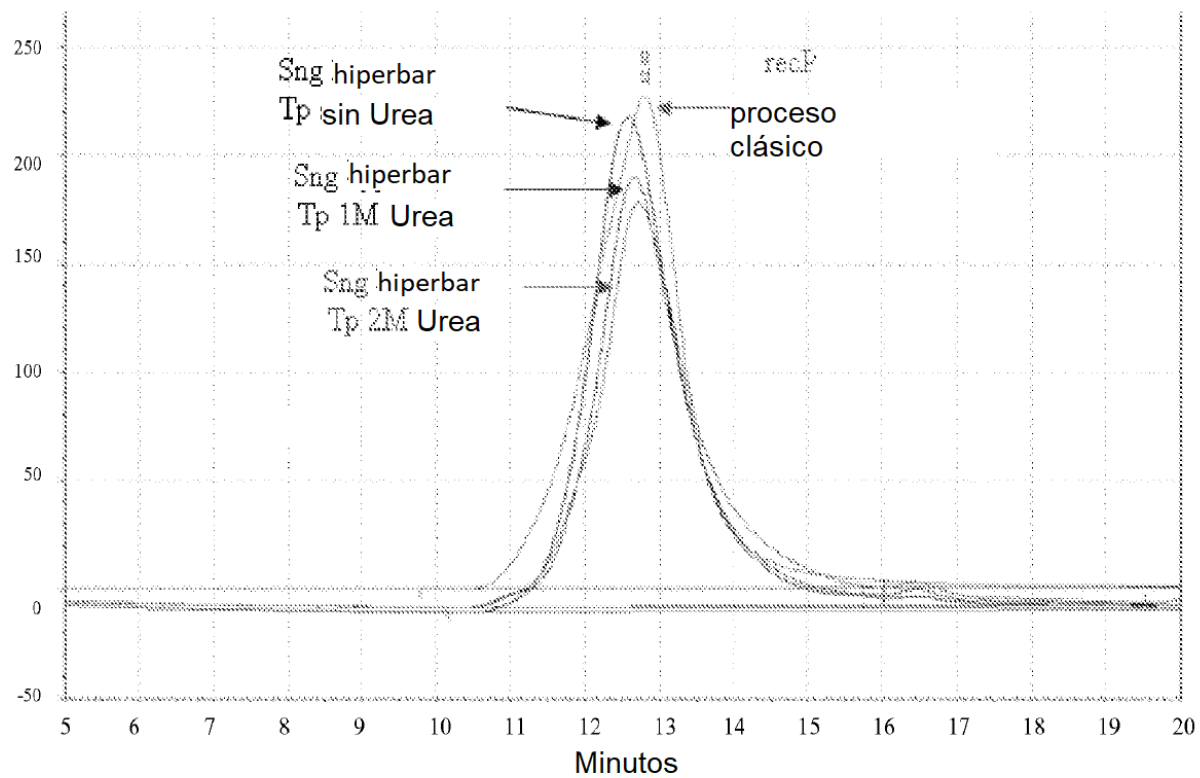


Figura 13

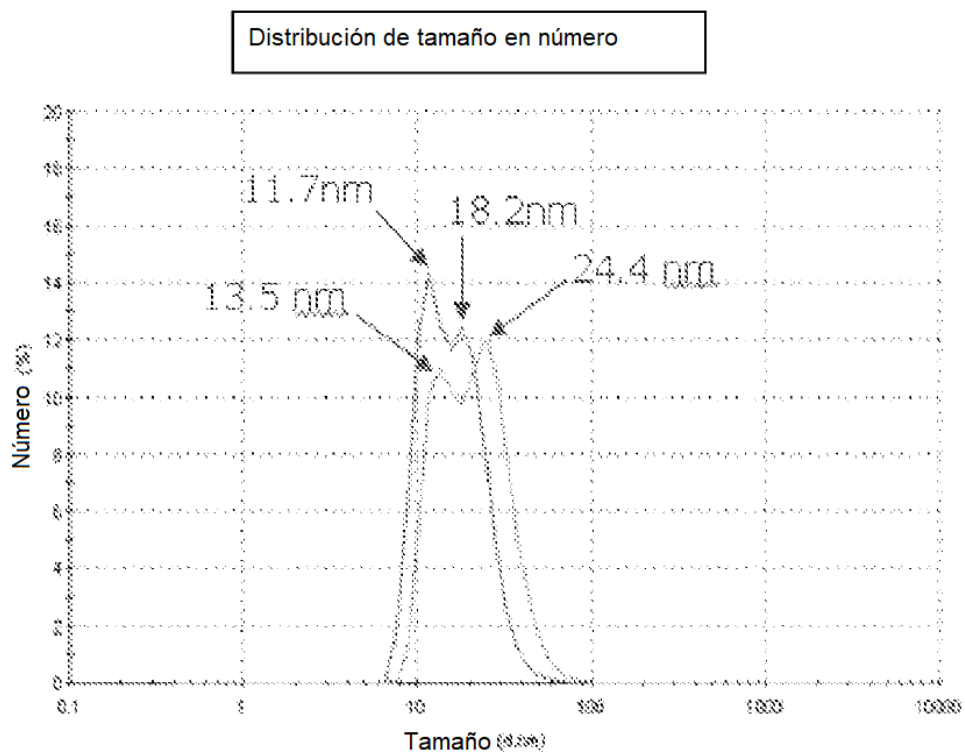
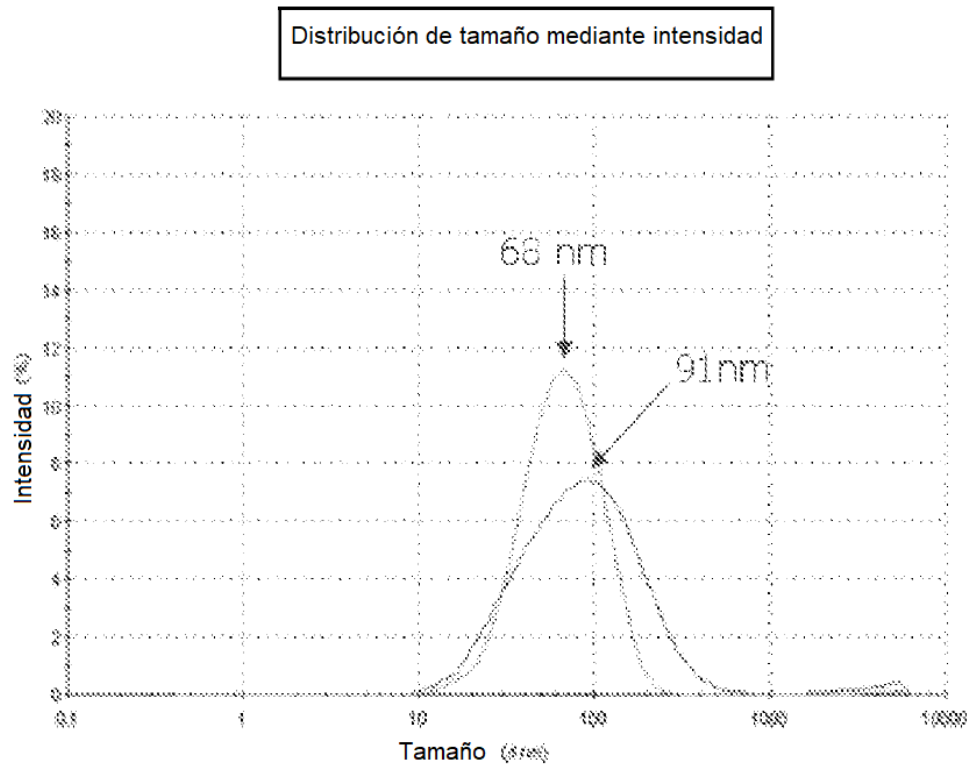


Figura 14

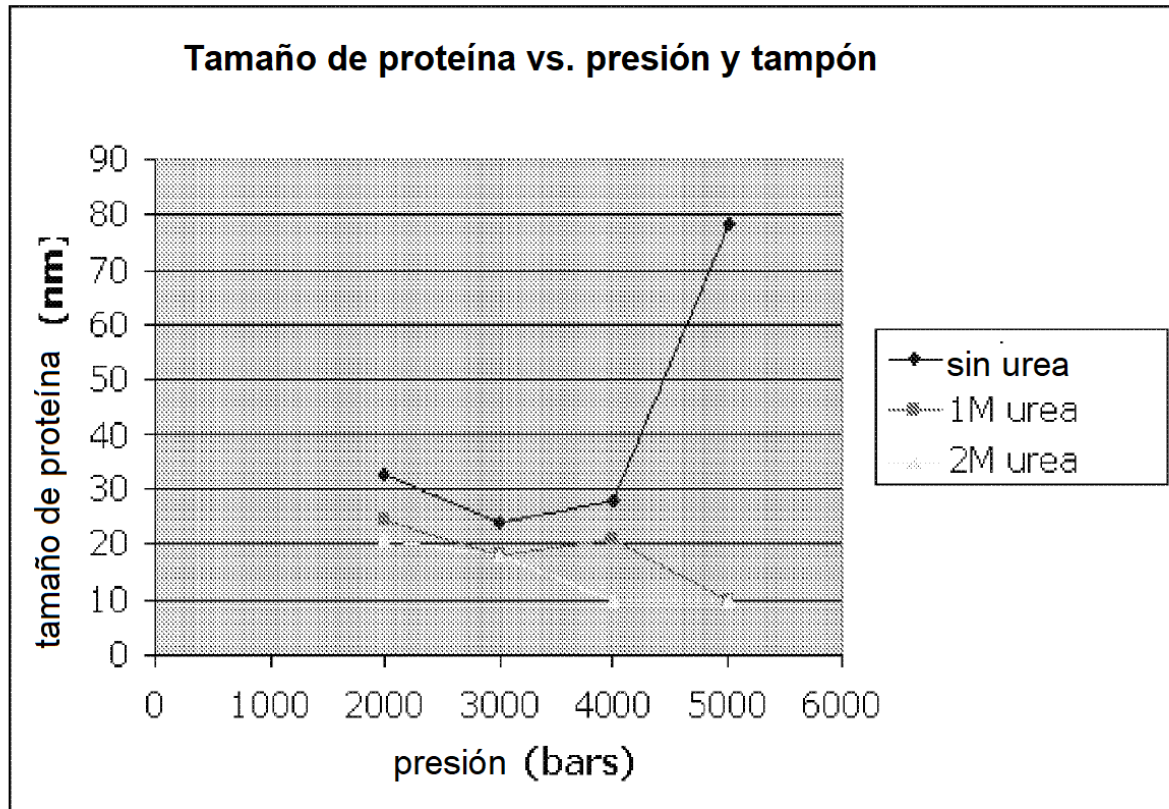


Fig. 15A

Figura 15

Cromatograma de HPLC de muestras tratadas con 4000 bar

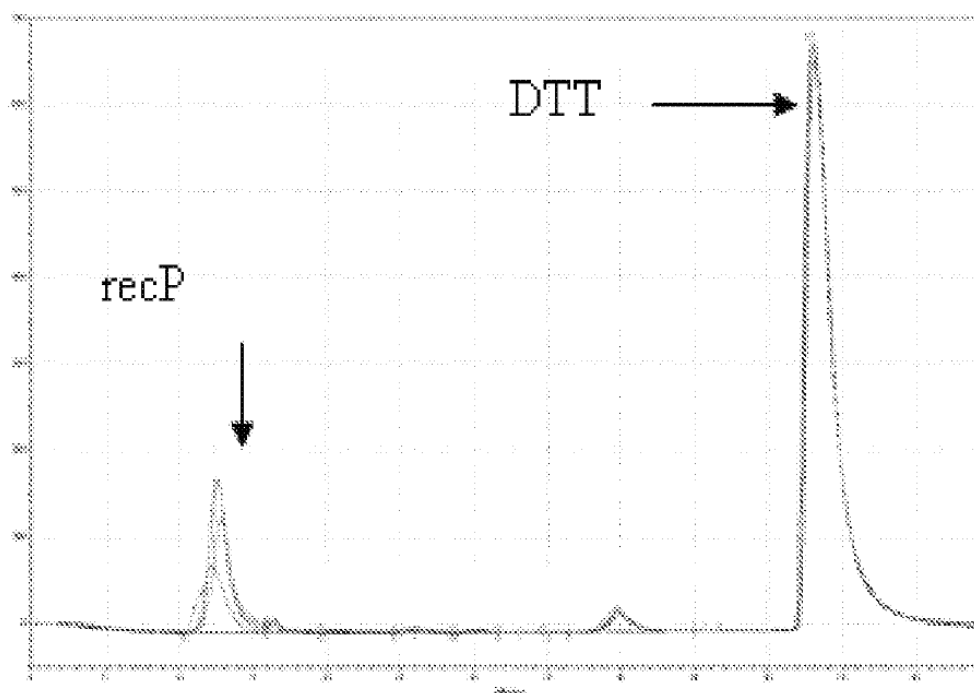


FIG.15B

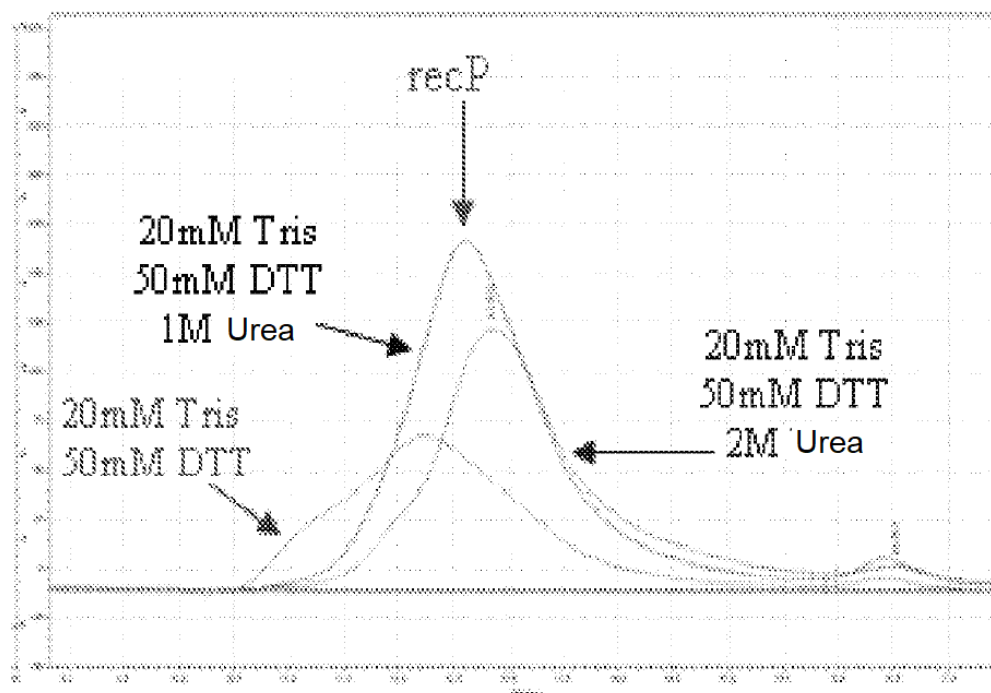


Figura 16

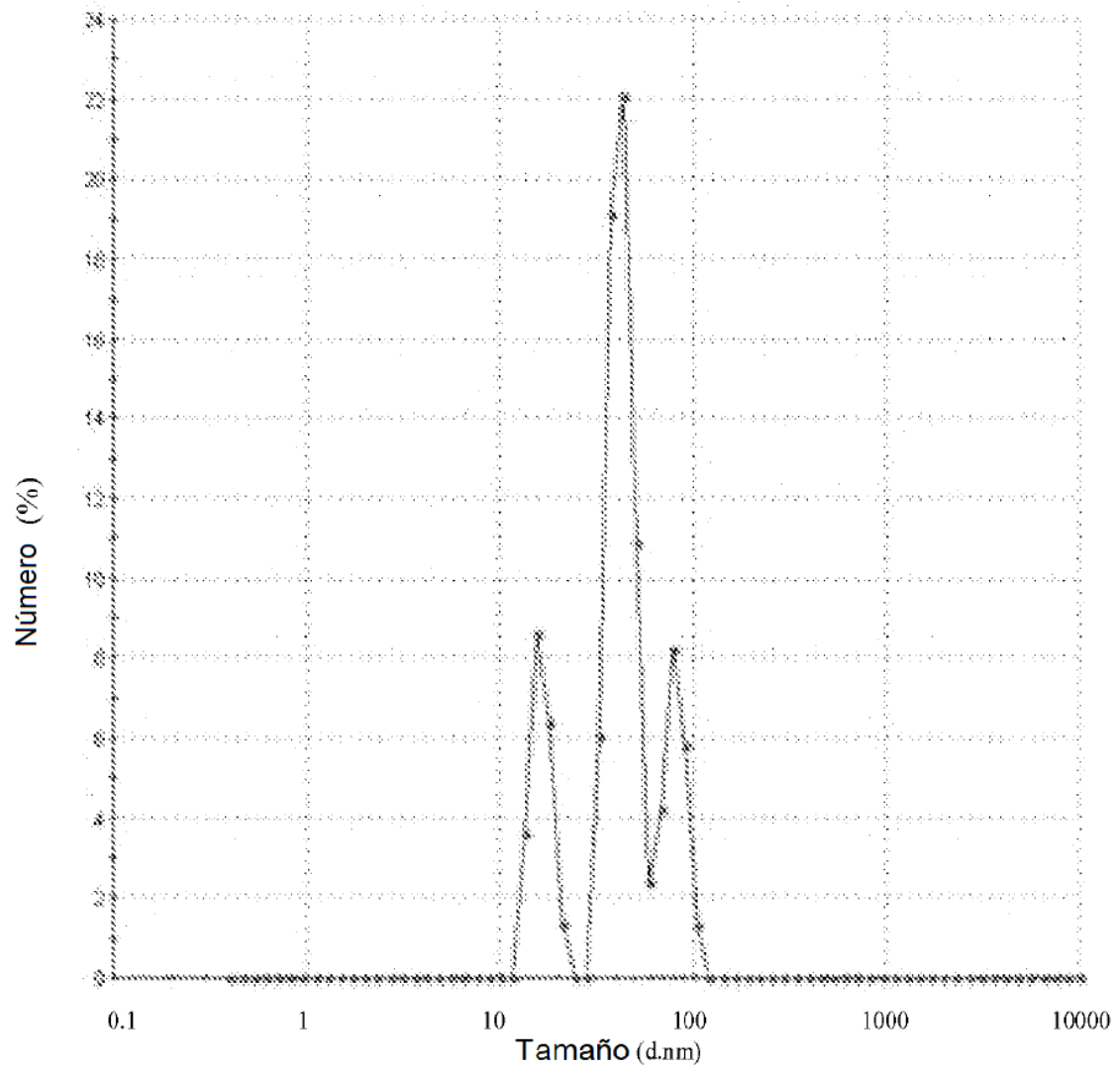


Figura 17

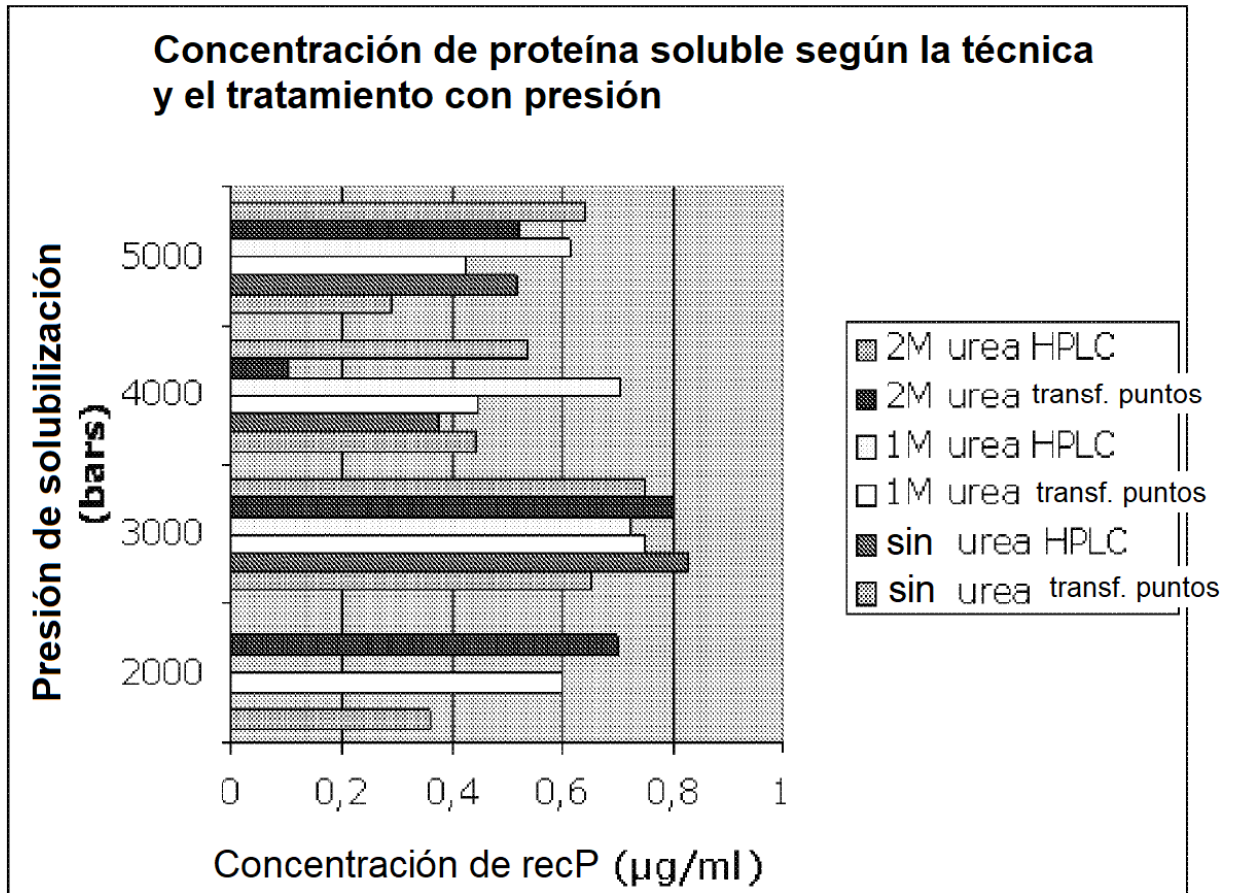
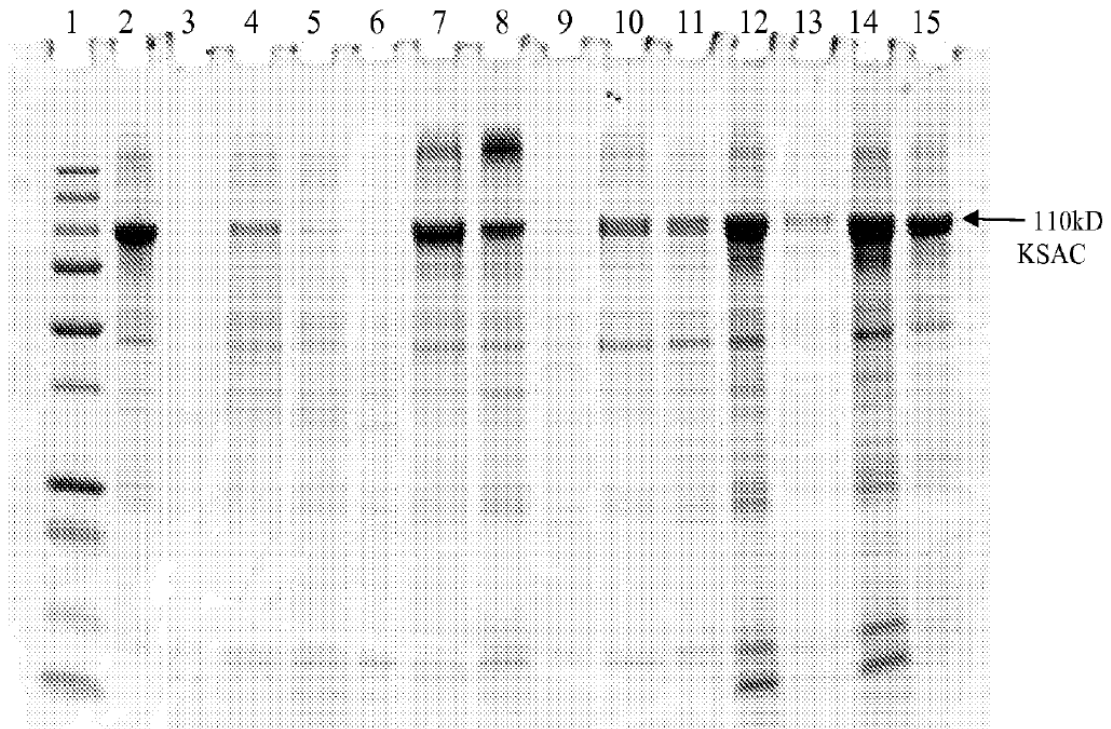


Figura 18A

Análisis por SDS Page de la proteína KSAC mediante el proceso A



Carril 1: marcador

Carril 2: control de los cuerpos de inclusión de KSAC

Carril 3: sobrenadante de la muestra 3

Carril 4: residuo de la muestra 3

Carril 5: muestra 3 antes de la centrifugación

Carril 6: sobrenadante de la muestra 1

Carril 7: residuo de muestra 1

Carril 8: muestra 1 antes de la centrifugación

Carril 9: sobrenadante de la muestra 4

Carril 10: residuo de muestra 4

Carril 11: muestra 4 antes de la centrifugación

Carril 12: sobrenadante de la muestra 2

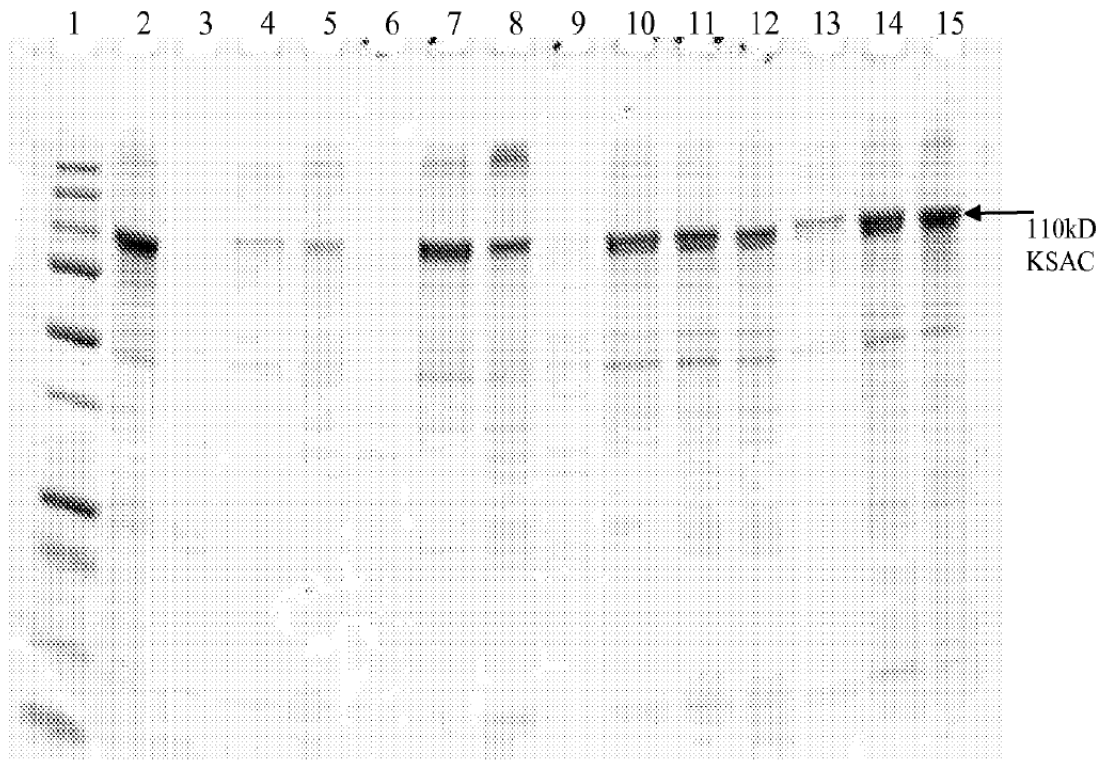
Carril 13: residuo de muestra 2

Carril 14: muestra 2 antes de la centrifugación

Carril 15: control de los cuerpos de inclusión de KSAC

Figura 18B

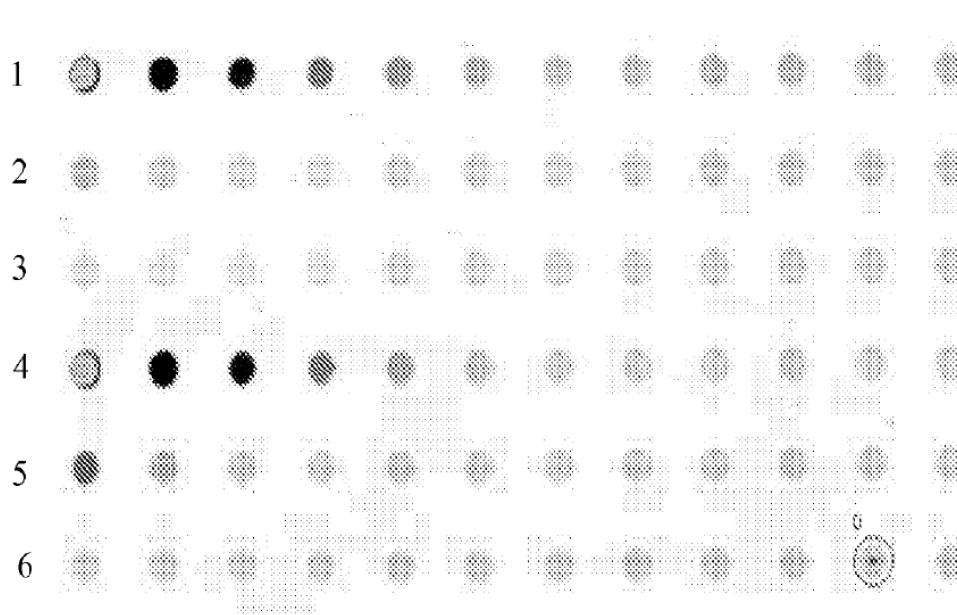
Análisis de SDS Page de proteína KSAC mediante el proceso B



- Carril 1: marcador
- Carril 2: control de los cuerpos de inclusión de KSAC
- Carril 3: sobrenadante de la muestra 7
- Carril 4: residuo de la muestra 7
- Carril 5: muestra 7 antes de la centrifugación
- Carril 6: sobrenadante de la muestra 5
- Carril 7: residuo de muestra 5
- Carril 8: muestra 5 antes de la centrifugación
- Carril 9: sobrenadante de la muestra 8
- Carril 10: residuo de muestra 8
- Carril 11: muestra 8 antes de la centrifugación
- Carril 12: sobrenadante de la muestra 6
- Carril 13: residuo de muestra 6
- Carril 14: muestra 6 antes de la centrifugación
- Carril 15: control de los cuerpos de inclusión de KSAC

Figura 19A

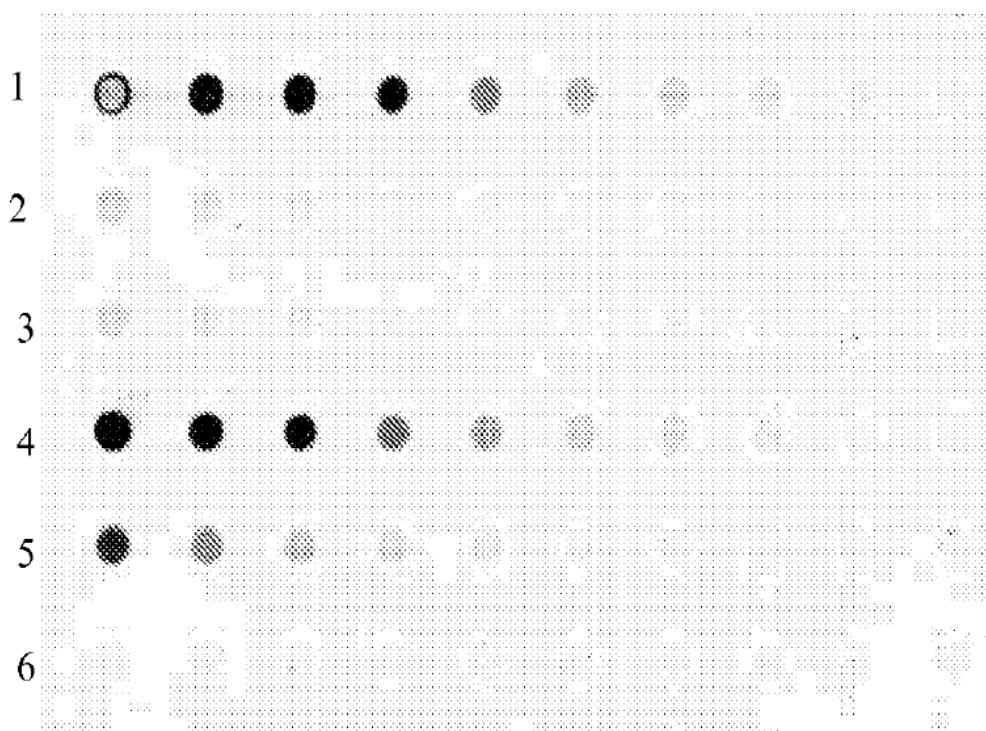
Análisis por transferencia QDot de proteína KSAC mediante el proceso A



- 1: KSAC de referencia
- 2: proceso A sin DTT (muestra 1)
- 3: control sin DTT (muestra 3)
- 4: proceso A con DTT (muestra 2)
- 5: control con DTT (muestra 4)
- 6: tampón Tris 20 mM

Figura 19B

Análisis por transferencia QDot de proteína KSAC
mediante el proceso B



- 1: KSAC de referencia
- 2: proceso B sin DTT (muestra 5)
- 3: control sin DTT (muestra 7)
- 4: proceso B con DTT (muestra 6)
- 5: control con DTT (muestra 8)
- 6: tampón Tris 20 mM

Figura 19C

Cuantificación de la proteína KSAC a partir
de la transferencia QDot

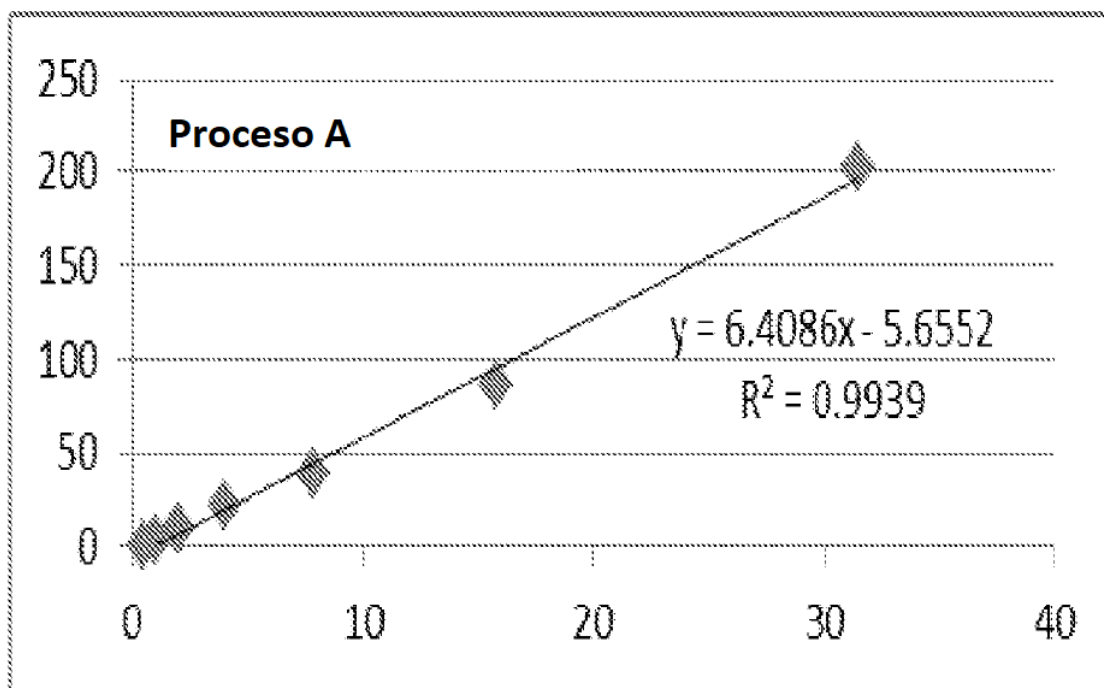


Figura 19D

Cuantificación de proteína KSAC a partir de la transferencia QDot

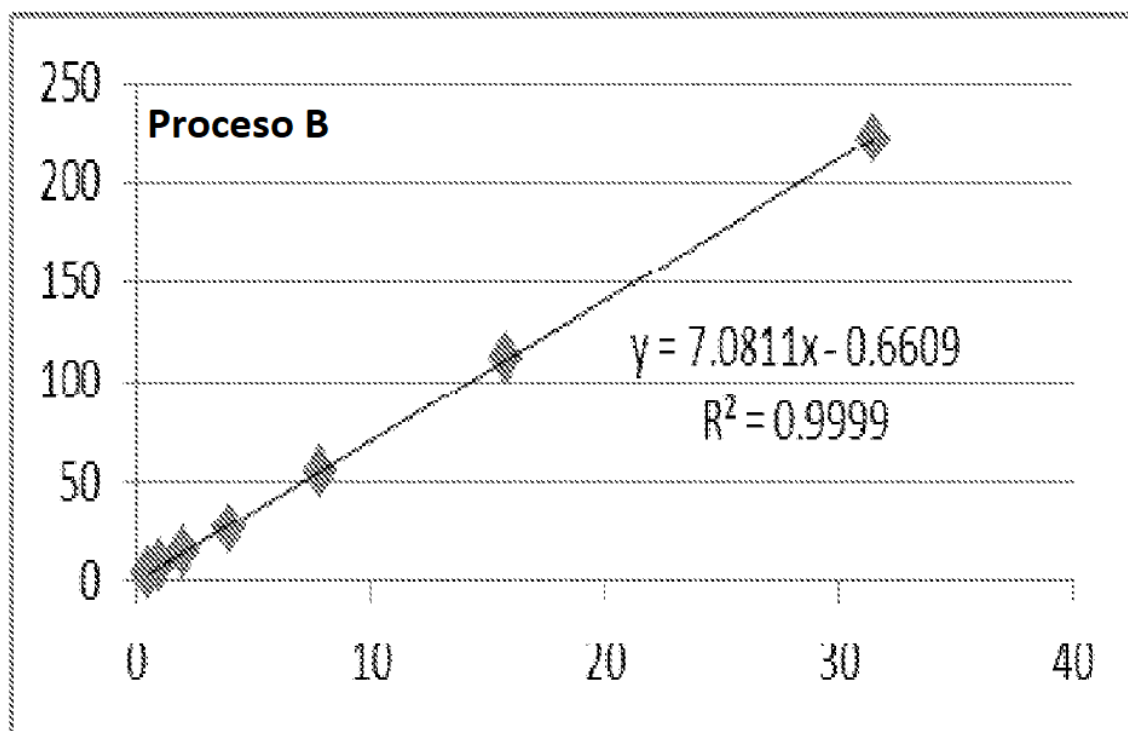


Figura 20
Análisis HPLC

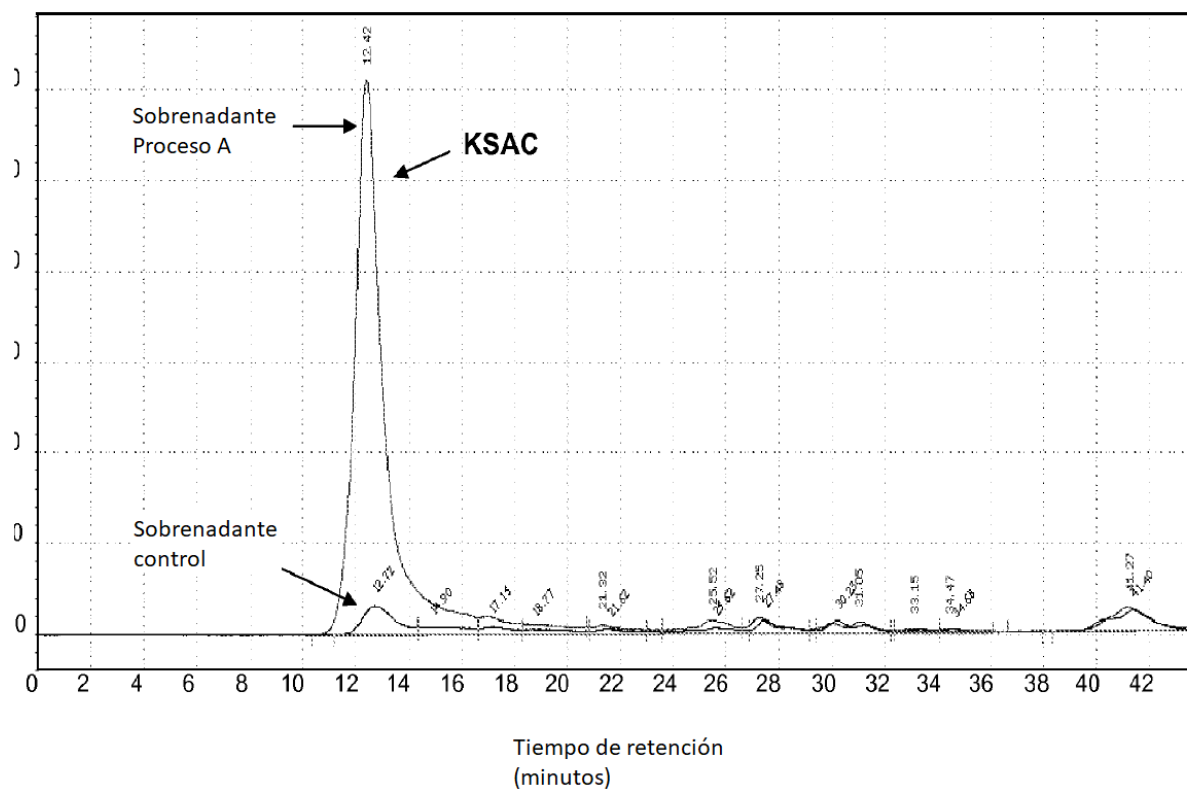


Figura 21

Análisis HPLC

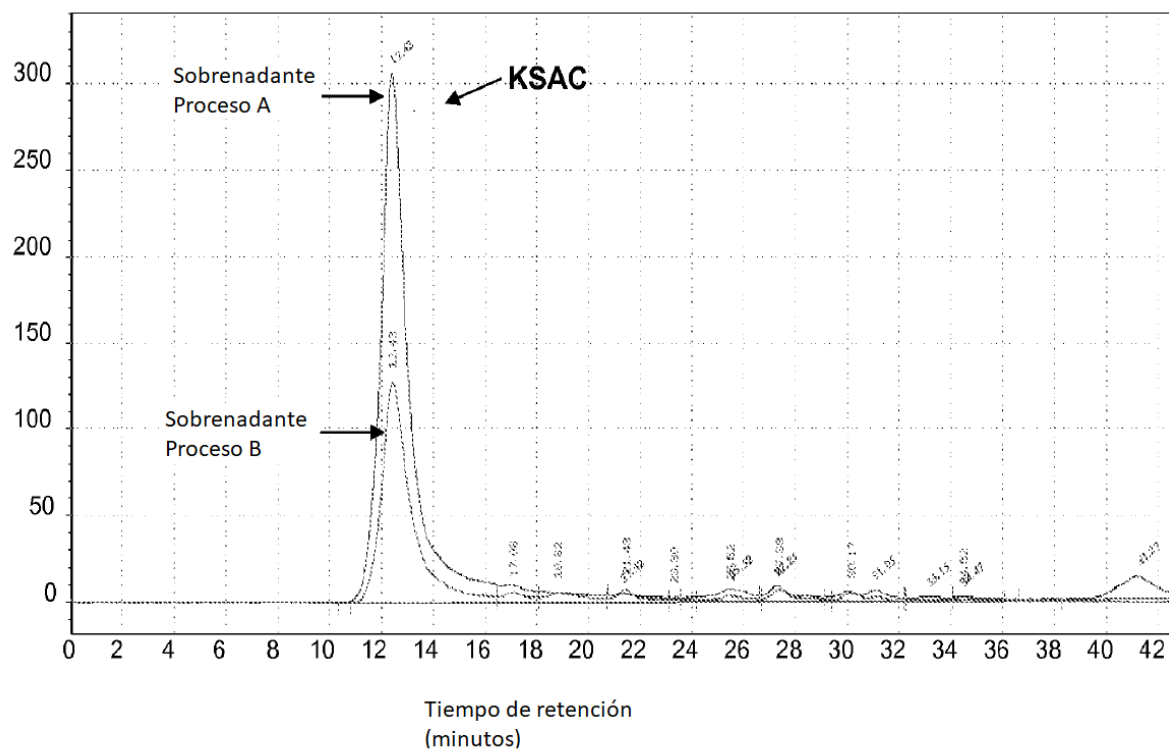


Figura 22
Análisis HPLC

