



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 358 331**

51 Int. Cl.:

C12N 9/16 (2006.01)

C12N 15/63 (2006.01)

C12Q 1/44 (2006.01)

C07K 16/40 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04787575 .2**

96 Fecha de presentación : **03.09.2004**

97 Número de publicación de la solicitud: **1664289**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **07.06.2006**

54

Título: **Fosfodiesterasas específicas de nucleótidos cíclicos procedentes de *Leishmania* y usos de las mismas.**

30

Prioridad: **05.09.2003 US 500244 P**
19.09.2003 US 504070 P
25.06.2004 US 582584 P

73

Titular/es: **Universität Bern**
Verwaltungsdirektion, Hochschulstrasse 4
3012 Bern, CH
OTSUKA PHARMACEUTICAL Co., Ltd.

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
09.05.2011

72

Inventor/es: **Johner, Andrea;**
Seebeck, Thomas y
Shakur, Yasmin

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
09.05.2011

74

Agente: **Zea Checa, Bernabé**

ES 2 358 331 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

CAMPO DE LA INVENCION

[0001] Solicitamos la prioridad de las Solicitudes Provisionales de Estados Unidos N° 60/500,244 (presentada el 5 de septiembre de 2003), 60/504.070 (presentada el 19 de septiembre de 2003) y 60/582.584 (presentada el 25 de junio de 2004).

[0002] La presente invención se refiere a nuevas secuencias de aminoácidos y de ácidos nucleicos de fosfodiesterasas específicas de nucleótidos cíclicos de un parásito de la familia de *Leishmania*, tal como *Leishmania major*. La invención también se refiere a construcciones de ácido nucleico, vectores y células hospedadoras que comprenden las secuencias de ácido nucleico así como métodos para producir y usar las secuencias de aminoácidos y ácidos nucleicos. La invención se refiere adicionalmente al uso de estas secuencias y de anticuerpos dirigidos contra estas secuencias, en el diagnóstico y tratamiento de trastornos relacionados con la infección de *Leishmania*, tal como *Leishmania major*, incluyendo la identificación de compuestos que forman complejos con los polipéptidos y ácidos nucleicos en la presente invención.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

[0003] *Leishmania major* es uno de varios parásitos de *Leishmania* que, cuando se introduce en un organismo hospedador, es el agente causante de leishmaniasis. *Leishmania major* es una especie del complejo *Leishmania tropica*. Otros complejos (que comprenden especies y subespecies) incluyen *Leishmania donovani*, *Leishmania mexicana* y *Leishmania viannia*. De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud, la leishmaniasis está entre las enfermedades más infecciosas a nivel global y es endémica en 88 países de África, Asia, Europa y en Sudamérica y Norteamérica. Se ha estimado que más de 12 millones de personas sufren infecciones Leishmaniales a nivel global, existiendo serios problemas de salud pública particularmente en países tales como Irán, Irak, Afganistán, Argelia, Brasil, India, Perú y Siria. La leishmaniasis se manifiesta de manera más habitual como leishmaniasis cutánea (es decir de piel) (CL) o leishmaniasis visceral (es decir en órganos internos) (VL). CL es la forma más común de leishmaniasis y es el resultado de la transmisión del parásito *Leishmania major* mediante la mordedura de un flebótomo hembra infectado. Los síntomas de CL incluyen grandes lesiones o úlceras de piel en partes expuestas del cuerpo, que causan una discapacidad grave y cicatriz permanente.

[0004] Los métodos de tratamiento de leishmaniasis típicamente se han limitado a administrar antimonio pentavalente (Sb^V) (Sundar *et al.* (2002) *Curr. Opin. Infect. Dis.* 15, 593-598). Debido a la reciente aparición de resistencia a gran escala a Sb^V, sin embargo, la eficacia de este tratamiento se está volviendo crecientemente limitada. Además, el tratamiento con Sb^V tiene varios efectos secundarios que incluyen náuseas, vómitos, diarrea y convulsiones. Además, la coinfección de VIH con especies de *Leishmania* presenta retos adicionales puesto que dicha coinfección puede alterar dramáticamente la epidemiología, diagnóstico y respuesta de leishmaniasis a terapia (Lee *et al.* (2003) *Int. J. Infect. Dis.* 7, 86-93).

DESCRIPCIÓN RESUMIDA DE LA INVENCION

[0005] La invención proporciona nuevos polipéptidos de fosfodiesterasa específica de nucleótido cíclico de *Leishmania* (LmPDE) y moléculas de ácidos nucleicos de los mismos que son útiles en el diagnóstico y tratamiento de leishmaniasis. Los polipéptidos de la presente invención también incluyen anticuerpos que reconocen y se unen a polipéptidos de LmPDE. Las moléculas de ácido nucleico de la invención también incluyen ácidos péptido nucleicos (PNA) y moléculas antisentido que reaccionan con las moléculas de ácido nucleico de la invención.

[0006] En una realización, la invención proporciona fosfodiesterasas nuevas de longitud completa (PDE) del parásito *Leishmania major*, designadas LmPDE-A, LmPDE-B1 y LmPDE-B2, incluyendo las moléculas polipeptídicas, moléculas de ácido nucleico correspondientes y fragmentos de las mismas.

[0007] La presente invención también abarca diversas secuencias de nucleótidos y aminoácidos que representan diferentes formas y fragmentos de los genes, transcritos y proteínas de LmPDE tales como proteínas mutadas de forma conservativa, formas alélicas diferentes, formas polimórficas, transcritos precursores alternativos y transcritos maduros. Adicionalmente, se proporcionan moléculas de ácido nucleico recombinante que son variantes de utilización de codón de las nuevas secuencias de LmPDE. La invención abarca LmPDE de *Leishmania major*, así como de otras especies y subespecies de *Leishmania* de los complejos *Leishmania tropica*, *Leishmania donovani*, *Leishmania mexicana* y *Leishmania viannia*.

[0008] La presente invención proporciona adicionalmente moléculas de ácido nucleico recombinante que codifican secuencias de tipo silvestre o mutantes de polipéptidos de LmPDE que mantienen la actividad biológica de PDE. Estas incluyen mutantes de origen natural y sintéticos, así como polipéptidos semisintéticos y recombinantes.

[0009] La presente invención también incluye los polinucleótidos que codifican LmPDE en vectores de expresión recombinante y sistemas de hospedador-vector que incluyen vectores de expresión. Una realización proporciona diversas células hospedadoras transformadas con vectores recombinantes que incluyen las secuencias de nucleótidos de LmPDE de la invención. La invención también proporciona organismos modificados genéticamente que comprenden

un vector que contiene una secuencia de LmPDE recombinante en la que al menos un gen de LmPDE endógeno se ha deshabilitado.

[0010] La presente invención proporciona adicionalmente métodos para usar polipéptidos de LmPDE sustancialmente purificados para identificar compuestos que modulan la expresión o actividad de las LmPDE.

- 5 [0011] La presente invención también proporciona métodos para usar secuencias de nucleótidos de LmPDE como sondas y cebadores de ácido nucleico y para usar polipéptidos de LmPDE como antígenos para la producción de anticuerpos anti LmPDE nuevos. Las sondas y cebadores de LmPDE y los anticuerpos anti LmPDE son útiles en los ensayos de diagnóstico y kits para la detección de secuencias proteicas y de nucleótidos de LmPDE de origen natural presentes en muestras biológicas.
- 10 [0012] Se expondrán objetos y ventajas adicionales de la invención en parte en la descripción a continuación y en parte resultarán obvias a partir de la descripción o pueden aprenderse por práctica de la invención. Los objetos y ventajas de la invención se realizarán y obtendrán por medio de los elementos y combinaciones particularmente indicados en las reivindicaciones adjuntas. Además, las ventajas descritas en el cuerpo de la memoria, si no están incluidas en las reivindicaciones, no son por sí mismas limitaciones de la invención reivindicada.
- 15 [0013] Las publicaciones analizadas en la presente memoria se proporcionan solamente por su descripción previa a la fecha de presentación de la presente solicitud. Nada de la presente memoria debe interpretarse como una admisión de que la presente invención no tiene derecho a antedatar dicha publicación en virtud de invención previa. Además, las fechas de publicación proporcionadas pueden ser diferentes de las fechas de publicación reales que pueden requerir confirmarse de forma independiente.

20 BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0014] La Figura 1 muestra la secuencia de aminoácidos deducida de un polipéptido de LmPDE-A de longitud completa (SEC ID N°: 1).

[0015] Las Figuras 2A-2S muestran la secuencia de ADN (SEC ID N°: 2) para el gen de longitud completa de LmPDE-A. La fase abierta de lectura comienza con adenina en la posición 530 y termina con guanina en la posición 2425.

- 25 [0016] Las Figuras 3A-3B muestran la secuencia de aminoácidos deducida de un polipéptido de LmPDE-B1 de longitud completa (SEC ID N°: 3).

[0017] Las Figuras 4A-4L muestran la secuencia de ADN (SEC ID N°: 4) para el gen de longitud completa de LmPDE-B1. La fase abierta de lectura comienza con adenina en la posición 1267 y termina con adenina en la posición 4059.

- 30 [0018] Las Figuras 5A-B muestran la secuencia de aminoácidos deducida de un polipéptido de LmPDE-B2 de longitud completa (SEC ID N°: 5).

[0019] Las Figuras 6A-6L muestran la secuencia de ADN (SEC ID N°: 6) para el gen de longitud completa de LmPDE-B2. La fase abierta de lectura comienza con adenina en la posición 2182 y termina con adenina en la posición 5004.

[0020] Las Figuras 7A, 7B y 7C muestran la localización de dominios conservados que se encuentran en las secuencias polipeptídicas de LmPDE-A, LmPDE-B1 y LmPDE-B2, respectivamente.

- 35 [0021] La Figura 8 muestra los resultados de un análisis por transferencia de Southern para LmPDE-B1 usando una región conservada de la secuencia de LmPDE-B1 como sonda de hibridación.

[0022] La Figura 9 muestra los resultados de un análisis de transferencia de Southern para LmPDE-B2 usando una región conservada de la secuencia de LmPDE-B2 como sonda de hibridación.

- 40 [0023] La Figura 10 muestra los resultados de un análisis de transferencia de Southern usando una región conservada que era específica para tanto LmPDE-B1 como LmPDE-B2 como sonda de hibridación.

[0024] La Figura 11 muestra un dibujo esquemático de la localización de los loci de LmPDE-B1 y LmPDE-B2 y sus localizaciones relativas aproximadas en el cromosoma 15.

[0025] Las Figuras 12A, 12B, 12C y 12D muestran los resultados de ensayo de choque térmico de células de *Saccharomyces cerevisiae* deficientes en PDE que se han transfectado con LmPDE-B1 y LmPDE-A.

- 45 [0026] Las Figuras 13A, 13B y 13C muestran la cinética de Michaelis-Menten de la hidrólisis de AMPc mediada por LmPDE-B1 recombinante. Las Figuras 13A y 13B muestran la hidrólisis de AMPc en ausencia y presencia de un exceso de 100 veces de GMPc, respectivamente. La Figura 13C muestra el efecto de un exceso de 50 veces de AMP. Las inserciones de figuras representan las representaciones Eadie-Hofstee correspondientes.

- 50 [0027] Las Figuras 14A y 14B muestran el efecto de diversos inhibidores de PDE sobre LmPDE-B1 y LmPDE-B2, respectivamente, en presencia de AMPc 1 μ M y cilostamida (A), zaprinast (B), etazolato (C), dipiridamol (D), Ro-20-1724

(E), rolipram (F), isobutylmetilxantina (IBMX) (G), 8-metoximetil-IBMX (H), trequinsina (I), papaverina (K), milrinona (L), petoxifilina (M) y eritro-9-(2-hidroxi-3-nonil)adenina (EHNA) (N) 100 μ M. Las Figuras 14C y 14D muestran perfiles de dosis-respuesta representativos de trequinsina frente a LmPDE-B1 y LmPDE-B2, respectivamente.

[0028] La Figura 15 muestra la inhibición de proliferación de promastigote de *L. major* en presencia de concentraciones crecientes de dipiridamol (A), etazolato (B) y trequinsina (C).

DEFINICIONES

[0029] La expresión “**secuencia de aminoácidos**” se refiere a aminoácidos que codifican un oligopéptido, péptido, polipéptido o secuencia proteica y fragmentos de los mismos e incluye moléculas de origen natural o sintéticas.

[0030] El término “**anticuerpo**” se refiere a moléculas intactas así como fragmentos de las mismas (por ejemplo, Fab), que pueden unirse a un determinante antigénico en un antígeno (por ejemplo, un determinante o determinantes antigénicos en un LmPDE). El anticuerpo puede ser “policlonal”, “monoclonal”, “quimérico”, “humanizado” o humano.

[0031] La expresión “**determinante antigénico**” se refiere al fragmento de una molécula (es decir, un epítipo) que induce a un anticuerpo y que a partir de entonces entra en contacto con un anticuerpo particular. Cuando una proteína o fragmento de una proteína se usa para inmunizar un animal hospedador, numerosas regiones de la proteína pueden inducir la producción de anticuerpos que se unen específicamente a una región o estructura tridimensional dada en la proteína; estas regiones o estructuras se denominan determinantes antigénicos. Un determinante antigénico puede competir con el antígeno intacto (es decir, el inmunógeno usado para inducir la respuesta inmune) por la unión con un anticuerpo.

[0032] El término “**antisentido**” se refiere a cualquier composición que contiene secuencias de nucleótidos que son complementarias a una secuencia de ADN o ARN específica.

[0033] La expresión “**cadena antisentido**” se usa en referencia a una cadena de ácido nucleico que es complementaria a la cadena “sentido”. Las moléculas antisentido incluyen ácidos nucleicos (que pueden incluir restos de bases de nucleótidos modificadas y de azúcares modificados) y pueden producirse por cualquier método incluyendo síntesis o transcripción. Una vez introducidos en una célula, los nucleótidos complementarios se combinan con secuencias naturales producidas por la célula para formar dobles cadenas y bloquear la transcripción o la traducción de las secuencias.

[0034] La expresión “**muestra biológica**” se usa en su sentido más amplio. Una muestra biológica es sospechosa de contener moléculas de ácido nucleico de LmPDE, o fragmentos de las mismas, o un polipéptido de LmPDE. La muestra biológica adecuada puede ser de un animal o de un ser humano. La muestra puede ser una muestra celular o una muestra tisular, incluyendo muestras de bazo, ganglio linfático, timo, médula ósea, hígado, corazón, testículo, cerebro, placenta, pulmón, músculo esquelético, riñón y páncreas. La muestra puede ser un fluido biológico, incluyendo orina, sueros sanguíneos, plasma sanguíneo, flema o fluido de lavado. Como alternativa, la muestra puede ser un hisopo de la nariz, oreja o garganta.

[0035] La expresión “**biológicamente activo**” se refiere a un polipéptido que tiene funciones estructurales, reguladoras o bioquímicas de una molécula de origen natural. De forma similar, “**inmunológicamente activo**” se refiere a la capacidad de los LmPDE naturales, recombinantes o sintéticos de la invención, o cualquier fragmento de los mismos, para inducir una respuesta inmune específica en animales o células apropiadas y unirse con anticuerpos específicos. Por ejemplo, los polipéptidos de la invención pueden inducir anticuerpos que se unen específicamente a un epítipo asociado con un polipéptido de LmPDE de la invención. En consecuencia, un polipéptido de LmPDE es capaz de inducir una respuesta inmune específica en animales o células apropiadas y/o unirse con ligandos tales como anticuerpos específicos.

[0036] La expresión “**dominio catalítico**” se refiere a un subconjunto de aminoácidos conservado dentro de una secuencia de PDE que es responsable de catalizar la reacción de hidrólisis del sustrato unido.

[0037] La expresión “**anticuerpo quimérico**” se refiere a un anticuerpo en el que las regiones variables derivadas de una especie se combinan con las regiones constantes de un anticuerpo derivado de una especie diferente. Los anticuerpos quiméricos son útiles, puesto que es menos probable que sean antigénicos para un sujeto humano que anticuerpos con regiones constantes no humanas y regiones variables. La región que se combina con antígeno (región variable) de un anticuerpo quimérico puede derivar de una fuente no humana (por ejemplo murina) y la región constante del anticuerpo quimérico, que confiere función efectora biológica a la inmunoglobulina puede derivar de una fuente humana (Morrison *et al.* (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 81, 6851; Takeda *et al.* (1985) *Nature* 314, 452; Cabilly *et al.*, Patente de Estados Unidos N° 4.816.567; Boss *et al.*, Patente de Estados Unidos N° 4.816.397). El anticuerpo quimérico puede tener la especificidad de unión a antígeno de la molécula de anticuerpo no humana y la función efectora conferida por la molécula del anticuerpo humana.

[0038] El término “**complementario**” se refiere a moléculas de ácido nucleico que tienen nucleótidos de purina y pirimidina que tienen la capacidad de asociarse a través de enlaces de hidrógeno para formar moléculas de ácido nucleico bicatenarias. Los siguientes pares de bases se relacionan por complementariedad: guanina y citosina; adenina

- y timina; y adenina y uracilo. El término “complementario” se aplica a todos los pares de bases que comprenden dos moléculas de ácido nucleico bicatenarias o a todos los pares de bases que comprenden una molécula de ácido nucleico monocatenaria plegada sobre sí misma. La complementariedad entre dos moléculas monocatenarias puede ser parcial, en la que sólo se unen algunos de los ácidos nucleicos o puede ser completa en la que existe una complementariedad total entre las moléculas monocatenarias. El grado de complementariedad entre cadenas de ácido nucleico tiene efectos significativos en la eficacia y fuerza de hibridación entre cadenas de ácido nucleico.
- [0039]** La expresión “**célula control**” es una célula que es generalmente la misma, por ejemplo, genotípica y fenotípicamente, a la célula con la que se compara (por ejemplo, las células pueden ser células hermanas), pero que no está expuesta a un compuesto de ensayo.
- [0040]** La expresión “**secuencia de control de la expresión**” o “**elemento de control de la expresión**” se refiere a una secuencia polinucleotídica reguladora que puede dirigir la transcripción y traducción de una fase abierta de lectura. Se conocen elementos de control de la expresión en la técnica e incluyen, sin limitación, promotores inducibles, promotores constitutivos, sitios donadores y aceptores de corte y empalme, señales de secreción, potenciadores, terminadores de la transcripción y otros elementos reguladores transcripcionales. Otros elementos de control de la expresión que están implicados en la traducción se conocen en la técnica, e incluyen la secuencia Shine-Dalgarno y codones de inicio y terminación.
- [0041]** El término “**fragmento**” de un polipéptido de LmPDE se refiere a una parte de un polipéptido de LmPDE. Por ejemplo, un fragmento de LmPDE puede ser un polipéptido con menos aminoácidos que una LmPDE de longitud completa, pero que tiene la actividad biológica de un polipéptido de LmPDE-A, LmPDE-B1 o LmPDE-B2 de longitud completa, por ejemplo, la capacidad de hidrolizar AMPc. Un fragmento también puede ser una parte de un polipéptido de LmPDE que induce una respuesta inmune o que posee cualquier otra propiedad biológica o de diagnóstico de los LmPDE de longitud completa de la invención.
- [0042]** El término “**fragmento**” de una molécula de ácido nucleico de LmPDE se refiere a una parte de una secuencia de nucleótidos de LmPDE de longitud completa. Por ejemplo, dicho fragmento de ácido nucleico puede codificar un fragmento de polipéptido de LmPDE que mantiene la actividad biológica de un polipéptido de LmPDE-A, LmPDE-B o LmPDE-B2 de longitud completa, por ejemplo, la capacidad de hidrolizar AMPc (según se determina por métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, Schilling *et al.* (1994) *Anal. Biochem.* 216, 154-158).
- [0043]** La expresión “**dominio GAF**” se refiere a un dominio altamente conservado que se une a ligandos de bajo peso molecular. Se sabe que el dominio GAF en algunas PDE se une a GMPc.
- [0044]** La expresión “**anticuerpo humanizado**” se refiere a una molécula de anticuerpo en la que se han reemplazado aminoácidos en las regiones no de unión a antígeno para que se asemejen de forma más estrecha a un anticuerpo humano, manteniendo aún la capacidad de unión original. Como se usa en la presente memoria, un anticuerpo LmPDE humanizado es una molécula de inmunoglobulina que es capaz de unirse a un polipéptido de LmPDE y tiene regiones variables sustancialmente con la misma secuencia de aminoácidos que una inmunoglobulina humana y tiene una región hipervariable sustancialmente con la misma secuencia de aminoácidos que una inmunoglobulina no humana.
- [0045]** El término “**hibridación**” o “**hibridar**” se refiere a cualquier proceso mediante el cual una secuencia de ácidos nucleicos se une a una cadena complementaria a través de formación de pares de bases.
- [0046]** El término “**hidrolizar**” se refiere a una reacción química en la que un enlace químico se escinde mediante una molécula de agua. La función catalítica de las LmPDE de la invención, como en todas las PDE, implica la hidrólisis de AMPc (según se determina por métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, Schilling *et al.* (1994) *Anal. Biochem.* 216, 154-158).
- [0047]** Como se usa en la presente memoria, una primera secuencia de aminoácidos o nucleótidos se dice que es “**idéntica**” a una segunda secuencia de aminoácidos o nucleótidos de referencia, respectivamente, cuando una comparación de la primera y la segunda secuencias son exactamente iguales. Se dice que dos secuencias son “**X% idénticas**” cuando una comparación de la primera y segunda secuencias tiene X% de nucleótidos o aminoácidos que son exactamente iguales. El porcentaje de identidad puede determinarse electrónicamente, por ejemplo, mediante el uso del programa MEGALIGN (DNASTAR) que crea alineamientos entre dos o más secuencias de acuerdo con métodos seleccionados por el usuario, por ejemplo, el método clustal (por ejemplo, Higgins *et al.* (1988) *Gene* 73:237-244). El porcentaje de identidad entre secuencias también puede contarse o calcularse por otros métodos conocidos en la técnica (por ejemplo, Hein (1990) *Methods Enzymol.* 183:626-645). La identidad entre secuencias también se puede determinar por otros métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, mediante la variación de las condiciones de hibridación.
- [0048]** El término “**incubar**” se refiere a un proceso de poner en contacto una célula o un cultivo celular con el compuesto de interés o introducir de otro modo el compuesto de interés en una célula.
- [0049]** El término “**inhibidor**” se refiere a un agente que, cuando se une a una LmPDE o a algún otro polipéptido o ácido nucleico, disminuye la cantidad (expresión) o la actividad biológica de una LmPDE. Los inhibidores pueden incluir proteínas, ácidos nucleicos, carbohidratos, anticuerpos o cualquier otra molécula que disminuye la cantidad (expresión)

o actividad biológica de las LmPDE presentes en una muestra. El inhibidor preferido inhibirá selectivamente la actividad biológica de una LmPDE, sin afectar a la vez a ninguna otra proteína celular.

[0050] El término “aislado” o “purificado” se refiere a un ácido nucleico, proteína o polipéptido específico, o un fragmento de los mismos, en el que se han separado o sustancialmente separado los contaminantes (es decir, sustancias que difieren de la molécula de ácido nucleico, proteína o polipéptido específico) del ácido nucleico, proteína o polipéptido específico.

[0051] El término “LmPDE” significa cualquiera de LmPDE-A, LmPDE-B1 o LmPDE-B2 y puede referirse a las secuencias polipeptídicas o de ácido nucleico. Los polipéptidos de LmPDE pueden ser naturales, sintéticos, semisintéticos o recombinantes. LmPDE incluye polipéptidos de *Leishmania major*, así como otras especies y subespecies de *Leishmania* de los complejos *Leishmania tropica*, *Leishmania donovani*, *Leishmania mexicana* y *Leishmania viannia* incluyendo *Leishmania aethiopica*, *Leishmania brasiliensis*, *Leishmania d. donovani*, *Leishmania d. infantum*, *Leishmania d. chagasi*, *Leishmania garnhami*, *Leishmania m. mexicana*, *Leishmania m. amazonensis*, y *Leishmania pifanoi*.

[0052] La expresión “molécula de ácido nucleico de LmPDE-A” se refiere a una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido de LmPDE-A.

[0053] La expresión “molécula de ácido nucleico de LmPDE-B1” se refiere a una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido de LmPDE-B1.

[0054] La expresión “molécula de ácido nucleico de LmPDE-B2” se refiere a una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido de LmPDE-B2.

[0055] La expresión “expresión de LmPDE” se refiere al proceso por el que un transcrito de ARN o un polipéptido traducido se produce a partir de una secuencia de nucleótidos de LmPDE.

[0056] El término “modula” se refiere a un cambio en la actividad del LmPDE de la presente invención. Por ejemplo, la modulación puede causar un aumento o una disminución en la cantidad de proteína (expresión) o actividad, características de unión u otras propiedades biológicas, funcionales o inmunológicas de los LmPDE de la invención.

[0057] La expresión “secuencia de ácido nucleico” o “molécula de ácido nucleico” se refiere a un oligonucleótido, nucleótido o polinucleótido y fragmentos de los mismos; a ADN o ARN de origen genómico o sintético, que puede ser bicatenario o monocatenario; y representa la cadena sentido o antisentido.

[0058] La expresión “unido operativamente” se refiere a secuencias de ácido nucleico relacionadas funcionalmente. Por ejemplo, un promotor está unido operativamente con una secuencia codificante si el promotor controla la traducción del polipéptido codificado. Aunque las secuencias de ácido nucleico unidas operativamente pueden ser contiguas y estar en la misma fase de lectura, ciertos elementos genéticos, por ejemplo, genes represores, no están unidos contiguamente a la secuencia que codifica el polipéptido sino que se une aún a las secuencias operadoras que controlan la expresión del polipéptido.

[0059] La expresión “dominio PDEasa” se refiere al dominio catalítico conservado de las PDE.

[0060] La expresión “condiciones rigurosas” se refiere a condiciones que permiten la hibridación entre secuencias polinucleotídicas complementarias. Las condiciones rigurosas adecuadas pueden definirse por, por ejemplo, las concentraciones de sal y/o formamida en las soluciones de pre-hibridación e hibridación o por la temperatura de hibridación, que se conoce bien en la técnica. En particular, puede aumentarse el rigor reduciendo la concentración de sal, aumentando la concentración de formamida o aumentando la temperatura de hibridación.

[0061] La expresión “sustancialmente purificado” se refiere a secuencias de ácido nucleico o polipeptídicas que se retiran de su ambiente natural y se aíslan o separan y están al menos 60% sin, 65% sin, 70% sin, 75% sin, 80% sin, 85% sin, 90% sin, 95% sin, 96% sin, 97% sin, 98% sin, o 99% sin otros componentes con los que se asocian de forma natural.

[0062] La expresión “variantes y mutantes” se refiere a cambios en una secuencia polipeptídica o de ácido nucleico tales como sustituciones, inserciones, deleciones de aminoácidos o nucleótidos, cambios de aminoácidos conservativos, cambios polimórficos, cambios alélicos, cambios de alteración de fase, truncamiento o similares, en los que la proteína variante mutante mantiene su función nativa (en la presente memoria, al menos la hidrólisis de AMPc) y en los que la molécula de ácido nucleico variante o mutante codifica una proteína que mantiene su función nativa.

[0063] El término “vector” incluye, sin limitación, plásmidos, cósmidos y fagémidos.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

[0064] Los segundos agujeros tales como adenosín monofosfato cíclico (AMPc) y guanósín monofosfato cíclico (GMPc) juegan papeles biológicos importantes en la modulación de los efectos de una amplia diversidad de primeros mensajeros. Por ejemplo AMPc y GMPc están implicados en la propagación de una diversidad de señales

extracelulares que se originan de primeros mensajeros tales como hormonas, luz y neurotransmisores. Los niveles intracelulares en estado estacionario de AMPc y GMPc están controlados por sus velocidades de síntesis mediante ciclasas y por su velocidad de degradación mediante fosfodiesterasas específicas de nucleótido cíclico (PDE).

[0065] Las PDE se componen típicamente de un dominio catalítico (aproximadamente 270 aminoácidos), un dominio regulador N terminal responsable de unir los cofactores y, en algunos casos, un dominio C terminal de función desconocida. Un motivo conservado, HDXXHXGXXN, se ha descubierto en el dominio catalítico de todas las PDE. Se han identificado varias familias de PDE (Beavo (1995) *Physiol. Rev.* 75, 725-748; Soderling *et al.* (1998) *J. Biol. Chem.* 273,15553-15558; y Fisher *et al.* (1998) *J. Biol. Chem.* 273,15559-15564). Las familias de PDE presentan aproximadamente un 35% de identidad de secuencia de aminoácidos con su dominio catalítico. Las isozimas dentro de la misma familia típicamente presentan una identidad de secuencia del 75-95% en esta región. Dentro de una familia, con frecuencia hay una identidad de secuencia mayor del 60% fuera del dominio catalítico, mientras que entre diferentes familias de PDE, existe poca o ninguna similitud de secuencia.

[0066] En eucariotas, se han identificado dos clases distintas de PDE. Las enzimas de clase I muestran todas conservación de secuencia de aminoácidos significativa dentro de sus dominios catalíticos. Las PDE de Clase I incluyen todas las familias actualmente conocidas de PDE de mamíferos así como varias PDE de eucariotas inferiores tales como PDE2 de *Saccharomyces cerevisiae* y el producto del gen regA de *Dictyostelium discoideum*. Las PDE de Clase II, sin embargo, comparten muy poca identidad de secuencia de aminoácidos con las PDE de Clase I y por lo tanto probablemente tienen un origen evolutivo distinto. Además las PDE de clase II con frecuencia se distinguen por sus valores de K_M generalmente más altos (Zoraghi *et al.* (2001) *J. Biol. Chem.* 276, 11559-11566). Se han identificado PDE de clase II en levadura (Nikawa *et al.* (1987) *Mol. Cell Biol.* 7, 3629-3636), el moho mucilaginoso *Dictyostelium discoideum* (Lacombe *et al.* (1986) *J. Biol. Chem.* 261,16811-16817), *Vibrio fischeri* (Dunlap *et al.* (1993) *J. Bacteriol.* 175, 4615-4624), y *Candida albicans* (Hoyer *et al.* (1994) *Microbiology* 140, 1533-1542).

[0067] Se piensa que una diversidad de enfermedades resultan de unos niveles disminuidos de nucleótidos cíclicos debido a un aumento en la actividad de PDE. En consecuencia, los PDE se han convertido en dianas de fármacos altamente atractivos durante los últimos años. Se está desarrollando una variedad creciente de inhibidores de PDE específicos de familia y específicos de subtipo como agentes terapéuticos para una amplia serie de enfermedades tales como enfermedad autoinmune (Bielekova *et al.* (2000) *J. Immunol.* 164, 1117-1124), (Dal Piaz *et al.* (2000) *Fármaco*, 57(2), 89-96), artritis (Kiely *et al.* (1995) *Eur. J. Immunol.* 25, 2899-2906), asma (Barnette (1999) *Prog. Drug Res.* 53, 193-229), enfermedades inflamatorias (Barnes (2001) *Novartis Found. Symp.* 234, 255-267), impotencia (Langtry *et al.* (1999) *Drugs* 57, 967-989) y cáncer (Marko *et al.* (2000) *Chem. Res. Toxicol.* 10, 944-948). Hasta el momento, existe información limitada sobre PDE en kinetoplastea tales como *Leishmania major*.

[0068] Rascón A *et al.* describe y caracteriza una fosfodiesterasa de AMP cíclico en *Leishmania mexicana* y la purificación de una forma soluble de la misma, pero no se describe en dicho documento una secuencia de aminoácidos (Mol Biochem Parasitol. 5 mar 2000; 106(2): 283-92).

[0069] Al-Chalabi KA *et al.* Indica el asilamiento y la purificación parcial de fosfodiesterasa de AMPc (EC 3.1.4.17) de la forma de promastigote de *Leishmania tropica* y un resultado preliminar de *Leishmania donovani*, pero no describe ninguna secuencia de aminoácidos o secuencia de nucleótidos que codifique estas proteínas (Comp Biochem Physiol B. 1989; 93(4): 789-92).

Polipéptidos de la Invención

[0070] Un aspecto de la presente invención se refiere a nuevos polipéptidos de PDE aislados del parásito *Leishmania major*, designados LmPDE-B1 (SEC ID N°: 3) y LmPDE-B2 (SEC ID N°: 5). Las realizaciones particulares de los polipéptidos de LmPDE de la invención incluyen LmPDE-B1 y LmPDE-B2 de longitud completa de *Leishmania major*. En otro aspecto, la invención se refiere a fragmentos de LmPDE.

[0071] La presente invención también se refiere a variantes y mutantes de LmPDE. Los alelos mutantes de LmPDE codifican formas mutantes de polipéptidos de LmPDE que tienen al menos una sustitución, inserción, delección, truncamiento de aminoácidos o cambio de fase.

[0072] Otra variante de polipéptidos de LmPDE puede tener secuencias de aminoácidos que difieren en una o más sustituciones de aminoácidos. La variante puede tener cambios de aminoácidos conservativos, cuando un aminoácido sustituido tiene propiedades estructurales o químicas similares. Los restos aminoacídicos que pueden sustituirse de forma conservativa entre sí, incluyen, sin limitación: glicina/alanina; valina/isoleucina/leucina; asparagina/glutamina; ácido aspártico/ácido glutámico; serina/treonina; lisina/arginina y fenilalanina/tirosina. Otras sustituciones también pueden considerarse conservativas, dependiendo del ambiente del aminoácido particular y su papel en la estructura tridimensional de la proteína. Por ejemplo, la metionina, que es relativamente hidrófoba, con frecuencia puede intercambiarse con leucina e isoleucina y a veces con valina.

[0073] Como alternativa, una variante puede tener cambios de aminoácidos no conservativos, tales como, por ejemplo, reemplazo de una glicina con un triptófano o alanina con lisina. Variaciones menores similares también pueden incluir delecciones e inserciones de aminoácidos. Cualquier sustitución de aminoácidos que no afecte significativamente a las propiedades biológicas y/o químicas de los polipéptidos de LmPDE está abarcada por la presente invención. Puede

encontrarse orientación en la determinación de que y cuantos restos aminoacídicos pueden sustituirse, insertarse y suprimirse usando programas informáticos bien conocidos en la técnica tales como el paquete de software DNASTAR.

[0074] La presente invención también abarca diversas secuencias de aminoácidos que representan diferentes formas y fragmentos de los polipéptidos de LmPDE tales como polipéptidos con mutaciones conservativas y fragmentos que contienen el dominio de PDEasa. Los polipéptidos de LmPDE puede ser de *Leishmania major*, u otra especie de *Leishmania* y subespecies de los complejos *Leishmania tropica*, *Leishmania donovani*, *Leishmania mexicana*, y *Leishmania viannia* incluyendo *Leishmania aethiopica*, *Leishmania brasiliensis*, *Leishmania d. donovani*, *Leishmania d. infantum*, *Leishmania d. chagasi*, *Leishmania garnhami*, *Leishmania m. mexicana*, *Leishmania m. amazonensis*, y *Leishmania pifanoi*.

[0075] Los LmPDE de la presente invención pueden realizarse de muchas formas, tales como en forma aislada o en forma purificada. Un experto en la materia puede emplear fácilmente métodos de aislamiento y purificación convencionales para obtener polipéptidos de LmPDE aislados (véase, por ejemplo, Marchak *et al.* (1996) *Strategies for Protein Purification and Characterization*, Cold Spring Harbor Press, Plainview, NY). La naturaleza y grado de aislamiento y purificación dependerá del uso pretendido. Por ejemplo, las moléculas de proteína LmPDE purificadas estarán sustancialmente sin otras proteínas o moléculas que alteren la unión de proteínas LmPDE a anticuerpos u otros ligandos. Las realizaciones de polipéptidos de LmPDE incluyen polipéptidos de LmPDE purificados que tienen la actividad biológica de una proteína LmPDE. En una forma, dichos polipéptidos de LmPDE purificados mantienen la capacidad de unirse a anticuerpo u otro ligando.

[0076] Pueden producirse diversas formas de un polipéptido particular de LmPDE de la invención como resultado de procesos tales como modificaciones post-traduccionales. Por ejemplo, las diversas formas de polipéptidos de LmPDE aislados pueden incluir formas precursoras y formas maduras diferentes de una proteína o polipéptido de LmPDE que resultan de acontecimientos post-traduccionales, tales como glucosilación, fosforilación y escisión intramolecular.

[0077] La presente invención proporciona polipéptidos aislados y purificados que tienen una secuencia de aminoácidos idéntica a las secuencias polipeptídicas de LmPDE predichas descritas en la presente memoria. En consecuencia, las secuencias de aminoácidos de la presente invención pueden ser idénticas a LmPDE-B1 (SEC ID N°: 3) o LmPDE-B2 (SEC ID N°: 5). Los polipéptidos LmPDE de la invención también pueden comprender al menos una secuencia que es idéntica a un fragmento de una secuencia polipeptídica LmPDE de longitud completa. La presente invención también proporciona polipéptidos aislados y purificados con al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con las secuencias descritas en la presente memoria.

30 Moléculas de Ácido Nucleico de la invención

[0078] La presente invención proporciona moléculas de ácido nucleico de LmPDE que corresponden a los genes de longitud completa de LmPDE-B1 (SEC ID N°: 4) y LmPDE-B2 (SEC ID N°: 6). La presente invención también proporciona moléculas de ácido nucleico que codifican los polipéptidos de LmPDE analizados previamente. La presente invención también abarca diversas secuencias de nucleótidos que representan diferentes formas y fragmentos de genes y transcritos de LmPDE, tales como diferentes formas alélicas, formas polimórficas, transcritos precursores alternativos y transcritos maduros. Adicionalmente, se proporcionan moléculas de ácido nucleico recombinante que son variantes de uso de codón de nuevas secuencias de LmPDE.

[0079] Una realización específica de un ácido nucleico que codifica un polipéptido LmPDE-B1 de la presente invención comprende la secuencia de nucleótidos de SEC ID N°: 4, comenzando con adenina en la posición 1267 y terminando con adenina en la posición 4059 (que corresponde a los aminoácidos 1-930 de SEC ID N°: 3). Otra realización comprende una secuencia de nucleótidos que se encuentra en SEC ID N°: 4, comenzando con timina en la posición 3205 y terminando con citosina en la posición 3906 que corresponde al dominio de PDEasa de LmPDE-B1 (aminoácidos 647-880 de SEC ID N°: 3). Debido a la degeneración del código genético, la presente invención también proporciona cualquier molécula de ácido nucleico que codifique un polipéptido que comprende la secuencia polipeptídica de LmPDE-B1 expuesta en la SEC ID N°: 3, empezando con metionina en la posición de aminoácido 1 y terminando con valina en la posición de aminoácido 930. La invención también proporciona ácidos nucleicos que codifican fragmentos de un polipéptido de LmPDE-B1, por ejemplo un ácido nucleico que codifica el dominio de PDEasa que comprende los aminoácidos 647-880 como se exponen en la SEC ID N°: 3.

[0080] Una realización específica de un ácido nucleico que codifica un polipéptido LmPDE-B2 de la presente invención comprende la secuencia de nucleótidos de SEC ID N°: 6, comenzando con adenina en la posición 2182 y terminando con adenina en la posición 5004 (que corresponde a los aminoácidos 1-940 de SEC ID N°: 5). Otra realización comprende una secuencia de nucleótidos que se encuentra en la SEC ID N°: 6, comenzando con timina en la posición 4150 y terminando con citosina en la posición 4851, que corresponde al dominio de PDEasa de LmPDE-B2 (aminoácidos 657-890 de SEC ID N°: 5). Debido a la degeneración del código genético, la presente invención también proporciona cualquier molécula de ácido nucleico que codifique un polipéptido que comprende la secuencia polipeptídica de LmPDE-B2 expuesta en la SEC ID N°: 5, empezando con metionina en la posición de aminoácido 1 y terminando con valina en la posición de aminoácido 940. La invención también proporciona ácidos nucleicos que codifican fragmentos de un polipéptido de LmPDE-B2, por ejemplo un ácido nucleico que codifica el dominio PDEasa que comprende los aminoácidos 657-890 como se exponen en SEC ID N°: 5.

[0081] Un experto en la materia apreciará que los ácidos nucleicos de la presente invención pueden codificar dominios o partes de polipéptidos de LmPDE distintos de los mencionados específicamente anteriormente.

[0082] La presente invención contempla formas alélicas alternativas de secuencias de nucleótidos de LmPDE que se aíslan de diferentes sujetos de la misma especie. Típicamente, las formas alélicas aisladas de secuencias génicas de origen natural incluyen alelos de tipo silvestre y mutantes. Una secuencia génica de LmPDE de tipo silvestre codificará una proteína LmPDE que tiene actividad biológica de PDE normal, tal como, por ejemplo, una función fosfodiesterasa. Como alternativa, un mutante de una secuencia génica de LmPDE puede codificar un polipéptido de LmPDE que tenga actividad normal. En consecuencia, la presente invención proporciona forma alélicas de tipo silvestre y mutantes de secuencias de nucleótidos de LmPDE.

[0083] La presente invención contempla adicionalmente formas polimórficas de secuencias de nucleótidos de LmPDE. Típicamente, las formas polimórficas aisladas de secuencias génicas de origen natural se aíslan de diferentes sujetos de la misma especie. Las formas polimórficas incluyen secuencias que tienen una o más sustituciones de nucleótidos que pueden dar como resultado o no cambios en la secuencia de codones de aminoácidos. Estas sustituciones pueden dar como resultado un gen de LmPDE de tipo silvestre que codifica una proteína que tiene la actividad biológica de las proteínas LmPDE de tipo silvestre.

[0084] La presente invención proporciona adicionalmente variantes de uso de codón aisladas (véase Tabla 1) que difieren de las secuencias de nucleótidos de LmPDE descritas, pero no alteran la secuencia proteica de LmPDE predicha o su actividad biológica. Las variantes de uso de codón pueden generarse por tecnología de ADN recombinante. Pueden seleccionarse codones para optimizar el nivel de producción del transcrito de LmPDE o la proteína de LmPDE en un hospedador de expresión procariota o eucariota particular, de acuerdo con la frecuencia de codones utilizados por la célula hospedadora. Las razones alternativas para alterar la secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de LmPDE incluyen la producción de transcritos de ARN que tienen propiedades más deseables, tales como una semivida prolongada o estabilidad aumentada.

Tabla 1

<u>Aminoácido</u>	<u>Símbolo</u>	<u>Símbolo de Una Letra</u>	<u>Codones</u>
Alanina	Ala	A	GCU, GCC, GCA, GCG
Cisteína	Cys	C	UGU, UGC
Ácido Aspártico	Asp	D	GAU, GAC
Ácido Glutámico	Glu	E	GAA, GAG
Fenilalanina	Phe	F	UUU, UUC
Glicina	Gly	G	GGU, GGC, GGA, GGG
Histidina	His	H	CAU, CAC
Isoleucina	He	I	AUU, AUC, AUA
Lisina	Lys	K	AAA, AAG
Leucina	Leu	L	UUA, UUG, CUU, CUC, CUA, CUG
Metionina	Met	M	AUG
Asparagina	Asn	N	AAU, AAC
Prolina	Pro	P	CCU, CCC, CCA, CCG
Glutamina	Gln	Q	CAA, CAG
Arginina	Arg	R	CGU, CGC, CGA, CGG, AGA, AGG
Serina	Ser	S	UCU, UCC, UCA, UCG, AGU, AGC
Treonina	Thr	T	ACU, ACC, ACA, ACG
Valina	Val	V	GUU, GUC, GUA, GUG
Triptófano	Trp	W	UGG
Tirosina	Tyr	Y	UAU, UAC

[0085] La presente invención proporciona adicionalmente nuevos polinucleótidos purificados y aislados (es decir secuencias de ADN y fragmentos de las mismas), que pueden estar en forma aislada, incluyendo transcritos de ADN y ARN (cadenas tanto sentido como antisentido complementarias) que codifican LmPDE, híbridos de ADN/ARN y moléculas relacionadas. Las moléculas de ácido nucleico de la presente invención incluyen secuencias de nucleótidos sustancialmente idénticas o complementarias a las secuencias de nucleótidos de LmPDE descritas en la presente memoria.

[0086] La invención abarca moléculas genómicas, de ADNc, ribozimas y antisentido así como ácidos nucleicos basados en cadena principal alternativa y que incluyen bases alternativas y restos de azúcares modificados, derivados de fuentes naturales o sintetizados completa o parcialmente. Como se usa en la presente memoria, ADN sintetizado

“completamente” significa que el ADN se produce completamente por medios químicos y sintetizado “parcialmente” significa que sólo partes del ADN resultante se producen por síntesis química. Las moléculas antisentido pueden ser ARN u otras moléculas, incluyendo ácidos péptido nucleicos (PNA) o moléculas no de ácido nucleico tales como derivados de fosforotioato (descritas en mayor detalle posteriormente) que se unen específicamente a ADN o ARN de una manera dependiente de par de bases. Un experto en la materia puede obtener fácilmente estas clases de moléculas de ácidos nucleicos usando las secuencias descritas en la presente memoria.

[0087] La presente invención proporciona adicionalmente secuencias de nucleótidos que hibridan de forma selectiva con secuencias de nucleótidos de LmPDE en condiciones de hibridación altamente rigurosas. Típicamente, la hibridación en condiciones convencionales altamente rigurosas se producirá entre dos moléculas de ácido nucleico complementarias que difieran en complementariedad de secuencia de aproximadamente el 70% a aproximadamente el 100%. Resulta inmediatamente evidente para un experto en la materia que la hibridación altamente rigurosa entre moléculas de ácidos nucleicos depende de, por ejemplo, el grado de identidad, el rigor de la hibridación y la longitud de las cadenas que hibridan. Los métodos y fórmulas para llevar a cabo hibridaciones altamente rigurosas se conocen bien en la técnica y pueden encontrarse, por ejemplo, en Sambrook, *et al.* (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY).

[0088] En general, son condiciones de hibridación rigurosas las que: (1) emplean fuerza iónica baja y alta temperatura para el lavado, por ejemplo, NaCl 0,015 M, citrato sódico 0,0015 M y SDS al 0,1% a 50°C; o (2) emplean un agente desnaturante durante la hibridación tal como formamida, por ejemplo, formamida al 50% (vol/vol) con albúmina de suero bovino al 0,1%, Ficoll al 0,1%, polivinilpirrolidona al 0,1%, tampón de fosfato sódico 50 mM a pH 6,5 con NaCl 750 mM y citrato sódico 75 mM a 42°C.

[0089] Otro ejemplo de condiciones rigurosas es el uso de formamida al 50%, SSC 5x (NaCl 0,75 M, citrato sódico 0,075 M), fosfato sódico 50 mM (pH 6,8), pirofosfato sódico al 0,1%, solución de Denhardt 5x, ADN de esperma de salmón sonificado (50 mg/ml), SDS al 0,1% y sulfato de dextrano al 10% a 42°C, con lavados a 42°C en SSC 0,2x y SDS al 0,1%. Un experto en la materia puede determinar fácilmente y variar las condiciones de rigor de forma apropiada para obtener una señal de hibridación clara y detectable. Los intervalos típicos de condiciones rigurosas incluyen: (1) bajo rigor (SSC 2x /SDS 0,1% (p/v), temperatura ambiente), (2) rigor moderado (SSC 0,2x/SDS 0,1% (p/v), 42°C) y (3) alto rigor (SSC 0,1x/SDS 0,1% (p/v), 68°C).

[0090] La presente invención proporciona moléculas de ARN que codifican polipéptidos de LmPDE. En particular, las moléculas de ARN de la invención pueden aislarse con longitud completa o como moléculas de ARNm parciales u oligómeros de ARN que codifican un polipéptido de LmPDE.

[0091] Las moléculas de ácido nucleico de la invención también incluyen moléculas de ácido nucleico derivadas que difieren de moléculas de ADN o ARN y moléculas antisentido. Las moléculas derivadas incluyen ácidos péptido nucleicos (PNA) y moléculas no de ácido nucleico que incluyen moléculas de fosforotioato, fosfotriéster, fosforamido y metilfosfonato, que se unen a ADN o ARN monocatenario de una manera dependiente de par de bases (Zamecnik *et al.* (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75, 280-284; Goodchild *et al.* (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 4143-4146).

[0092] Las moléculas de ácido péptido nucleico comprenden un oligómero de ácido nucleico al que se ha añadido un resto de aminoácido, tal como lisina y un grupo amino. Estas moléculas pequeñas (también conocidas como agentes antígenicos) detienen la elongación del transcrito mediante su unión a su cadena complementaria (molde) de ácido nucleico (Nielsen *et al.*, (1993) *Anticancer Drug Des.* 8, 53-63). Pueden encontrarse revisiones de métodos para síntesis de ADN, ARN y sus análogos en *Oligonucleotides and Analogues* (ed. F. Eckstein (1991) IRL Press, Nueva York) y *Oligonucleotide Synthesis* (ed. M. J. Gait (1984) IRL Press, Oxford, Inglaterra). Adicionalmente, se describen métodos para tecnología de ARN antisentido en las patentes de Estados Unidos N° 5.194.428 y 5.110.802. Un experto en la materia puede obtener fácilmente estas clases de moléculas de ácido nucleico usando las secuencias de nucleótidos de LmPDE descritas en la presente memoria (véase, por ejemplo, *Innovative and Perspectives in Solid Phase Synthesis* (1992) Egholm, *et al.* págs. 325-328, o la Patente de Estados Unidos N° 5.539.082).

[0093] Las realizaciones de moléculas de ácido nucleico de LmPDE de la invención incluyen cebadores de ADN y ARN que permiten la amplificación específica de secuencias de LmPDE o de cualquier fragmento de las mismas y sondas que hibridan de forma selectiva o específica con secuencias de LmPDE o con cualquier fragmento de las mismas. Como se usa en la presente memoria, la amplificación se refiere a la producción de copias adicionales de una secuencia de ácido nucleico y se lleva a cabo generalmente usando tecnología de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que se conoce bien en la técnica (Dieffenbach *et al.* (1995) *PCR Primer, a Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, Plainview, NY). Las sondas de ácido nucleico pueden marcarse con un marcador detectable. Ejemplos de un marcador detectable incluyen, pero sin limitación, un radioisótopo, un compuesto fluorescente, un compuesto bioluminiscente, un compuesto quimioluminiscente, un quelador metálico o una enzima. La tecnología para generar sondas de ADN y ARN marcadas se conoce bien en la técnica (véase, por ejemplo, Sambrook *et al.* (1989) in *Molecular Cloning*).

Moléculas de Ácido Nucleico Recombinantes que Codifican el LmPDE

[0094] La invención también incluye moléculas de ácido nucleico recombinante que codifican polipéptidos de LmPDE. Dichas moléculas pueden tener secuencias reguladoras unidas operativamente a las secuencias de nucleótidos de

LmPDE de la invención.

[0095] La presente invención también abarca moléculas de ácido nucleico recombinantes tales como moléculas de ADN (ADNr) que comprenden secuencias de nucleótidos que codifican polipéptidos de LmPDE. Como se usa en la presente memoria, una molécula de ADNr es una molécula de ADN que se ha sometido a manipulación molecular *in vitro*. Los métodos para generar moléculas de ADNr se conocen bien en la técnica (véase, por ejemplo, Sambrook *et al.* (1989) *Molecular Cloning*, mencionado anteriormente). En una realización de la presente invención, las secuencias de ADNr que codifican un polipéptido de LmPDE, o fragmentos del mismo, están unidas operativamente a una o más secuencias de control de la expresión y/o secuencias vector.

Vectores que Comprenden las LmPDE Nuevas

[0096] Las moléculas de ácido nucleico de la presente invención pueden ser moléculas recombinantes, comprendiendo cada una la secuencia, o parte de la misma, de una secuencia de nucleótidos de LmPDE unida a una secuencia de nucleótidos que no es de LmPDE. Por ejemplo, la secuencia de LmPDE puede unirse operativamente a un vector para generar una molécula recombinante.

[0097] Un posible vector para la expresión es un vector que se replica de forma autónoma que comprende un replicón que dirige la replicación del ADNr dentro de la célula hospedadora apropiada. Como alternativa, el vector dirige la integración del vector recombinante en una célula hospedadora. También pueden usarse diversos vectores virales, tales como varios vectores retrovirales, adenovirales y virales adenoasociados (AAV) bien conocidos (Berkner (1988) *Biotechniques* 6, 616-629).

[0098] Los vectores de la presente invención pueden permitir la expresión de un transcrito o secuencia polipeptídica de LmPDE en células hospedadoras procariotas o eucariotas. Dichos vectores incluyen vectores de expresión que comprenden un elemento de control de la expresión, descrito anteriormente. Los vectores usados para la expresión de las secuencias de nucleótidos de LmPDE en células hospedadoras eucariotas pueden incluir elementos de control de la expresión tales como el promotor de polihedrina de baculovirus para la expresión en células de insecto. Otros posibles elementos de control de la expresión incluyen promotores o potenciadores derivados de los genomas de células vegetales (por ejemplo, genes de choque térmico, de RUBISCO, de proteínas de almacenamiento), promotores virales o secuencias líder de virus vegetales y promotores o potenciadores de los genes de mamífero o de virus de mamífero.

[0099] También pueden requerirse señales de iniciación específicas para una traducción eficaz de las secuencias de nucleótidos de LmPDE. Estas señales incluyen el codón de iniciación ATG y secuencias adyacentes. En los casos en los que se inserta un codón de iniciación de LmPDE y secuencias cadena arriba en el vector de expresión apropiado, puede no necesitarse señales de control de la traducción adicionales. Sin embargo, en casos en los que solamente se inserta la secuencia codificante (o una parte de la misma), deben proporcionarse señales de control traduccional exógenas que incluyen el codón de iniciación ATG. Además, el codón de iniciación debe estar en la fase de lectura correcta para asegurar la traducción del inserto completo. Los elementos traduccionales y codones de iniciación exógenos pueden ser de diversos orígenes, tanto naturales como sintéticos. La eficacia de la expresión puede potenciarse por la inclusión de potenciadores apropiados para el sistema celular en uso (Scharf *et al.* (1994) *Results Probl. Cell. Differ.* 20,125-162; Bittner *et al.* (1987) *Methods in Enzymol.* 153, 516-544).

[0100] Un posible vector incluye al menos un gel indicador seleccionable que codifica un producto génico que confiere resistencia a fármaco tal como resistencia a ampicilina o tetraciclina. El vector también puede comprender múltiples sitios de restricción de endonucleasas que permiten una inserción conveniente de secuencias de ADN exógeno. Los métodos para generar un vector de expresión recombinante que codifica una proteína de LmPDE de la invención se conocen bien en la técnica (véase, por ejemplo, Sambrook *et al.* (2001) *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY y Ausubel (1989) *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Nueva York NY).

[0101] Los vectores de la presente invención para generar transcritos de LmPDE y/o los polipéptidos de LmPDE codificados pueden ser vectores de expresión que son compatibles con células hospedadoras procariotas. Los vectores de expresión de células procariotas se conocen bien en la técnica y están disponibles de varias fuentes comerciales. Por ejemplo, pueden usarse los vectores pET (por ejemplo, pET-21, Novagen Corp.), vectores pQE (Qiagen, Chatsworth, CA), fagémido BLUESCRIPT (Stratagene, LaJolla, CA), pSPORT (Gibco BRL) o híbridos ptrp-lac para expresar polipéptidos de LmPDE en células hospedadoras bacterianas.

[0102] Como alternativa, los vectores de expresión de la presente invención para generar transcritos de LmPDE y/o los polipéptidos de LmPDE codificados pueden ser vectores de expresión que son compatibles con células hospedadoras eucariotas, tal como células de vertebrados. Los vectores de expresión de células eucariotas se conocen bien en la técnica y están disponibles de varias fuentes comerciales. Dichos vectores pueden contener sitios de restricción convenientes para la inserción del segmento de ADN deseado. Son típicos de dichos vectores PSVL y pKSV-10 (Pharmacia), pBPV-1/pML2d (International Biotechnologies, Inc.), pTDT1 (ATCC, N° 31255) y vectores de expresión eucariotas similares.

Sistemas de Hospedador-Vector que Comprenden LmPDE

[0103] La invención proporciona adicionalmente un sistema de hospedador-vector que comprende un vector, plásmido, fagémido o cósmido que comprende una secuencia de nucleótidos de LmPDE, o un fragmento de la misma, introducido en una célula hospedadora adecuada. Pueden utilizarse una diversidad de sistemas de expresión vector/hospedador para portar y expresar secuencias de nucleótidos de LmPDE. El sistema hospedador-vector puede usarse para expresar (por ejemplo, producir) polipéptidos de LmPDE codificados por secuencias de nucleótidos de LmPDE. La célula hospedadora puede ser procariota o eucariota. Los ejemplos de células hospedadoras procariotas adecuadas incluyen cepas bacterianas de géneros tales como *Escherichia*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Streptococcus*, y *Streptomyces*. Los ejemplos de células hospedadoras eucariotas adecuadas incluyen células de levadura, células vegetales o células animales tales como células de mamíferos y células de insectos. Varias posibles realizaciones proporcionan un sistema de hospedador-vector que comprende el vector pcDNA3 (Invitrogen, Carlsbad, CA) en células de mamífero COS-7, el vector pGEX (Promega, Madison, WI) en células bacterianas, el vector pLT1 (S. Kunz, no publicado) en células de *Saccharomyces cerevisiae* o el vector de baculovirus pFastBac HT (Gibco/BRL) en células de insecto Sf9 (ATCC, Manassas, VA).

[0104] La introducción de las moléculas de ADN recombinante de la presente invención en una células hospedadora apropiada puede conseguirse mediante métodos bien conocidos que dependen del tipo de vector y sistema hospedador empleados. Por ejemplo, se introducen células hospedadoras procariotas (por ejemplo, transformadas) con moléculas de ácido nucleico por electroporación o métodos de tratamiento con sal (véase, por ejemplo, Cohen *et al.* (1972) *Proc Natl Acad Sci USA* 69, 2110; Sambrook *et al.* (1989) *Molecular Cloning*, mencionado anteriormente). Pueden transformarse células de vertebrados con vectores que contienen ADN recombinantes por diversos métodos, incluyendo electroporación o tratamiento con lípidos catiónicos o sal (Graham *et al.* (1973) *Virol.* 52,456; Wigler *et al.* (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76,1373-1376).

[0105] Las células transformadas con éxito, es decir, células que contienen una molécula de ADN de la presente invención, pueden identificarse por técnicas bien conocidas en la materia. Por ejemplo, las células resultantes de la introducción de ADN recombinante de la presente invención se seleccionan y clonan para producir colonias únicas. Las células de esas colonias se recogen, se lisan y se examina su contenido de ADN con respecto a la presencia del ADN usando un método tal como el descrito por Southern (1975) *J. Mol. Biol.* 98, 503, o Berent *et al.* (1985) *Biotech.* 3, 208. Las proteínas producidas de la célula pueden también ensayarse mediante un ensayo bioquímico o un método inmunológico.

[0106] En sistemas bacterianos, pueden seleccionarse varios vectores de expresión dependiendo del uso pretendido para los polipéptidos de LmPDE. Por ejemplo, cuando se necesitan grandes cantidades de LmPDE para la inducción de anticuerpos, pueden ser deseables vectores que dirigen un alto nivel de expresión de proteínas de fusión que son solubles y fácilmente purificables. Dichos vectores incluyen, pero sin limitación, vectores de clonación y expresión de *E. coli* multifuncionales tales como BLUESCRIPT (Stratagene, San Diego, CA), en los que una secuencia de nucleótidos de LmPDE puede estar ligada en fase con secuencias para el Met amino terminal y los 7 restos posteriores de β -galactosidasa de modo que se produce una proteína híbrida; vectores pIN (Van Heeke & Schuster (1989) *J. Biol. Chem.* 264, 5503-5509) y similares. También pueden usarse los vectores pGEX (Promega, Madison, WI) para expresar polipéptidos de LmPDE como proteínas de fusión con glutatión S-transferasa (GST). En general, dichas proteínas de fusión son solubles y pueden purificarse fácilmente a partir de células lisadas mediante adsorción a perlas de glutatión-agarosa seguido de elución en presencia de glutatión libre. Las proteínas preparadas en dichos sistemas se diseñan para incluir sitios de escisión de heparina, trombina o proteasa de factor XA de modo que la proteína clonada de interés pueda liberarse del resto de GST a voluntad.

[0107] En levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) pueden usarse varios vectores que contienen promotores constitutivos o inducibles tales como factor beta, alcohol oxidasa y PGH. Para revisiones, véase Ausubel *et al.* (mencionado anteriormente) y Grant *et al.* (1987) *Methods in Enzymology* 153, 516-544.

[0108] En los casos en los que se usen vectores de expresión en plantas, la expresión de una secuencia que codifica un polipéptido de LmPDE puede dirigirse por varios promotores diferentes. Por ejemplo, promotores virales tales como los promotores 35S y 19S de CaMV (Brisson *et al.* (1984) *Nature* 310, 511-514) pueden usarse solos o en combinación con la secuencia líder omega de TMV (Takamatsu *et al.* (1987) *EMBO J* 6, 307-311). Como alternativa, pueden usarse promotores vegetales tales como la subunidad pequeña de RUBISCO (Coruzzi *et al.* (1984) *EMBO J* 3, 1671-1680; Broglie *et al.* (1984) *Science* 224, 838-843), o promotores de choque térmico (Winter *et al.* (1991) *Results Probl. Cell Differ.* 17, 85-105). Estas construcciones pueden introducirse en células vegetales por transformación con ADN directa o transfección mediada por patógeno. Para revisiones de dichas técnicas, véase Hobbs (1992) *McGraw Yearbook of Science and Technology*, McGraw Hill Nueva York N. Y., págs. 191-196; o Weissbach y Weissbach (1988) *Methods for Plant Molecular Biology*, Academic Press, Nueva York N. Y., págs. 421-463.

[0109] Un sistema de expresión alternativo que puede usarse para expresar polipéptidos de LmPDE es un sistema de insectos. En un sistema tal, se usa el virus de la polihedrosis nuclear de *Autographa californica* (AcNPV) como un vector para expresar genes ajenos en células de *Spodoptera frugiperda* o en larvas de *Trichoplusia* (Smith *et al.* (1983) *J. Virol.* 46, 584; Engelhard *et al.* (1994) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 91, 3224-3227). La secuencia que codifica un polipéptido de LmPDE puede clonarse en una región no esencial del virus, tal como el gen de polihedrina, y ponerse bajo el control del

promotor de polihedrina. La inserción exitosa de una secuencia de nucleótidos de LmPDE hará al gen de polihedrina inactivo y producirá virus recombinantes que carecen de proteína de cubierta. Los virus recombinantes se usan después para infectar células de *S. frugiperda* o larvas de *Trichoplusia* en las que se expresa el polipéptido de LmPDE.

[0110] En células hospedadoras de mamífero, se utilizan varios sistemas de expresión basados en virus. En casos en los que se usa un adenovirus como vector de expresión, una secuencia de nucleótidos de LmPDE se liga a un vector de traducción/traduccion de adenovirus que consiste en el promotor tardío y la secuencia líder tripartita. La inserción en una región no esencial E1 o E3 del genoma viral da como resultado un virus viable (Logan *et al.* (1984) *Proc Natl. Acad. Sci. USA* 81, 3655-3659) capaz de expresar una proteína de LmPDE en células hospedadoras infectadas. Además, pueden usarse potenciadores de la transcripción, tales como el potenciador del virus del sarcoma de rous (RSV), para aumentar la expresión en células hospedadoras de mamífero.

[0111] Una cepa de células hospedadoras también se puede seleccionar por su capacidad para modular la expresión de las secuencias de nucleótidos de LmPDE insertadas o para procesar el polipéptido de LmPDE expresado de una manera particular. Dichas modificaciones de polipéptidos de LmPDE incluyen, sin limitación, acetilación, carboxilación, glucosilación, fosforilación, lipidación y acilación. El procesamiento post-traduccion que escinde una forma precursora de la proteína también puede ser importante para una inserción, plegamiento y/o función correctas. Diferentes células hospedadoras tales como CHO, HeLa, MDCK, 293, WI38, etc. tienen maquinaria celular específica y mecanismos característicos para dichas actividades post-traduccionales y pueden seleccionarse para asegurar la modificación y procesamiento correctos de la proteína ajena introducida.

[0112] Para una producción a largo plazo de alto rendimiento de proteínas recombinantes, se prefiere expresión estable. Por ejemplo, las líneas celulares que expresan de forma estable polipéptidos de LmPDE se transforman usando vectores de expresión que contienen orígenes de replicación virales o elementos de expresión endógena y un gen indicador seleccionable. Después de la introducción del vector, las células se cultivan en un medio enriquecido antes de cambiar a medio selectivo. El propósito del marcador seleccionable es conferir resistencia a la selección y su presencia permite el crecimiento y recuperación de las células que expresan de forma exitosa las secuencias introducidas. Se puede hacer que los grupos resistentes de células transformadas de forma estable proliferen usando técnicas de cultivo tisular apropiadas para el tipo de células usado.

[0113] Puede usarse cualquier número de sistemas de selección para recuperar líneas celulares transformadas. Estos incluyen, sin limitación, los genes de la timidina quinasa del virus de herpes simple (tk) (Wigler *et al.* (1977) *Cell* 11, 223-232) o de la adenina fosforibosiltransferasa (aprt) (Lowy *et al.* (1980) *Cell* 22, 817-823) que pueden emplearse en células tk-menos o aprt-menos, respectivamente. También puede usarse resistencia a antimetabolitos, antibióticos o herbicidas como la base para la selección. Los ejemplos incluyen: dhfr que confiere resistencia a metotrexato (Wigler *et al.* (1980) *Proc Natl Acad Sci USA* 77, 3567-3570); npt, que confiere resistencia a la neomicina de aminoglucósidos y G-418 (Colbere-Garapin *et al.* (1981) *J. Mol. Biol.* 150,1-14) y también pat, que confiere resistencia a clorosulfaron y fosfinotricina acetiltransferasa, respectivamente (Murry, mencionado anteriormente).

[0114] Se han descrito genes seleccionables adicionales, por ejemplo UpB, que permite a las células utilizar indol en lugar de triptófano, o hisD, que permite a las células utilizar histinol en lugar de histidina (Hartman *et al.* (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 8047-8051). Recientemente, el uso de marcadores visibles ha ganado popularidad. Dichos marcadores incluyen antocianinas, β -glucuronidasa y su sustrato, GUS y luciferasa y su sustrato, luciferina. Estos marcadores se usan ampliamente no solamente para identificar transformantes sino también para cuantificar la cantidad de expresión proteica transitoria o estable atribuible a un sistema de vector específico (Rhodes *et al.* (1995) *Methods Mol. Biol.* 55,121-131).

Anticuerpos Reactivos Frente a polipéptidos de LmPDE

[0115] La presente invención también proporciona anticuerpos que se unen a los LmPDE de la invención. Estos anticuerpos pueden usarse para propósitos de diagnóstico y terapéuticos.

[0116] La invención proporciona anticuerpos, tales como anticuerpos policlonales, monoclonales, quiméricos, humanizados y humanos, así como fragmentos de los mismos (por ejemplo, Fab), que se unen a polipéptidos de LmPDE. Dichos anticuerpos pueden unirse de forma selectiva a un polipéptido de LmPDE pero no se unirán (o se unirán débilmente) a una proteína que no sea LmPDE. Estos anticuerpos pueden ser de cualquier fuente, por ejemplo, conejo, oveja, rata, perro, gato, cerdo, caballo, ratón y ser humano.

[0117] Como entenderán los expertos en la materia, los epítopos de un polipéptido de LmPDE a los que se dirige un anticuerpo pueden variar con la aplicación pretendida. Los polipéptidos de LmPDE pueden ser dianas para métodos terapéuticos tales como terapia de anticuerpo dirigido e inmunoterapia para tratar afecciones asociadas con la presencia o ausencia de una LmPDE de la invención. Adicionalmente, algunos de los anticuerpos de la invención pueden ser anticuerpos de internalización, que se internalizan (por ejemplo, entran) en la célula antes o después de la unión. Los anticuerpos de internalización son útiles para inhibir el crecimiento celular y/o inducir la muerte celular y para detectar o dirigir las LmPDE dentro de células dañadas o que están muriendo.

[0118] La invención también abarca fragmentos de anticuerpo que reconocen específicamente un polipéptido de LmPDE. Como se usa en la presente memoria, un fragmento de anticuerpo se define como al menos una porción de la

región variable de la molécula de inmunoglobulina que se une a su diana, es decir, la región de unión a antígeno. Parte de la región constante de la inmunoglobulina puede estar incluida. Los fragmentos de los anticuerpos monoclonales o los antisueros policlonales incluyen Fab, F(ab')₂, fragmentos de Fv, anticuerpos de cadena sencilla y proteínas de fusión que incluyen la parte inmunológicamente significativa (es decir, una parte que reconoce y se une a una LmPDE).

[0119] Los anticuerpos quiméricos de la invención pueden ser moléculas de inmunoglobulina que comprenden al menos dos partes de anticuerpo de diferentes especies, por ejemplo una parte humana y no humana. La invención también proporciona anticuerpos quiméricos que tienen diferentes funciones efectoras (Neuberger *et al.* (1984) *Nature* 312, 604), regiones constantes de inmunoglobulina de otras especies y regiones constantes de otra cadena de inmunoglobulina (Sharon *et al.* (1984) *Nature* 309, 364; Tan *et al.* (1985) *J. Immunol.* 135, 3565-3567). Se han descrito procedimientos adicionales para modificar moléculas de anticuerpo y para producir moléculas de anticuerpo quimérico usando recombinación homóloga para modificación de gen diana (Fell *et al.* (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 8507-8511).

[0120] Los anticuerpos humanizados dirigidos contra polipéptidos de LmPDE también son útiles. Pueden prepararse anticuerpos humanizados de acuerdo con varios métodos conocidos en la técnica (Teng *et al.* (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 7308-7312; Kozbor *et al.* (1983) *Immunology Today* 4, 7279; Olsson *et al.* (1982) *Meth. Enzymol.* 92, 3-16).

[0121] Se conocen bien en la técnica diversos métodos para la preparación de anticuerpos. Por ejemplo, pueden prepararse anticuerpos mediante la inmunización de un hospedador mamífero adecuado con un inmunógeno tal como un polipéptido de LmPDE aislado (Harlow (1989) *Antibodies*, Cold Spring Harbor Press, NY). Además, también pueden usarse proteínas de LmPDE como inmunógenos, tal como una LmPDE fusionada con GST, Ig humana o proteínas de fusión marcadas con His. Las células que expresan o sobreexpresan polipéptidos de LmPDE también pueden usarse para inmunizaciones. Esta estrategia puede dar como resultado la producción de anticuerpos monoclonales con capacidades mejoradas para el reconocimiento de polipéptidos LmPDE endógenos (Harlow *et al.* (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press).

[0122] La invención también proporciona anticuerpos humanos. Existen varias estrategias bien conocidas que podría usar un experto en la materia para producir anticuerpos recombinantes humanos. Una es la generación de anticuerpos usando tecnologías de presentación de fagos (Low *et al.* (1996). *J Mol Biol* 260(3): 359-368; Winter *et al.* (1994). *Annu Rev Immunol* 12:433-455). Específicamente, se usa ARN humano para producir una biblioteca de ADNc de fragmentos de cadena pesada y ligera de anticuerpos expresados en la superficie de un bacteriófago. Estas bibliotecas pueden usarse para explorar el antígeno de interés. El fago que se une, debido a un anticuerpo expresado en la superficie, puede aislarse después. El ADN que codifica las regiones variables se secuencian y clona para la expresión de anticuerpos.

[0123] Otro método para producir anticuerpos humanos emplea ratones "humanizados". Se han reemplazado los genes de los propios anticuerpos de estos ratones transgénicos con una parte del complejo génico de anticuerpos humanos de modo que tras la inoculación con un antígeno producen anticuerpos humanos (Green *et al.* (1994) *Nat. Genet.* 7:13-21; Low *et al.* (1996). *J Mol Biol* 260(3): 359-368; Wagner *et al.* (1994) *Eur. J. Immunol.* 24(11): 2672-2681; Wagner *et al.* (1994) *Nuc. Acids Res.* 22(8): 1389-1393; Winter *et al.* (1994) *Annu Rev. Immunol.* 12: 433-455). Las células productoras de anticuerpos que resultan pueden después incorporarse en la tecnología de hibridoma convencional para el establecimiento de líneas celulares productoras de anticuerpo monoclonal específicas.

[0124] Los anticuerpos humanos recombinantes también se producen por aislamiento de linfocitos B productores de anticuerpos de voluntarios humanos que tienen una respuesta robusta frente a antígeno de interés. Usando selección de células activada por fluorescencia (FACS) y antígeno marcado con fluorescencia, pueden separarse las células que producen los anticuerpos dirigidos contra el antígeno de las otras células. Puede extraerse el ARN a continuación y determinarse la secuencia de las regiones variables del anticuerpo reactivo (Kantor *et al.* (1995) *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 764: 224-227, Wang *et al.* (2000) *J. Immunol. Methods* 244: 217-225). La secuencia de ADN de las regiones variables funcionales puede sintetizarse o clonarse en vectores de expresión de mamíferos para producir anticuerpos recombinantes humanos a gran escala.

[0125] La secuencia de aminoácidos de polipéptidos de LmPDE puede usarse para seleccionar regiones específicas de una proteína de LmPDE para generar anticuerpos. Por ejemplo, pueden usarse análisis de hidrofobicidad e hidrofilia de una secuencia de aminoácidos de LmPDE para identificar regiones hidrófilas en una estructura proteica de LmPDE. Las regiones de un polipéptido de LmPDE que muestran estructura inmunogénica, así como otras regiones y dominios, pueden identificarse fácilmente usando diversos métodos diferentes conocidos en la técnica tales como análisis Chou-Fasman, Garnier-Robson, Kyte-Doolittle, Eisenberg, Karplus-Schultz o Jameson-Wolf (Rost *et al.* (1994) *Protein* 19, 55-72).

[0126] Los métodos para preparar una proteína para su uso como un inmunógeno y para preparar conjugados inmunogénicos de una proteína con un vehículo tal como BSA, KLH u otras proteínas vehículo se conocen bien en la técnica. Las técnicas para conjugar o unir agentes terapéuticos a anticuerpos se conocen bien (Amon *et al.* (1985) "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", *Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy*, Reisfeld *et al.* (eds.) págs. 243-56, Alan R. Liss, Inc; Hellstrom *et al.* (1987) "Antibodies For Drug Delivery", *Controlled Drug Delivery* (2ª Ed.), Robinson *et al.* (eds.) págs. 623-53, Marcel Dekker, Inc.; Thorpe (1985) "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", *Monoclonal Antibodies '84 - Biological And Clinical*

Applications, Pinchera *et al.* (eds.) págs. 475-506; Thorpe *et al.* (1982) "The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates", *Immunol. Rev.* 62,119-158; y Sodee *et al.* (1997), *Clin. Nuc. Med.* 21, 759-766). En algunas circunstancias, por ejemplo, puede usarse conjugación directa usando reactivos de carbodiimida; en otros casos pueden ser eficaces reactivos de unión como los proporcionados por Pierce Chemical Co., Rockford, IL.

5 [0127] La administración de un inmunógeno de LmPDE se realiza generalmente por inyección durante un periodo de tiempo adecuado y con el uso de un adyuvante adecuado, como se entiende generalmente en la técnica. (Harlow *et al.* (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press). Durante el programa de inmunización, pueden tomarse títulos de anticuerpos para determinar si la formación de anticuerpo es suficiente.

10 [0128] Aunque los antiseros policlonales producidos de este modo pueden ser satisfactorios para algunas aplicaciones, se prefieren preparaciones de anticuerpos monoclonales para composiciones farmacéuticas. Las líneas celulares inmortalizadas que secretan un anticuerpo monoclonal deseado pueden prepararse usando el método convencional de Kohler y Milstein (*Nature* 256, 495-497) o modificaciones que efectúan inmortalización de linfocitos o células del bazo, como se conoce generalmente en la técnica. Las líneas celulares inmortalizadas que secretan los anticuerpos deseados se exploran mediante inmunoensayo en el que el antígeno es un polipéptido de LmPDE. Cuando el cultivo de células inmortalizadas apropiado que secreta el anticuerpo deseado se identifica, las células pueden cultivarse *in vitro* o por producción en líquido ascítico. Los anticuerpos monoclonales deseados se recuperan después del sobrenadante del cultivo o del sobrenadante del líquido ascítico.

15 [0129] Los anticuerpos o fragmentos también pueden producirse por medios recombinantes. Las regiones de anticuerpo que se unen específicamente a las regiones deseadas de un polipéptido de LmPDE también pueden producirse en el contexto de anticuerpos quiméricos de origen de múltiples especies.

20 [0130] Los anticuerpos de la invención pueden unirse específicamente a polipéptidos de LmPDE. En una realización, los anticuerpos de LmPDE pueden unirse específicamente al dominio GAF de una proteína LmPDE. En otra realización, los anticuerpos de la invención pueden unirse específicamente al dominio C terminal de una proteína LmPDE. En una realización adicional, los anticuerpos pueden unirse específicamente al dominio catalítico de PDE de un polipéptido de LmPDE. En otras realizaciones, los anticuerpos de la presente invención pueden unirse a otros dominios de un polipéptido de LmPDE, por ejemplo los anticuerpos pueden unirse al dominio N terminal de un polipéptido de LmPDE.

Uso de Anticuerpos Contra LmPDE

25 [0131] Pueden usarse polipéptidos de LmPDE para inducir la generación de anticuerpos, incluyendo fragmentos, que se unen específicamente a un epítipo asociado con un polipéptido de LmPDE, usando métodos descritos en la presente memoria (Kohler *et al.* mencionado anteriormente). Los anticuerpos que son inmunorreactivos con dominios o regiones seleccionadas de un polipéptido de LmPDE son particularmente útiles. En una realización, se usan anticuerpos de LmPDE para explorar bibliotecas de expresión para obtener polipéptidos relacionados con polipéptidos de LmPDE (por ejemplo, homólogos).

30 [0132] En otra realización, se usan anticuerpos de LmPDE para enriquecer o purificar polipéptidos de LmPDE de una muestra que tiene una población heteróloga de polipéptidos. Los métodos de enriquecimiento y purificación incluyen técnicas convencionales, tales como métodos de inmunoafinidad. En general, los métodos de inmunoafinidad incluyen las siguientes etapas: preparar una matriz de afinidad ligando una matriz de soporte sólido con un anticuerpo de LmPDE, uniéndose la matriz de afinidad ligada específicamente con un polipéptido de LmPDE; poner en contacto la matriz de afinidad ligada con la muestra en condiciones que permiten a un polipéptido de LmPDE en la muestra unirse a la matriz de afinidad ligada; eliminar los polipéptidos no LmPDE que no se unieron a la matriz de afinidad ligada, enriqueciendo de este modo o purificando un polipéptido de LmPDE. Una etapa adicional puede incluir eluir un polipéptido de LmPDE de la matriz de afinidad. Las etapas y condiciones generales para enriquecimiento de afinidad para una proteína o complejo proteico deseados pueden encontrarse en *Antibodies: A Laboratory Manual* (Harlow *et al.* (1988) CSHL, Cold Spring, NY).

35 [0133] Además, existen múltiples usos de diagnóstico de los anticuerpos de la invención. La invención proporciona métodos para diagnosticar en un sujeto, por ejemplo, un animal o un sujeto humano, una enfermedad asociada con la presencia o deficiencia de al menos un polipéptido de LmPDE. En una realización, el método comprende determinar cuantitativamente la cantidad de al menos un polipéptido de LmPDE en la muestra (por ejemplo, muestra celular o de fluido biológico) usando uno cualquiera o una combinación de los anticuerpos de la invención. La cantidad determinada de este modo puede compararse después con la cantidad en una muestra de un sujeto normal. La presencia de una cantidad apreciablemente diferente en la muestra (es decir, la cantidad de un polipéptido de LmPDE en la muestra de ensayo excede o se reduce de la cantidad de un polipéptido de LmPDE en una muestra normal) indica la presencia de la enfermedad.

40 [0134] Los anticuerpos anti-LmPDE de la invención también pueden ser útiles en metodologías de formación de imágenes de diagnóstico, en las que los anticuerpos tienen un marcador detectable. La invención proporciona diversos ensayos inmunológicos útiles para la detección de polipéptidos LmPDE en una muestra biológica adecuada. Los marcadores detectables adecuados incluyen, sin limitación, un radioisótopo, un compuesto fluorescente, un compuesto bioluminiscente, un compuesto quimioluminiscente, un cromóforo, un quelante metálico, biotina o una enzima. Dichos

ensayos generalmente comprenden uno o más anticuerpos de LmPDE marcados que reconocen y se unen a un polipéptido de LmPDE e incluyen diversos formatos de ensayo inmunológico bien conocidos en la técnica, incluyendo sin limitación diversos tipos de precipitación, aglutinación, fijación de complemento, radioinmunoensayos (RIA), ensayos por inmunoabsorción ligados a enzimas (ELISA), ensayos inmunofluorescentes ligados a enzima (ELIFA) (H. Liu *et al.* (1998) *Cancer Research* 58, 4055-4060), análisis inmunohistoquímicos y similares.

Métodos para Generar Polipéptidos de LmPDE

[0135] Los polipéptidos de LmPDE de la presente invención pueden generarse por síntesis química o por métodos recombinantes. Si se desea un alto rendimiento, pueden usarse métodos recombinantes, como se ha expuesto anteriormente. Los polipéptidos de LmPDE de la invención también pueden generarse por métodos sintéticos químicos. Los principios de la síntesis química de fase sólida de polipéptidos se conoce bien en la técnica y puede encontrarse en textos generales relacionados con esta área (véase, por ejemplo, Dugas *et al.* (1981) *Bioorganic Chemistry*, págs. 54-92, Springer-Verlag, Nueva York).

[0136] La presente invención también proporciona moléculas polipeptídicas derivadas, tales como polipéptidos de LmPDE modificados químicamente. Es ilustrativo de dichas modificaciones el reemplazo de hidrógeno con un grupo alquilo, acilo o amino. Los derivados de polipéptido de LmPDE conservan las actividades biológicas de las LmPDE de origen natural.

Exploración de Compuestos que Modulan la Actividad/Expresión de LmPDE

[0137] Los polipéptidos de LmPDE de la presente invención son fosfodiesterasas de *Leishmania*, tales como *Leishmania major*, que funcionan como componentes clave en la regulación de niveles intracelulares de AMPc mediante la catálisis de su hidrólisis. Junto con las ciclasas de adenililo, esas fosfodiesterasas controlan en última instancia las respuestas biológicas mediadas por el AMPc mensajero. La regulación de los niveles intracelulares de AMPc es crucial en los procesos de transformación y proliferación celular. Por lo tanto, los polipéptidos de LmPDE son dianas importantes para los compuestos que modulan su actividad biológica o que modulan su expresión. Los compuestos que modulan de forma eficaz las funciones biológicas de las LmPDE pueden servir como agentes terapéuticos importantes para el tratamiento de enfermedades parasitarias tales como leishmaniasis. La invención también proporciona un método para obtener compuestos que modulan la actividad o la expresión de LmPDE.

[0138] La presente invención se refiere a métodos de exploración para identificar compuestos que se unen a polipéptidos de LmPDE (por ejemplo ligandos) y modulan la actividad biológica de polipéptidos de LmPDE. Estos métodos de exploración también pueden identificar compuestos que no se unen necesariamente de forma directa a LmPDE, pero que modulan no obstante la actividad de LmPDE. Dichos métodos de exploración también pueden usarse para identificar compuestos que modulen la expresión de polipéptidos de LmPDE.

[0139] Típicamente, el objetivo de los métodos de exploración es identificar compuestos que se unen a las LmPDE diana y provocan cambios en la actividad biológica del polipéptido o molécula de ácido nucleico diana. Los compuestos de interés se identifican a partir de una formulación de compuestos candidatos. Por ejemplo, un compuesto que se une eficazmente a la molécula de ácido nucleico diana puede reducir la expresión del polipéptido de LmPDE y reducir de este modo la proliferación de células que expresan polipéptidos de LmPDE. La reducción de la proliferación de células que expresan polipéptidos de LmPDE puede ser un método eficaz para tratar enfermedades asociadas con la infección de parásitos tales como *Leishmania major*.

[0140] Pueden usarse varios ensayos y exploraciones para identificar compuestos que modulen la actividad y/o expresión de LmPDE. Los compuestos identificados en los ensayos y exploraciones pueden modular la actividad del LmPDE de diversas maneras. Por ejemplo, los compuestos pueden unirse directamente a un polipéptido de LmPDE o pueden unirse a proteínas intracelulares que se unen a un LmPDE. Los compuestos pueden también modular la actividad de un gen de LmPDE o modular la expresión de un gen de LmPDE o un polipéptido de LmPDE. Por ejemplo, tales compuestos pueden unirse a una secuencia reguladora de LmPDE y modular de este modo la expresión génica (véase, por ejemplo, Piatt (1994) *J. Biol. Chem.* 269, 28558-28562).

[0141] Los compuestos que pueden explorarse por los métodos descritos en la presente invención incluyen, sin limitación, péptidos y derivados de los mismos (por ejemplo peptidomiméticos) que se unen a un polipéptido de LmPDE o modulan de otro modo su actividad de cualquier manera. Dichos compuestos pueden incluir péptidos, tales como péptidos solubles, incluyendo miembros de bibliotecas de péptidos aleatorias (Lam *et al.* (1991) *Nature* 354, 82-84; Houghten *et al.* (1991) *Nature* 354, 84-86), y bibliotecas moleculares derivadas de química combinatoria compuestas de aminoácidos D y/o L, fosfopéptidos (incluyendo, sin limitación, miembros de bibliotecas de fosfopéptidos dirigidas parcialmente degeneradas o aleatorias; véase, por ejemplo Songyang *et al.* (1993) *Cell* 72, 767-778), carbohidratos y moléculas pequeñas orgánicas o inorgánicas. Los compuestos que pueden explorarse incluyen, sin limitación, productos naturales y sintéticos. Un experto en la materia puede reconocer fácilmente que no existe un límite con respecto a la naturaleza estructural de los compuestos ensayados con respecto a su unión a polipéptidos de LmPDE.

[0142] Los compuestos candidatos que se ensayan con respecto a su unión a polipéptidos de LmPDE y/o modulación de la actividad de polipéptidos de LmPDE pueden seleccionarse aleatoriamente o seleccionarse racionalmente. Como se usa en la presente memoria, se dice que un compuesto se selecciona aleatoriamente cuando el compuesto se

selecciona aleatoriamente sin considerar las secuencias específicas del polipéptido o ácido nucleico de LmPDE. Son ejemplos de agentes seleccionados aleatoriamente los miembros de una biblioteca química, una biblioteca combinatoria de péptidos, un caldo de cultivo de un organismo o extracto vegetal.

[0143] Como se usa en la presente memoria, se dice que un compuesto se selecciona racionalmente cuando el compuesto se selecciona de forma no aleatoria que está basada en la secuencia del sitio diana y/o su conformación con relación a la acción del compuesto. Los compuestos pueden seleccionarse racionalmente utilizando las secuencias peptídicas que componen el polipéptido de LmPDE o analizando la secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de LmPDE.

[0144] Los métodos para seleccionar de forma racional un compuesto que modula la actividad y/o expresión de un polipéptido de LmPDE incluyen técnicas de modelación o búsqueda por ordenador. Por ejemplo, se identifican compuestos que probablemente interaccionan con el sitio activo de un polipéptido de LmPDE. El sitio activo de un polipéptido de LmPDE puede identificarse usando métodos conocidos en la técnica incluyendo, por ejemplo, análisis de la secuencia de aminoácidos de una molécula y a partir de un estudio de complejos formados por un polipéptido de LmPDE y un sustrato nativo (por ejemplo AMPc). Pueden usarse métodos tales como cristalografía de rayos X y NMR para resolver la estructura tridimensional de una proteína para identificar posibles sitios de unión, incluyendo el sitio activo del sustrato natural.

[0145] Puede usarse formación de modelos basada en ordenador para completar una estructura incompleta o insuficientemente precisa. Los métodos de modelización que pueden usarse son, por ejemplo, modelos con parámetros fijados específicos para biopolímeros particulares tales como proteínas o ácidos nucleicos, modelización de dinámica molecular basada en cálculos de movimientos moleculares, modelos mecánicos estadísticos basados en conjuntos térmicos o modelos combinados. Para la mayoría de los tipos de modelos, son necesarios campos de fuerza molecular convencionales, que representan las fuerzas entre átomos y grupos constituyentes, y pueden seleccionarse de campos de fuerza conocidos en la técnica. Puede incorporarse información sobre estructuras incompletas o menos precisas determinadas como se ha indicado anteriormente como restricciones en las estructuras calculadas por estos métodos de modelización.

[0146] Una vez que la estructura del sitio activo de un polipéptido de LmPDE se ha determinado, pueden identificarse compuestos de modulación candidatos mediante búsqueda en bases de datos que contienen compuestos junto con información sobre su estructura molecular. Los compuestos identificados en tal búsqueda son los que tienen estructuras que coinciden con la estructura de sitio activo, se ajustan al sitio activo o interaccionan con grupos que definen el sitio activo. Los compuestos identificados por la búsqueda son compuestos moduladores de LmPDE potenciales.

[0147] Estos métodos pueden usarse para identificar compuestos moduladores mejorados basándose en compuestos que se sabe que modulan otras PDE. La estructura del compuesto conocido se modifica y se determinan los efectos moduladores usando métodos experimentales e informáticos como se describe en la presente memoria. La estructura alterada se compara con la estructura de sitio activo de un polipéptido de LmPDE para determinar o predecir como afectará una modificación particular del compuesto a su interacción con esa proteína. Pueden evaluarse variaciones sistemáticas en la composición, tal como variando grupos laterales, para obtener compuestos moduladores modificados de especificidad o actividad preferida.

[0148] Son ejemplos de sistemas de modelización molecular los programas QUANTA, por ejemplo, CHARMM, MCSS/HOOK y X-LIGAND (Molecular Simulations, Inc., San Diego, Ca.). QUANTA proporciona un ambiente de modelización para la simulación y análisis de macromoléculas y moléculas orgánicas pequeñas.

[0149] El proceso de usar información estructural experimental o predicha en una simulación informática para predecir las interacciones de compuestos moduladores potenciales se conoce bien en la técnica. Por ejemplo, véase Rotivinen *et al.* (1988) *Acta Pharm. Fenn.* 97, 159-166; y McKinaly *et al.* (1989) *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 29, 111-122. Los programas informáticos diseñados para explorar y representar compuestos químicos están disponibles de compañías tales como MSI, Allelix, Inc., y Hypercube, Inc. Estas aplicaciones se diseñan en gran parte para fármacos específicos de proteínas particulares; sin embargo, pueden adaptarse al diseño de fármacos específicos para regiones identificadas de ADN o ARN. Pueden usarse fuentes comerciales de bibliotecas químicas como fuentes de compuestos candidatos. Dichas bibliotecas químicas pueden obtenerse de, por ejemplo, ArQule, Inc.

[0150] Los compuestos que modulan la actividad y/o expresión de un polipéptido de LmPDE también pueden estar basados en construcciones antisentido. Las técnicas terapéuticas basadas en un enfoque antisentido implican el diseño de oligonucleótidos que son complementarios a los ARNm de LmPDE. Estos oligonucleótidos se unen a los transcritos complementarios y evitan la traducción. No se requiere complementariedad absoluta (o total). Un oligonucleótido puede funcionar como una construcción antisentido eficaz siempre que su secuencia sea suficientemente complementaria para ser capaz de hibridar con ARN y formar una doble cadena estable. En el caso de una molécula de ácido nucleico antisentido bicatenaria, puede ensayarse una hebra sencilla de la doble cadena o puede ensayarse una formación de triple cadena. La capacidad de hibridar dependerá del grado de complementariedad y la longitud del ácido nucleico antisentido. En general, cuanto más largo sea el ácido nucleico que hibrida, más emparejamientos erróneos de bases con un ARN puede contener y formar aún una doble cadena estable (o triple cadena, según sea el caso). Un experto en la materia puede determinar un grado tolerable de emparejamiento erróneo mediante el uso de procedimientos

convencionales para determinar el punto de fusión del complejo hibridado.

[0151] Además, pueden usarse varios ensayos *in vitro* para identificar compuestos que modulan la expresión y/o la actividad de un polipéptido LmPDE. Dichos ensayos implican típicamente la preparación de una mezcla de reacción que comprende un polipéptido de LmPDE y un compuesto de ensayo en condiciones suficientes para permitir a los dos componentes interactuar y unirse, formando de este modo un complejo que puede detectarse y/o aislarse. La unión de un compuesto con un polipéptido de LmPDE puede ensayarse usando un cambio en el peso molecular o un cambio en la actividad biológica del polipéptido de LmPDE no unido o la expresión de un gen indicador en un sistema de dos híbridos de levadura (Fields *et al.* (1989) *Nature* 340, 245-246). El método usado para identificar si un compuesto se une a un polipéptido de LmPDE se basará principalmente en la naturaleza del polipéptido de LmPDE usado. Por ejemplo, puede usarse un ensayo de retardo en gel para determinar si un compuesto se une a un polipéptido LmPDE. Como alternativa, pueden adoptarse tecnologías de inmunodetección y biochip (por ejemplo, Patente de Estados Unidos N° 4.777.019) para su uso con un polipéptido de LmPDE. Un método alternativo para identificar compuestos que se unen a un polipéptido de LmPDE emplea ensayos de superposición de TLC que usan extractos de glucolípidos de células de tipo inmune (Abdullah *et al.* (1992) *Infect. Immunol.* 60, 56-62). Además, puede medirse una reducción de la actividad hidrolítica de AMPc de LmPDE para determinar si un compuesto particular inhibe o no un LmPDE. Un experto en la materia puede emplear fácilmente numerosas técnicas conocidas en la materia para determinar si un compuesto particular se une a un polipéptido de LmPDE de la invención. Tales ensayos típicamente utilizarán una célula control.

[0152] También es posible usar ensayos basados en células para identificar compuestos que interactúan con polipéptidos de LmPDE. Pueden usarse líneas celulares que expresan de forma natural LmPDE o que se han modificado por ingeniería genética para expresar LmPDE. Por ejemplo, pueden añadirse compuestos de ensayo a cultivos celulares después de lo cual puede medirse la hidrólisis de AMPc usando técnicas convencionales conocidas en la materia. Una reducción de la cantidad de hidrólisis en presencia de un compuesto de ensayo en comparación con células control que no contienen el compuesto de ensayo indica que el compuesto de ensayo es un inhibidor de la actividad de LmPDE.

[0153] Pueden identificarse inhibidores de la expresión de LmPDE mediante el uso de un gen quimérico en el que una secuencia de nucleótidos de LmPDE se fusiona con un indicador, tal como la luciferasa de luciérnaga. Las células cultivadas que se han transformado con el gen quimérico pueden explorarse con respecto a la expresión de actividad luciferasa en presencia de compuestos de ensayo. Los compuestos que inhiben la actividad luciferasa en este ensayo de alto rendimiento también pueden confirmarse mediante medición directa con respecto a la presencia del polipéptido de LmPDE endógeno (por ejemplo, mediante transferencia de Western) y ARNm de LmPDE (por ejemplo, mediante transferencia de Northern) usando métodos que se conocen bien en la técnica (véase, por ejemplo, Ausubel *et al.* (1994) *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons). Los compuestos candidatos pueden ensayarse adicionalmente en cultivos celulares o titulares así como en modelos animales. Pueden incubarse, por ejemplo, células que expresan un polipéptido de LmPDE con un compuesto de ensayo, después de lo cual se preparan lisados celulares y se exploran con respecto a la presencia del polipéptido de LmPDE (por ejemplo, usando técnicas de transferencia de Western). Una reducción en la cantidad de expresión de LmPDE en los cultivos tratados con el compuesto de ensayo en comparación con cultivos control sin el compuesto de ensayo indica que el compuesto de ensayo es un inhibidor de la expresión de LmPDE.

[0154] También pueden usarse ensayos *in vivo* para ensayar estos compuestos en modelos animales de infección por *Leishmania*. Se administran compuestos de ensayo que se predice que inhiben la actividad y/o expresión de LmPDE a los animales. Los animales tratados pueden ensayarse después con respecto a la inhibición de la actividad de LmPDE. Dichos ensayos pueden ser indirectos o inferenciales. Una salud mejorada, por ejemplo, puede indicar la eficacia de un compuesto de ensayo. Los ensayos directos pueden también realizarse cuando puede medirse una reducción de la expresión de LmPDE mediante un análisis de transferencia de Northern. Una reducción en la cantidad de ARNm de LmPDE presente en la muestra de animales tratados en comparación con animales control no tratados indica que el compuesto de ensayo inhibe la expresión de LmPDE. También puede realizarse un ensayo directo que mide la actividad hidrolítica de una LmPDE en AMPc. Una reducción en la hidrólisis de AMPc en la muestra de animales tratados en comparación con los animales control no tratados indica que el compuesto de ensayo inhibe la actividad de LmPDE.

[0155] Los polipéptidos de LmPDE que se usan en los ensayos de exploración descritos en la presente memoria incluyen, sin limitación, un polipéptido de LmPDE aislado, una célula hospedadora que expresa un polipéptido de LmPDE o una fracción de una célula hospedadora que expresa un polipéptido de LmPDE.

[0156] Los extractos celulares a ensayar con respecto a unión con polipéptidos de LmPDE y/o modulación de la actividad de polipéptidos de LmPDE pueden ser, por ejemplo, extractos acuosos de células o tejidos, extractos orgánicos de células o tejidos o fracciones celulares parcialmente purificadas. Un experto en la materia puede reconocer fácilmente que no existe límite con respecto a la fuente de los extractos celulares usados en los métodos de exploración de la presente invención.

[0157] Los compuestos que se identifican como candidatos para inhibir la actividad y/o expresión de un polipéptido de LmPDE, cuando se administra en una cantidad terapéuticamente eficaz, pueden ser útiles para tratar enfermedades y reducir síntomas asociados con la infección de *Leishmania*, tales como leishmaniasis. La toxicidad y eficacia terapéutica de compuestos identificados que modulan la actividad y/o expresión de un polipéptido de LmPDE pueden determinarse

mediante procedimientos farmacéuticos convencionales. Por ejemplo, usando células en cultivo o animales experimentales, puede determinarse la dosis letal para el 50% de la población (DL₅₀). La relación de dosis entre efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico y puede expresarse como la relación DL₅₀/DE₅₀. Se prefieren compuestos con un alto índice terapéutico. Aunque pueden usarse compuestos que tengan efectos secundarios tóxicos, debería tenerse cuidado para diseñar un sistema de suministro que dirija tales compuestos al sitio de tejido afectado para minimizar el daño potencial a células no infectadas y reducir de este modo los efectos secundarios.

[0158] Los datos obtenidos de ensayos de cultivo celular y estudios animales pueden usarse en la formulación de una serie de dosificaciones para su uso en seres humanos. La dosificación de dichos compuestos se sitúa preferiblemente dentro de un intervalo de concentraciones en circulación que incluyen la DE₅₀ con poca o sin toxicidad. La dosificación puede variar dentro de este intervalo dependiendo de la forma de dosificación empleada y la vía de administración usada. Para cualquier compuesto usado en el método de la presente invención, la dosis terapéuticamente eficaz puede estimarse inicialmente a partir de los ensayos de cultivo celular. Puede formularse una dosis en modelos animales para conseguir un intervalo de concentración en plasma circulante que incluye la CI₅₀ como se determina en el cultivo celular. Dicha información puede usarse para determinar de forma más precisa las dosis útiles en seres humanos. Pueden medirse los niveles en plasma, por ejemplo, mediante cromatografía líquida de alto rendimiento.

Generación de organismos transgénicos

[0159] Otro aspecto de la invención proporciona organismos transgénicos que comprenden ácidos nucleicos de LmPDE. Como se usa en la presente memoria, un organismo modificado genéticamente se refiere a un organismo que se ha alterado de su estado natural mediante manipulación de las secuencias de ácido nucleico nativas. Por ejemplo, en una aplicación, pueden generarse organismos deficientes en PDE usando procedimientos knock-out convencionales para inactivar una PDE endógena. Como alternativa, pueden usarse moléculas antisentido de PDE inducibles para regular la actividad y/o expresión de la PDE endógena. Puede producirse también un organismo de modo que contenga una molécula de ácido nucleico que codifique la LmPDE o una unidad de expresión de LmPDE antisentido que dirige la expresión de un polipéptido de LmPDE o la molécula antisentido. En dichos casos, se genera un organismo en el que la expresión del gen de PDE endógeno está alterado por inactivación y/o reemplazado por un gen de LmPDE. Esto puede conseguirse usando una diversidad de procedimientos conocidos en la técnica tales como recombinación dirigida. Una vez generado, el organismo deficiente en PDE endógena que expresa un polipéptido de LmPDE puede usarse para (1) identificar procesos biológicos y patológicos mediados por polipéptidos de LmPDE, (2) identificar proteínas y otros genes que interactúan con polipéptidos de LmPDE, (3) identificar compuestos que pueden proporcionarse de manera exógena para inhibir un polipéptido de LmPDE y (4) servir como una exploración apropiada para identificar mutaciones dentro de los genes de LmPDE que aumentan o reducen la actividad.

[0160] Por ejemplo, en una realización los genes de PDE endógena en *S. cerevisiae* pueden suprimirse, lo que da como resultado una acumulación intracelular de AMPc. Los organismos que acumulan altos niveles de AMPc intracelular dejan de crecer cuando se exponen a un choque térmico. Pueden clonarse después moléculas de ácido nucleico de LmPDE en un vector de expresión de levadura y transfectarse en la cepa deficiente en PDE en *S. Cerevisiae*. La restauración de crecimiento insensible al calor es de este modo un indicador de actividad de LmPDE. La observación de si el crecimiento insensible al calor se restaura o no en la cepa transfectada en diversas condiciones puede indicar los efectos que esas condiciones tienen en la actividad del LmPDE.

Usos de los Polipéptidos en LmPDE

[0161] Como se ha analizado previamente, la presente invención proporciona PDE específicas de AMPc de *Leishmania*, tales como *Leishmania major*, incluyendo LmPDE-A, LmPDE-B1 y LmPDE-B2 y fragmentos, variantes y mutantes de las mismas. Se sabe que AMPc juega un papel clave en el crecimiento y diferenciación celular en este parásito y que las PDE son responsables de la hidrólisis de este mensajero. Por lo tanto, como se ha analizado anteriormente, las LmPDE son dianas para ensayos de exploración de fármacos y son útiles para conseguir un diseño de fármaco selectivo.

[0162] Adicionalmente, la invención proporciona métodos para controlar el curso de la enfermedad o trastornos asociados con la presencia de LmPDE en un sujeto de ensayo mediante la medición de la cantidad de un polipéptido de LmPDE en una muestra del sujeto de ensayo en diversos puntos en el tiempo. Esto se realiza con el fin de determinar un cambio en la cantidad de un LmPDE a lo largo del tiempo. El control del curso de una enfermedad o trastorno a lo largo del tiempo puede optimizar la temporización, dosificación y tipo de tratamiento. En una realización, el método comprende determinar cuantitativamente en una primera muestra del sujeto la presencia de un polipéptido de LmPDE y comparar la cantidad determinada de este modo con la cantidad presente en una segunda muestra del mismo sujeto tomada en un punto diferente en el tiempo, siendo una diferencia en las cantidades determinadas indicativa del curso de la enfermedad. La medición de la cantidad de polipéptido de LmPDE presente en una muestra puede realizarse usando una diversidad de técnicas bien conocidas en la materia, por ejemplo, mediante el uso de inmunoensayos como se analiza posteriormente.

[0163] La presente invención proporciona adicionalmente métodos para usar polipéptidos de LmPDE aislados y sustancialmente purificados como antígenos para la producción de nuevos anticuerpos anti-LmPDE y para usar polipéptidos de LmPDE para obtener y detectar nuevos ligandos de LmPDE. Los anticuerpos anti-LmPDE son útiles en ensayos y kits de diagnóstico para la detección de secuencias de proteína LmPDE de origen natural presentes en

muestras biológicas.

Usos de Moléculas de Ácido Nucleico que Codifican LmPDE

[0164] Las moléculas de ácido nucleico que codifican polipéptidos de LmPDE de la invención son útiles para una diversidad de fines, incluyendo su uso en diagnóstico y/o métodos de pronóstico. Las moléculas de ácido nucleico y polipéptidos de la invención pueden usarse para ensayar con respecto a la presencia y/o cantidad de secuencias de nucleótidos de LmPDE y polipéptidos de LmPDE en una muestra biológica adecuada.

[0165] Las moléculas de ácido nucleico de la presente invención pueden usarse en diversos métodos de hibridación para identificar y/o aislar secuencias de nucleótidos relacionadas con secuencias de nucleótidos de LmPDE, tales como diferentes formas polimórficas y secuencias genómicas. Las secuencias relacionadas con una secuencia de nucleótidos de LmPDE son útiles para el desarrollo de ligandos y anticuerpos adicionales. Los métodos de hibridación se usan para identificar/aislar secuencias de ADN y ARN que son al menos el 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o el 99% idénticas a las secuencias de nucleótidos de LmPDE, tales como nuevos homólogos, variantes alélicas y formas mutantes de LmPDE.

[0166] Las secuencias de nucleótidos que codifican polipéptidos de LmPDE descritos en la presente memoria pueden usarse como sondas de ácido nucleico para recuperar moléculas de ácido nucleico que tienen secuencias relacionadas con LmPDE.

[0167] En una realización, una sonda de ácido nucleico de LmPDE se usa para explorar bibliotecas genómicas, tales como bibliotecas construidas en fago lambda o BAC (cromosomas artificiales de bacteria) o YAC (cromosomas artificiales de levadura), para aislar un clon genómico de un gen de LmPDE. Las secuencias de nucleótidos de LmPDE de bibliotecas genómicas son útiles para aislar secuencias no codificantes cadena arriba o cadena abajo, tales como secuencias promotoras, potenciadoras y de determinación de la transcripción. Las secuencias cadena arriba de un gen de LmPDE pueden unirse a secuencias no LmPDE para construir una molécula de ADN recombinante que expresa la secuencia no LmPDE tras su introducción en una célula hospedadora apropiada. En otra realización, se usa una sonda de LmPDE para explorar bibliotecas de ADNc para aislar clones de ADNc expresados en ciertos tipos de tejidos o células.

[0168] Adicionalmente, pueden prepararse pares de cebadores oligonucleotídicos para su uso en una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para amplificar o clonar de forma selectiva moléculas de ácido nucleico que codifican proteínas LmPDE o fragmentos de las mismas. Los métodos de PCR (Patente de Estados Unidos N° 4.965.188) que incluyen numerosos ciclos de etapas de desnaturalizar/hibridar/polimerizar se conocen bien en la técnica y pueden adoptarse fácilmente para su uso en el aislamiento de moléculas de ácido nucleico que codifican LmPDE.

[0169] Además, las moléculas de ácido nucleico de la invención también pueden emplearse en realizaciones de diagnóstico, usando sondas de ácido nucleico de LmPDE para determinar la presencia y/o la cantidad de secuencias de LmPDE presente en una muestra biológica. Una realización abarca determinar la cantidad de secuencias de nucleótidos de LmPDE presentes dentro de la muestra biológica adecuada tal como en tipos celulares, tejidos o fluidos corporales específicos, usando una sonda de LmPDE en un procedimiento de hibridación. La cantidad de moléculas de ácido nucleico de LmPDE en la muestra de ensayo puede compararse con la cantidad de moléculas de ácido nucleico de LmPDE en una muestra de referencia de un sujeto normal. La presencia de una cantidad apreciablemente diferente de moléculas de ácido nucleico de LmPDE entre las muestras de ensayo y referencia pueden correlacionarse con la presencia o con la gravedad de una enfermedad asociada con niveles anómalos (altos o bajos) de moléculas de ácido nucleico de LmPDE en comparación con niveles normales.

[0170] En otra realización, el control de la cantidad de transcritos de ARN de LmPDE a lo largo del tiempo se efectúa por la determinación cuantitativa de la cantidad de transcritos de ARN de LmPDE en muestras de ensayo tomadas en diferentes momentos en el tiempo. Una diferencia de las cantidades de transcritos de ARN de LmPDE en las diversas muestras es indicativa del curso de la enfermedad asociada con la expresión de un transcrito de LmPDE.

[0171] Para realizar tales métodos de diagnóstico, se pone en contacto una muestra biológica adecuada de un sujeto de ensayo con una sonda de LmPDE marcada, en condiciones eficaces para permitir la hibridación entre las moléculas de ácido nucleico de la muestra y la sonda. De manera similar, una muestra biológica de un sujeto normal se pone en contacto con una sonda de LmPDE y se hibrida en condiciones similares. Se detecta la presencia de las moléculas de ácido nucleico hibridadas con la sonda. Puede compararse la cantidad relativa y/o cuantificada de las moléculas hibridadas entre las muestras de ensayo y de referencia. Las sondas de LmPDE pueden marcarse con cualquiera de varios marcadores detectables conocidos, incluyendo marcadores radiactivos, enzimáticos, fluorescentes o quimioluminiscentes.

[0172] Muchas variaciones adecuadas de tecnología de hibridación están disponibles para su uso en la detección de ácidos nucleicos que codifican polipéptidos de LmPDE. Estas incluyen, por ejemplo, procedimientos de Southern y Northern. Se conocen otras técnicas y sistemas de hibridación que pueden usarse con relación a los aspectos de detección de la invención, incluyendo ensayos de diagnóstico tales como los descritos en Falkow *et al.* (Patente de Estados Unidos n° 4.358.535). Otro procedimiento de hibridación incluye hibridación *in situ*, en la que los ácidos nucleicos diana se localizan dentro de una o más células y entran en contacto con las sondas de LmPDE. Como se

conoce bien en la técnica, las células se preparan para hibridación por fijación, por ejemplo hibridación química, y se sitúan en condiciones que permiten la hibridación de una sonda de LmPDE con ácidos nucleicos localizados dentro de la célula fijada.

[0173] Las moléculas de ácido nucleico de la presente invención proporcionan adicionalmente moléculas antisentido que reconocen e hibridan con un ácido nucleico de LmPDE. Los polinucleótidos antisentido son particularmente útiles en la regulación de la expresión de una proteína LmPDE en las células que expresan un ARNm de LmPDE. Una realización útil para este enfoque es una molécula antisentido que corresponde a la secuencia N-terminal del gen. La presente invención incluye dichos polinucleótidos antisentido de longitud completa y fragmentos.

[0174] Los polinucleótidos de la presente invención proporcionan adicionalmente reactivos para desarrollar modelos animales usando estrategias de "knock-out" a través de recombinación homóloga. Los métodos para generar animales knock-out que no expresan una molécula proteica funcional se conocen bien en la técnica (Capecchi (1989) *Science* 244, 1288-1292), y pueden usarse en el estudio de funciones *in vivo* de LmPDE.

[0175] Debe entenderse que tanto la descripción general anterior como los ejemplos a continuación son ejemplares y explicativos solamente y no son restrictivos de la invención, según se reivindica. Además, debe entenderse que la invención no está limitada a las realizaciones particulares descritas. Además, no se pretende que la terminología usada para describir realizaciones particulares sea limitante, puesto que el ámbito de la presente invención se limitará solamente por sus reivindicaciones.

[0176] Los siguientes ejemplos se presentan para ilustrar la presente invención y para ayudar a un experto habitual en la preparación y uso de la misma. La metodología y resultados pueden variar dependiendo del objetivo pretendido de tratamiento y los procedimientos empleados. No se pretende que los ejemplos limiten en ningún caso de otra manera el ámbito de la invención.

EJEMPLOS

Ejemplo 1

[0177] El siguiente ejemplo proporciona los métodos usados para identificar tres fosfodiesterasas específicas de nucleótido cíclico de *Leishmania major*.

[0178] Se han caracterizado e identificado previamente dos familias de PDE específicas de AMPc del parásito protozoario *Trypanosoma brucei* (Zoraghi *et al.* (2001) *J. Biol. Chem.* 276, 11559-11566; Zoraghi *et al.* (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 4343-4348; Gong *et al.* (2001) *Mol. Biochem. Parasitol.* 116, 229-232); y Rascon *et al.* (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 4714-4719. Se usaron después secuencias que representan a cada familia para explorar la base de datos genómica de *Leishmania* (<http://www.genedb.org/genedb/leish>). Se realizó una búsqueda de BLAST usando la secuencia de nucleótidos correspondiente a la enzima tripanosómica TbPDE1, que identificó una secuencia de nucleótidos en *Leishmania major* que comparte una identidad de secuencia de aminoácidos del 45,1% (determinada usando la utilidad BESTFIT del conjunto de programas GCG con parámetros por defecto). Esta secuencia nueva se etiquetó LmPDE-A. El gen para LmPDE-A está localizado dentro de un grupo de secuencias que consiste en los cromosomas 18, 20 y 22. También se realizó una búsqueda de BLAST usando la secuencia de nucleótidos que corresponde a la enzima de tripanosómica TbPDE2C, que identificó dos secuencias estrechamente relacionadas que se etiquetaron posteriormente LmPDE-B1 y LmPDE-B2. El LmPDE-B1 comparte una identidad de secuencia de aminoácidos del 70,2% con la secuencia de búsqueda TbPDE2C, mientras que el LmPDE-B2 comparte una identidad de secuencia global del 69,8% con TbPDE2C. La identidad de secuencia de aminoácidos global entre LmPDE-B1 y LmPDE-B2 es del 84,5%. De acuerdo con la base de datos del genoma de *Leishmania*, los loci LmPDE-B1 y LmPDE-B2 identificados están localizados en el cromosoma 15.

Ejemplo 2

[0179] El siguiente ejemplo proporciona los métodos usados para clonar y secuenciar las secuencias nuevas identificadas en la base de datos del genoma de *Leishmania*.

[0180] Basándose en las secuencias identificadas en la base de datos del genoma de *Leishmania* (como se ha analizado en el Ejemplo 1), se diseñaron cebadores de PCR para amplificar los tres genes de longitud completa del ADN genómico de *Leishmania major*. También se diseñaron cebadores de PCR para amplificar solamente la porción de la fase abierta de lectura de los tres genes de longitud completa. Se diseñaron los cebadores para contener un sitio Sall para una clonación en fase en el vector pLT1 (proporcionándose el codón de iniciación ATG por el vector) y para codificar un marcador de hemaglutinina C-terminal. Para LmPDE-A se diseñaron los cebadores directo e inverso como sigue: directo – 5'-gtgtcgactcgactttcttgagcag-3' (nucleótidos 4-21 de la fase abierta de lectura, que corresponden a los nucleótidos 533-550 de la Figura 2); inverso – 5'-ctgggaatcctaagcataatctggaacatcatatggatacagagtcgtcgtgttg-3' (nucleótidos 1896-1877 de la fase abierta de lectura, que corresponden a los nucleótidos 2425-2406 en la Figura 2 - y marcador HA). Para LmPDE-B1, los cebadores directo e inverso se diseñaron como sigue: directo - 5'-gatgtcgactggcatttcacggcca-3' (nucleótidos 2-19 de la fase abierta de lectura, que corresponden a los nucleótidos 1268-1286 en la Figura 4); inverso - 5'-ctgggaatcctaagcataatctggaacatcatatggataaacaatcgagggtcggatg-3' (nucleótidos 2792-2772 de la fase abierta de lectura, que corresponden a los nucleótidos 4058-4038 en la Figura 4, y marcador HA). Para

LmPDE-B2 los cebadores directo e inverso se diseñaron como sigue: directo - 5'-gatgtcgacattcagcggtctttcc-3' (nucleótidos 3-21 de la fase abierta de lectura, que corresponde a los nucleótidos 2184-2202 en la Figura 6); inverso - 5'-ctgggaatcctaagcataatctggaacatcatatggataaacaatcgaggatcggtatg-3' (nucleótidos 2822-2803 de la fase abierta de lectura, que corresponde a los nucleótidos 5003-4984 en la Figura 6, y marcador HA). Los genes de *Leishmania major*, como con otros kinetoplastea, no contienen intrones. En consecuencia, la amplificación de las fases abiertas de lectura directamente del ADN genómico se realiza de forma rutinaria (Beverley (2003) Nat. Rev. Genet. 4, 11-19). Ambas cadenas de los tres fragmentos de PCR (LmPDE-A, LmPDE-B1 y LmPDE-B2) se clonaron después mediante el saliente TA en el vector pCR2.1-TOPO siguiendo las instrucciones del kit proporcionado por Invitrogen. Los clones se secuenciaron después usando el kit de reacción preparado para secuenciación en ciclo ABI PRISM Big Dye Terminator v3.0 (Applied Biosystems). Se secuenciaron ambas hebras de cada clon al menos dos veces para verificar.

[0181] La secuencia de nucleótidos de LmPDE-A de longitud completa, con una longitud de 10.966 nucleótidos, se muestra en la Figura 2 en la que la fase abierta de lectura comienza con adenina en la posición 530 y termina con guanina en la posición 2425. La secuencia de aminoácidos correspondiente se expone en la Figura 1. La secuencia de nucleótidos de longitud completa de LmPDE-B1, que es de 7095 nucleótidos de longitud se muestra en la Figura 4, en la que la fase abierta de lectura comienza con adenina en la posición 1267 y termina con adenina en la posición 4059 y la secuencia de aminoácidos correspondiente se expone en la Figura 3. La secuencia de nucleótidos de longitud completa de LmPDE-B2 que es de 6.945 nucleótidos de longitud, se muestra en la Figura 6, en la que la fase abierta de lectura comienza con adenina en la posición 2182 y termina con adenina en la posición 5004. La secuencia de aminoácidos que corresponde a esta secuencia se expone en la Figura 5.

[0182] La secuencia de la LmPDE-A clonada coincidía al 100% con la secuencia presente en la base de datos de *Leishmania*. La secuencia de aminoácidos predicha de LmPDE-A (Figura 1) comparte una identidad de secuencia global del 45,1% con la secuencia de aminoácidos de la TbPDE1 tripanosómica. La secuencia de aminoácidos predicha de LmPDE-B1 (Figura 3) comparte una identidad de secuencia global del 70,2% con la secuencia de aminoácidos de TbPDE2C tripanosómica, mientras que la secuencia de aminoácidos predicha de LmPDE-B2 (Figura 5) comparte una identidad de secuencia global del 69,8% con TbPDE2C. Usando el servicio de búsqueda de dominio conservado proporcionado por NCBI (véase <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/ccd/cdd.shtml>) se identificaron varios dominios conservados en las secuencias de aminoácidos de LmPDE. Como se indica en la Figura 7, LmPDE-A contiene un dominio catalítico altamente conservado (PDEasa) que comienza con tirosina en la posición de aminoácido 384 y termina con prolina en la posición de aminoácido 609. LmPDE-B1 y LmPDE-B2 también contienen cada una un dominio de PDEasa altamente conservado, que comienza con fenilalanina en la posición de aminoácido 647 y termina con fenilalanina en la posición de aminoácido 880 (LmPDE-B1) y que comienza con fenilalanina en la posición de aminoácido 657 y termina con fenilalanina en la posición de aminoácido 890 (LmPDE-B2). Además del dominio PDEasa, LmPDE-B1 y LmPDE-B2 tienen ambos dos dominios GAF como se muestra en las Figuras 7B y 7C.

Ejemplo 3

[0183] El siguiente ejemplo describe los métodos usados para evaluar la organización genómica de LmPDE-B1 y LmPDE-B2.

[0184] Cuando las secuencias de nucleótidos de los genes de LmPDE-B1 y LmPDE-B2 clonados se compararon con las secuencias presentes en la base de datos de genoma de *Leishmania*, resultó evidente que las secuencias de la base de datos se habían ensamblado de forma incorrecta. Las regiones 3' no traducidas de los dos genes se habían intercambiado de forma involuntaria. La organización correcta de estos dos genes se estableció después mediante análisis de transferencia de Southern de una serie de digestiones de restricción de ADN genómico de *L. major* (como se muestra en las Figuras 8 y 9). El carril 8 de cada hibridación (doble digestión NotI/Scal) se usará como ejemplo del razonamiento analítico. Si el ensamblaje de secuencia en la base de datos fuera correcto, una doble digestión de NotI/Scal debería producir un fragmento de al menos 8 kb cuando se hibrida con una sonda específica de LmPDE-B2 (puesto que no está presente un sitio de restricción de Scal en la región 3' inmediata del gen de LmPDE-B2). A diferencia de esta predicción, los datos muestran que se genera un fragmento de 4 kb, lo que demuestra la presencia de un sitio de restricción de Scal cercano al extremo 3' del gen de LmPDE-B2. Todas las digestiones adicionales mostradas en las Figuras 8 y 9 apoyan o son compatibles con esta conclusión. Además de establecer la organización genómica de los genes de LmPDE-B1 y LmPDE-B2, estos experimentos demostraron que cada uno es un gen de copia única. Las sondas de hibridación usadas en el análisis de transferencia de Southern fueron las siguientes: específicas de LmPDE-A: nucleótidos 462-910 de la fase abierta de lectura (que corresponde a los nucleótidos 991-1439 de la Figura 2); específica de LmPDE-B1: nucleótidos 96-489 de la fase abierta de lectura (que corresponde a los nucleótidos 1362-1755 en la Figura 4); específica de LmPDE-B2: 106-417 de la fase abierta de lectura (que corresponde a 2287-3936 en la Figura 6). Este análisis también confirmó que LmPDE-B1 y LmPDE-B2 se disponen en tándem y están separados por aproximadamente 5 kb en el cromosoma 15 como se muestra en la Figura 11.

Ejemplo 4

[0185] El siguiente ejemplo proporciona los métodos usados para producir una cepa de levadura transgénica, que contiene una LmPDE-A y una LmPDE-B1, en la que la actividad de PDE endógena se suprimió.

[0186] Las fases abiertas de lectura verificadas de LmPDE-A y LmPDE-B1 se clonaron en un vector de expresión de

levadura (pLT1, S. Kunz, no publicado) y se transfectaron en una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* en la que ambos genes de PDE endógenos se habían suprimido previamente (cepa PP5: MATa leu2-3 leu2-112 ura3-52 his3-532 his4 cam pde1::URA3 pde2::HIS3; Colicelli *et al.* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90,11970-11974). El vector de expresión pLT1 es un vector de levadura basado en 2μ que porta un gen selector LEU2. El sitio de clonación está flanqueado por un promotor TEF2 seguido de una caja Kozak optimizada y por un terminador Cyc1. *S. cerevisiae* deficiente en PDE acumula AMPc intracelular, lo que da como resultado un fenotipo sensible al calor. En particular, no se observó crecimiento después de un choque térmico de 15 minutos a 55°C. Como se muestra en la figura 12, tanto LmPDE-A como LmPDE-B1 complementaron completamente este fenotipo y restauraron el crecimiento insensible al choque térmico. Para un ensayo de choque térmico, se sembraron parches en estrías en placas de SC-met-ura y se dejaron crecer durante 2 días a 30°C. Se replicaron los parches en una placa precalentada a 55°C. La placa se incubó durante 15 minutos adicionales a 55°C, se dejó enfriar a temperatura ambiente y se incubó después durante 1-2 días a 30°C. Estos hallazgos demuestran que las construcciones de LmPDE-A y LmPDE-B1 producen enzimas activas y que ambas enzimas son capaces de hidrolizar AMPc. Los experimentos posteriores demostraron que LmPDE-B2 también complementaba completamente el fenotipo sensible al calor y restauraba la resistencia al choque térmico (Johner *et al.* (presentada) *J. Biol. Chem.*).

[0187] Las fases abiertas de lectura de LmPDE-A, LmPDE-B1 y LmPDE-B2 se clonaron de forma independiente en un vector de expresión de levadura (pLT1, S. Kunz, no publicado) y se transfectaron en una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* en la que los genes de PDE endógenos se habían suprimido previamente (cepa PP5: MATa leu2-3 leu2-112 ura3-52 his3-532 his4 cam pde1::URA3 pde2::HIS3; Colicelli *et al.* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90, 11970-11974). Estas cepas se depositaron en la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC) el 25 agosto 2004 y se les han asignado los números PTA-6167, _____ y _____, respectivamente.

Ejemplo 5

[0188] El siguiente ejemplo proporciona los métodos usados para caracterizar las actividades catalíticas de LmPDE-A, LmPDE-B1 y LmPDE-B2 recombinantes. El ejemplo también proporciona los métodos usados para evaluar la sensibilidad de LmPDE-B1 y LmPDE-B2 recombinantes a inhibidores de PDE disponibles en el mercado.

Ejemplo 5.1: Preparación de Lisados de Levadura

[0189] Se lisaron células de levadura PP5 que expresaban LmPDE-A, LmPDE-B1 y LmPDE-B2 como se ha descrito previamente (Zoraghi *et al.* (2001) *J. Biol. Chem.* 276, 11559-11566). Las células se cultivaron hasta fases de crecimiento logarítmico medio a logarítmico final en medio SC-leu, se recogieron, se resuspendieron en el volumen original de medio YPD precalentado y se incubaron durante 3,5 horas adicionales a 30°C para maximizar la expresión de proteína. Las células se recolectaron después, se lavaron dos veces en H₂O, se sedimentaron por centrifugación y se almacenaron durante una noche a -70°C. El sedimento celular se descongeló en hielo y se resuspendió en tampón de extracción helado (Hepes 50 mM pH 7,5, NaCl 100 mM, cóctel de inhibidores de proteasa Complete[®] 1X sin EDTA (Roche)). Se lisaron células mediante molienda con perlas de vidrio (0,45-0,50 mm) en tubos de Sarstedt de 2 ml usando un disruptor celular FastPrep FP120 (3 x 45 segundos en el ajuste 4). Las células lisadas se centrifugaron y se añadió glicerol al sobrenadante resultante hasta una concentración final del 15% (v/v). Se congelaron rápidamente las alícuotas en nitrógeno líquido y se almacenaron a -70 °C.

Ejemplo 5.2: Ensayo de actividad de PDE en lisados de levadura

[0190] Se determinó la actividad de PDE en HEPES 50 mM, pH 7,5, EDTA 0,5 mM, MgCl₂ 10 mM y BSA 50 mg/ml en un volumen de ensayo final de 100 μ l. Cada ensayo contenía 50.000 cpm de AMPc marcado con ³H, con AMPc no marcado añadido para ajustar la concentración de sustrato total deseada. Las reacciones se realizaron a 30°C y fueron lineales durante al menos 60 minutos. El tiempo de reacción convencional se ajustó a 15 minutos y la cantidad de enzima se seleccionó siempre de modo que no se hidrolizara más del 15% de sustrato. Se realizaron estudios de inhibidor a una concentración de AMPc de 1 μ M. Se disolvieron los inhibidores en DMSO, pero la concentración final de DMSO en los ensayos nunca excedió el 1%. Siempre se incluyeron reacciones control con DMSO sólo. Las reacciones se detuvieron mediante la adición de 25 μ l de HCl 0,5 N. Para la desfosforilación posterior del AMP, las reacciones detenidas se neutralizaron con 20 μ l de base Tris 1 M, seguido de la adición de 10 μ l de fosfatasa alcalina (Roche Diagnostics; 1 unidad/10 μ l). Las reacciones de desfosforilación se incubaron durante 15 minutos a 37 °C y se aplicaron después a columnas de 1 ml de QAE-Sephadex A25 en formiato de amonio 30 mM, pH 6,0. La ³H-adenosina formada como un producto de reacción se eluyó con 1,6 ml de formiato de amonio 30 mM, pH 6,0 y se recogió en 3,5 ml de fluido de centelleo soluble en agua (Packard Ultima Flo). Se realizaron ensayos por triplicado y se analizaron los datos usando el paquete de software Graph Pad Prism.

Ejemplo 5.3: Actividad y especificidad de LmPDE

[0191] Los lisados preparados a partir de levadura que expresaba LmPDE-A de forma consistente no mostraron actividad PDE apreciable. Esta observación es coherente con el hallazgo de que LmPDE-A es menos eficaz que LmPDE-B1 y LmPDE-B2 en la complementación de la deficiencia en PDE de la cepa hospedadora PP5. Además, estos hallazgos son muy similares a las observaciones realizadas con el homólogo tripanosómico TbPDE1. Por ejemplo, TbPDE1 complementó la deficiencia en PDE de células PP5 pero su efecto fue menor que el de otras PDE

tripanosómicas o humanas y no se pudo detectar actividad enzimática en los lisados celulares de levadura correspondientes (Kunz *et al.* (2004) *Eur. J. Biochem.* 271, 637-647).

[0192] A diferencia de los lisados de células que expresaban LmPDE-A, los lisados de cepas de levadura que expresaban LmPDE-B1 y LmPDE-B2 mostraron fuertes actividades PDE. Ambas enzimas mostraron valores de K_M muy similares para AMPc que estaban dentro del intervalo de otros PDE de clase I (Zoraghi *et al.* (2001) *J. Biol. Chem.* 276, 11559-11566; Rascon *et al.* (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 4714-4719; Zoraghi *et al.* (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 4343-4348; Francis *et al.* (2001) *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 65, 1-52; Mou y Cote (2001) *J. Biol. Chem.* 276, 27527-27534). Además, la presencia de un exceso de 100 veces de GMPc no afectó a la tasa de hidrólisis de AMPc por LmPDE-B1 (compárese figura 13B con figura 13A). Un exceso de 50 veces del producto de reacción 5'-AMP tampoco tuvo efecto en K_M (ni K_{cat}) (figura 13C). Se obtuvieron resultados similares con LmPDE-B2 (datos no mostrados). Por lo tanto, LmPDE-B1 y LmPDE-B2 son PDE específicas de AMPc.

[0193] Estos datos concuerdan bien con el hallazgo de que no puede detectarse actividad de hidrólisis de GMPc en estratos celulares completos de *Leishmania major* (datos no mostrados). Debido a que la hidrólisis catalizada por PDE es el único mecanismo por el que una célula puede disponer de sus nucleótidos cíclicos (excepto por posibles mecanismos de exportación; Guo *et al.* (2003) *J. Biol. Chem.* 278, 29509-29514), la ausencia de una actividad de PDE que hidroliza GMPc de células de *Leishmania* sugiere que una señalización de GMPc puede no existir en *Leishmania major*.

Ejemplo 5.4: Actividad de LmPDE en presencia de inhibidores de PDE

[0194] La figura 14 muestra los efectos de varios inhibidores de PDE disponibles en el mercado (100 μ M) en la actividad de LmPDE-B1 y LmPDE-B2 en presencia de AMPc 1 μ M. Ambas enzimas fueron insensibles al inhibidor de PDE de amplio espectro IBMX pero fueron parcialmente sensibles a trequinsina, dipiridamol y etazolato. Trequinsina y dipiridamol inhibieron la actividad de LmPDE-B1 con valores de CI_{50} de 96,6 y 22,6 μ M respectivamente.

[0195] El perfil inhibitor observado, incluyendo el hecho de que dipiridamol y trequinsina eran los compuestos más potentes, se corresponde estrechamente con el indicado previamente para PDE tripanosómica (Zoraghi *et al.* (2001) *J. Biol. Chem.* 276, 11559-11566; Zoraghi *et al.* (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 4343-4348; Rascon *et al.* (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 4714-4719). El hecho de que varios inhibidores potentes y específicos de diferentes PDE humanas no tuvieran efecto en las PDE de *Leishmania* sugiere sólidamente que el desarrollo de inhibidores de PDE específicos de *Leishmania* es factible.

Ejemplo 6

[0196] El siguiente ejemplo describe los métodos usados para determinar el efecto de los inhibidores de PDE dipiridamol, etazolato y trequinsina en la proliferación de promastigotes de *L. major* *in vitro*.

[0197] Las formas de promastigotes de *L. major* MHRO/IR/75/ER o LV39 se cultivaron a 27°C en medio SDM que contenía suero bovino fetal inactivado por calor al 5% (R. Brun y M. Schonenberger (1979) *Acta Trop.* 36, 289-292). La proliferación celular se ensayó en cultivos de 5 ml que contenían diversas concentraciones de dipiridamol, etazolato o trequinsina disueltos en DMSO (concentración final de 1% v/v) o DMSO al 1% v/v como control. En diversos momentos, se retiraron alícuotas de 150 μ l y se midió la absorbancia a 600 nm en un lector de placa de microtitulación. La correlación entre DO_{600} y el número de células era estrictamente lineal durante al menos el intervalo de 3×10^5 a 4×10^7 células/ml.

[0198] Como se muestra en la figura 15, los tres inhibidores de PDE inhibieron fuertemente la proliferación de promastigotes con valores de CI_{50} de aproximadamente 50 μ M. El alcance de la inhibición fue independiente de la densidad celular y el efecto de los inhibidores no se redujo por incubación prolongada de los cultivos.

[0199] Estos resultados son coherentes con la capacidad de dipiridamol, etazolato y trequinsina de inhibir la actividad de LmPDE-B1 recombinante (véase, por ejemplo, figura 14). Además, los datos sugieren sólidamente que LmPDE-B1 y LmPDE-B2 están implicados en el crecimiento de *L. major* y apoyan adicionalmente el desarrollo de inhibidores de PDE específicos de *Leishmania* para la terapia de leishmaniasis.

[0200] Con respecto a los intervalos de valores, la invención abarca cada valor intermedio entre los límites superior e inferior del intervalo hasta al menos un décimo de la unidad del límite inferior, a no ser que el contexto claramente indique otra cosa. Además, la invención abarca cualquier otro valor intermedio indicado. Además, la invención también abarca intervalos que excluyen los límites superior o inferior o ambos del intervalo, a no ser que se incluya específicamente en el intervalo indicado.

[0201] A no ser que se defina de otro modo, los significados de todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria son los comúnmente entendidos por un experto en la materia a la que pertenece la presente invención. Un experto habitual en la materia también apreciará que puede usarse cualquier método y material similar o equivalente a los descritos en la presente memoria para practicar o ensayar la invención.

[0202] Debe observarse que, como se usan en la presente memoria y en las reivindicaciones adjuntas, las formas

singulares "un", "o" y "el" incluyen referencias plurales a no ser que el contexto claramente indique otra cosa. De este modo, por ejemplo, la referencia a "un polipéptido objeto" incluye una pluralidad de tales polipéptidos y la referencia a "el agente" incluye referencias a uno o más agentes y equivalentes de los mismos conocidos para los expertos en la materia, y así sucesivamente.

- 5 **[0203]** Aunque la invención anterior se ha descrito en algún detalle por medio de ilustraciones y ejemplos con el fin de que exista una claridad de entendimiento, resultará evidente para los expertos en la materia que pueden practicarse ciertos cambios y modificaciones. Por lo tanto, la descripción y ejemplos de la descripción no deberían considerarse limitantes del ámbito de la invención, que se define por el ámbito de las reivindicaciones adjuntas.

LISTA DE SECUENCIAS

5 <110> UNIVERSIDAD DE BERNA
 OTSUKA PHARMACEUTICAL CO., LTD.
 <120> FOSFODIESTERASAS ESPECÍFICAS DE NUCLEÓTIDOS CÍCLICOS DE LEISHMANIA Y USOS DE LAS MISMAS
 10 <130> 3459.40
 <140>
 <141>
 15 <150> 60/500.244
 <151> 05-09-2003
 <150> 60/504.070
 <151> 19-09-2003
 20 <150> 60/582.584
 <151> 25-06-2004
 <160> 6
 25 <170> PatentIn Ver. 3.3
 <210> 1
 <211> 631
 <212> PRT
 30 <213> Leishmania major
 <400> 1
 Met Leu Asp Phe Leu Glu Gln Leu Gln Gln Leu Ala Ser Val Tyr Ala
 1 5 10 15
 Ile Cys Gly Asn Ala Val Ser Val Met Ala Gly Met Ser Asp Thr Ala
 20 25 30
 Glu Glu Leu Thr Phe Arg Ser Tyr Asp Ser Leu Glu Gly Ala Ser Tyr
 35 40 45
 Ile Cys Asn Leu Asn Glu Lys Ala Leu His Thr Ala Lys Ala Ser Leu
 50 55 60
 Cys Asp Asn Ala Asp Trp Ser Ser Phe Phe Arg Glu Val Gln Leu Ala
 65 70 75 80
 Phe Asn Ser Gly Arg Val Thr Val Gln Pro Gly Asn Ala His Arg Val
 85 90 95
 Ala Val Asn Ala Ala Ala Pro Val Ser Ala Asp Ser Lys Gly Leu Ala
 100 105 110
 Cys Ser Met Glu Val His Cys Leu Ser Gly Ser Gly Glu Lys Cys Ala
 115 120 125
 Thr Phe Val Leu Glu Arg Thr Thr Glu Asp Gln Gln Lys Tyr Ile Leu
 130 135 140

Glu Ser Met Leu Gln Ala His His Met Tyr Asn His Pro Lys Glu Tyr
 145 150 155 160
 Glu Gln Lys Leu Leu His Ile Met Glu Ala Lys Glu Ile Ala Cys Thr
 165 170 175
 Lys Arg Glu Ala Leu Asp Arg Glu Leu Val Ala Leu Asn Asp Asn Leu
 180 185 190
 Thr Arg Asn Lys His Lys Gln Lys Ile Asn Asn Glu Arg Lys Glu Glu
 195 200 205
 Leu Leu Lys Lys Leu Gly Gly Tyr Ser Thr Glu Asn Thr Gly Asn Pro
 210 215 220
 Trp Gln Ala Ile Gln Glu Gln Gln Arg Thr Ala Gly Glu Asn Thr
 225 230 235 240
 Lys Ser Arg Leu Pro Ser Pro Leu Gly Asn Arg Thr Cys Lys Asp Phe
 245 250 255
 Asp Leu Val Leu Phe Arg Met Ile Lys Ser Arg Trp Leu Ser Pro Glu
 260 265 270
 Gln Cys Asp Ala Ser Ser Pro Ala Asn Arg Val Val Gln Pro Tyr Ser
 275 280 285
 Lys Glu Asp Leu Ala Ile Gln Val Ser Gln Leu Ser Gly Ser Arg Ala
 290 295 300
 Ala Ile Trp Lys Ala Leu Asp Ser Ile Asp Ser Trp Ser Tyr Arg Val
 305 310 315 320
 Phe Asp Val Gln Ala Ala Met Ser Gly Asp Asp Tyr Leu Ser Leu Ser
 325 330 335
 Thr Gln Thr His Gly Gly Ser Leu Leu Ile Thr Met Tyr Ala Leu Leu
 340 345 350
 Cys Met His Asp Phe Leu Gln Lys Phe Lys Ile Asp Glu Gln Ile Ala
 355 360 365
 Leu Asn Trp Ile Ser Ala Val Glu Ala Ser Tyr His Gly Asn Pro Tyr
 370 375 380
 His Asn Ser Met His Ala Ala Asp Val Leu Gln Ile Thr Asp Phe Ile
 385 390 395 400
 Ile Thr Gln Gly Gly Leu Ala Lys Arg Cys Asp Leu Ser Asp Ile Gln
 405 410 415
 Val Phe Ser Ala Leu Leu Ala Ala Ser Ile His Asp Phe Asp His Pro
 420 425 430
 Gly Ile Asn Asn Asn Phe His Ile Lys Thr Gly Ser Tyr Leu Ala Thr
 435 440 445

Leu Tyr Asn Asp Arg Ser Val Leu Glu Asn Leu His Val Ser Ser Val
 450 455 460
 Phe Glu Leu Met Lys Asn Pro Ala Phe Asn Ile Leu Ala Ser Phe Ser
 465 470 475 480
 Asp Glu Gln His His Glu Val Arg Glu Thr Met Ile Glu Met Val Leu
 485 490 495
 Ala Thr Asp Met Gly Ser His Gly Lys Tyr Val Ala Ser Leu Lys Gly
 500 505 510
 Lys Met Gln Glu His Ser Ser Phe Thr Gln Thr Ala Glu Gln Asn Leu
 515 520 525
 Cys Leu Ala Ile Ala Leu Lys Met Ala Asp Ile Ser Asn Cys Gly Arg
 530 535 540
 Pro Leu Asp Ile Tyr Leu Arg Trp Gly Ala Lys Val Ser Asp Glu Phe
 545 550 555 560
 Tyr Gln Gln Gly Asp Arg Glu Arg Asn Leu Gly Leu Glu Cys Ser Pro
 565 570 575
 Phe Met Asp Arg Leu Gln Pro Ser Leu Ala Lys Ser Gln Ile Ala Phe
 580 585 590
 Met Asn Tyr Ile Ile Thr Pro Phe Phe Glu Gln Val Ala Glu Leu Leu
 595 600 605
 Pro Asp Met Arg Phe Ala Val Ala Leu Val Glu Glu Asn Lys Ala Tyr
 610 615 620
 Trp Ala Asn His Asp Asp Ser
 625 630

<210> 2

<211> 10966

<212> ADN

<213> Leishmania major

<220>

<221> modified_base

<222> (414)

<223> a, t, c, g, otro o desconocido

<220>

<221> modified_base

<222> (423)

<223> a, t, c, g, otro o desconocido

<400> 2

tggctaccgc cctgccagca agtaccggag gcgcccggctc gttttctttt tgttgccttt 60
 tccaagcaac tgacgggaca cgtttcagtg catgcgcatt accacgatgc ttacggtgaa 120
 gcacgaccgt gcacattcac tcaaggtatt gtgagcgcga acaagcaaata cccaaaacaa 180
 gccgcctgcg tatgtctctg cagtttccca tgtgcaaata tacctgtctt cgactctgcc 240
 gccatccttc tctcttttct aactctgttt ctctttctct gcaacagagc tgaagtctga 300


```

cgcgcttctc gttcttttctg ttttttttctt cttccccctt tttttttgcag cttctcccca 360
acacgggttg tgcaccgctc cagaaaaataa cagcaagagg cgaacacagta acgnaaacac 420
ccnaccacc caccactca ccaaacaggc ggccgaaaaa aaagactccc ctctgaactt 480
ttgcttttctg ttgctcttcc tgcgggtgccg cgctctagca gcggcagcga tgctcgactt 540
tcttgagcag ctgcagcagc tggcaagtgt gtacgccatc tgcggcaatg ctgtctccgt 600
gatggcgggg atgagcgaca cggcagagga gctgacgttc cgttctctacg acagttttaga 660
aggcgctctc tacatctgca acttgaacga gaaggctctt cacacagcga aggcctcgct 720
ctgcgacaat gccgattgga gcagcttctt tcgcgagggt cagctggcat tcaactcggg 780
tagagtaacc gtgcagcctg gaaatgctca tcgagtcgcc gttaacgccg ccgcgccagt 840
ttccgccgac tctaaaggcc tagcatgctc gatggagggt cattgcctgt cggggtcagg 900
ggagaagtgt gcaacctttg tgcttgagcg aaccacggag gaccagcaga agtatattct 960
cgagagcatg ctgcaggcac atcacatgta taaccaccgg aaggagtacg agcagaagct 1020
gctccacatc atggaagcca aggagatagc gtgcacgaag cgcgaggcac ttgatcgtga 1080
gctggctcgc ctgaacgata atttgacacg caacaagcac aagcagaaga taaacaacga 1140
gcgcaaagag gagcttctaa agaagctcgg cggttacagc acagagaaca cgggaaatcc 1200
gtggcaggcg attcaggagc agcagcagag gacagctggc gagaacacga agtctcggct 1260
gccgagcccg ctccgggaacc gcacctgcaa ggattttgat cttgtcctgt ttcgcatgat 1320
caagagtccg tggctgtcac cggagcagtg cgacgcaccc tcgcccgcga atcgcgctcg 1380
tcgacccgtac tccaaggagg acctcgcgat ccaggtgagc caactctcag gtagccgagc 1440
tgcatatagg aaggcactgg attccatcga ctcatggagc taccgcgtgt ttgatgtcca 1500
ggcggtatg agcggtgacg actacctctc gcacgcacg cagacgcacg gcgggtctct 1560
cctgataacc atgtacgcac tgctgtgcat gcacgacttt ctgcaaaaat tcaagattga 1620
cgagcaaat gcgctcaact ggatcagcgc agtgaggcg agttaccatg gcaaccgta 1680
tcacaactcg atgcacgccg cggatgtgct gcagattacg gacttcatca tcacacaggg 1740
agggttggcg aagaggtgcg acctaaagca catccaggtc ttctctgcct tgctggctgc 1800
ctcgatccat gacttcgacc acctggcat caacaataac ttccacatca agacaggcag 1860
ctaccttgct acgctgtaca acgatcgagc tgtcctggaa aatctgcacg tgagcagcgt 1920
tttcgagctc atgaagaacc cagccttcaa catcctagcc agcttcagtg atgagcagca 1980
tcatgaggtc cgcgagacga tgatagagat ggtgctggcg acggacatgg gctctcacg 2040
aaagtacgtg gcgagctgta agggcaagat gcaggagcac tctagtttca ctacagccg 2100
cgagcagaat ctctgcctcg cgattgctct gaaaatggcc gacatttcaa actgcggcg 2160
cccgttgac atttacctgc gctggggagc gaaggtgtcg gatgagttct accagcaggg 2220
cgaccgtgag cgcaacctgg gcctcgaatg cagtccttcc atggatcgcc ttcagccgag 2280
ccttgcgaa agccagattg ccttcatgaa ctacatcatc actcccttct ttgagcaggt 2340
ggccgagctt ctgcccgata tgcgcttcgc ggtggctttg gtggaggaaa acaaagcgta 2400
ctggggccaa cagcagcact cgtagagaca tcccactcac cgcctttctg ggcgcacctg 2460
tttctcacc gccccctttt ttctgtggtg acgcgctctt tgtggataca cacacacaca 2520
cacacacaca cacacacaga cagctcttc gtgtcacgtc ggttttcttc 2580
accggaagcg gggcaaggat gtatatatct atttctctct cttgttgagc cttccacctt 2640
cactgcctcc ctggttgctt ctcttgcgca tgtattatta ttatttttgt tgttctcgcc 2700
gattatttct tccacgctga tgggaagggt taaaaggcgg aggagaaggg ggagaggagt 2760
tgaaggaaaa aggagtaaca ccaactggaa cctcactcgt ttttcttttt cgcctttttg 2820
ttccgtatcc gctcagctc cttaattttt ttttgtggtg tgaatttgct gaggttgtct 2880
cttgaagtgc gaacacttgt aatccctctg gtggcttttg acacgtgtgt gatgagctcc 2940
acacttctct tcttgcttcc ttcccacttt ctgctctctt caccctccat tcttccactc 3000
acatgtgcat ctggcgtgtg tgcacgtatg cgtacgcaca cgcttcttct 3060
cctctctcat gcttttgttt gtgcatttcc ttcatgccaa cctccgtgtt ttatgttct 3120
atttttacgc ttgctttcaa cctgtgtgt gtgcttccgc cgcgcttttt atttttccct 3180
cctcagtggt tgtttgtggt ggtaccggaa ttgcggttcc gcacatacgc gggcttcgcc 3240
ttgacgaggt ttacctctct ctcccttccc ctgggtttgt cgcagaccgc cctagctccc 3300
tcccttccc acatccctcc cgatcctttg gcccccttg tgcaaaacaa gaaagagaga 3360
gggcaccgct cactccttc ggttctctct gttttcttcc cctcttcgat gatgcgctta 3420
gtttgactga cgcggtgcag cgggtagcgt ttacatgctg ttgccttttt ttttgtattt 3480
ccttttgacg attatggttc tacgcggctt gcgtttggcg gcgacaagcc actactctgt 3540
gaagaaaaac aaacaagaaa agcggtgttc aatgcgaaag ggtgcgtac tggagatgga 3600
gatgagcgtt ggtgtcatct tcgttggtgc ttccatcgc tgagttcatg cattgcgatg 3660
ttaggcctta tccaaggtct ggccggcact tctccacaag gattttgtca ctgccgtatg 3720
aactcggtag ccaggctatg attcccatct cttgcttctg gagcacagcg caaccccccc 3780

```

```

tttgcatect tctcttctcg agtccaacgg ctcttctccc tttctctcct cttctcttcc 3840
gctgccccgc ttcgtcgacg tttctggggt tcatgccact ccccttctcc ctgcacggag 3900
gaaaagcaga agtacagttt ctcaaaatct tgtctctaca cggcttgcca gtgtccgcac 3960
tcgtcccgtt actttcacac ggcgcacacg acgacactta ccccccccc tacacacaca 4020
cacacacaca cacacacaca cactgcacag tgtcacgggt catcatctga 4080
aacatttttc ctttttttct tttcgcgga cacttctttt cttcctatta ctattttgct 4140
tacccttggt ggcagcctgc taccattttt ttgtttccgt ttccttggtg tggcgattat 4200
atacatatat acatatatgt atatatatat atatatgtgt atatgcttcg atcatcgtgg 4260
gtctttgcat ccgtgtgcac ctctcgcaac acacttctgt cagcgcaatt gtctttttga 4320
aaagtagatt gttggccaca cactctgcga tagcgcggtt tccagggacg agctgcagtc 4380
tgcacacttc accgcctcat cacottgacg ttattattat tattttaage ttcccgaga 4440
gtttgtctgc aagttgaccc agagtctttt actcgagcgc acaccatcaa acatcagcca 4500
tgcattcttc tgagctttgc cggcggtctt tctctttgtc cgaaggagca gcagatgacg 4620
aggtagcacc cctagagcct cactcggact ttcatgggct gtggagctat caggacaatg 4680
acacaactcc cgcaactgga cactcggact ttcatgggct gtggagctat caggacaatg 4740
acgggcgtac agccttccat tgggcatag cgctcaagaa cttcgacctg gctcgcaagt 4800
tgatgcaggc accgtacaat tcgctgtgct tgaccgaaga tgaggagtgg agcacaccgt 4860
ttgccactgc ctgtagcgtt ggggacccgc tagacctgct gagagagatt ctggaccgga 4920
gtgtgggtga gttagccgcg cacatgaagc agaaggagac tcagcaaaac cccacttccg 4980
aggagcagaa cagcagcagt gccgcctgta ccgagcctgc cgaggggagc agcgacggaa 5040
agccgacaaa gttcttgtca gacatgccgg gaattttgca gcccgctgcg ggcactcctg 5100
cttctattag cgccgtgctt gttgacccg aggatgcgac gggacaaacg cctctgcttc 5160
tagctgtggg acgtgggcac ctgagcattg tgcgcttctt gctggagaac ggtgcaaatt 5220
tgatgcatca aaaccgcagg ggccagtctg gtgagaacaa cgcgaagagc aaggcagtgc 5280
tggagctcgt tgagtttctt gtttcgacaa gtgagaacaa cgcgctcttc tacgcttcca 5340
atcggtgtg gatggacctg cgggacaaac acggcgactc cgcgctcttc tacgcttcca 5400
tggataacaa tgaggagatt ggccggtacc tgctgcgcca cggcgccgat cgcgagctgc 5460
gcaatgcaga cggcaaaagc gtcgacttca gctcttggtt agcatatgtc gagaaggcca 5520
ttgagcgcaa ccgaaaaatc gtcgacttca gctcttggtt gctactgtgc gacaagaggg 5580
tcgctgttct tgagggcagg gacttatgct gctgtgcatt gctactgtgc gacaagaggg 5640
catcaattca ggaccaccta gcgctgtac ttcttgcttc ttaccacccc ctccccaca 5700
tgtcgccgct tccccatcaa agtgtgtgct taactttgaa aacgcagtga tcatctcggc 5760
ttgtatcgca tttttttctc catttttttt tttgcttggg cctcccccaa acaaaaggaa 5820
aagggttgag gtgtgggtgg ctgacccac tcgtcaccat gcgctcgtg ggaaggagg 5880
ggcgggggtg tacggttaaca ctgcacatgc acacatacgg tatgccactt tggggctctt 5940
ttgaaaagct aaagaacaac aaaaagaga cagcactcat ctgcaagtat ggtctttgtc 6000
attgtttctt cttgagctgc accgcaggag ccttgcgcc acttcgacgc cgtgcgcat 6060
agttcggtgt ctctgtcgca cgctgcggca cgttgcgcca cggggcaaca cccaagctcg 6120
accaagcctc gtgcttcccc cacttggtct gtgtttgttt tgctctcgtg cgccccctct 6180
ttcttggtcg tttttccatt tcgtgccaat cagctctctg tgccccccc ccttccccctc 6240
tctctcactt cagtcccttt tgtacaacgt accgcagtt ttacgttggg aagtggcgt 6300
catgaagcgt cgtgagcagc gccgacagcg cgagcgagag cagctgcaa ctgccttgac 6360
gaagctggtc cagctcattc catccgacga ggatgcgcgc cgctaccttg caaggagtt 6420
cgccgacatc acgcaggagc aagcagggtc gaatgcaccg tgctccgcgg agggaggtg 6480
gcacgatgct ggcgcaggcg acgcgtggat ctacggcagc gggctcgaga agctgctgtc 6540
ggttctagga gaggaggcgt gtcttgatgg ggctttcgat attgttcgta tcaactcgcc 6600
cgtgccgcgc agccaatcca cgattgacag gatcaatgtg gcggagtgtg gctttgcgt 6660
ttcccaggcg tcgggcccgg tggatgtcca cgagcgacgt cgactgctg gtgccacgtc 6720
cggaccgctg gacgagacga tacctcttct gcagctcga catgccgcg ccgacgcagc 6780
cattgtgcgt ggcgaggacc gccatcttga gatcgctctt gcaggcaacg gcagcagaaa 6840
actattggag gaaaatagca gccatcttga gatcgctctt gcaggcaacg gcagcagaaa 6900
gaacgttgac tcggaatggc cggcgttctg gcagagcatg tctacgcgcg ttcctatgac 6960
gcttcgcctg caccacagtg agcgtgcttt ggaggccatc gcaaccgcga tgctcaccac 7020
accgacatt gccgcgtag tgcgtcctgt gaccgccttt ccgtccagcg ctggtctcta 7080
ctcctgcagc aatagcgact accacagcca caagcgctg gagtacgtc gccgcacct 7140
gcacgtgct agcgcggtgt catttcagga ggtggtgtcg gcgataccgg tgtttgtgct 7200
ggatgtgcag ccgcaacaca ctgtcgtgga tctctgcgcg gcacctggca gcaaaacagt 7260
gcaggccttg gacaccatgc tgagcgggtg gtggtctgca gacgtctgtc gagggtgct

```

catcgccaac	gaaaaggaca	gagtgaaggc	gacgcagaca	cttccggcgc	ggctgaagcg	7320
ctaccacgcc	ccaaacgtga	tgactaccgc	atgcgacggt	gtgcagtggc	ctcgtttgta	7380
ctttaacgat	cctacgaacc	caagcagcga	gccgcaagaa	cggcggtttg	accgcatcat	7440
ctgcgacgtc	ccgtgcagcg	gcgacggcac	catccgcaag	gagtgttcca	tcgccacaac	7500
atggtcggca	agctacgtga	agtcctctgt	gccaaaccaa	cgtgcgttgc	tgtgccgcgg	7560
ccttgacctc	ttggccacag	ggggcattct	ggtttacagc	acgtgcagca	tgaatccgaa	7620
ggaggacgag	gaggtggttt	gcgtcgggtt	ggaggctttc	ggcgacagtgc	tcgagctcat	7680
cgacgtgaat	gcggttctac	aggagaaggg	atttcacctg	cactcggcag	gagggattct	7740
ctccccgaat	gtggagggga	tgacgacccc	ggtgctgccg	ccgacgtacg	acggcaacaa	7800
ggctcctgcg	attttgccgc	atcgtgatga	caccggcggg	ttctttgtgg	cggctttccg	7860
caaagcaaa	cagccagacc	ggacggcgcc	cacagtgatt	cgacacaagc	tgaaccactg	7920
gacgaaaggc	aagctgtggg	cgcagttggg	cgtcgaggac	gaggcgtggg	ccaacataatc	7980
aacctttctac	ggctttgacc	gccgcgacga	agcgaacttc	gtctactatg	acgccactag	8040
ctcttcgtcc	gggaaaggcc	tcgtgcctct	gtatcacctc	aatccaaatg	gtgggcctat	8100
acgccgcate	gtgctctcga	ctccggcgct	ggcggatatg	gtgctgcgca	cacgtccgta	8160
caagggccct	ggcgtggagg	tggtgtccgt	cggatatgcgc	gcgttcgagg	catacgacgg	8220
aaggtttttg	ccaactgcgg	cctgccggtg	gcgcgccgtc	gttgagtccg	cctctttttt	8280
ggcaccgcgc	tttactgccc	gaaggctgca	cttccacgtt	tcgaagcaca	agcagctact	8340
cgaggatctg	ctccgaaacg	gccacgttta	cacgcgagat	cactggagga	cagtgttggg	8400
tggagatcct	gctgttgtag	ccgctaacgc	gaatccgaag	gcgctggtca	agcctggcag	8460
ccgactcgag	gcgttgctga	cgcaggcgag	tagtgaatct	accatctctg	acgaggaggt	8520
ggcgggtgctg	ctgacaagcc	acgtggaggt	aggggtgcgt	ttggtgggca	tcctcttcga	8580
cgagccgacc	gatgcagccg	ctggtccgtg	gtacatgagc	gcgacgctga	gcgggcacaa	8640
gctggagctc	gccatcgatg	gctctctcgc	tgcggtccgg	ttgatgacgt	tttttggtac	8700
tcacgacggt	gagcgtggct	cgctggccgg	caacaacatc	ggcagtgcgg	tcgcagacga	8760
agagcctgag	gagcaggcaa	aggaggtgta	gcaccggaag	cttcacacgg	cgtggtgtcg	8820
cataactcct	gtgctttcac	tgacgtggct	tatcgagact	acagttacat	tcgatttcaa	8880
tcgaagaggc	catggagcct	gtctgcactg	ttgatccctc	tccttttttt	gcgtatgcgt	8940
actattctaa	gcgagtaacc	gcattcttcac	tgactaaacc	gccaaacttc	atgagtcgca	9000
ggagcagtat	aattgtcgcc	gagccctca	tcacgtgtat	gaggggcgaa	acgaaaaatg	9060
atgagaggcg	atgcatggct	tttcaatagc	cgtgacgcgt	ccgtgtgtgc	gctggattcg	9120
ctgctctggc	ttttccacga	aggggatgga	tcgcgcaata	cacgcgcggt	ggaatgcacg	9180
gccattctcg	ctctgtgctc	cggcgtccct	ttgaggggtc	ggctgggtgt	ggagtggggt	9240
tgaggggtcgc	cgagaagacg	cgtgctttct	gaacagctca	cgagcagagc	ctctgctact	9300
tgaaccaact	ctcttccact	acgaacgctc	tttcgggtatc	ttcaatccat	cttctctgtc	9360
ttgctattcg	gtcttcgtcc	accttggtct	cacgaagaag	ggaagccaag	cctcagcaca	9420
cagcaacatc	cgcacaagcc	gtacccttta	ccacctctgt	ggttccactc	catctccttc	9480
actggtgtac	acgatataat	cggcgttttt	cttctctgtt	ggtgcctcc	tttctctctc	9540
gtgctcctgt	tgggccattt	cgatacgcgc	aagcgtcgct	atttcgtgct	ttacatcttg	9600
cgttggtctc	gccccgattg	ctcgtggcat	ttctctgca	tcgtttttcc	gtctccgtac	9660
glttgccgtgt	ttctctttac	ttctatggag	gcacgttgtg	catcttcgcc	cctctccgct	9720
tctttgtcag	acagcgcggc	caaggcgagg	ttggtcgggt	gcgcgggcgg	tctcatttct	9780
ccatagctcc	gtgcttttaa	tacaccctcc	ttctctctcc	cttgtttcca	taactcgtaa	9840
ttttcttggt	tctggggggg	gttcgacccc	tttttgtgta	atcagcacca	tgacggctcg	9900
tgtatatgac	agagatgac	agatgtgcc	gtatgagggc	tgacgggaga	tcgatctgct	9960
gcctgcccg	tgctccaact	gcgacaagcg	attctgcacc	caccatctct	cccacagcgc	10020
acatcgctgt	ccggccgtga	cggatgtgcg	ggtcgggacg	tgccccatat	gctatcgctg	10080
tgtaccgttg	gagtaaccgc	gccaatgcat	ggacgagggc	gtgtcccggc	acattgaccg	10140
aggatgtcgc	gatgtaccgc	agggcagctt	attttacggc	ggcgctctcg	cgaagggggc	10200
gcccggccag	gcgagaggtc	gccgcttggg	cggctcggca	cggccgtgca	gcattcaagg	10260
ctgccacgag	gcctccgaga	cgcgcgtgga	agtgtgacca	atgcggccag	acattctgcc	10320
ttcagcaccg	cggacctctg	cagcaccact	gccgcgcgcg	cgcgcgccag	cgcagcgcgc	10380
tcgcgcctc	cccttcagag	cgggatgctg	gcattgctgt	gtctctgccg	ggtgacaagg	10440
cggtttccgt	ggcatgtctg	ctcactcatc	ccgccaaacac	tcccgaaaag	gcggtggggc	10500
aggcgacaga	gctgcctcgt	gacatggtga	catgcctcgt	gtgcttcctc	atacccactt	10560
gtgtgtocaa	aaaggacggc	aacgctggct	gcgaagagtt	cgaagccggtg	cccccggtct	10620
tcattgtcat	gcccagaagt	acagcactag	gccgtctcct	ggacacggcg	gtggatcgtg	10680
ccgccatgaa	ctcaccggcc	gtgcgcaccg	gaaaaccctg	gaacttggtc	gccgtcacac	10740
tgcccatcca	cgccgaggcc	gaggcagcct	actattctcc	tcttacactc	tcgacggtgg	10800
tgaaaaagag	tgctgtcggc	atggcggagc	gcactattgt	gtttctctcg	ccgctccaag	10860
ccttgcccgga	aggcgtgac	aaggcgggtg	aggacttgga	taggaaaggg	tcgtggccgt	10920
caacgtcatc	gtcctccagt	caagggtgtc	aagtgtgtg	atgagg		10966

<210> 3
 <211> 930
 <212> PRT
 <213> Leishmania major

5

<400> 3

```

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

```

Val Leu Val Gln Ser Ile Ile Asn Thr Ala Lys Thr Leu Thr Glu Ser
 245 250 255
 Asp Arg Cys Ser Ile Phe Leu Val Lys Ala Asp Gly Ser Leu Glu Ala
 260 265 270
 His Phe Glu Asp Gly Asn Val Val Val Leu Pro Ala Gly Thr Gly Ile
 275 280 285
 Ala Gly His Val Ala Glu Ser Gly Ala Val Val Asn Ile Pro Asn Ala
 290 295 300
 Tyr Glu Asp Asp Arg Phe His Arg Ser Val Asp Lys Val Thr Gly Tyr
 305 310 315 320
 His Thr Arg Thr Ile Leu Cys Leu Pro Ile Ala Phe Glu Gly Thr Ile
 325 330 335
 Val Ala Val Ala Gln Leu Ile Asn Lys Leu Asp Met Val Thr Gln Ser
 340 345 350
 Gly Gln Arg Leu Pro Arg Val Phe Gly Arg Arg Asp Glu Glu Leu Phe
 355 360 365
 Glu Thr Phe Ser Met Phe Ala Ala Ala Ser Leu Arg Asn Cys Arg Ile
 370 375 380
 Asn Glu Thr Leu Leu Lys Glu Lys Lys Lys Ser Asp Ala Ile Leu Asp
 385 390 395 400
 Val Val Ala Leu Leu Ser Asn Thr Asp Ile Arg Asp Val Asp Ser Ile
 405 410 415
 Val Arg His Val Leu His Gly Ala Lys Lys Leu Leu Asn Ala Asp Arg
 420 425 430
 Ser Ser Met Phe Leu Leu Asp Lys Glu Arg Asn Glu Leu Tyr Ser Lys
 435 440 445
 Met Ala Asp Ser Ala Asn Glu Ile Arg Phe Pro Cys Gly Gln Gly Ile
 450 455 460
 Ala Gly Thr Val Ala Glu Ser Gly Val Gly Glu Asn Ile Met Asp Ala
 465 470 475 480
 Tyr Ala Asp Ser Arg Phe Asn Ser Ala Val Asp Arg Gln Leu Gly Tyr
 485 490 495
 Arg Thr Gln Ser Ile Leu Cys Glu Pro Ile Thr Leu Asn Gly Glu Val
 500 505 510
 Leu Ala Val Val Gln Leu Val Asn Lys Leu Gly Asp Asp Gly Ser Val
 515 520 525
 Thr Cys Phe Thr Pro Thr Asp Gln Glu Thr Phe Lys Val Phe Ser Leu
 530 535 540

Phe Ala Gly Ile Ser Ile Asn Asn Ser His Leu Leu Glu Phe Ala Val
 545 550 555 560
 Asn Ala Gly Arg Glu Ala Met Thr Leu Asn Leu Gln Arg Asn Ser Ile
 565 570 575
 Thr Ala Gln Arg Ala Pro Lys Ser Val Lys Val Ile Ala Val Thr Pro
 580 585 590
 Glu Glu Arg Glu Ala Val Met Ser Ile Asp Phe Gly Gly Ala Tyr Asp
 595 600 605
 Phe Thr Ser Pro Gly Phe Asn Leu Phe Glu Val Arg Glu Lys Tyr Ser
 610 615 620
 Glu Pro Met Asp Ala Ala Ala Gly Val Val Tyr Asn Leu Leu Trp Asn
 625 630 635 640
 Ser Gly Leu Pro Glu Lys Phe Gly Cys Arg Glu Gln Thr Leu Leu Asn
 645 650 655
 Phe Ile Leu Gln Cys Arg Arg Arg Tyr Arg Arg Val Pro Tyr His Asn
 660 665 670
 Phe Tyr His Val Val Asp Val Cys Gln Thr Leu His Thr Tyr Leu Tyr
 675 680 685
 Thr Gly Lys Ala Ser Glu Leu Leu Thr Glu Leu Glu Cys Tyr Val Leu
 690 695 700
 Leu Val Thr Ala Leu Val His Asp Leu Asp His Met Gly Val Asn Asn
 705 710 715 720
 Ser Phe Tyr Leu Lys Thr Asp Ser Pro Leu Gly Ile Leu Ser Ser Ala
 725 730 735
 Ser Gly Asn Asn Ser Val Leu Glu Val His His Cys Ser Leu Ala Ile
 740 745 750
 Glu Ile Leu Ser Asp Pro Ala Ala Asp Val Phe Glu Gly Leu Ser Gly
 755 760 765
 Gln Asp Val Ala Tyr Ala Tyr Arg Ala Leu Ile Asp Cys Val Leu Ala
 770 775 780
 Thr Asp Met Ala Arg His Gly Asp Leu Ser Arg Val Phe Asp Asp Met
 785 790 795 800
 Ala Lys Ala Gly Tyr Asp Ser Asn Asp Gln Glu Ser Arg Arg Leu Val
 805 810 815
 Met Glu Thr Leu Ile Lys Ala Gly Asp Val Ser Asn Val Thr Lys Pro
 820 825 830
 Phe Glu Thr Ser Arg Met Trp Ala Met Ala Val Thr Glu Glu Phe Tyr
 835 840 845

Arg Gln Gly Asp Met Glu Lys Glu Lys Gly Val Glu Val Leu Pro Met
850 855 860

Phe Asp Arg Ser Lys Asn Asn Glu Leu Ala Arg Gly Gln Ile Gly Phe
865 870 875 880

Ile Asp Phe Val Ala Gly Lys Phe Phe Arg Asp Ile Val Gly Asn Leu
885 890 895

Phe His Gly Met Gln Trp Cys Val Asp Thr Val Asn Ser Asn Arg Ala
900 905 910

Lys Trp Gln Glu Ile Leu Asp Gly Arg Arg Asp Ser Ile Arg Pro Ser
915 920 925

Ile Val
930

<210> 4
<211> 7095
<212> ADN
<213> Leishmania major

<400> 4

```

ctgcgagcgg gagacaggg cgaggcaacg tgtgcgagat aaggtcgtgg cacagagagg 60
atacggctat gagagggatg tgtgctgttg gtgtgtcctc aacgttcgtg ctaaagggtcc 120
gtccaaaggt gaggaagttg ggacgaggaa gcatgcatgg acggtctcgt ggccctcatca 180
cctcctttcg gtgccatcat taccaccctt cgctcctgct ttttcgccgc catgcccagc 240
gggacttttt ttctgtcttggt tctgttttct cctcctcctc ctctcctccc tgtggttgct 300
ttcatgcatg taatctatgc gcggtgtgcg gactacaccg tcgcccaccg ccctcccctc 360
tccccgtctt ttctctcttg tttagcgttc tctttttctt ggcacccctt ctttttcccg 420
agcaacgcaa tgcttcggcc tccccacccc gtatgtcgca cccctgtgtc ccttgcgcac 480
gcctcttacc gtactgtaac ctttttcgcg tacacgggca ccactcgggt tttacttgta 540
tattagtctg gcctgccaaa atcatgaagt ccaccacacc tgccctagtc atgccccta 600
tctgttgccg cgattctgca ccgctcctta tccagcgctt cggttgagta gaatctcccg 660
ctggcccgtc ccgttgccct tgtatggaga ccgccaagag ttgtggcaca ttcaaagttg 720
ccccatgtgc gacccggcga ttaggcaact gtaaaaaaag gagcggcgct attcacagga 780
gtagacgggtg cgttctgccc tggcctcttt cgtgctgctc tctctctatg catctctctc 840
cttctcacgg attactctcc gtggccactg cgtgccctcc tggctgtttc ccggctcttt 900
tccccatttg tgcgctcttc catccatgca cccaatcaaa aaatcggatg cggctcatgtc 960
tgtcgtgcgt gcatctctgc atccgtctgc cagtgcgtgc gtgcgtgtgt gtgtgtgtgt 1020
gtgcgcacgt cagaaccgtc tcaagtccct cacctcagcg tcaatctacc ctcatgtcgt 1080
tcgtcggcct tgacgtgttt tcggctcatg tttcaccatt gtctcggtc aacgaccaca 1140
atagaaaaaa gcatagggat cggaaagctg tggcctatac acgttcacgg gtgcccgtc 1200
agcgtgggac acgtgcgcac gtccaccgca tcacagttag agacggagag aaaccagcgt 1260
agcgccatgg catatttcac ggccaagagg gcgtcctcga tgggtgcaag caccgttccg 1320
agcggcaacg accatctcct cgaggcactc acgctgtgcg actgcattct gagccgttac 1380
aagcgtgcg gggttcagct caacgacgcg gaggcgcgcg ccttcgccaa tttgcagcag 1440
cgcatatcta gcatctccgg ccacgcagca gacgcgcgat gccacgagg cgccactcga 1500
aagcagtcgc aggaactggg actgcacgag tacgctcaac tggcgcagcg gtgcctgatc 1560
ttccagaacc cctcgccca aattgtgcgc accatcaatg aagagttctc caaacttgtg 1620
agctgttcag tgcgcacgca ctacgccaac acaaacgacg cggtgctatg cgaccagtg 1680
cacgacactg ttgcaaccat cgatacatcg acccccatcg gcaggtgtgc gaagacgaag 1740
acgaccgtta ccatttcga cagcgtgtac atccccctat gttacaacag ccacgtcgtc 1800
ggctgcctgg aggtggagag caccgcaatc gacacgagca cgccgttttt cgggtacctg 1860
cttcaagtgg cggcactaac actgcagaac gctacctcca tcgatacact gcggtgggag 1920
actcggaagg cagaggccat ggtgggcatg gcgacacggc ttgctcgaga cacgttgagg 1980

```

gagtcggtgc	tgggtgcagtc	catcatcaac	acggcaaaaga	cgctgacgga	gagcgaccgg	2040
tgtagcatct	tcttgggtgaa	agcggacggc	agcctggagg	cgcacttcga	ggacggcaac	2100
gttgtggtgc	tgcctgcggg	gacgggcac	gcaggtcacg	ttgcggaatc	tggcgccgtg	2160
gtgaacatcc	cgaacgcgta	cgaggacgac	cggttccacc	ggctccgtgga	caaggtgact	2220
ggctaccaca	cgcgacgcat	cttgtgtctg	ccgatacgct	tcgagggcac	gatacgttgc	2280
gttgccgagc	tgatcaacaa	gctggacatg	gtgacacaga	gcgggcagcg	gcttccgcgc	2340
gtgtttggac	ggcgcgacga	ggagctgttc	gagacgttct	cgatgttcgc	tgcggcgctg	2400
ctgcgcaact	gccgcatcaa	cgagacgctg	ctgaaggaga	agaagaagag	cgacgcgata	2460
ctggacgttg	tggcgctgct	gtcgaatacg	gacatccgcg	atgtggacag	cattgtgcgg	2520
cacgtgctgc	acggcgcgaa	gaagctgctg	aacgcggaca	ggtcatcgat	gtttctgctg	2580
gataaggagc	gcaatgagct	gtacagtaag	atggcggaca	gcgcgaacga	gataccggtt	2640
ccctgcgggc	aaggcattgc	cggcactggt	gccgagtcgg	gcgttggcga	gaatatcatg	2700
gacgcgtacg	ctgactcgcg	cttcaacagc	gctgtggacc	ggcagctggg	ctaccgcaca	2760
cagtccatcc	tgtgcgagcc	gattacgctg	aatggcgagg	tgcctgccgt	ggtgcagctc	2820
gtcaacaagc	tcggcgacga	cggtagcgtg	acctgcttta	cacccactga	tcaagagacg	2880
tttaaatgtg	tctcgctggt	tgcgggcata	tcgatcaaca	acagccatct	gctggagttc	2940
gcggtgaacg	caggtcgtga	ggcgatgacc	ttgaacctgc	agcgtaacag	cattacagcg	3000
cagcgtgctc	cgaagagtgt	gaaggtgatc	gcggtgacgc	cggaggagcg	tgaggcagtg	3060
atgtccatcg	acttcggggg	cgcataatgc	ttcacttcac	cgggcttcaa	cctgtttgaa	3120
gtgcgcgaga	agtacagcga	gccgatggat	gcggctgccc	gtgttgtgta	taacctgcta	3180
tggaaacagt	gtctacccca	gaagtgtggc	tgcctgagc	agacactgct	gaacttcata	3240
ttgcagtgcc	gccgcaggta	ccgccgagtg	ccgtaccaca	acttctacca	cgctcgaggc	3300
gtgtgccaga	cgctgcacac	gtacttgtac	acaggcaagg	cgctcgagct	cctgacagag	3360
ctggagtgct	acgtgctgct	cgtgacggca	ctggtgcacg	atcttgacca	catgggcgtg	3420
aacaacagct	tctacctgaa	gacggactcg	ccgctaggca	tcctctccag	cgcgagcggg	3480
aacaactccg	tgctggaggt	gcaccaactgc	agcctcgcca	tcgagattct	gtccgacccc	3540
gccgcggacg	tgctcgaggg	gctgagcggg	caggacgttg	cgtatgcgta	ccgcgcgctg	3600
atcgattgct	tgctggccac	tgatatggct	cgccacgggg	acttgtcgag	ggttttcgat	3660
gatattggcg	aggccggcta	cgactctaac	gatacaggaat	ctcgctcgct	gggtgatgaa	3720
acgctgatca	aggccggtga	cgtgtcgaat	gtgacgaaac	cgttcgagac	gtcgcgcgat	3780
tgggcgatgg	ctgtgacgga	ggagtctctac	cgtcagggtg	acatggagaa	ggagaagggc	3840
gtggaggtgc	tgccgatggt	tgaccggctc	aagaacaacg	agctggcgcg	tgggcagatt	3900
ggcttcacgc	acttcgtagc	tggcaagtct	ttccgggata	ttgtgggcaa	cctatttcat	3960
ggaatgcagt	ggtgtgtgga	cacggtaaac	tccaaccgcg	caaagtggca	agagatcctg	4020
gatggccgcc	gcgactccat	ccgaccctcg	attgttttaag	gcgtcggtcc	cgtggtatcg	4080
ttgatgccgt	aatagcgcgc	ggtggtgccc	ttgctcctgg	tgcggaaagt	gtctggtaag	4140
tgcaggcgtc	gtgttgacgt	tggcggtcgt	gcttatctag	gcgaacgctt	gtgtcatgga	4200
tgagcagcag	gtttcgagca	gcggcgctcg	gcggcgctcg	gaagggggaa	tggtgcagtg	4260
ttgttggggg	gtgtggctac	aatgctaagc	gtctgtgctg	tggagcttgt	tctcatgtgt	4320
tgtctctatg	ctacccattg	gatgttcaat	cgcaaagggt	aagagactgc	tgtctgtttt	4380
ttttttgtct	gtacaactct	tctgtctctt	ctctctgtgt	tgctgctgct	gtcgccctcg	4440
tgcaccgcca	ctcgcccccc	ttcttccgtg	gccccatgct	cgtgcgtacg	tgtgcgtgaa	4500
gaggcactgg	cgggtgcggc	gtccggccca	ccccaccccc	cggcaggcca	cacgcattcg	4560
gagactaccc	cctctcgctt	ctctcgcttt	cgtttcgctt	ttggttggtt	ctcttgctcg	4620
tttggttggt	cctctgcact	gtgcgcttgc	tcgtatttat	cccttgccct	tgtttcctgt	4680
cgggtgtaac	ggatgcacca	gccacgtgtg	tatgccgggt	tctgtaagtg	aagaagttag	4740
agattggtac	gcttgtgcac	agactcagat	acccatata	atgccaataa	aatcgattat	4800
tgtatctcgg	ccattcacca	agccctccct	ccccctcgcc	cactccattt	ccgagtgtgc	4860
tgtactttgt	ttcttccctc	ttcttcaatt	tctcttcccc	ccccctctct	cttgatttctg	4920
tccccctccc	gcttctcgca	cgaaacgaca	ggagggcggt	gcgatgtggc	tgaggccgat	4980
gctggaacac	tgggaaaaacg	ccgcagaaac	gtcttggtat	tagatctgtc	tcaccctccc	5040
ctatacctat	ctctcccgcc	accagtgtag	gcgatggagt	gtctatttgt	tgggtggacgg	5100
tgtcctctgt	gggtaaatgg	cctgtaggat	gttcgaagta	cgtgttcttc	tcagcacaa	5160
gctggtatgc	ctgcgcttgc	caccgcgtct	gtctcccaca	ttctctgtat	gtttcacctt	5220
ctctctcccg	ttggcacaag	gcaggcatcg	agcgtgtgcg	ttcttttctc	ttggcgatgg	5280
cgcacgctct	gtgcttcttt	tcgtctctgc	tcgctgttac	cctcccgtcg	tcagtgcgcc	5340
tctcttgttc	tacgacttctg	cggtctctgt	ccactcccc	ccccctatct	cccccccccc	5400
cacacacaca	ccactcccat	ctgttcgcgt	actatatgct	caatgctgag	cctgggttcc	5460


```

aagtgggtctt cttgtctctt gtcgtccccc tctcgcgctc ttgtctctct tttcccgtta 5520
cggtttctctg tctgtcgcca ctttctcggc atccccgacc cgatgtacaa ctcaagcccc 5580
cccctagggc tcacctccgt cttctctctc cccgaacccc atgtgacgtc gcttctcttc 5640
tctctcccga tttttgtctt cttttttctc ttttacgatt ggattgcact tcttcgtgct 5700
tccgcgtatg ataggacgcc ggcgtggccc ccccccttc cactcccg cacttctctc 5760
cgtccctctt cccacgtgta gctgtccgtg cttttgtgcg aagtcgatgc aatccaaacc 5820
aagctgtgtg cgcggaagga gagcgacaga gagagagaga gcgagcgagc ggaactggag 5880
aaggtgccgc tcaccaacag aagaggaaag aggcgggtac gttacaccac gagccaaagc 5940
gaaagaaaag taggacggtg ccgcacacac tgcggtacgc ccggagactc gttccctcgc 6000
catgaccgcc gccaaagaag ccgtgttaga gtgaaccaga ttgtttctga gttgctcccc 6060
gggtgtgcttg gctgcggcag cactctctcc cttcacgtc tgcggcgggc cacgcgcggt 6120
gagagggcgt agacacacca cgcattggag aagacaaaac atgagatgac gaacacctcg 6180
tgcggtgctg aaagcagtgc taagtagcgt ctttaaggca cccacagga cgactgctct 6240
gtcggcgact tctatccaga tgtgttcac ctcgtgtacc tctcccttga ttcgctgtg 6300
ttccacgcac gtgtccacc tcatcatact ttactgatcc tccccctcct cttccctgc 6360
tctgcgacac cttctcttct acacttgcca cgacctgtcg gtgcgccctt ctccctctc 6420
tcgccacgtc ctgccccact tcgacacctt gggaaacttg cactgtctcg tgcacgcggc 6480
cgtttggcac ctcacccatc tcccacagc cgacatacat atgccccgct cctcgcttca 6540
gcaataacag gttaggcata cacacgtaca caagtgcact tccatcacta caactctttt 6600
gacaggacta ccaccctttt acaaccctcc cccaacacga gaaatgactg gagaaatcag 6660
cgagaaggcc ttccctcttt cgacggaccg cctcagccag accatcctcg atctcgtgca 6720
ggaggcgagc aatgccaaaga tggtagaaga aggtgccaac gaggccacca aggccttgaa 6780
ccgcggtatt gcggacctga tagtgttggc gggtagacac aaccgattg agattctcct 6840
gcacctcccc ctctgtgctg aagacaagaa cgtcccgtac gtcttcgtgc cgtccaagac 6900
ggcgcttggc cgcgcgtcgc aggtgtctcg caatgtcgtg gcgctagcca tccttcaggg 6960
cgagaacagc cctgttgctg cgaaggtgca ggcagtgaag ctcgagatcg agcgcttgc 7020
ctgaggtgtt tttccttgc tctctgttgc aattttttt tgtatttgcg tgttccctgt 7080
gtttctgttc tctttt 7095

```

<210> 5

<211> 940

<212> PRT

5 <213> Leishmania major

<400> 5

```

Met His Ser Ala Val Phe Ser Pro Asp Ala Pro Tyr Cys Gly Ala Ala
 1              5              10              15

Gly Ser Asn His Leu Cys Glu Ala Val Ala Leu Cys Gln Ser Ile Leu
      20              25              30

Ala Arg Tyr Arg Arg Thr Gly Thr Ser Phe Ser Ser Thr Glu Leu Lys
 35              40              45

Ala Ile Gln Ala Leu Arg Thr Glu Phe Pro Asp Thr Ala Gln Glu Pro
 50              55              60

Ala Ala Asn Ser Ala Ala Ser Pro Asp Gln Thr Thr Lys Asp Phe Leu
 65              70              75              80

Ser Ile Leu Asp Asp Ala Thr Asp Val Pro His Asn Pro Gln Asn Asp
      85              90              95

Ile Val Ala Phe Val Glu Glu Cys Cys Asp Asn Thr Lys Glu Pro Thr
100              105              110

```

Val	Leu	Phe	Ala	Ala	Ile	Asn	Glu	Arg	Ile	Ser	Ala	Val	Thr	Cys	Ser	115	120	125
Arg	Asn	Val	Arg	Thr	Tyr	Met	Val	Ile	Ala	Asn	Asp	Asn	Leu	Leu	Trp	130	135	140
Asp	Pro	Val	Asn	Gly	Val	Ala	Ala	Leu	Ile	Asp	Asp	Val	Thr	Pro	Leu	145	150	155
Gly	Lys	Cys	Ala	Gln	Ala	Arg	Asn	Met	Leu	Thr	Ile	Ala	Asn	Thr	Leu	165	170	175
Tyr	Ile	Pro	Leu	Trp	Phe	Arg	Ser	Glu	Leu	Val	Gly	Cys	Val	Glu	Val	180	185	190
Pro	Gly	Ala	Cys	Ile	Pro	Arg	Asp	Lys	Ala	Thr	Cys	Ala	Gln	Leu	Leu	195	200	205
Leu	Arg	Cys	Val	Thr	Val	Ala	Val	Arg	Asn	Ser	Ile	Asn	Ile	Ser	Ile	210	215	220
Arg	Lys	Arg	Glu	Ala	Asn	Lys	Ile	Glu	Ala	Met	Val	Gly	Met	Ala	Thr	225	230	235
Arg	Leu	Ala	Arg	Asp	Thr	Leu	Glu	Glu	Ser	Val	Leu	Val	Gln	Ser	Ile	245	250	255
Ile	Asn	Thr	Ala	Lys	Thr	Leu	Thr	Glu	Ser	Asp	Arg	Cys	Ser	Ile	Phe	260	265	270
Leu	Val	Lys	Ala	Asp	Gly	Ser	Leu	Glu	Ala	His	Phe	Glu	Asp	Gly	Asn	275	280	285
Val	Val	Val	Leu	Pro	Ala	Gly	Thr	Gly	Ile	Ala	Gly	His	Val	Ala	Glu	290	295	300
Ser	Gly	Ala	Val	Val	Asn	Ile	Pro	Asn	Ala	Tyr	Glu	Asp	Asp	Arg	Phe	305	310	315
His	Arg	Ser	Val	Asp	Lys	Val	Thr	Gly	Tyr	His	Thr	Arg	Thr	Ile	Leu	325	330	335
Cys	Leu	Pro	Ile	Ala	Phe	Glu	Gly	Thr	Ile	Val	Ala	Val	Ala	Gln	Leu	340	345	350
Ile	Asn	Lys	Leu	Asp	Met	Val	Thr	Gln	Ser	Gly	Gln	Arg	Leu	Pro	Arg	355	360	365
Val	Phe	Gly	Arg	Arg	Asp	Glu	Glu	Leu	Phe	Glu	Thr	Phe	Ser	Met	Phe	370	375	380
Ala	Ala	Ala	Ser	Leu	Arg	Asn	Cys	Arg	Ile	Asn	Glu	Thr	Leu	Leu	Lys	385	390	395
Glu	Lys	Lys	Lys	Ser	Asp	Ala	Ile	Leu	Asp	Val	Val	Ala	Leu	Leu	Ser	405	410	415

Asn Thr Asp Ile Arg Asp Val Asp Ser Ile Val Arg His Val Leu His
 420 425 430
 Gly Ala Lys Lys Leu Leu Asn Ala Asp Arg Ser Ser Met Phe Leu Leu
 435 440 445
 Asp Lys Glu Arg Asn Glu Leu Tyr Ser Lys Met Ala Asp Ser Ala Asn
 450 455 460
 Glu Ile Arg Phe Pro Cys Gly Gln Gly Ile Ala Gly Thr Val Ala Glu
 465 470 475 480
 Ser Gly Val Gly Glu Asn Ile Met Asp Ala Tyr Ala Asp Ser Arg Phe
 485 490 495
 Asn Ser Ala Val Asp Arg Gln Leu Gly Tyr Arg Thr Gln Ser Ile Leu
 500 505 510
 Cys Glu Pro Ile Thr Leu Asn Gly Glu Val Leu Ala Val Val Gln Leu
 515 520 525
 Val Asn Lys Leu Gly Asp Asp Gly Ser Val Thr Cys Phe Thr Pro Met
 530 535 540
 Asp Arg Glu Thr Phe Gln Val Phe Ser Leu Phe Ala Gly Ile Ser Ile
 545 550 555 560
 Asn Asn Ser His Leu Leu Glu Phe Ala Val Asn Ala Gly Arg Glu Ala
 565 570 575
 Met Thr Leu Ser Leu Gln Arg Asn Ser Ile Thr Ala Gln Arg Ala Pro
 580 585 590
 Lys Ser Val Lys Val Ile Ala Val Thr Pro Glu Glu Arg Glu Ala Val
 595 600 605
 Met Ser Ile Asp Phe Gly Gly Ala Tyr Asp Phe Thr Ser Pro Gly Phe
 610 615 620
 Asn Leu Phe Glu Val Arg Glu Lys Tyr Ser Glu Pro Met Asp Ala Ala
 625 630 635 640
 Ala Gly Val Val Tyr Asn Leu Leu Trp Asn Ser Gly Leu Pro Glu Lys
 645 650 655
 Phe Gly Cys Arg Glu Gln Thr Leu Leu Asn Phe Ile Leu Gln Cys Arg
 660 665 670
 Arg Arg Tyr Arg Arg Val Pro Tyr His Asn Phe Tyr His Val Val Asp
 675 680 685
 Val Cys Gln Thr Leu His Thr Tyr Leu Tyr Thr Gly Lys Ala Ser Glu
 690 695 700
 Leu Leu Thr Glu Leu Glu Cys Tyr Val Leu Leu Val Thr Ala Leu Val
 705 710 715 720

His Asp Leu Asp His Met Gly Val Asn Asn Ser Phe Tyr Leu Lys Thr
 725 730 735
 Asp Ser Pro Leu Gly Ile Leu Ser Ser Ala Ser Gly Asn Asn Ser Val
 740 745 750
 Leu Glu Val His His Cys Ser Leu Ala Ile Glu Ile Leu Ser Asp Pro
 755 760 765
 Ala Ala Asp Val Phe Glu Gly Leu Ser Gly Gln Asp Val Ala Tyr Ala
 770 775 780
 Tyr Arg Ala Leu Ile Asp Cys Val Leu Ala Thr Asp Met Ala Lys His
 785 790 795 800
 Ala Asp Ala Leu Ser Arg Phe Thr Glu Leu Ala Thr Ser Gly Phe Glu
 805 810 815
 Lys Asp Asn Asp Thr His Arg Arg Leu Val Met Glu Thr Leu Ile Lys
 820 825 830
 Ala Gly Asp Val Ser Asn Val Thr Lys Pro Phe Glu Thr Ser Arg Met
 835 840 845
 Trp Ala Met Ala Val Thr Glu Glu Phe Tyr Arg Gln Gly Asp Met Glu
 850 855 860
 Lys Glu Lys Gly Val Glu Val Leu Pro Met Phe Asp Arg Ser Lys Asn
 865 870 875 880
 Asn Glu Leu Ala Arg Gly Gln Ile Gly Phe Ile Asp Phe Val Ala Gly
 885 890 895
 Lys Phe Phe Arg Asp Ile Val Gly Asn Leu Phe His Gly Met Gln Trp
 900 905 910
 Cys Val Asp Thr Val Asn Ser Asn Arg Ala Lys Trp Gln Glu Ile Leu
 915 920 925
 Asp Gly Arg Arg Asp Ser Ile Arg Ser Ser Ile Val
 930 935 940

<210> 6

<211> 6945

<212> ADN

<213> Leishmania major

<400> 6

acaggcaggt gcgtgtggag aggttgaagg acaaggttca tccacagctc agtgccgccca 60
 agccggtgct caagttgaat gcggctcccc cgccgttggt caagaagaat ccactgtcag 120
 cccagtgcc tttgaagaag gtgccagcaa tggtaaagcc gcaacggaag cggacgctgc 180
 cgatcgtcac caagacaact gcgagaaagg ccgcaccggt ggcgtctcct gatagaaatg 240
 ccccgccggc agtgacgctt cagctggtca ccaagcgagc tgccggcggt tcccgcactg 300
 aaacgaaggg tgtgcccgcc tctgcccag cccgcgtgaa ggtcagcgcg gcccaaaagg 360
 tagccgcggc cgctaccaag aaggcgctca agaagggtac atccacctca caggcgacaa 420
 ccgccacaga cgagggtggg gacttcttcg ccgaggattt catggcgga ggtgaaggag 480
 acgacgtcgg gctcgagggt gccgacaagt ccgctggtga cacgaacgcg caagtagcag 540

cgccacgggc	gccagtgaag	cagaagcgta	agtcgcggcg	gcgtcgtgca	gctcgcagtc	600
acctccttgc	acccgagtcg	atgctccctg	cgacggcacg	gtcacagaag	gtgattgtgg	660
cgcacacccc	cacgtgtaga	aaggcacccg	ggccgggtgtg	cacctcccca	tcacccccct	720
ttactcctgc	acgacgcaag	gtgagccttg	ccgacaacat	ccgcgctcag	ctggccagtt	780
ttttgtagtc	actgggtcgc	gtgcgtggtg	ccgaacgcgg	ggaacggcct	gacctacctc	840
ttcacgcgcg	ctgaacaaca	tatagagaaa	acactagatg	ccaccctttc	ctctcctctc	900
ccagctgccc	ttcccctgct	ccccatcgac	catgcgtgaa	ggttgtcccc	accacctcgt	960
atctgtccag	cggtggcatg	ataatggcgg	cagatttgag	ctgacttgga	gaatggcaag	1020
acaggaaagc	gggggggggg	gggcaaaaga	agagatagag	gggagagcgt	atgagggggg	1080
ggggcgggcg	acgcgcacac	actcatctgc	tcgtgagggc	acgtaacgcc	ctagcaaatg	1140
ttttgcatag	acaagggaag	gacaaagcgc	catcgatacc	ggagagcaat	acagactcac	1200
atacatacat	acatgcgaac	gcctacgcgc	gtcccgcaca	tgaggacagc	cgaataagtc	1260
tgcggtgtta	cctcaaaaga	aaaggcacag	gaggcacaat	cgagacagca	gctgtgctgt	1320
ctcggttgcg	gtacgaggtg	ttccgcccac	gtcgttttct	gcacatccct	tcacgattgt	1380
gctgcgggtg	cgctcgtgtg	actcattgtc	gaaacacgtc	agagcagctg	ccggccacaa	1440
cagtaccccc	ctggcgcgcc	tggcgagacg	cggggacatc	acgtgtcagt	atggtgccac	1500
caagcgaaga	gggagggaga	ggcgaagggc	tgagatgacg	gatctgctac	tgaatgcgcg	1560
aagagcgggc	gtgtggtacg	tggaggatag	ccgccccagt	tgaacgttac	ggctcgatct	1620
tctccgtgaa	gaaacgggtg	gcgttctcct	tttccgctgc	cgtttctttc	tctccctgta	1680
tgcttcgcca	tcattgtatc	ttacggatgt	cctgtcctgc	cccacttctt	cctgcctttc	1740
tcgcctacca	actactgaac	gctgtcagtg	cgctctcgc	ttctccagct	ccacacgcgc	1800
tcactggcca	tcacaaagg	gaagccaacca	ctggcaccca	aggagcttaa	ccagcatttg	1860
aggttcttca	aaaggcgggtg	tgagggtgcag	ctgcactgga	tcattcgggg	gacacaaacg	1920
cgcattgcgtg	cacggctgca	cacgggaccc	gtcattgtct	cttccgctct	gttgcctcctg	1980
tcgcgcgtct	ccacagcgac	acacatacac	acacagtcag	acacacacac	acacacacac	2040
acacacacac	acacacaagc	gagccccata	cacgcaaacg	ccacgcggcc	tctttgttgt	2100
tcgtttgttc	actcttgttt	ttcggtcctg	attggccgct	gtcttcgatt	tggtatcaac	2160
tggcagtgac	gccgtacagc	gatgcattca	gcggtctttt	cccccgatgc	gccgtatttg	2220
ggcgagcccg	gctccaatca	cctatgtgag	gcggttgac	tctgccagtc	gattctggcg	2280
cgctaccgtc	ggactggtag	atccttctcc	tccacagagc	tgaaggcgat	tcaagccctg	2340
cgaccagagt	tccttgatac	cgcgcaagag	ccggtcgca	atagcgcgcc	ttcacccgac	2400
cagaccacga	aggacttcct	gagcattcct	gacgatgcaa	ccgacgtgcc	gcacaaccca	2460
cagaacgaca	ttgtcgcgtt	tgtggaggag	tgctgcgaca	acaccaagga	gccaaacagta	2520
ttgtttgccg	cgattaatga	gcgcatttca	gccgtgactt	gctcgcgtaa	tgtccgcacg	2580
tacatggtga	tcgcaaacga	caatctccta	tgggaccttg	tcaacggtgt	tgcgcgccct	2640
atcgacgacg	tcacgccctt	gggcaagtgc	gcgcaagcgc	gcaacatgct	gacgattgcc	2700
aacaccctat	acatccccct	ctggtttcgg	tccgagctcg	ttggctgcgt	ggagggtgcc	2760
ggtgectgca	tcccaaggga	caaggctacc	tgtgctcagc	ttctgctccg	gtgcgtcacc	2820
ggtgcccgtt	gaaacagcat	caacatctcc	atcagaaaga	gggaagcaaa	taagatcgag	2880
gccatggttg	gcattggcgac	acggcttgct	cgagacacgt	tggaggagtc	ggtgctggtg	2940
cagtccatca	tcaacacggc	aaagacgctg	acggagagcg	accggtgtag	catcttctcg	3000
gtgaaagcgg	acggcagcct	ggaggcgcac	ttcgaggacg	gcaacgttgt	ggtgctgcct	3060
gcggggacgg	gcatcgcagg	tcacgttgcg	gaatctggcg	ccgtggtgaa	catcccgaa	3120
gcgtacgagg	acgaccgggt	ccaccggctc	gtggacaagg	tgactggcta	ccacacgcgc	3180
acgatcttgt	gtctgcccga	cgcgttcgag	ggcacgatcg	ttgcccgttg	gcagctgate	3240
aacaagctgg	acatggtgac	acagagcggg	cagcggcttc	cgcgctgtgt	tggacggcgc	3300
gacgaggagc	tgttcgagac	gttctcgatg	ttcgctgcgg	cgtcgtgcg	caactgccgc	3360
atcaacgaga	cgctgctgaa	ggagaagaag	aagagcgacg	cgatcctgga	cgttgtggcg	3420
ctgctgtcga	atacggacat	ccgcgatgtg	gacagcattg	tgcggcacgt	gctgcacggc	3480
gcgaagaagc	tgctgaacgc	ggacaggtca	tcgatgtttc	tgctggataa	ggagcgcaat	3540
gagctgtaca	gtaagatggc	ggacagcgcg	aacgagatcc	ggtttccctg	cgggcaaggc	3600
attgccggca	ctggtgccga	gtccggcggt	ggcgagaata	tcattggacg	gtacgctgac	3660
tcgcgcttca	acagcgttgt	ggaccggcag	ctgggctacc	gcacacagtc	catcctgtgc	3720
gagccgatta	cgctgaatgg	cgaggtgctt	gccgtgggtg	agctcgtcaa	caagctcggc	3780
gacgacggta	gcgtgacctg	ctttacaccc	atggaccggg	aaacgttcca	agtgttctcg	3840
ctgtttgccg	gcatctcgat	caacaacagc	catctgctgg	agttcgcggg	gaacgcaggt	3900
cgtgaggcga	tgaccttgag	cctgcagcgc	aacagcatta	cagcgcagcg	tgctccgaag	3960
agtgtgaagg	tgatcgcggg	gacgcgggag	gagcgtgagg	cagtgtatgtc	gatcgacttc	4020

gggggagcat	atgacttcac	ttcaccgggc	ttcaacctgt	ttgaagtgcg	cgagaagtac	4080
agcgagccga	tggatgcggc	tgccgggtgt	gtgtataaac	tgctatggaa	cagtgggtta	4140
cccgagaagt	ttggctgccc	tgagcagaca	ctgctgaact	tcattcttga	gtgcccgcgc	4200
aggtaccgcc	gagtgcgcta	ccacaacttc	taccacgtcg	tggacgtgtg	ccagacgtcg	4260
cacacgtact	tgtacacagg	caaggcgtcg	gagctcctga	cagagctgga	gtgctacgtg	4320
ctgctcgtga	cggcactggc	gcacgatctt	gaccacatgg	gcgtgaacaa	cagcttctac	4380
ctgaagacgg	actcgccgct	aggcatcctc	tccagcgcca	gcgggaacaa	ctccgtgctg	4440
gaggtgcacc	actgcagcct	cgccatcgag	attctgtccg	accccgccgc	ggacgtgttc	4500
gaggggctga	gcgggcagga	cgttgcgat	gcgtaccgcg	cgtgatcgga	ttgctgtgctg	4560
gccactgata	tggcgaagca	cgtgcacgcg	ctaagtcgct	tcacagagtt	ggcgacaagc	4620
gggttttgaga	aagacaacga	caccacccgt	cgcctgggtga	tggaaacgct	gatcaaggct	4680
ggtgacgtgt	cgaatgtgac	gaaaccgttc	gagacgtcgc	gcatgtgggc	gatggctgtg	4740
acggaggagt	tctaccgtca	gggtgacatg	gagaaggaga	agggcgtgga	gggtgctgccg	4800
atgtttgacc	ggtcgaagaa	caacgagctg	gcgcgtgggc	agattggctt	catcgacttc	4860
gtagctggca	agttcttccg	ggatattgtg	ggcaacctat	ttcatggaat	gcagtgggtg	4920
gtggacacgg	taaactccaa	ccgcgcaaag	tggcaagaga	tcctggatgg	ccgcgcgcac	4980
tccatccgat	cctcgattgt	ttaaggcatc	ggtcccgcgc	tatcgttgat	gccgtaatat	5040
cgcgcggaag	tactcacggc	gaatgtcttt	cgagaagtga	aagcggtgag	ctcacttgctc	5100
actatggacg	gatgagtggc	gttggtcgcc	gctctgtctg	gcgtgtctac	gcgtcttctc	5160
cccacctcag	tatgtgcacc	gggcgctcat	ttccctttgt	acccgctcgt	gtatccgcga	5220
cgcgggatgg	tttgtgtgtt	gggtgagtctc	cctctctctg	caccagggcc	tggtctgggt	5280
gatgggcgcc	tctcgactcg	ctgaggacaa	ggtgtggcac	atgtgggcgt	gtgagtctgtg	5340
tttttttttt	ttggctctcg	tcttgtctcc	tctctcctcg	ctattagccc	ttttctgaac	5400
agacctctct	ctctctctct	gctcgtcttt	cggaggagtg	gtttgccgtt	gaaggctgaa	5460
cggtagcaag	ggggaggagt	gagcagtgca	ggtgcacaca	cacgcaccac	acctaatctc	5520
ctcttcatcc	gcctttcctt	tttttcgggt	gtgtgtcccg	aagatgggtt	cctgtctttg	5580
catecgtttc	tctccccctt	ttttcgtgtg	tctgtctttt	gttgttcgtc	acgaatctca	5640
cccgcctccc	tccccctctt	cccatttttt	ctctcgtagg	tgtgtgcate	tgtgtcctcg	5700
gtgagacgga	gtggagtggg	ggcaccgccg	agcgcgtggc	atctctcccc	ccccccaggt	5760
gggggggtcat	tcgtgcaccc	aaactctgtc	tctggggagg	aagctcagcg	gcgcaccccc	5820
acccccaccc	ccacctctct	cctcctatat	ccctgccagt	gcggaaccgc	ttctcctggc	5880
gacaggggtca	agcacctata	acgcaggagg	gacagagcaa	gatgtcgtcg	cggatgtcgg	5940
ccgtcaggtg	ccgatggcg	tggcgccgga	gcgacctgcg	acagcgcaca	cgcacgattc	6000
atgtgatggg	cagagtgcgg	gcgtgactcg	aacgcattcc	acccccggcc	ctcacactgt	6060
cctgctgctg	tggggagcct	gtgccatcgc	gatggaatcg	caccgtgtgg	cgaccggcac	6120
aacgtgagcg	gctgtggggc	gacctgtgag	gcgggggtgg	tgggtgggtg	gcgggtagag	6180
ttcgaggctg	aggctgtgcc	ctcagatggc	cagattggcg	cgttgccggtc	acgtgtgtct	6240
ctgcagctgc	ttcgaccag	gcgatagagg	cctgtgacag	ggccggtgca	agagtggggc	6300
tcgacctcat	gttgcattgac	agagaaatga	acatgctgta	actccccctc	ccttgactca	6360
tttccatctc	ttgtgtcacc	tactacctgt	ccttctcagt	gtcttggtgc	acttgtgacg	6420
ttctcgcgtg	tctcctcttt	tcttttcttc	tcgaagtttt	ttgggtctgc	agagagaggc	6480
gatgggagga	ggagcagcca	ggcttgcggt	gtgtgatgtc	gagaagaaca	atgtaacagc	6540
tcttctctcg	ttgtcctcct	tctcccgcgt	tctgttcggc	gaggaaaaca	gcagacttgt	6600
gtagcacaag	atgtgctgtg	cgcctgctgt	gtgacatgtg	cgagggaagcc	tgcgcgcaac	6660
cgtttgtggc	ctctggaggc	ggtactgcga	gcgggaggac	agggcgaggc	aacgtgtgcg	6720
agataaggtc	gtggcacaga	gaggatacgg	ctatgagagg	gctgtgtgct	gttgggtgtt	6780
cctcaacggt	cgtgctaaag	gtccgtccaa	aggtgaggaa	gttgggacga	ggaagcatgc	6840
atggacggtc	tcgtggcctc	atcacctcct	ttcggtgcca	tcattaccac	ccctcgctcc	6900
tgctttttcg	ccgcatggcc	cagcgggact	ttttttcgtc	tgttc		6945

REIVINDICACIONES

1. Proteína sustancialmente purificada que comprende un dominio catalítico de fosfodiesterasa (PDE) de PDE-B1 de *Leishmania* que comprende los aminoácidos 647-880 como se expone en SEC ID N°: 3 o variantes y mutantes del dominio catalítico que son al menos un 80% idénticos a los aminoácidos 647-880 de SEC ID N°: 3 y que hidrolizan AMPc.
2. Proteína sustancialmente purificada que comprende un dominio catalítico de PDE de PDE-B2 de *Leishmania* que comprende los aminoácidos 657-890 como se expone en SEC ID N°: 5 o variantes y mutantes del dominio catalítico que son al menos un 80% idénticos a los aminoácidos 657-890 de SEC ID N°: 5 y que hidrolizan AMPc.
3. Proteína sustancialmente purificada de la reivindicación 1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID N°: 3 o variantes y mutantes de la misma que son al menos un 80% idénticos a SEC ID N°: 3 y que hidrolizan AMPc.
4. Proteína sustancialmente purificada de la reivindicación 2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID N°: 5 o variantes y mutantes de la misma que son al menos un 80% idénticos a SEC ID N°: 5 y que hidrolizan AMPc.
5. Molécula de ácido nucleico sustancialmente purificada que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína de la reivindicación 1 ó 2.
6. Molécula de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 5 que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína de la reivindicación 3.
7. Molécula de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 6, en donde la molécula de ácido nucleico comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en SEC ID N°: 4 que comienza con adenina en la posición 1267 y termina con adenina en la posición 4059.
8. Molécula de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 5 que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína de la reivindicación 4.
9. Molécula de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 8, en donde la molécula de ácido nucleico comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en SEC ID N°: 6 que comienza con adenina en la posición 2182 y termina con adenina en la posición 5004.
10. Molécula de ácido nucleico de la reivindicación 6 u 8, siendo la molécula de ácido nucleico una molécula de ADN.
11. Proteína de la reivindicación 3 o reivindicación 4, o el ácido nucleico de la reivindicación 6 u 8, en donde la proteína tiene un valor de K_M de 1 a 2 μM para AMPc.
12. Proteína de la reivindicación 3 o reivindicación 4, o el ácido nucleico de la reivindicación 6 u 8, en donde la proteína no hidroliza GMPc.
13. Proteína de la reivindicación 3 ó 4, o el ácido nucleico de la reivindicación 6 u 8, en donde la proteína hidroliza sustancialmente AMPc en presencia de hasta aproximadamente 100 μM de un inhibidor de fosfodiesterasa seleccionado de cilostamida, zaprinast, etazolato, Ro-20-1724, rolipram, isobutilmetilxantina (IBMX), 8-metoximetil-IBMX, papaverina, milrinona, petoxifilina y eritro-9-(2-hidroxi-3-nonil)adenina.
14. Vector que comprende la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 6 u 8.
15. Vector de la reivindicación 14 en donde la molécula de ácido nucleico está unida operativamente al menos a una secuencia de control de la expresión.
16. Sistema de vector hospedador que comprende el vector de la reivindicación 14 en una célula hospedadora adecuada.
17. Sistema de vector hospedador de la reivindicación 16 en donde la célula hospedadora adecuada es una célula bacteriana.
18. Sistema de vector hospedador de la reivindicación 16 en donde la célula hospedadora adecuada es una célula eucariota.
19. Sistema de vector hospedador de la reivindicación 18 en donde la célula eucariota es *Saccharomyces cerevisiae*.
20. Anticuerpo o fragmento de anticuerpo que comprende un sitio de unión a antígeno que reconoce y se une selectivamente a una proteína de la reivindicación 1, 2, 3 ó 4.
21. Anticuerpo de la reivindicación 20, en donde el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal o un anticuerpo policlonal.

22. Anticuerpo de la reivindicación 21, en donde el anticuerpo es quimérico, humanizado o humano.
23. Método para producir una proteína PDE que comprende cultivar el sistema de vector hospedador de la reivindicación 16 en condiciones adecuadas para producir la proteína PDE en el hospedador y recuperar la proteína PDE producida de esta manera.
- 5 24. Método para identificar un compuesto que modula la expresión de una proteína de acuerdo con la reivindicación 3 ó 4, comprendiendo el método:
- (a) incubar una célula que puede expresar dicha proteína con un compuesto en condiciones y durante un tiempo suficientes para que la célula exprese dicha proteína sin el compuesto;
- (b) incubar una célula de control en las mismas condiciones y durante el mismo tiempo sin el compuesto;
- 10 (c) medir la expresión de dicha proteína en la célula en presencia del compuesto;
- (d) medir la expresión de dicha proteína en la célula control; y
- (e) comparar la cantidad de expresión de dicha proteína en presencia y ausencia del compuesto, en donde una diferencia en el nivel de expresión indica que el compuesto modula la expresión de dicha proteína.
25. Método de la reivindicación 24 en donde el compuesto reduce la expresión de dicha proteína.
- 15 26. Método para identificar un compuesto que modula la actividad PDE de *Leishmania* de la proteína de acuerdo con la reivindicación 3 ó 4, comprendiendo el método:
- (a) poner en contacto una línea celular modificada por ingeniería genética para expresar dicha proteína, con un compuesto en condiciones y durante un tiempo suficientes para que la muestra exprese dicha proteína sin el compuesto;
- 20 (b) incubar una muestra de control en las mismas condiciones y durante el mismo tiempo sin el compuesto;
- (c) medir dicha actividad PDE de dicha proteína en la muestra en presencia del compuesto;
- (d) medir dicha actividad PDE de dicha proteína en la muestra de control; y
- (e) comparar la cantidad de dicha actividad PDE de dicha proteína en presencia y ausencia del compuesto, en donde una diferencia en el nivel de actividad indica que el compuesto modula la actividad PDE de dicha proteína.
- 25 27. Método de la reivindicación 24 ó 26, en el cual el compuesto reduce la actividad PDE.
28. Organismo no humano modificado genéticamente que comprende el vector de la reivindicación 14 y en el donde se ha desactivado al menos un gen PDE endógeno.
29. Método para detectar la infección por el parásito *Leishmania* que comprende determinar la cantidad presente en una muestra de un sujeto de al menos una proteína de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
- 30 30. Método para detectar la infección por el parásito *Leishmania* que comprende determinar la cantidad presente en una muestra de un sujeto de al menos una molécula de ácido nucleico de cualquiera de las reivindicaciones 5 a 9.
31. Método de la reivindicación 29 ó 30, en donde el parásito *Leishmania* es *Leishmania major*.

1/62

1 MLDFLEQLQQ LASVYAICGN AVSVMAGMSD TAEELTFRSY DSLEGASYIC
51 NLNEKALHTA KASLCDNADW SSFEREVQLA FNSGRVTVQP GNAHRVAVNA
101 AAPVSADSKG LACSMEVHCL SGSGEKCATF VLERTTEDQQ KYILESMLQA
151 HHMYNHPKEY EQKLLHIMEA KEIACTKREA LDRELVALND NLTRNKHKQK
201 INNERKEELL KKLGGYSTEN TGNPWQAIQE QQORTAGENT KSRLPSP LGN
251 RTCKDFDLVL FRMIKSRWLS PEQCDASSPA NRVVQPYske DLAIQVSQLS
301 GSRAAIWKAL DSIDSWSYRV FDVQAAMSGD DYLSLSTQTH GGSLLITMYA
351 LLCMHDFLQK FKIDEQIALN WISAVEASYH GNPYHNSMHA ADVLQITDFI
401 ITQGGLAKRC DLSDIQVFSA LLAAASIHDEF HPGINNNFHI KTGsyLATLY
451 NDRSVLENLH VSSVFELMKN PAFNILASFS DEQHHEVRET MIEMVLATDM
501 GSHGKYVASL KGKMQEHSSF TQTAEQNLCL AIALKMADIS NCGRPLDIYL
551 RWGAKVSDEF YQQGDRERNL GLECSPPFMDR LQPSLAKSQI AFMNYIITPF
601 FEQVAELLPD MRFAVALVEE NKAYWANHDD S*

FIG. 1

2/62

1 TGGCTACCGC CCTGCCAGCA AGTACCGGAG GCGCCGGCTC GTTTCTTTT
51 TGTGTCCTTT TCCAAGCAAC TGACGGGACA CGTTTCAGTG CATGCCATT
101 ACCACGATGC TTACGGTGAA GCACGACCGT GCACATTCAC TCAAGGTATT
151 GTGAGCGCGA ACAAGCAAAT CCCAAACAA GCCGCTGCG TATGTCTCTG
201 CAGTTTCCCA TGTGCAAATC TACCTGTCTT CGACTCTGCC GCCATCCTTC
251 TCTCTTTCCCT AACTCTGTTT CTCTTTCTCT GCAACAGAGC TGAAGTCTGA
301 CGCGCTTCTC GTTCTTTTCGT TTTTTCCTT CTTCCCCCTT TTTTTCGAG
351 CTTCTCCCCA ACACGGTTGG TCGACCGCTC CAGAAATAA CAGCAAGAGG
401 CGAAACAGTA ACGNAAACAC CCNACCCACC CACCCACTCA CCAACAGGC
451 GGCCGAAAAA AAAGACTCCC CTCTGAACTT TTGCTTTTCG TTGCTCTTCC
501 TGCGGTGCCG CGCTCTAGCA GCGGCAGCGA TGCTCGACTT TCTTGAGCAG
551 CTGCAGCAGC TGGCAAGTGT GTACGCCATC TCGGCAATG CTGTCTCCGT

FIG. 2A

3/62

601 GATGGCGGG ATGAGCGACA CGGCAGAGGA GCTGACGTTT CGTTCCTACG
651 ACAGTTTAGA AGCGCCCTCC TACATCTGCA ACTTGAACGA GAAGGCTCTT
701 CACACAGCGA AGGCCTCGCT CTGGGACAAAT GCCGATTGGA GCAGCTTCTT
751 TCGCGAGGTT CAGCTGGCAT TCAACTCGGG TAGAGTAACC GTGCAGCCTG
801 GAAATGCTCA TCGAGTCGCC GTTAACGCCG CCGCGCCAGT TTCCGCCGAC
851 TCTAAAGGCC TAGCATGCTC GATGGAGGTG CATGCTCTGT CCGGGTCAGG
901 GGAGAAAGTGT GCAACCTTTG TGCTTGAGCG AACCAAGGAG GACCAGCAGA
951 AGTATATTCT CGAGAGCATG CTGCAGGCAC ATCACAATGA TAACCAACCG
1001 AAGGAGTAGC AGCAGAAAGCT GCTCCACATC ATGGAAGCCA AGGAGATAGC
1051 GTGCACGAAG CGCGAGGCAC TTGATCGTGA GCTGGTCGCG CTGAACGATA
1101 ATTTGACACG CAACAAGCAC AAGCAGAAGA TAAACAACGA GCGCAAGAG
1151 GAGCTTCTAA AGAAGCTCGG CCGTTACAGC ACAGAGAACA CCGGAAATCC

FIG. 2B

4/62

1201 GTGGCAGGCG ATTCAGGAGC AGCAGCAGAG GACAGCTGGC GAGAACACGA
1251 AGTCTCGGCT GCCGAGCCCG CTCGGGAACC GCACCTGCAA GGATTTTGAT
1301 CTTGTCTGTGTTTCCATGAT CAAGAGTCGG TGGCTGTAC CGGAGCAGTG
1351 CGACGCATCC TCGCCCCGGA ATCGCGTCGT GCAGCCGTAC TCCAAGGAGG
1401 ACCTCGCGAT CCAGGTGAGC CAACTCTCAG GTAGCCGAGC TGCATATGG
1451 AAGGCACTGG ATTCCATCGA CTCATGGAGC TACCGCGTGT TTGATGTCCA
1501 GCGGGCTATG AGCGGTGACG ACTACCTCTC GCTCTCGACG CAGACGCACG
1551 GCGGGTCTCT CCTGATAACC ATGTACGCAC TGCTGTGCAT GCACGACTTT
1601 CTGCAAAAAT TCAAGATTGA CGAGCAAATT GCGCTCAACT GGATCAGCGC
1651 AGTGGAGGCG AGTTACCATG GCAACCCGTA TCACAACTCG ATGCACGCCG
1701 CGGATGTGCT GCAGATTACG GACTTCATCA TCACACAGG AGGGTTGGCG
1751 AAGAGGTGCG ACCTAAGCGA CATCCAGGTC TTCTCTGCCT TGCTGGCTGC

FIG. 2C

5/62

1801 CTCGATCCAT GACTTCGACC ACCCTGGCAT CAACAATAAC TTCCACATCA
1851 AGACAGGCAG CTACCTTGCT ACGCTGTACA ACGATCGCAG TGTCTGGAA
1901 AATCTGCACG TGAGCAGCGT TTTTCGAGCTC ATGAAGAACC CAGCCTTCAA
1951 CATCCTAGCC AGCTTCAGTG ATGAGCAGCA TCATGAGGTC CGCGAGACGA
2001 TGATAGAGAT GGTGCTGGCG ACGGACATGG GCTCTCACGG AAAGTAÇGTG
2051 GCGAGTCTGA AGGGCAAGAT GCAGGAGCAC TCTAGTTTCA CTCAGACCGC
2101 CGAGCAGAAT CTCCTGCCCTCG CGATTGCTCT GAAAATGGCC GACATTTCAA
2151 ACTGCCGGCG CCCGCTTGAC ATTTACCTGC GCTGGGGAGC GAAGGTGTCTG
2201 GATGAGTTCT ACCAGCAGGG CGACCGTGAG CGCAACCCTGG GCCTCGAATG
2251 CAGTCCCTTC ATGGATCGCC TTCAGCCGAG CCTTGCGAAG AGCCAGATTG
2301 CCTTCATGAA CTACATCATC ACTCCCTTCT TTGAGCAGGT GGCCGAGCTT
2351 CTGCCCCGATA TCGGCTTCGC GGTGGCTTGT GTGAGGAAA ACAAAGCGTA

FIG. 2D

6/62

2401 CTGGGCCAAC CACGACGACT CGTAGAGACA TCCCACTCAC CGCCTTTCGT
2451 GCGGCACCTG TTTCCCTCACC GCCCCCTTTT TTTCGTGGTG ACGCGCTCTT
2501 TGTGGATACA CACACACACA CACACACAGA CACAGTCTTC
2551 GTTCTACCTA GTGTACGTC GGTTTCTTC ACCGGAAGCG GGGCAAGGAT
2601 GTATATACT ATTTCTCTCT CTGTGTCAG CTCCACCTT CACTGCCCTC
2651 CTCGTTGCCCT CTCCTTGCGA TGTATTATTA TTATTTTGT TGTTCTCGCC
2701 GATTATTCT TCCACGCTGA TGGGAAGGTG TAAAAGGCGG AGGAGAAGGG
2751 GGAGAGGAGT TGAAGGAAA AGGAGTAACA CCAACTGGAA CCTCACTCG
2801 TTTTCTTTT CGCCTTTTGT TTCCGTATCC GTCAGTCTC CTTAATTTT
2851 TTTTGTGGTA TGAATTTGCT GAGTTGTCCT CTGAAGTGC GAACACTGT
2901 AATCCCTCTG GTGGCTTTTG ACACGTGTGT GATGAGCTCC AACTTCTCT
2951 TCTTGCTTCC TTCCCACTTT CTCGTCTTCT CACCCTCCAT TCTTCACCTC

FIG. 2E

7/62

3001 ACATGTGCAT CTGGCGTGTG TGCACGTATG CGTAACGAGC CTGTGCGACA
3051 CGCTTCTTCG CCTCTCTCAT GCTTTTGTTT GTGCATTTC TTCATGCCAA
3101 CCTCCGTGTT TTTATGTTCT ATTTTACGC TTGCTTTCAA CCTGTGTGT
3151 GTGCTTCCGC CGCCGTTTT ATTTTCCCT CCTCAGTGGT TGTGTGTGT
3201 GGTAACCGAA TTGCCGTTTC GCACATACGC GGGCTTCGCC TTGACGAGGT
3251 TTACCTCTCT CTTCCTTCC CTGGGTTTGT CGCAGACCGC CCTAGCTCCC
3301 TCCCTTCCCC ACATCCCTCC CGATCCTTG GCCCCCCCTG TGCAAAACAA
3351 GAAAGAGAGA GGGCACCGTC CACCTCCTC GGTCTCTCT GTTTCTTCG
3401 CCTCTTCGAT GATGCGCTTA GTTGACTGA CGCGTGCAG CGGTAGCGT
3451 TTACATGCTG TTGCCTTTT TTTTGATTT CCTTTTGACG ATTATGTTT
3501 TACGCGGCTT GCGTTTGGC GCGACAAGCC ACTACTCTGT GAAGAAAAAC
3551 AAACAAGAAA AGCGTTGTC AATGCGAAG GGTGCGCTAC TGGAGATGGA

FIG. 2F

8/62

3601 GATGAGCGTT GGTGTCATCT TCGTTGGTGC TTCCCATCGC TGAGTTCATG
3651 CATTGCGACT TTAGGCCCTTA TCCAAGGTCT GGCCGGCACT TCTCCACAAG
3701 GATTTGTCA CTGCCGTATG AACTCGGTAG CCAGGCTATG ATTCCCATCT
3751 CTTGCTTCTG GAGCACAGCG CAACCCCCC TTTGCATCCT TCTCTCTCG
3801 AGTCCAACGG CTCTTCTCCC TTCTCTCCTT CTCTCTTCC GCTGCCCCGCC
3851 TTCGTCGACG TTTCTGGGTT TCATGCCACT CCCCCTTCC CTGCACGGAG
3901 GAAAAGCAGA AGTACAGTTT CTCAAAATCT TGTCTCTACA CGGCTTGCCA
3951 GTGTCCGCAC TCGTCCCGTT ACTTTCACAC GGCGCACACG ACGACACTTA
4001 CCCCCCCCC TACACACACA CACACACACA CACACACACA CACACACACA
4051 CACTGCACAG TGTACGGTG CATCATCTGA AACATTTTC CTTTTTTCCT
4101 TTTCGGGAA CACATTCTTT CTCCTATTA CTATTTGCT TACCCTTGTT
4151 GGCAGCCTGC TACCATTTTT TTGTTTCCGT TTCCTTGTGT TGGCGATTAT

FIG. 2G

9/62

4201 ATACATATAT ACATATATGT ATATATATAT ATATATGTGT ATATGCTTCG
4251 ATCATCGTGG GTCTTTTGCAT CCGTGTGCAC CTCTCGCAAC ACACTTCTGT
4301 CAGCGCAATT GTCTTTTGA AAAGTAGATT GTTGCCACA CACTCTGCCA
4351 TAGCGCGTTT TCCAGGGACG AGCTGCAGTC TGCACACTTC ACCGCCTCAT
4401 CACCTTGACG TTATTATTAT TATTTAAGC TTCCCGCAGA GTTTGTCTGC
4451 AAGTTGACCC AGAGTCTTTT ACTCGAGCGC ACACCATCAA ACATCAGCCA
4501 TGCATCTTTC TGAGCTTTGC CGGGACTCCA ACATCGACGT GATCATCGCT
4551 CGCCTTCGCC AGGTAGCACC CCTAGAGCCT GCGCCGGCTT TCTCTTTGTC
4601 CGAAGGAGCA GCAGATGACG ACACAACTCC CGCAACTGGA CACTCGGACT
4651 TTCATGGGCT GTGGAGCTAT CAGGACAATG ACGGGCGTAC AGCCTTCCAT
4701 TGGGCCATAG CGCTCAAGAA CTTCGACCCTG GCTCGCAAGT TGATGCAGGC
4751 ACCGTACAAT TCGCCTGTGC TGACCGAAGA TGAGGAGTGG AGCACACCGT

FIG. 2H

10/62

4801 AATGTTGAC CGGTCGAAGA ACACGAGCTG GCGCGTGGGC AGATTGGCTT
4851 CATCGACTTC GTAGCTGGCA AGTTCTTCCG GGATATTGTG GGCAACCTAT
4901 TTCATGGAAT GCAGTGGTGT GTGGACACGG TAAACTCCAA CCGCGCAAAG
4951 TGGCAAGAGA TCCTGGATGG CCGCCGCGAC TCCATCCGAT CCTCGATTGT
5001 TTAAGGCATC GGTCCC GCGG TATCGTTGAT GCCGTAATAG CGCGCGGAAG
5051 TACTCACGGC GAATGTCTTT CGAGAAGTGA AAGCGGTGAG CTCACTTGTC
5101 ACTATGGACG GATGAGTGCC GTTGGTCGCC GCTCTGCTGT GCGTGTCTAC
5151 GCGTCTTATC CCCACCTCAG TATGTGCACC GGGCCGTCAT TTCCCTTTGT
5201 ACCCGTCGCT GTATCCGCGA CCGGGGATGG TTTGTGTGTT GGTGAGTCTC
5251 CCTCTCTCTG CACCAGGGCC TGTCTGGTT GATGGCGCC TCTCGCACTG
5301 CTGAGGACAA GGTGTGGCAC ATGTGGGCGT GTGAGTCGTG TTTTTTTTTT
5351 TTGGCTCTCG TCTTGTCTCC TCTCTCCTCG CTATTAGCCC TTTTCTGAAC

FIG. 21

11/62

5401 AGACCTCTCT CTCTCTCTCT GTCGTCTTT CGGAGGAGTG GTTTGCCGTT
5451 GAAGGCTGAA CCGTACGAAG GGGAGGAGT GAGCAGTGCA GGTGCACACA
5501 CACGCACCAC ACCTAATTCT CTCTTCATCC GCCTTTCCCTT TTTTCCGGT
5551 GTGTGTCCCG AAGATGTTT CCTGTCTTG CATCCGTTTCT TCTCCCCCTT
5601 TTTTCGTGTG TCTGTCTTTT GTTGTTCGTC ACGAATCTCA CCCGCCCTCCC
5651 TCCCCCCTCT CCATTTTTT CTCTCGTAGG TGTGTGCATC TGTGCTCCTG
5701 GTGAGACGGA GTGGAGTGGG GGCACCCCGC AGCGCGTGGC ATCTCTCCCC
5751 CCCCCCAGGT GGGGGGTCT TCGTGCACCC AAATCTGTC TCTGGGAGG
5801 AAGCTCAGCG GCGCACCCCC ACCCCCACCC CCACCCCTCTC CCTCCTATAT
5851 CCTTGCCAGT GCGGAACCGC TTCTCCTGGC GACAGGGTCA AGCACCTATA
5901 ACGCAGGGAG GACAGAGCAA GATGTCGCTG CGGATGTCGG CCGTCAGGTG
5951 CCGGATGGCG TGGCGCCGGA GCGACCTGCG ACAGCGCACA CGCACGATTC

FIG. 2J

12/62

6001 ATGTGATGGG CAGAGTGCCG GCGTGACTCG AACGCATCCC ACCCCCGGCC
6051 CTCACACTGT CCTGCTGCTG TGGGAGCCT GTGCCATCGC GATGGAATCG
6101 CACCGTGTGG CGACCGGCAC AACGTGAGCG GCTGTGGGC GACCTGTGAG
6151 GCGGGGTGGG TGGGTGGGTG GCGGGTAGAG TTCGAGGCTG AGGCTGTGCC
6201 CTCAGATGGC CGAGTTGGCG CGTTGCGGTC ACGTGTGTCT CTGCAGCTGC
6251 TTCGCACCAG GCGATAGAGG CCTGTGACAG GGCCGGTGCA AGAGTGGGGC
6301 TCGACCTCAT GTTGCAATGAC AGAGAAATGA ACATGCTGTA ACTCCCCTCT
6351 CCTTGACTCA TTTCCATCTC TTGTGTCACC TACTACCTGT CCTTCTCAGT
6401 GTCTTGGTGC ACTTGTGACG TTCTCGCGTG TCTCCTCTTT TCTTTTCTTC
6451 TCGAAGTTTT TTGGGTCTGC AGAGAGAGGC GATGGGAGGA GGAGCAGCCA
6501 GGCTTGCGTT GTGTGATGTC GAGAAGAACA ATGTAACAGC TCTTCTCTCG

FIG. 2K

13/62

6551 TTGTCCCTCCT TCCTCCCGCT TCTGTTCTGGC GAGGAAACA GCAGACTTGT
6601 GTAGCACAAG ATGCTGCTGG CGCCTGCTGT GTGACATGTG CGAGGAAGCC
6651 TCGCGCAAAC CGTTTGTGGT CTCTGGAGGG GGTACTGCGA GCGGGAGGAC
6701 AGGGCGAGGC AACGTGTGCG AGATAAGGTC GTGGCACAGA GAGGATACGG
6751 CTATGAGAGG GCTGTGTGCT GTTGGTGTTT CCTCAACGTT CGTGCTAAAG
6801 GTCCGTCCAA AGGTGAGGAA GTTGGGACGA GGAAGCATGC ATGGACGGTC
6851 TCGTGGCCTC ATCACCTCCT TTCGGTGCCA TCATTACCAC CCCTCGCTCC
6901 GCTTCGCCCTG CACCACAGTG AGCGTGCTTT GGAGGCCATC GCAACCCGCA
6951 TGCTCACCCAC ACCCGACATT GCCGCCGTAG TCGGTCCCTGT GACCGCCTTT
7001 CCGTCCAGCG CTGGTCTCTA CTCTGCAGC AATAGCGACT ACCACAGCCA
7051 CAAGCGCGTG GAGTACGTCT GCCGCACCCT GCACGCTGCT AGCGCCGTGT
7101 CATTTCAGGA GGTGGTGTCG GCGATACCGG TGTTTGTGCT GGATGTGCAG

FIG. 2L

7151 CCGCAACACA CTGTCGTGGA TCTCTGCGCG GCACCTGGCA GCAAAACAGT
7201 GCAGGCCCTTG GACACCATGC TGAGCGGTGG GTGGTCTGCA GACGTCTGTC
7251 GAGGGGTGCT CATCGCCAAC GAAAGGACA GAGTGAAGGC GACGCAGACA
7301 CTTCCGGCGC GGCTGAAGCG CTACCACGCC CCAAACGTGA TGA TACCCG
7351 ATGCGACGGT GTGCAGTGGC CTCGTTTGTA CTTTAACGAT CCTACGAACC
7401 CAAGCAGCGA GCCGCAAGAA CGGCGGTTTG ACCGCATCAT CTGCGACGTC
7451 CCGTGCAGCG GCGACGGCAC CATCCGCAAG GAGTGTCCA TCGCCACAAC
7501 ATGGTCGGCA AGCTACGTGA AGTCCCCTCGT GCCAACCCAA CGTGCGTTGC
7551 TGTGCCGCGG CCTTGACCTC TTGGCCACAG GGGGCATTCT GGTTTACAGC
7601 ACGTGCAGCA TGAATCCGAA GGAGGACGAG GAGGTGGTT GCGTCGGGTT
7651 GGAGGCTTTC GCGACACAGTG TCGAGCTCAT CGACGTGAAT GCGGTTCTAC
7701 AGGAGAAGG ATTTCACCTG CACTCGGCAG GAGGGATTCT CTC CCCC GAAT

FIG. 2M

15/62

7751 GTGGAGGGGA TGCAGCACCC GGTGCTGCCG CCGACGTACG ACGGCAACAA
7801 GGTCCTGCGC ATTTGCCCGC ATCGTGATGA CACCGGCGGG TTCCTTGTGG
7851 CGGCTTTCCG CAAAGCAAAG CAGCCAGACC GGACGGCGCC CACAGTGATT
7901 CGACACAAGC TGAACCACTG GACGAAAGGC AAGCTGTGGG CGCCAGTTGG
7951 CGTCGAGGAC GAGGCGTGGG CCAACATATC AACCTTCTAC GGCTTTGACC
8001 GCCGCGACGA AGCGAACTTC GTCTACTATG ACGCCACTAG CTCTTCGTCC
8051 GGGAAAGGCC TCGTGCCCTCT GTATCACCTC AATCCAAATG GTGGGCCCTAT
8101 ACGCCGCATC GTGCTCTCGA CTCCGGCGCT GGCGGATATG GTGCTGCCGA
8151 CACGTCCGTA CAAGGCCCTT GGCGTGGAGG TGGTGTCCGT CGGTATGCGC
8201 GCGTTCGAGG CATAAGACGG AAGGTTTTTG CCAACTGCGG CCTGCCGGTG
8251 GCGGCGCGTC GTTAGTCCG CCTCTTTTTT GGCACCGCGC TTACTGCCC
8301 GAAGGCTGCA CTCCACGTT TCGAAGCACA AGCAGCTACT CGAGGATCTG

FIG. 2N

-16/62

8351 CTCCGAAACG GCCACGTTTA CACGCGAGAT CACTGGAGGA CAGTGTGGG
8401 TGGAGATCCT GCTGTTGTAG CCGCTAACGC GAATCCGAAG GCGCTGGTCA
8451 AGCCTGGCAG CCGACTCGAG GCGTTGCTGA CGCAGGGCAG TAGTGAATCT
8501 ACCATCTCTG ACGAGGAGGT GCGGGTGCTG CTGACAAGCC ACGTGGAGGT
8551 AGGGTGCGTT TTGGTGGGCA TCCTCTTCGA CGAGCCGACC GATGCAGCCG
8601 CTGGTCCGTG GTACATGAGC GCGACGCTGA GCGGGCACAA GCTGGAGCTC
8651 GCCATCGATG GCTCTCTGCG TGCGTTCGGG TTGATGACGT TTTTGGCAT
8701 TCACGACGTT GAGCGTGGCT CGCTGGCCGG CAACAACATC GGCAGTGCGG
8751 TCGCAGACGA AGAGCCTGAG GAGCAGGCAA AGGAGGTGTA GCACCGAAG
8801 CTTCACACGG CGTGTGTGCG CATAACTCCT GTGCTTTCAC TGCAGTGGCT
8851 TATCGAGACT ACAGTTACAT TCGATTCAA TCGAAGAGGC CATGGAGCC

FIG. 20

17/62

8901 GTCTGCACTG TTGATCCTTC TCCTTTTTTT GCGTATGCGT ACTATTCTAA
8951 GCGAGTAACC GCATCTTCAC TGAATAAACC GCCAAACTTC ATGAGTCGCA
9001 GGAGCAGTAT AATTGTCGCC GAGCCCCTCA TCACGTGTAT GAGGGGCGAA
9051 ACGAAAAATG ATGAGAGGCG ATGCATGGCT TTCAATAGC CGTGACGCGT
9101 CCGTGTGTGC GCTGGATTTC CTGCTCTGGC TTTTCCACGA AGGGGATGGA
9151 TCGCGCAATA CACGCGCGTT GGAATGCACG GCCATTCTCG CTCTGTGCTC
9201 CGGCGTCCTC TTGAGGGTGC GGCTGGTGTT GGAGTGGGT TGAGGGTTCG
9251 CGAGAAGACG CGTGCTTTCT GAACAGCTCA CGAGCAGAGC CTCTGCTACT
9301 TGAACCAACT CTCCTCCACT ACGAACGCTC TTTCGGTATC TTCAATCCAT
9351 CTTCTCTGTC TTGCTATTTC GTCTTCGTCC ACCTTGGCTT CACGAAGAAG
9401 GGAAGCCAAG CCTCAGCACA CAGCAACATC CGCACAGCC GTACCCCTTA
9451 CCACCTCTGT GGTCCACTC CATCTCCTTC ACTGGGTAC ACGATATAAT

FIG. 2P

18/62

9501 CGGCGTTTTT CTTCCTGT GTTGCCCTCC TTTCTCTCTC GTGCTCCTGT
9551 TGGGCCAATT CGATACGCGC AAGCGTCGCT ATTTCGTGCT TTACATCTTG
9601 CGTTGGTCTC GCCCCGATTG CTCGTGGCAT TTTCTCGTCA TCGTTTTTCC
9651 GTCCTCCGTAC GTTGCCGTGT TTCTCTTTAC TTCTATGGAG GCACGTTGTG
9701 CATCTTCGCC CCTCTCCGCT TCTTTGTCAG ACAGCGCGGC CAAGCGGAGG
9751 TTGGTCGGGT GCGCGGGCGG TCTCATTCT CCATAGCTCC GTGCTTTTAA
9801 TACACCCCTCC TTCCTCCCTCC CTGTGTTCCA TAACTCGTTA TTTTCTTTGT
9851 TCTGGGGGGG GTTCGACCCC TTTTGTGTA ATCAGCACCA TGCAGGTCGG
9901 TGTATATGAC AGAGATGATC AGATGTGCCA GTATGAGGGC TGCACGGAGA
9951 TCGATCTGCT GCCTGCCCGG TGCTCCAACT GCGACAAGCG ATTCTGCACC
10001 CACCATCTCT CCCACAGCGC ACATCGCTGT CCGGCCGTGA CGGATGTGCG

FIG. 2Q

19/62

10051 GGTCGGGACG TGCCCCATAT GCTATCGCGT TGTACCGTTG GAGTACCCGC
10101 GCCAATGCAT GGACGAGCG GTGTCCCGC ACATTGACCG AGGATGTCCG
10151 GATGTACCGC AGGGCAGCTT ATTTACGGC GCGCCTCTG CGAAGGGCG
10201 GCGCGGCCAG GCGAGAGTC GCCGCTTGGG CCGCTCGGA CGGCCGTGCA
10251 GCATTCAAGG CTGCCACGAG GCCTCCGAGA CGCGCGTGA AGTGTGACCA
10301 ATGCGGCCAG ACATTCTGCC TTCAGCACCG CGGACCTCTG CAGCACCACT
10351 GCCGCGCCGC CGCCGCCACG CGCAGGCCG TCGCGCCCTC CCCTTCAGAG
10401 CGGGATGCTG GCATGCTGGT GTCTCTGCCG GGTGACAAGG CGGTTTCCGT
10451 GGCATGTCTG CTCACTCATC CCGCCAACAC TCCCGAAAAG GCGGTGGGCA
10501 AGGCGACAGA GCTGCCCTCG GACATGGTGA CATGCCCTCGT GTGCTTCCTC
10551 ATACCCACTT GTGTGTCCAA AAAGGACGGC AACGCTGGCT GCGAAGAGTT

FIG. 2R

20/62

10601 CGAGCCGGTG CCCCCGTTCT TCATGTTTCAT GCCCAAGAAT ACAGCACTAG
10651 GCCGTCTCCT GGACACGGCG GTGGATCGTG CCGCCATGAA CTCACCGGCC
10701 GTGCGCACCG GAAAACCCCTG GAACTTGTTT GCCGTCACAC TGCCCCATCCA
10751 CGCCGAGGCC GAGGCAGCCT ACTATTCTCC TCTTACACTC TCGACGGTGG
10801 TGAAAAAGAG TGCTGTCGGC ATGGCGGAGC GCACTATTGT GTTCTCTCG
10851 CCGCTCCAAG CCTTGCCCGA AGCGGTGATC AAGCGGTGA AGGACTTGA
10901 TAGGAAAGGG TCGTGCCCGT CAACGTCATC GTCCTCCAGT CAAGGGTGC
10951 AAGTGATGTG ATGAGG

FIG. 2S

21/62

1 MAYFTAKRAS SMGASTVPSG NDHLLLEALTLCDCILSRYKR CGVQLNDAEA
51 AAFANLQORI SSISGHAADA ACPAGATRKQ SQELGLHEYA QLAQRCLIFQ
101 NPLAQIVATI NEEFSKLVSC SVRTHYANTN DAVLCDPVHD TVATIDTSTP
151 IGRCAKTKTT VTISDTVYIP LCYNSHVVGCVLEVESTAIDT STPFFGYLLQ
201 VAALTLQONAT SIDTLRWETR KAEAMVGMAT RLARDTLEES VLVQSIINTA
251 KLTLES DRCS IFLVKADGSL EAHFEDGNVV VLPAGTGIAG HVAESGAVVN
301 IPNAYEDDRF HRSVDKVTGY HTRTILCLPI AFEGTIVAVA QLINKLDMVT
351 QSGQRLPRVF GRRDEELFET FSMFAAASLR NCRINETLLK EKKKSDAILD

FIG. 3A

22/62

401 VVALLSNTDI RDVDSIVRHV LHGAKKLLNA DRSSMFLLDK ERNELYSKMA
451 DSANEIRFPC GQGIAGTVAE SGVGENIMDA YADSRFNSAV DRQLGYRTQS
501 ILCEPITLNG EVLAVVQLVN KLGDDGSVTC FTPTDQETFK VFSLEAGISI
551 NNSHLLFAV NAGREAMTLN LQNSITAQR APKSVKVIAV TPEEREAVMS
601 IDFGGAYDET SPGFNLFEVR EKYSEPMDAA AGVVYNLLWN SGLPEKFGCR
651 EQTLLNFILQ CRRRYRRVPY HNFYHVVDVC QTLHTYLYTG KASELLTELE
701 CYVLLVTALV HDLDHMGVNN SFYLKTD SPL GILSSASGNN SVLEVHHCSL
751 AIEILSDPAA DVFEGLSGQD VAYAYRALID CVLATDMARH GDLSRVFDDM
801 AKAGYDSNDQ ESRRLVMETL IKAGDVSNVT KPFETSRMWA MAVTEEFYRQ
851 GDMEKEKGE VLPMFDRSKN NELARGQIGF IDFVAGKFFR DIVGNLFHGM
901 QWCVDTVNSN RAKWQEILDG RRDSIRPSIV *

FIG. 3B

23/62

1 CTGCGAGCGG GAGGACAGGG CGAGGCAACG TGTGCGAGAT AAGTCGTGG
51 CACAGAGAGG ATACGGCTAT GAGAGGGATG TGTGCTGTTG GTGTGTCCTC
101 AACGTTCGTG CTAAGGTCC GTCCAAGGT GAGGAAGTTG GGACGAGGAA
151 GCATGCATGG ACGGTCTCGT GGCCTCATCA CCTCCTTTTCG GTGCCATCAT
201 TACCACCCCT CGCTCCTGCT TTTTCGCCGC CATGCCCAGC GGGACTTTT
251 TTCGTCTTGT TCGCTTTTCT CCTCCTCCTC CTCCTCCTCC TGTGGTTGCT
301 TTCATGCATG TAATCTATGC GCGGTGTGCG GACTACACCG TCGCCCACCG
351 CCCTCCCCCTC TCCCCGTCTT TTCCCTCCTG TTTAGCGTTC TCCTTTTCTT
401 GGCACCCCTT CTTTTTCCCG AGCAACGCAA TGCCCTCCGCC TCCCCACCCC
451 GTATGTCGCA CCCCTGTGTC CCTTGCGCAC GCCTCTTACC GTACTGTAAAC
501 CCTTTTCGCG TACACGGGCA CCATCTCGGT TTTACTTGTA TATTAGTCTG

FIG. 4A

24/62

551 GCCTGCCAAA ATCATGAAGT CCACCACACC TGCCTAGTCC ATGCCGCCTA
601 TCTGTTGCCG CGATTCTGCA CCGCTCCTTA TCCAGCGCGT CGTTGGAGTA
651 GAATCTCCCG CTGGCCCGTC CCGTTGCCCT TGTATGGAGA CCGCCAAGAG
701 TTGTGGCACA TTCAAAGTTG CCCCATGTGC GACCCGGCGA TTAGGCAACT
751 GTAAAAAAG GAGCGCGGTC ATTACACAGGA GTAGACGGTG CGTCTGCCG
801 TGGCCTCTTT CGTGCTGCTC TCTCTCTATG CATCTCTCTC CTTCTCACGG
851 ATTACTCTCC GTGGCCACTG CGTGCCCTCC TGGCTGTTC CCGGCTCTTT
901 TCCCCATTG TGCCTCTTC CATCCATGCA CCCAATCAAA AAATCGGATG
951 CCGTCATGTC TGTCGTGCGT GCATCTCTGC ATCCGTCTGC CAGTGCCTGC
1001 GTGCGTGTGT GTGTGTGTGT GTGCGCACGT CAGAACCGTC TCAAGTCCCT
1051 CACCTCAGCG TCAATCTACC CTCATTGTGC TCGTCGGCCT TGACGTGTTT
1101 TCGGTCAATCG TTTCACCAAT GTCTCGGCTC AACGACCACA ATAGAAAAA

FIG. 4B

25/62

1151 GCATAGGGAT CGGAAAGCTG TGGCCTATAC ACGTTCACGG GTGCCCGCTC
1201 AGCGCTGGAC ACGTGCGCAC GTCCACCGCA TCACAGTGAG AGACGGAGAG
1251 AAACCAGCGT AGCGCCATGG CATATTTCAC GGCCAAGAGG GCGTCCTCGA
1301 TGGGTGCAAG CACCGTTCCG AGCGGCAACG ACCATCTCCT CGAGGCACTC
1351 ACGCTGTGCG ACTGCATTCT GAGCCGTTAC AAGCGCTGCG GGGTTCAGCT
1401 CAACGACGCG GAGGCCGCCG CCTTCGCCAA TTTGCAGCAG CGCATATCTA
1451 GCATCTCCGG CCACGCAGCA GACGCCGCAT GCCCAGCAGG CGCCACTCGA
1501 AAGCAGTCGC AGGAACTGGG ACTGCACGAG TACGCTCAAC TGGCGCAGCG
1551 GTGCCCTGATC TTCCAGAACC CCCTCGCCCA AATTGTCGCC ACCATCAATG
1601 AAGAGTTCTC CAAACTTGTG AGCTGTTTCAG TGCGCACGCA CTACGCCAAC
1651 ACAAAACGACG CGGTGCTATG CGACCCAGTG CACGACACTG TTGCAACCAT
1701 CGATACATCG ACCCCCATCG GCAGGTGTGC GAAGACGAAG ACGACCGTTA

FIG. 4C

26/62

1751 CCATTTCCGA CACGGTGAC ATCCCCCTAT GTTACAACAG CCACGTCGTC
1801 GGCTGCCTGG AGGTGGAGAG CACCGCAATC GACACGAGCA CGCCGTTTTT
1851 CGGGTACCTG CTTCAAGTGG CGGACTAAC ACTGCAGAAC GCTACCTCCA
1901 TCGATACACT GCGGTGGGAG ACTCGGAAGG CAGAGGCCAT GGTGGGCATG
1951 GCGACACGGC TTGCTCGAGA CACGTGGAG GAGTCGGTGC TGGTGCAGTC
2001 CATCATCAAC ACGGCAAAGA CGCTGACGGA GAGCGACCGG TGTAGCATCT
2051 TCCTGGTGAA AGCGGACGGC AGCCTGGAGG CGCACTTCGA GGACGGCAAC
2101 GTTGTGGTGC TGCCTGCCGG GACGGGCATC GCAGGTCACG TTGCGGAATC
2151 TGGCGCCGTG GTGAACATCC CGAACGCGTA CGAGGACGAC CGGTCCACC
2201 GGTCCTGGA CAAGGTGACT GGCTACCACA CGCGCACGAT CTTGTGTCTG
2251 CCGATCGCGT TCGAGGGCAC GATCGTTGCC GTTGGCAGC TGATCAACAA
2301 GCTGGACATG GTGACACAGA GCGGGCAGCG GCTCCGCGC GTGTTTGAC

FIG. 4D

27/62

2351 GGCGCGACGA GGAGCTGTTC GAGACGTCTT CGATGTTCCG TCGGCGGTCTG
2401 CTGCGCAACT GCCGCATCAA CGAGACGCTG CTGAAGGAGA AGAAGAAGAG
2451 CGACGCGATC CTGGACGTTG TGGCGCTGCT GTCGAATACG GACATCCGCG
2501 ATGTGGACAG CATTGTGCGG CACGTGCTGC ACGGCGCGAA GAAGCTGCTG
2551 AACGCGGACA GGTCAATCGAT GTTCTGCTG GATAAGGAGC GCAATGAGCT
2601 GTACAGTAAG ATGGCGGACA GCGCGAACGA GATCCGGTTT CCCTGCGGGC
2651 AAGGCATTGC CGGCACTGTT GCCGAGTCCG GCGTTGGCGA GAATATCATG
2701 GACGCGTACG CTGACTCGCG CTTCAACAGC GCTGTGGACC GGCAGCTGGG
2751 CTACCGCACA CAGTCCATCC TGTGCGAGCC GATTACGCTG AATGGCGAGG
2801 TGCTTGCCGT GGTGCAGCTC GTCAACAAGC TCGGCGACGA CGGTAGCGTG
2851 ACCTGCTTTA CACCCACTGA TCAAGAGACG TTAAAGTGT TCTCGCTGTT
2901 TCGGGGCATC TCGATCAACA ACAGCCATCT GCTGGAGTTC GCGGTGAACG

FIG. 4E

28/62

2951 CAGGTCGTGA GCGATGACC TTGAACCTGC AGCGTAACAG CATTACAGCG
3001 CAGCGTGCTC CGAAGAGTGT GAAGGTGATC GCGGTGACGC CGGAGGAGCG
3051 TGAGGCAGTG ATGTCGATCG ACTTCGGGGG CGCATATGAC TTCACTTCAC
3101 CGGGCTTCAA CCTGTTTGAA GTGCGCGAGA AGTACAGCGA GCCGATGGAT
3151 GCGGCTGCCG GTGTTGTGTA TAACCTGCTA TGGAACAGTG GTCTACCCGA
3201 GAAGTTTGGC TGCCGTGAGC AGACACTGCT GAACCTCATC TTGCAGTGCC
3251 GCCGCAGGTA CCGCCGAGTG CCGTACCACA ACTTCTACCA CGTCGTGGAC
3301 GTGTGCCAGA CGCTGCACAC GTACTTGTA ACAGGCAAGG CGTCGGAGCT
3351 CCTGACAGAG CTGGAGTGCT ACGTGCTGCT CGTGACGGCA CTGGTGCACG
3401 ATCTTGACCA CATGGGCGTG AACAAACAGT TCTACCTGAA GACGGACTCG
3451 CCGCTAGGCA TCCTCTCCAG CGGAGCGGG AACAACTCCG TGCTGGAGGT
3501 GCACCACTGC AGCCTCGCCA TCGAGATTCT GTCCGACCCC GCCGCGGACG

FIG. 4F

29/62

3551 TGTTTCGAGGG GCTGAGCGGG CAGGACGTTG CGTATGCGTA CCGCGCGCTG
3601 ATCGATTGCG TGCTGGCCAC TGATATGGCT CGCCACGGGG ACTTGTCGAG
3651 GGTTTTCGAT GATATGGCGA AGGCCGGCTA CGACTCTAAC GATCAGGAAT
3701 CTCGTCGCCT GGTGATGGAA ACGCTGATCA AGGCCGGTGA CGTGTCGAAT
3751 GTGACGAAAC CGTTCGAGAC GTCGCGCATG TGGCGGATGG CTGTGACGGA
3801 GGAGTTCCTAC CGTCAGGGTG ACATGGAGAA GGAGAAGGGC GTGGAGGTGC
3851 TGCCGATGTT TGACCGGTCTG AAGAACAACG AGCTGGCGCG TGGGCAGATT
3901 GGGTTCATCG ACTTCGTAGC TGGCAAGTTC TTCCGGGATA TTGTGGGCAA
3951 CCTATTTCAT GGAATGCAGT GGTGTGTGGA CACGGTAAAC TCCAACCGCG
4001 CAAAGTGGCA AGAGATCCTG GATGGCCGCC GCGACTCCAT CCGACCCCTCG
4051 ATTGTTTAAG GCGTCGGTCC CGTGGTATCG TTGATGCCGT AATAGCGCGC
4101 GGTGGTGCCG TTGCTCCTGG TCGGAAAGT GTCTGTGAAG TGCAGGCGCT

FIG. 4G

30/62

4151 GTGTTGACGT TGGCGGCTGT GCTTATCTAG GCGAACGCTT GTGTCATGGA
4201 TGAGCAGCAG GTTTCGAGCA GCGGTGCAAT GCGGGCGCTG GAAGGGGAA
4251 TGTTGCAGTG TTGTTGGGGT GTGTGGCTAC AATGCTAAGC GTCGTGCGGT
4301 TGGAGCTTGT TCTCATGTGT TGCTTCTATG CTACCCATTG GATGTTCAAT
4351 CGCAAAGGTT AAGAGACTGC TGCTGTGTTT TTTTGTGCT GTACAACTCT
4401 TCTGCTTCTT CTCCTGTGT TGCTGCTGCT GTCGCCCTCG TGCACCGCCA
4451 CTCGGCCCCC TTCTTCCGTG GCCCATGCT CGTGCGTACG TGTGCGTGAA
4501 GAGGCACTGG CCGTGTGGC GTCCGGCCCA CCCCACCCCC CGGCAGGCCA
4551 CACGCATTG GAGACTACCC CCTCTCGCCT CTCTCGTTT CGTTTCGTTT
4601 TTGGTTGGTT CTCCTGTGCG TTGTTGGT CCTCTGCACT GTGCGCTTGC
4651 TCGTATTTAT CCCTTGCCCTC TGTTCCCTGT CCGTGTAATC GGATGCACCA
4701 GCCACGTGTG TATGCCGGTG TCTGTAAGTG AAGAAGTCAG AGATTGGTAC

FIG. 4H

31/62

4751 GCTTGTGCAC AGACTCAGAT ACCCATATAT ATGCCAATAA AATCGATTAT
4801 TGTATCTCGG CCATTACCA AGCCCTCCCT CCCCCTCGCC CACTCCCAT
4851 CCGAGTGTGC TGTACTTTGT TTCTTCCCTCC TTCTTCAATT TCTCTTCCCC
4901 CCCCCTCTCT CTTGATTTCG TCCCCCTCCC GCTTCTCGCA CGAAACGACA
4951 GGAGGGCGGT GCGATGTGGC TGAGGCCGAT GCTGGAACAC TGGGAAAACG
5001 CCGCAGAAAC GTCTTGGATT TAGATCTGTC TCACCCCTCCC CTATACCTAT
5051 CTCCTCCGCC ACCAGTGTAG GCGATGGAGT GTCTATTGTG TGGTGGACGG
5101 TGCTCCTGTT GGGTAAATGG CCTGTAGGAT GTTCGAAGTA CGTGTTCTTC
5151 TCAGCACAAAC GCTGGATGTC CTGCGCTTGC CACCGCGTCT GTCTCCCACA
5201 TTCTCTGTAT GTTTCACCTT CTCTCTCCCG TTGGCACAAG GCAGGCATCG
5251 AGCGTGTGCG TTCTTTTCTC TTGGCGATGG CGCAGCGTCT GTGCTTCTTT
5301 TCGTCTCTGC TCGCTGTTAC CCTCCCGCTG TCAGTGGGCC TCTCTTGTTC

FIG. 41

- 32/62

5351 TACGACTTCG CGGCTCTGTT CCACTCCCCC CCCCTATCT CCCCCCCCC
 5401 CACACACACA CCACTCCCAT CTGTCGCGT ACTATATGCT CAATGCTGAG
 5451 CCTGGGTTCC AAGTGGTTCT CTGCTCTTC GTCGTCCCCG TCTCGCGCTC
 5501 TTGTCTCTCT TTTCCCGTTA CGGTTCCCTG TCTGTCGCCA CTTTCTCGGC
 5551 ATCCCCGACC CGATGTACAA CTCAGCCCC CCCCTAGGGC TCACCTCCGT
 5601 CTTCCCTCCTC CCCGAACCCC ATGTGACGTC GCTTCTCTTC TCTCTCCCGA
 5651 TTTTGTGCTT CCTTTTCTC TTTTACGATT GGATTGCACT TCTTCGTGCT
 5701 TCCGCGTATG ATAGGACGCC GCGTGGCCC CCCCCCTTC CACCTCCCGC
 5751 ACCTTCTCTC CGTCCCTCTT CCCACGTGTA GCTGTCCGTG CTTTGTGCG
 5801 AAGTCGATGC AATCAAACC AAGCTGTGTG CGCGGAAGGA GAGCGACAGA
 5851 GAGAGAGAGA GCGAGCGAGC GGAAC TGAG AAGTGCCCGC TCACCAACAG
 5901 AAGAGGAAAG AGCGGGGTAC GTTACACCAC GAGCCAAAGC GAAAGAAAAG

FIG. 4J

33/62

5951 TAGGACGGTA CCGCACACAC TCGGTACGC CCGGAGACTC GTTCCCTCGC
6001 CATGACCGCC GCCAAGAAG CCGTGTTAGA GTGAACCAGA TTGTTTCTGA
6051 GTTGCTCCCC GGTGTGCTTG GCTGCGGCAG CACCTCTCCC CCTTCACGTC
6101 TCGGCGGGC CACGCGCGGT GAGAGGGCGT AGACACACCA CGCATGGGAG
6151 AAGACAAAAC ATGAGATGAC GAACACCTCG TCGGTGCTG AAAGCAGTGC
6201 TAAGTAGCGT CTTAAGGCA CCCACAGGA CGACTGCTCT GTCGGCGACT
6251 TCTATCCAGA TGTGTTATC CTCGTGTACC TCTCCCTTGA TTCGCCCTGTG
6301 TTCCACGCAC GTGCTCCACC TCATCATACT TTAATGATCC TCCCCCTCCT
6351 CTTCCCCCTGC TCTGCGACAC CTTCTCTTCG AACTTGCCA CGACCTGTGC
6401 GTGCGCCCTT CTCCCTCCTC TCGCCACGTC CTGCCCCACT TCGACACCCCT
6451 GGGAAACTTG CACGTGCTCG TGCACGCGGCG CGTTTGGCAC CTCACCCATC

FIG. 4K

34/62

6501 TCCCACACGC CGACATACAT ATGCCCCCGCT CCTCGCTTCA GCAATAACAG
 6551 GTTAGGCATA CACACGTACA CAAGTGCACT TCCATCACTA CAACTCTTTT
 6601 GACAGGACTA CCACCCTTT ACAACCCTCC CCCAACACGA GAAATGACTG
 6651 GAGAAATCAG CGAGAAGGCC TTCCCTCTTT CGACGGACCG CCTCAGCCAG
 6701 ACCATCCCTCG ATCTCGTGCA GGAGGCGAGC AATGCCAAGA TGGTGAAGAA
 6751 AGGTGCCAAC GAGGCCACCA AGGCCTTGAA CCGCGGTATT GCGGACCCTGA
 6801 TAGTGTTGGC GGGTGACACG AACCCGATTG AGATTCTCCT GCACCTCCCC
 6851 CTCTTGTCG AAGACAAGAA CGTCCCCTAC GTCTTCGTGC CGTCCAAGAC
 6901 GCGCTTGGC CGCGCGTCGC AGGTGTCTCG CAATGTCGTG GCGCTAGCCA
 6951 TCCCTTCAGG CGAGAACAGC CCTGTGCGG CGAAGTGCA GGCAGTGAAG
 7001 CTCGAGATCG AGCGCTTGCT CTGAGGTGTT TTTCCCTTGCT TTCTGTTTGT
 7051 AATTTTTTT TGTATTGCG TGTCCCTGT GTTCTGTTC TCCTT

FIG. 4L

35/62

1 MHSVFPDA PYCGAAGSNH LCEAVALCQS ILARYRRTGT SFSSTELKAI
51 QALRTEFPDT AQEPAANSAA SPDQTTKDEL SILDDATDVP HNPQNDIVAF
101 VEECCDNTKE PTVLFAAINE RISAVTCSRN VRTYMVIANL NLLWDPVNGV
151 AALIDDDVTPL GKCAQARNML TIANLYIPL WFRSELVGCV EVPGACIPRD
201 KATCAQLLLR CVTVAVRNSI NISIRKREAN KIEAMVGMAI RLARDTLEES
251 VLVQSIINTA KTLTESDRCS IFLVKADGSL EAHFEDGNVV VLPAGTGIAG
301 HVAESGAVVN IPNAYEDDRF HRSVDKVTGY HTRTILCLPI AFEGTIVAVA
351 QLINKLDMVT QSGQRLPRVF GRRDEELFET FSMFAAASLR NCRINETLLK
401 EKKKSDAILD VVALLSNTDI RDVDSIVRHV LHGAKKLLNA DRSSMFLLDK
451 ERNELYSKMA DSANEIRFPC GQGIAGTVAE SGVGENIMDA YADSRFNSAV
501 DRQLGYRTQS ILCEPITLNG EVLAVVQLVN KLGDDGSVTC FTPMDRETFQ

FIG. 5A

36/62

551 VFSLFAGISI NNSHLLFEFV NAGREAMTIS LQRNSITAQR APKSVKVIIV
601 TPEEREAVMS IDFGGAYDET SPGFNLFEVR EKYSEPMDAAGV VYNLLWN
651 SGLPEKFGCR EQTLNFILO CRRRYRRVPY HNFYHVVDVC QTLHTYLYTG
701 KASELLTELE CYVLLVTALV HDLDHMGVNN SFYTKTDSPL GILSSASGNN
751 SVLEVHHCSL AIEILSDPAA DVFEGLSGQD VAYAYRALID CVLATDMAKH
801 ADALSRFTEL ATSGFEKDND THRRVLMETL IKAGDVSNVT KPFETSRMWA
851 MAVTEEFYRQ GDMEKEKGE VLPFDRSKN NELARGQIGF IDFVAGKFER
901 DIVGNLFHGM QWCVDTVNSN RAKWQEILDG RRDSIRSSIV *

FIG. 5B

37/62

```

1  ACAGGCAGGT GCGTGTGGAG AGGTTGAAGG ACAAGGTTCA TCCACAGCTC
51 AGTGCCGCCA AGCCGGTGCT CAAGTTGAAT GCGGCTCCCG CGCCGTTGTG
101 CAAGAAGAAT CCACTGTCAG CCCAGTGCC TTTGAAGAAG GTGCCAGCAA
151 TGGTAAAGCC GCAACGGAAG CGGACGCTGC CGATCGTCAC CAAGACAACT
201 GCGAGAAAGG CCGCACCCGGT GCGTCTCCT GATAGAAATG CCCC GCCGGC
251 AGTGACGCTT CAGCTGGTCA CCAAGCGAGC TGCCGGCGTT TCCCGCACTG
301 AAACGAAAGG TGTGCCCCGCC TCCTGCCGAG CCCGCGTGAA GGT CAGCGCG
351 GCCCAAAGG TAGCCGCGGC CGTACCAAG AAGCGCTCA AGAAGGTAC
401 ATCCACCTCA CAGCGACAA CCGCCACAGA CGAGGTGGG GACTTCTTCG
451 CCGAGGATTT CATGGCGGAA GTGAAGGAG ACGACGTCGG GCTCGAGGTT
501 GCCGACAAGT CCGCTGGTGA CACGAACGG CAAGTAGCAG CGCCCACGGC

```

FIG. 6A

38/62

551 GCCAGTGAAG CAGAAGCGTA AGTCCGCCGG GCGTCGTGCA GCTCGCAGTC
 601 ACCTCCTTGC ACCGAGTCG ATGCTCCCTG CGACGGCAGG GTCACAGAAG
 651 GTGATTGTGG CGCACACCCC CACGTGTAGA AAGGCACCGC GGCCGGTGTG
 701 CACCTCCCCA TCATCCCCCT TTA CTCTCTG ACGACGCAAG GTGAGCCTTG
 751 CCGACAACAT CCGCGCTCAG CTGGCCAGTT TTTTGTAGTC ACTGGGTCGC
 801 GTGCGTGGTG CCGAACGCGG GGAACGGCTT GACCTACCTC TTCACGCGCG
 851 CTGAACAACA TATAGAGAA AACTAGATG CCACCCCTTC CTCTCCTCTC
 901 CCAGCTGCCC TTCCCCTGCT CCCCATCGAC CATGCCGTGAA GGTGTCTCCC
 951 ACCACCTCGT ATCTGTCCAG CCGTGGCATG ATAATGGCGG CAGATTGAG
 1001 CTGACTTGGA GAATGGCAAG ACAGGAAAGC GGGGGGGGGG GGGCAAAGA
 1051 AGAGATAGAG GGGAGAGCGT ATGAGGGGGG GGGCGGCGG ACGCGCACAC
 1101 ACTCATCTGC TCGTGAGGGC ACGTAACGCC CTAGCAAATG TTTTGCATAG

FIG. 6B

39/62

1151 ACAAGGGAAG GACAAAGCGC CATCGATACC GGAGAGCAAT ACAGACTCAC
 1201 ATACATACAT ACATGCGAAC GCCTACGCGC GTCCCGCACA TGAGGACAGC
 1251 CGAATAAGTC TCGGGTGTTA CCTCAAAGAA AAAGGCACAG GAGGCACAAT
 1301 CGAGACAGCA GCTGTGCTGT CTCGGTTGCG GTACGAGGTG TTCCGCCCCAC
 1351 GTCGTTTCTT GCACATCCCT TCACGATTGT GCTGCGGGTG CGCTCGTGTG
 1401 ACTCATTTGTC GAAACACGTC AGAGCAGCTG CCGGCCACAA CAGTACCCCG
 1451 CTGGCGCGGC TGGCGAGACG CGGGGACATC ACGTGTCACT ATGGTGCCAC
 1501 CAAGCGAAGA GGGAGGGAGA GCGGAAGGC TGAGATGACG GATCTGCTAC
 1551 TGAATGCGCG AAGAGCGGGC GTGTGGTACG TGGAGGATAG CCGCCCAAGT
 1601 TGAACGTTAC GGCTCGATCT TCTCCGTGAA GAAACGGTGC GCGTTCTCCT
 1651 TTTCCGCTGC CGTTTCTTTC TCTCCCTGTA TGCCTCGCCA TCATGTATCA
 1701 TTACGGATGT CCTGTCCTGC CCCACTTCTT CCTGCCCTTC TCGCCTACCA

FIG. 6C

40/62

1751 ACTACTGAAC GCTGTCAGTG CGCCTCTCGC TTCTCCAGCT CCACACGCGC
 1801 TCACTGGCCA TCATCAAAGG GAAGCCACCA TCGGCACCCA AGGAGCTTAA
 1851 CCAGCATTTG AGGTTCTTCA -AAAGCGGGTG TGAGGTGCAG CTGCACTGGA
 1901 TCATTGCGGG GACACAAACG CGCATGCGTG CACGGCTGCA CACGGGACCC
 1951 GTCATTGTCT CTTCCGCTCT GTTGCTCCTG TCGCCGCTCT CCACAGCGAC
 2001 ACACATACAC ACACAGTCAG ACACACACAC ACACACACAC ACACACACAC
 2051 ACACACAAGC GAGCCCCATA CACGCAAACG CCACGCGGCC TCCTTTGTTGT
 2101 TCGTTTGTTT ACTCTTGTTT TTCGGCTCGT ATTGGCCGCT GTCTTCGATT
 2151 TGTATCAAC TGGCAGTGAC GCCGTACAGC GATGCATTCA GCGGTCCTTT
 2201 CCCCCGATGC GCCGTATTGC GCGGCAGCCG GCTCCAATCA CCTATGTGAG
 2251 GCGGTTGCAC TCTGCCAGTC GATTCTGGCG CGCTACCGTC GGACTGGTAC
 2301 ATCCTTCTCC TCCACAGAGC TGAAGGCGAT TCAAGCCCTG CGCACCAGT

FIG. 6D

41/62

2351 TCCCTGATAC CGCGCAAGAG CCGGCTGCCA ATAGCGCGGC TTCACCCGAC
2401 CAGACCACGA AGGACTTCCT GAGCATTCCT GACGATGCAA CCGACGTGCC
2451 GCACAACCCA CAGAACGACA TTGTCGCCGT TGTGGAGGAG TGCTGCCACA
2501 ACACCAAGGA GCCAACAGTA TTGTTTGGCG CGATTAAATGA GCGCATTTCA
2551 GCCGTGACTT GCTCGCGTAA TGTCCGCACG TACATGGTGA TCGCAAACGA
2601 CAATCTCCTA TGGGACCCCTG TCAACGGTGT TGCCGCCCTT ATCGACGACG
2651 TCACGCCCCCTT GGGCAAGTGC GCGCAAGCGC GCAACATGCT GACGATTGCC
2701 AACACCCCTAT ACATCCCCCT CTGGTTTCGG TCCGAGCTCG TTGGCTGCGT
2751 GGAGGTGCCG GGTGCCCTGCA TCCCAAGGGA CAAGGCTACC TGTGCTCAGC
2801 TTCGTGCTCCG GTGCGTCACC GTTGCCGTTT GAAACAGCAT CAACATCTCC
2851 ATCAGAAAGA GGAAGCAA TAAGATCGAG GCCATGGTGG GCATGGCGAC
2901 ACGGCTTGCT CGAGACACGT TGGAGGAGTC GGTGCTGGTG CAGTCCATCA

FIG. 6E

42/62

2951 TCAACACGGC AAAGACGCTG ACGGAGAGCG ACCGGTGTAG CATCTTCCTG
3001 GTGAAAGCGG ACGGCAGCCT GGAGGCGCAC TTCGAGGACG GCAACGTTGT
3051 GGTGCTGCCT GCGGGGACGG GCATCGCAGG TCACGTTGCG GAATCTGGCG
3101 CCGTGGTGAA CATCCCGAAC GCGTACGAGG ACGACCGGTT CCACCGGTCC
3151 GTGGACAAGG TGA CTGGCTA CCACACGCGC ACGATCTTGT GTCTGCCGAT
3201 CGCGTTCGAG GGCACGATCG TTGCCGTGTC GCAGCTGATC AACAAAGCTGG
3251 ACATGGTGAC ACAGAGCGGG CAGCGGCTTC CGCGCGTGTT TGGACGGCGC
3301 GACGAGGAGC TGTTGAGAC GTTCTCGATG TTCGCTGCCG CGTCGCTGCG
3351 CAACTGCCGC ATCAACGAGA CGCTGCTGAA GGAGAAGAAG AAGAGCGACG
3401 CGATCCTGGA CGTTGTGGCG CTGCTGTCGA ATACGGACAT CCGCGATGTG
3451 GACAGCATTG TCGGACACGT GCTGCACGGC GCGAAGAAGC TGCTGAACGC
3501 GGACAGGTCA TCGATGTTTC TGCTGGATAA GGAGCGCAAT GAGCTGTACA

FIG. 6F

43/62

3551 GTAAGATGGC GGACAGCGCG AACGAGATCC GGTTCCTCTG CGGGCAAGGC
3601 ATTGCCGGCA CTGTTGCCGA GTCCGGCGGTT GCGGAGAATA TCATGGACGC
3651 GTACGCTGAC TCGCGCTTCA ACAGCGCTGT GGACCGGCAG CTGGCTACC
3701 GCACACAGTC CATCCTGTGC GAGCCGATTA CGCTGAATGG CGAGGTGCTT
3751 GCCGTGGTGC AGCTCGTCAA CAAGCTCGGC GACGACGGTA GCGTGACCTG
3801 CTTTACACCC ATGGACCGGG AAACGTTCCA AGTGTTCTCG CTGTTTGGG
3851 GCATCTCGAT CAACAACAGC CATCTGCTGG AGTTCGCGGT GAACGCAGGT
3901 CGTGAGGCGA TGACCTTGAG CCTGCAGCGC AACAGCATT A CAGCGCAGCG
3951 TGCTCCGAAG AGTGTGAAGG TGATCGCGGT GACGCCGGAG GAGCGTGAGG
4001 CAGTGATGTC GATCGACTTC GGGGGCGCAT ATGACTTCAC TTCACCGGGC
4051 TTCAACCTGT TTGAAGTGCG CGAGAAGTAC AGCGAGCCGA TGGATGCCGC
4101 TGCCGGTGTT GTGTATAACC TGCTATGAA CAGTGGTCTA CCCGAGAAGT

FIG. 6G

44/62

4151 TTGGCTGCCG TGAGCAGACA CTGCTGAACT TCATCTTGCA GTGCCGCCGC
4201 AGGTACCGCC GAGTGCCGTA CCACAACTC TACCACGTCG TGGACGTGTG
4251 CCAGACGCTG CACACGTACT TGTACACAGG CAAGGCGTCG GAGCTCCTGA
4301 CAGAGCTGGA GTGCTACGTG CTGCTCGTGA CGGCACTGGT GCACGATCTT
4351 GACCACATGG GCGTGAACAA CAGCTTCTAC CTGAAGACGG ACTCGCCGCT
4401 AGGCATCCTC TCCAGCGCGA GCGGGAACAA CTCCGTGCTG GAGGTGCACC
4451 ACTGCAGCCT CGCCATCGAG ATTCTGTCCG ACCCCGCCGC GGACGTGTTC
4501 GAGGGGCTGA GCGGGCAGGA CGTTGCGTAT GCGTACCGCG CGCTGATCGA
4551 TTGCGTGCTG GCCACTGATA TGGCGAAGCA CGCTGACGCG CTAAGTCGCT
4601 TCACAGAGTT GCGGACAAGC GGGTTTGAGA AAGACAACGA CACCCACCGT
4651 CGCCTGGTGA TGGAAACGCT GATCAAGGCC GGTGACGTGT CGAATGTGAC
4701 GAAACCGTTC GAGACGTCGC GCATGTGGGC GATGGCTGTG ACGGAGGAGT

FIG. 6H

45/62

4751 TCTACCGTCA GGGTGACATG GAGAAGGAGA AGGCGGTGGA GGTGCTGCCG
4801 ATGTTTGACC GGTCAAGAA CAACGAGCTG GCGCGTGGC AGATTGGCTT
4851 CATCGACTTC GTAGCTGGCA AGTTCTTCCG GGATATTGTG GGCAACCTAT
4901 TTCATGGAAT GCAGTGGTGT GTGGACACGG TAAACTCCAA CCGCGCAAAG
4951 TGGCAAGAGA TCCTGGATGG CCGCCGCGAC TCCATCCGAT CCTCGATTGT
5001 TTAAGGCATC GGTCCC GCCG TATCGTTGAT GCCGTAATAG CGCGCGGAAG
5051 TACTCACGGC GAATGTCTTT CGAGAGTGA AAGCGGTGAG CTCACCTTGTC
5101 ACTATGGACG GATGAGTGCC GTTGGTCGCC GCTCTGCTGT GCGTGCTCTAC
5151 GCGTCTTATC CCCACCTCAG TATGTGCACC GGGCCGTCAT TTCCCTTTGT
5201 ACCCGTCGCT GTATCCGCCA CGCGGGATGG TTTGTGTGTT GGTGAGTCTC
5251 CCTCTCTCTG CACCAGGGCC TGTCTGTGTT GATGGGCGCC TCTCGCACTG
5301 CTGAGGACAA GGTGTGGCAC ATGTGGGCGT GTGAGTCGTG TTTT TTTT

FIG. 6I

46/62

5351 TTGGCTCTCG TCTTGTCTCC TCTCTCCTCG CTATTAGCCC TTTTCTGAAC
 5401 AGACCTCTCT CTCTCTCTCT GCTCGTCTTT CGGAGGAGTG GTTTGCCGTT
 5451 GAAGGCTGAA CGGTACGAAG- GGGAGGAGT GAGCAGTGCA GGTGCACACA
 5501 CACGCACCAC ACCTAATTCT CTCTTCATCC GCCTTTCCCTT TTTTCCGGT
 5551 GTGTGTCCCG AAGATGGTTT CCTGTCTTTG CATCCGTTTC TCTCCCCCTT
 5601 TTTTCGTGTG TCTGTCTTTT GTTGTTCTGTC ACGAATCTCA CCCGCCCTCCC
 5651 TCCCCCCTCT CCCATTTTTT CTCTCGTAGG TGTGTGCATC TGTGCTCCTG
 5701 GTGAGACGGA GTGGAGTGGG GGCACCCCGC AGCGCGTGGC ATCTCTCCCC
 5751 CCCCCCAGGT GGGGGGTCTAT TCGTGCACCC AAACCTCTGC TCTGGGGAGG
 5801 AAGCTCAGCG GCGCACCCCC ACCCCACCC CCACCCCTCTC CCTCCTATAT
 5851 CCCTGCCAGT GCGGAACCGC TTCTCCTGGC GACAGGGTCA AGCACCTATA
 5901 ACGCAGGGAG GACAGAGCAA GATGTCGCTG CGGATGTCGG CCGTCAGGTG

FIG. 6J

47/62

5951 CCGGATGGCG TGGCGCCGGA GCGACCTGCG ACAGGCACA CGCAGGATTC
6001 ATGTGATGGG CAGAGTGCCG GCGTGA CTG AACGCATCCC ACCCCCGGCC
6051 CTCACACTGT CCTGCTGCTG TGGGGAGCCT GTGCCATCGC GATGGAATCG
6101 CACCGTGTGG CGACCCGGCAC AACGTGAGCG GCTGTGGGC GACCTGTGAG
6151 GCGGGGTGGG TGGGTGGTG GCGGGTAGAG TTCGAGGCTG AGGCTGTGCC
6451 TCGAAGTTTT TTGGGTCTGC AGAGAGAGCG GATGGGAGGA GGAGCAGCCA
6501 GGCTTGCGTT GTGTGATGTC GAGAAGAACA ATGTAACAGC TCTTCTCTCG
6551 TTGTCCCTCCT TCCTCCCGCT TCTGTTCCGC GAGGAAAACA GCAGACTTGT
6601 GTAGCACAAAG ATGCTGCTGG CGCCTGCTGT GTGACATGTG CGAGGAAGCC
6651 TCGCGCAAAC CGTTTGTTGGT CTCTGGAGGG GTACTGCGA GCGGGAGGAC
6701 AGGGCGAGGC AACGTGTGG AGATAAGGTC GTGGCACAGA GAGGATACGG

FIG. 6K

48/62

6751 CTATGAGAGG GCTGTGTGCT GTTGGTGTTT CCTCAACGTT CGTGCTAAAG
6801 GTCCGTCCAA AGTGAGGAA GTTGGGACGA GGAAGCATGC ATGGACGGTC
6851 TCGTGGCCTC ATCACCCTCCT TTCGGTGCCA TCATTACCAC CCCTCGCTCC
6901 TGCTTTTTCG CCGCCATGCC CAGCGGGACT TTTTTCGTC TGTTT

FIG. 6L

49/62

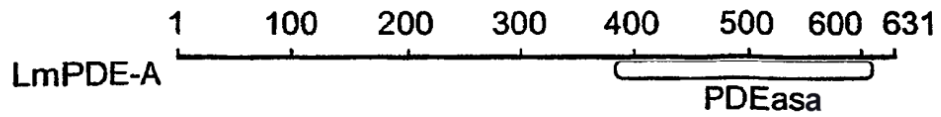


FIG. 7A

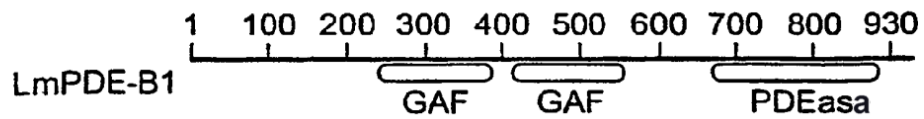


FIG. 7B

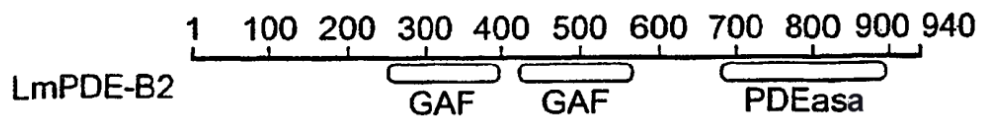
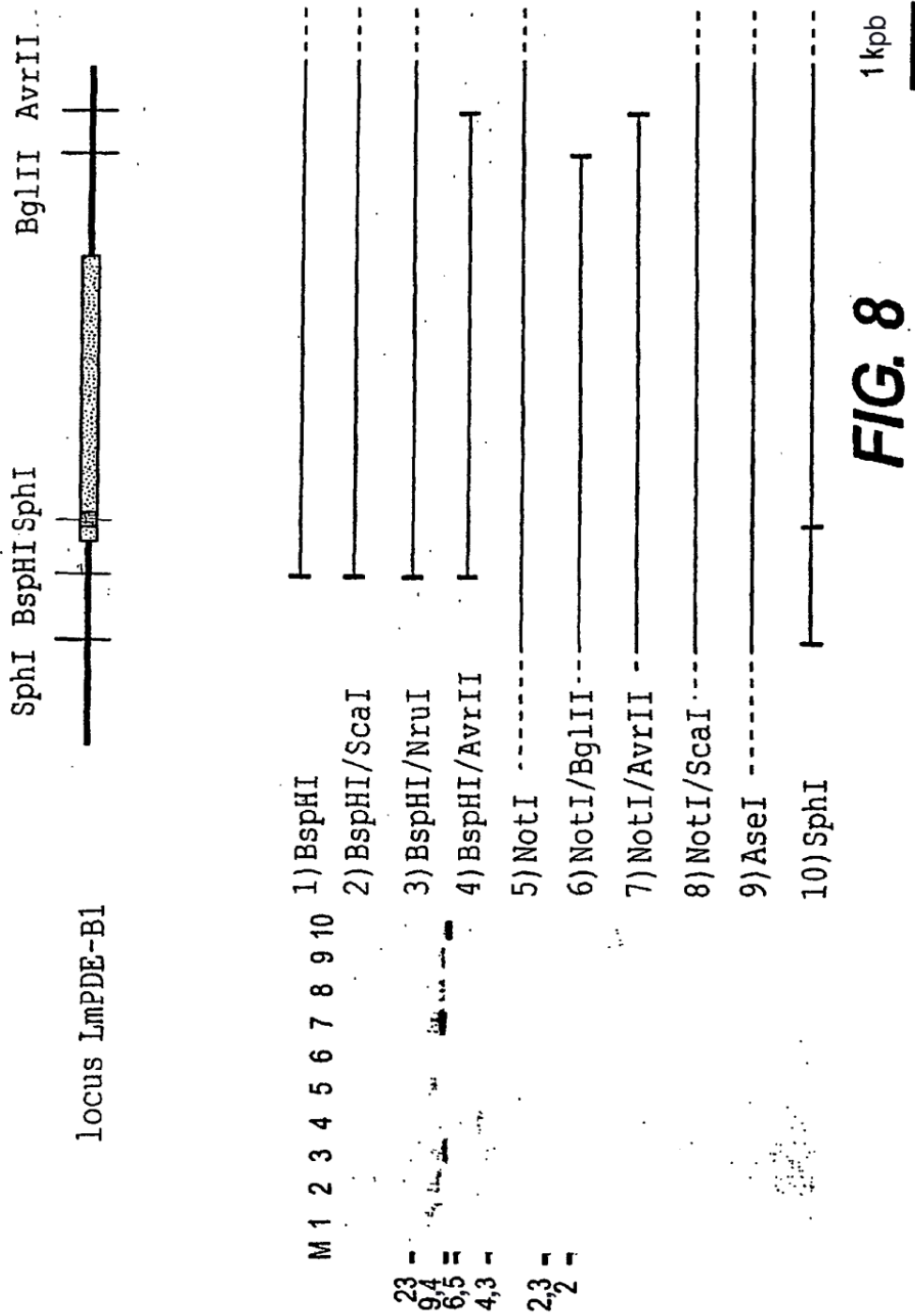
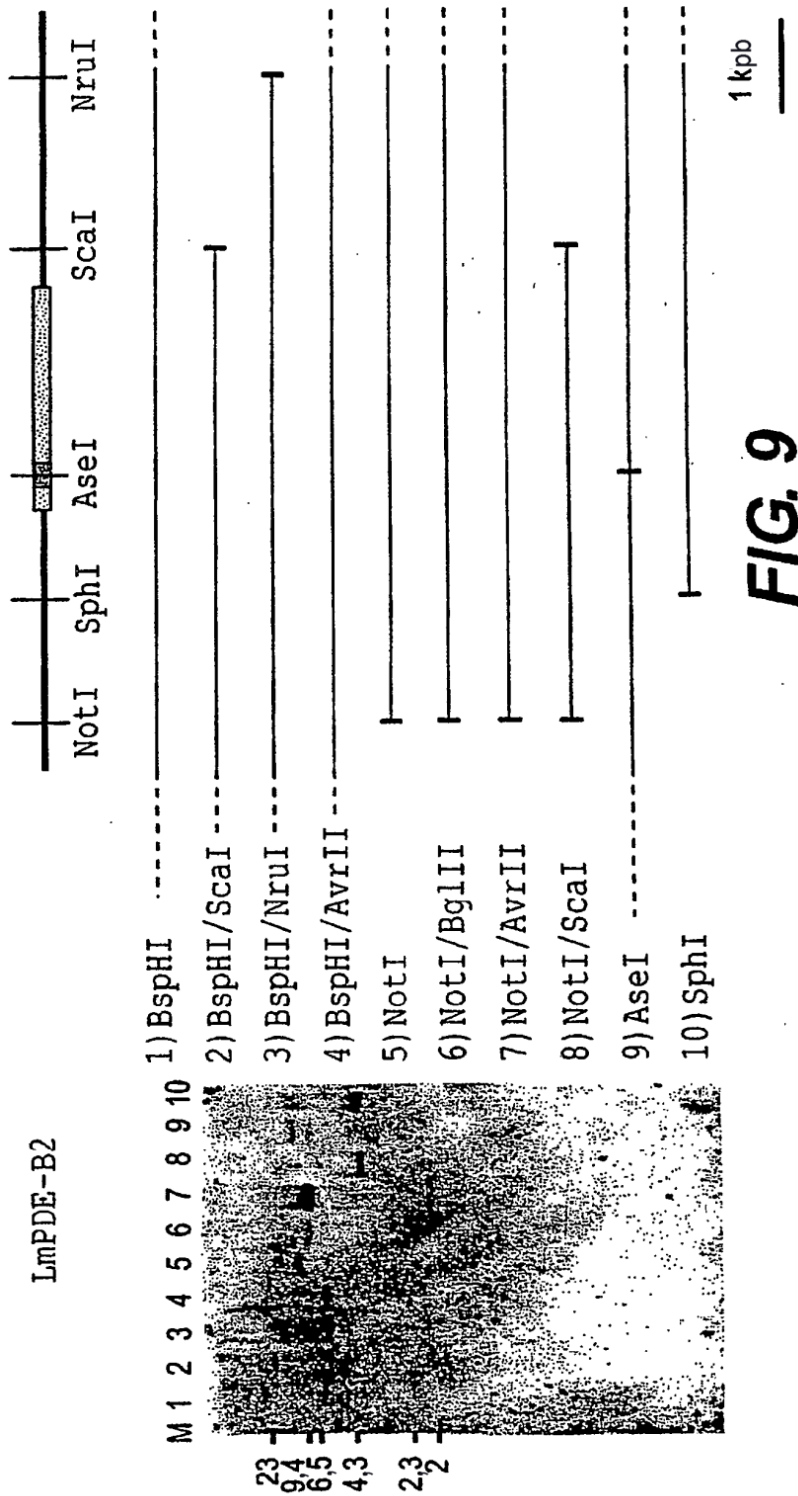


FIG. 7C

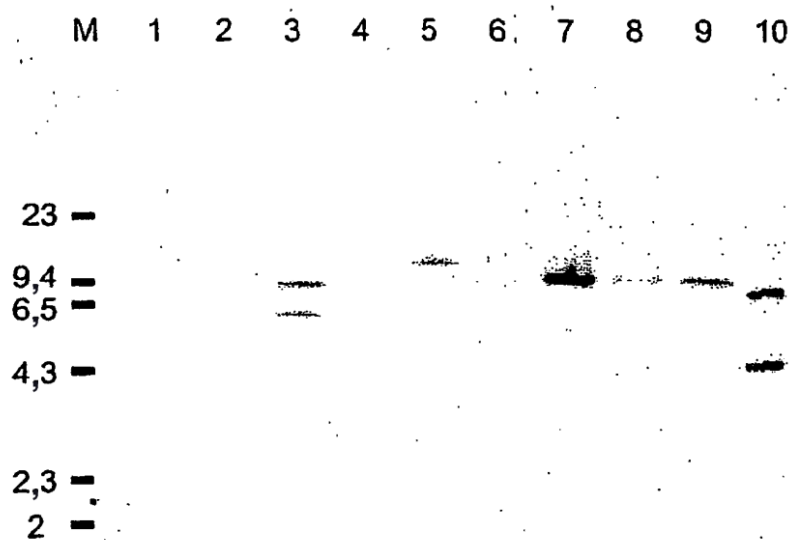
50/62



51/62



52/62



- | | |
|----------------|---------------|
| 1) BspHI | 6) NotI/BglII |
| 2) BspHI/ScaI | 7) NotI/AvrII |
| 3) BspHI/NruI | 8) NotI/ScaI |
| 4) BspHI/AvrII | 9) AseI |
| 5) NotI | 10) SphI |

FIG. 10

53/62

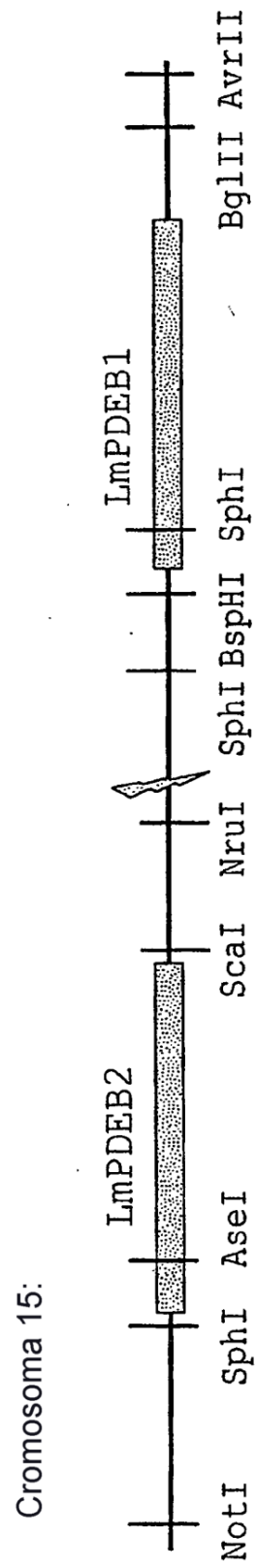


FIG. 11

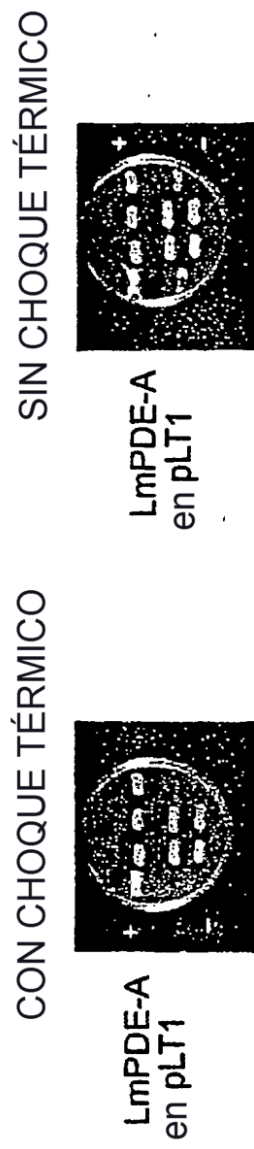


FIG. 12A

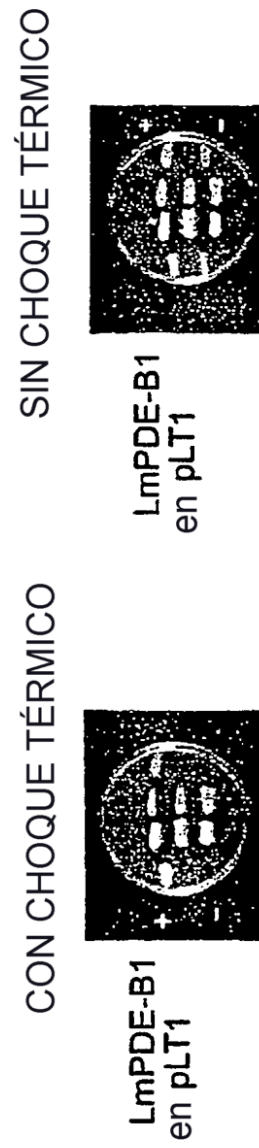
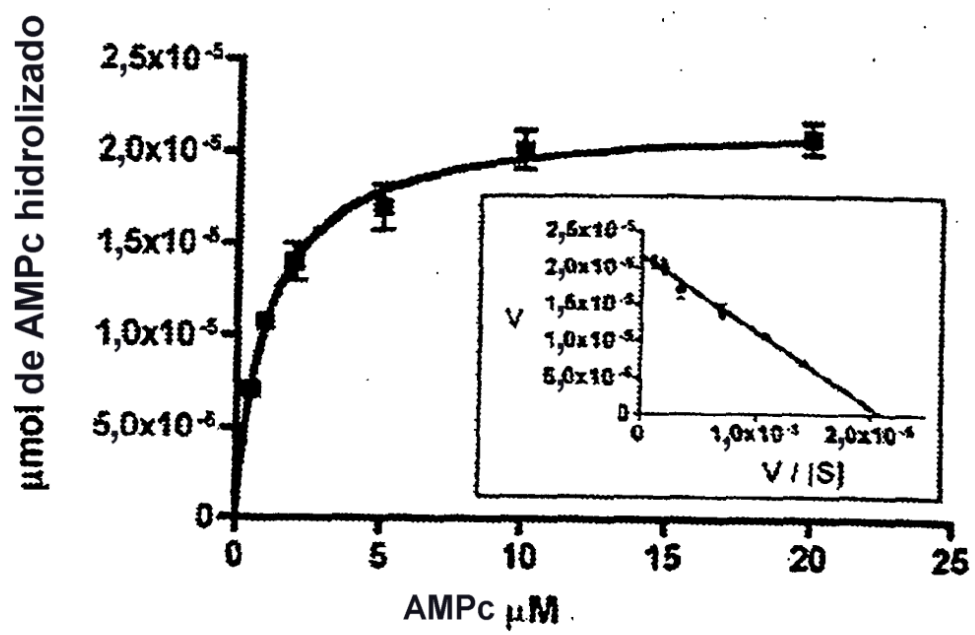


FIG. 12B

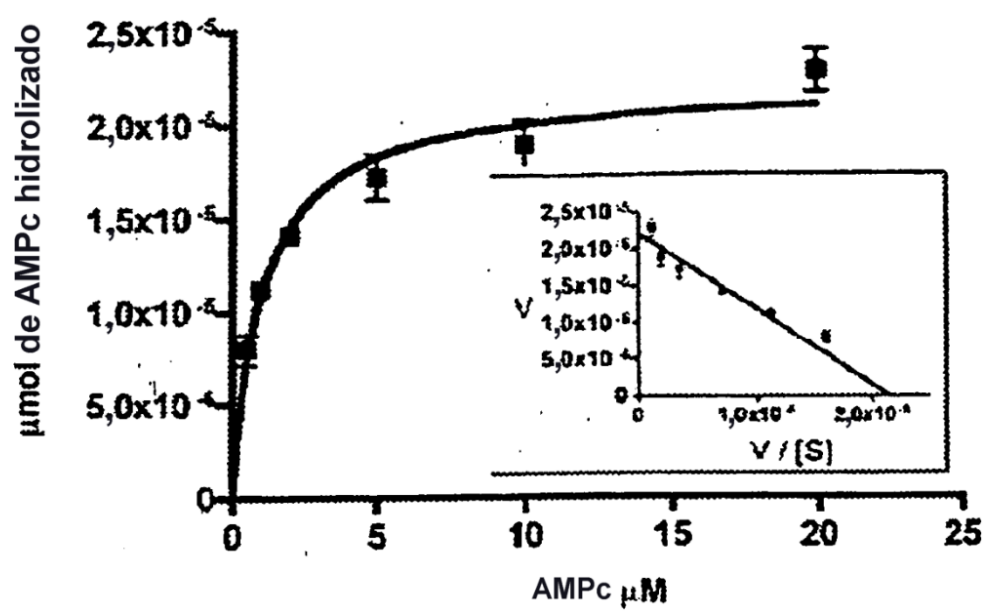
FIG. 12C

FIG. 12D

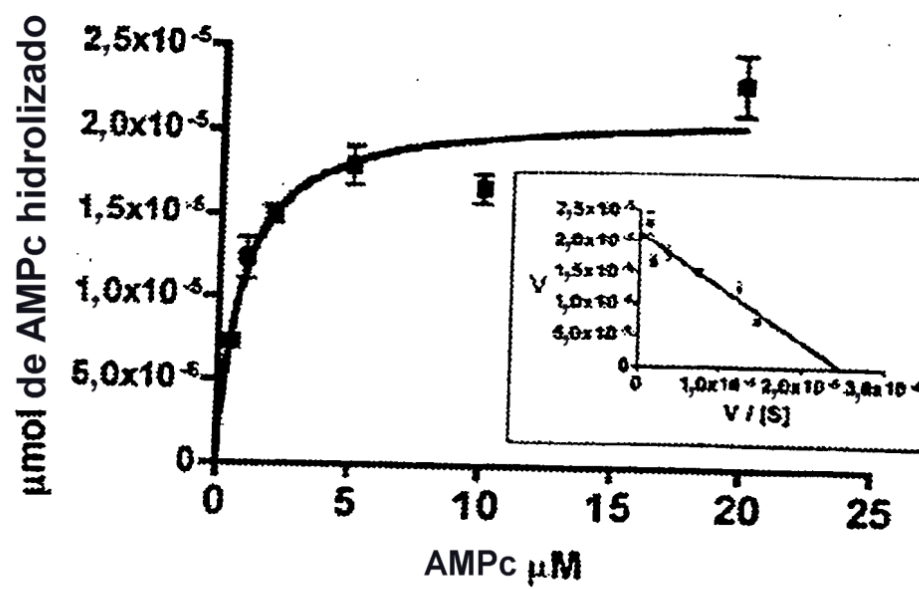
55/62

**FIG. 13A**

56/62

**FIG. 13B**

57/62

**FIG. 13C**

58/62

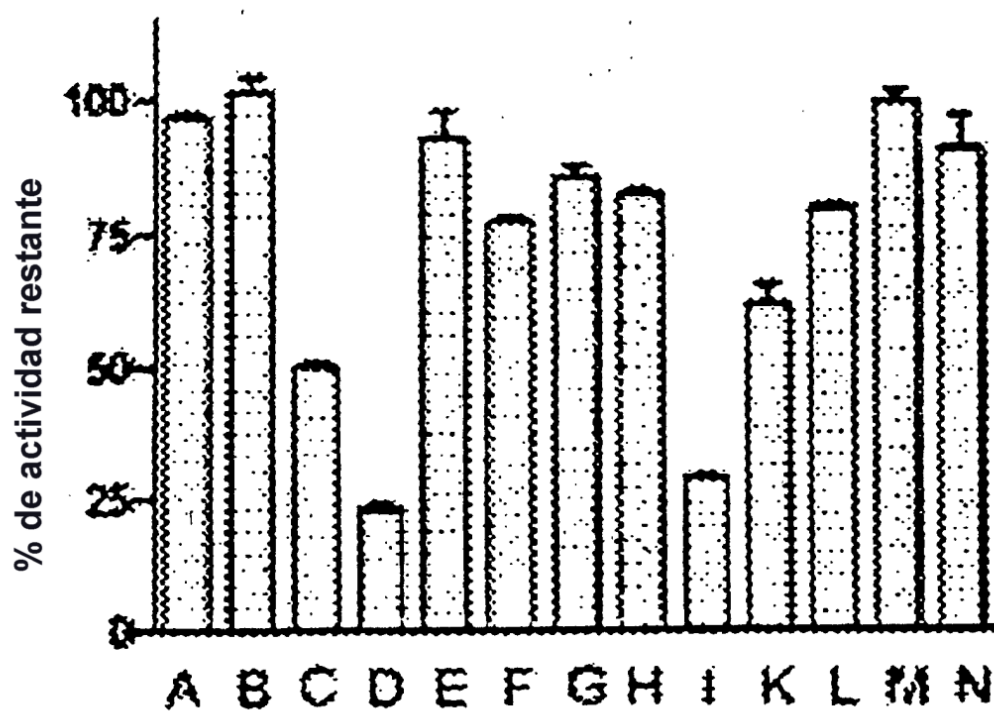


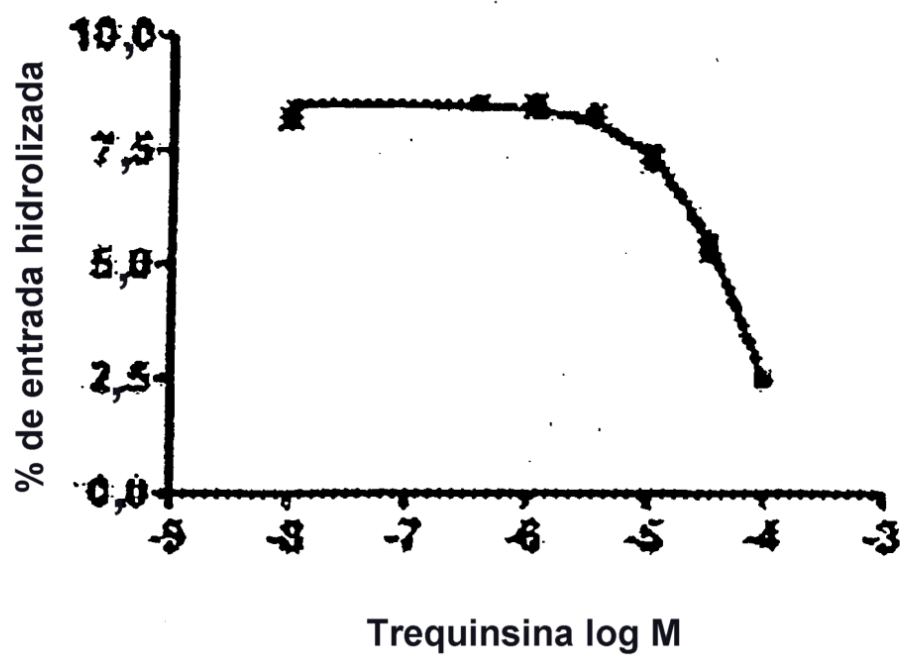
FIG. 14A

59/62

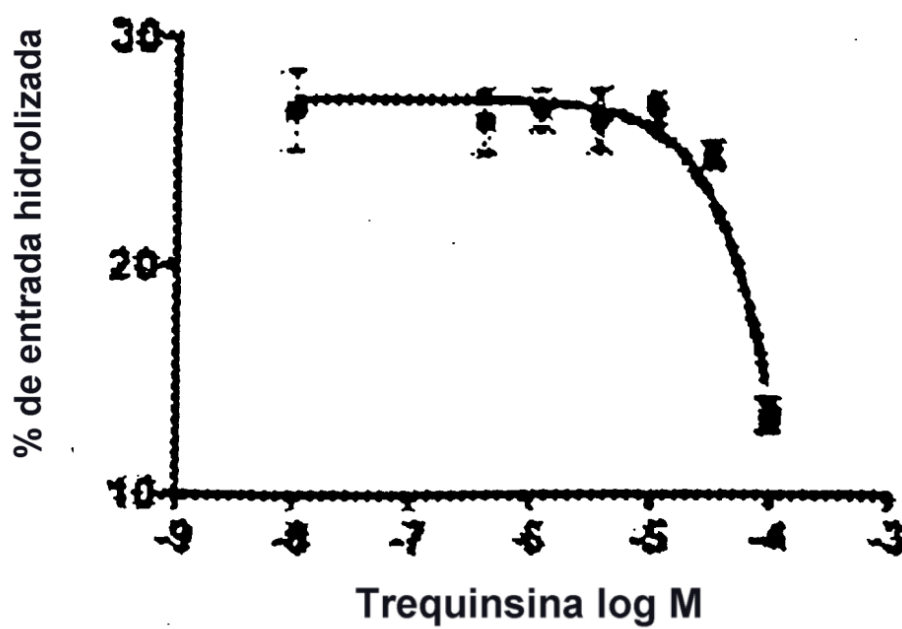


FIG. 14B

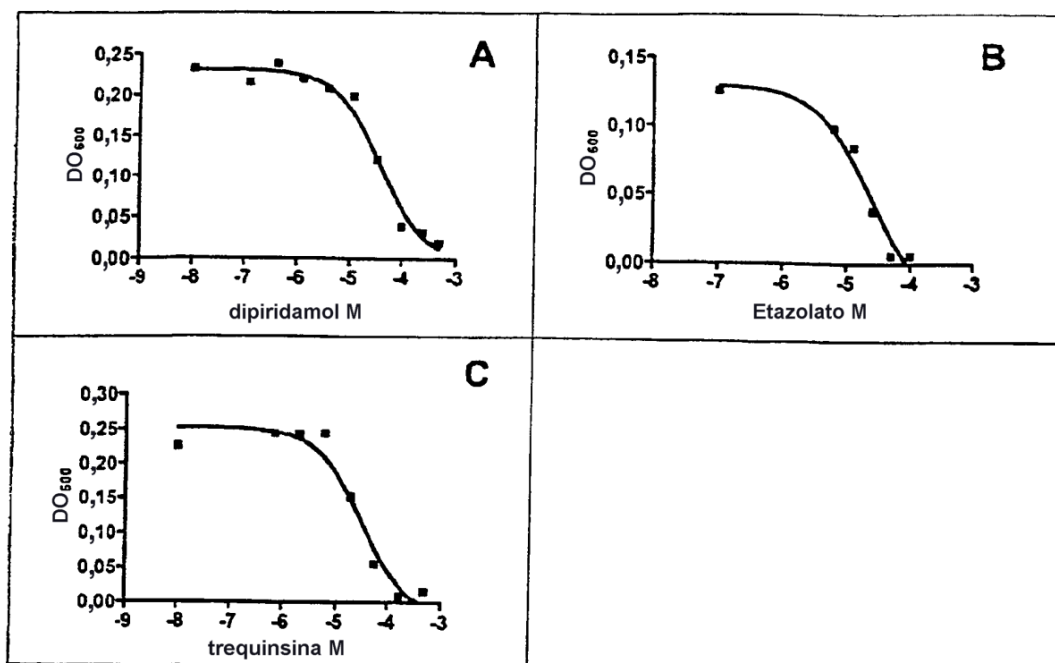
60/62

**FIG. 14C**

61/62

**FIG. 14D**

62/62

**FIG. 15**

REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

Esta lista de referencias citadas por el solicitante únicamente es para comodidad del lector. Dicha lista no forma parte del documento de patente europea. Aunque se ha tenido gran cuidado en la recopilación de las referencias, no se pueden excluir errores u omisiones y la EPO rechaza toda responsabilidad a este respecto.

5 Documentos de patente citados en la descripción

- US 50024403 P [0001]
- US 60504070 B [0001]
- US 60582584 B [0001]
- US 4816567 A, Cabilly [0037]
- US 4816397 A, Boss [0037]
- US 5194428 A [0092]
- US 5110802 A [0092]
- US 5539082 A [0092]
- US 4777019 A [0151]
- US 4965188 A [0168]
- US 4358535 A, Falkow [0172]
- US 60500244 B [0204]
- WO 60504070 A [0204]
- WO 60582584 A [0204]

Bibliografía no relativa a patentes citada en la descripción

- Sundar et al. *Curr. Opin. Infect. Dis.*, 2002, vol. 15, 593-598 [0004]
- Lee et al. *Int. J. Infect. Dis.*, 2003, vol. 7, 86-93 [0004]
- Morrison et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1985, vol. 81, 6851 [0037]
- Takeda et al. *Nature*, 1985, vol. 314, 452 [0037]
- Schilling et al. *Anal. Biochem.*, 1994, vol. 216, 154-158 [0042] [0046]
- Higgins et al. *Gene*, 1988, vol. 73, 237-244 [0047]
- Hein. *Methods Enzymol.*, 1990, vol. 183, 626-645 [0047]
- Beavo. *Physiol. Rev.*, 1995, vol. 75, 725-748 [0065]
- Soderling et al. *J. Biol. Chem.*, 1998, vol. 273, 15553-15558 [0065]
- Fisher et al. *J. Biol. Chem.*, 1998, vol. 273, 15559-15564 [0065]
- Zoraghi et al. *J. Biol. Chem.*, 2001, vol. 276, 11559-11566 [0066] [0178] [0189] [0192]
- Nikawa et al. *Mol. Cell Biol.*, 1987, vol. 7, 3629-3636 [0066]
- Lacombe et al. *J. Biol. Chem.*, 1986, vol. 261, 16811-16817 [0066]
- Dunlap et al. *J. Bacteriol.*, 1993, vol. 175, 4615-4624 [0066]
- Hoyer et al. *Microbiology*, 1994, vol. 140, 1533-1542 [0066]
- Dal Piaz V. et al. *Farmaco*, 2000, vol. 57 (2), 89-96 [0067]
- Bielekova et al. *J. Immunol.*, 2000, vol. 164, 1117-1124 [0067]
- Kiely et al. *Eur. J. Immunol.*, 1995, vol. 25, 2899-2906 [0067]
- Bamente. *Prog. Drug Res.*, 1999, vol. 53, 193-229 [0067]
- Bames. *Novartis Found. Symp.*, 2001, vol. 234, 255-267 [0067]
- Langtry et al. *Drugs*, 1999, vol. 57, 967-989 [0067]
- Marko et al. *Chem. Res. Toxicol.*, 2000, vol. 10, 944-948 [0067]
- *Mol Biochem Parasitol.*, 05 March 2000, vol. 106 (2), 283-92 [0068]
- *Comp Biochem Physiol B.*, 1989, vol. 93 (4), 789-92 [0069]
- Marchak et al. *Strategies for Protein Purification and Characterization*. Cold Spring Harbor Press, 1996 [0075]
- Sambrook et al. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, 2001 [0087]
- Zamecnik et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1978, vol. 75, 280-284 [0091]
- Goodchild et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1986, vol. 83, 4143-4146 [0091]
- Nielsen et al. *Anticancer Drug Des.*, 1993, vol. 8, 53-63 [0092]
- *Oligonucleotides and Analogues*. IRL Press, 1991 [0092]
- *Oligonucleotide Synthesis*. IRL Press, 1984 [0092]
- Egholm et al. *Innovative and Perspectives in Solid Phase Synthesis*, 1992, 325-328 [0092]
- Dieffenbach et al. *PCR Primer, a Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Press, 1995 [0093]
- Sambrook et al. *Molecular Cloning*, 1989 [0093] [0095] [0104]
- Berkner. *Biotechniques*, 1988, vol. 6, 616-629 [0097]
- Scharf et al. *Results Probl. Cell. Differ.*, 1994, vol. 20, 125-162 [0099]
- Bittner et al. *Methods in Enzymol.*, 1987, vol. 153, 516-544 [0099]
- Sambrook et al. *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, 2001 [0100]
- Ausubel. *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons, 1989 [0100]
- Cohen et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1972, vol. 69, 2110 [0104]

- **Graham et al.** *Viol.*, 1973, vol. 52, 456 [0104]
- **Wigler et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1979, vol. 76, 1373-1376 [0104]
- **Southern.** *J. Mol. Biol.*, 1975, vol. 98, 503 [0105]
- **Berent et al.** *Biotech.*, 1985, vol. 3, 208 [0105]
- **Van Heeke ; Schuster.** *J. Biol. Chem.*, 1989, vol. 264, 5503-5509 [0106]
- **Grant et al.** *Methods in Enzymology*, 1987, vol. 153, 516-544 [0107]
- 5 • **Brisson et al.** *Nature*, 1984, vol. 310, 511-514 [0108]
- **Takamatsu et al.** *EMBO J*, 1987, vol. 6, 307-311 [0108]
- **Coruzzi et al.** *EMBO J*, vol. 3, 1671-1680 [0108]
- **Broglie et al.** *Science*, 1984, vol. 224, 838-843 [0108]
- **Winter et al.** *Results Probl. Cell Differ.*, 1991, vol. 17, 85-105 [0108]
- 10 • **Hobbs.** McGraw Yearbook of Science and Technology. McGraw Hill, 1992, 191-196 [0108]
- **Weissbach ; Weissbach.** Methods for Plant Molecular Biology. Academic Press, 1988, 421-463 [0108]
- **Smith et al.** *J. Virol.*, 1983, vol. 46, 584 [0109]
- **Engelhard et al.** *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1994, vol. 91, 3224-3227 [0109]
- **Logan et al.** *Proc Natl. Acad. Sci. USA*, 1984, vol. 81, 3655-3659 [0110]
- 15 • **Wigler et al.** *Cell*, 1977, vol. 11, 223-232 [0113]
- **Lowy et al.** *Cell*, 1980, vol. 22, 817-823 [0113]
- **Wigler et al.** *Proc Natl Acad Sci USA*, 1980, vol. 77, 3567-3570 [0113]
- **Colbere-Garapin et al.** *J. Mol. Biol.*, 1981, vol. 150, 1-14 [0113]
- **Hartman et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1988, vol. 85, 8047-8051 [0114]
- **Rhodes et al.** *Methods Mol. Biol.*, 1995, vol. 55, 121-131 [0114]
- 20 • **Neuberger et al.** *Nature*, 1984, vol. 312, 604 [0119]
- **Sharon et al.** *Nature*, 1984, vol. 309, 364 [0119]
- **Tan et al.** *J. Immunol.*, 1985, vol. 135, 3565-3567 [0119]
- **Fell et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989, vol. 86, 8507-8511 [0119]
- **Teng et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1983, vol. 80, 7308-7312 [0120]
- 25 • **Kozbor et al.** *Immunology Today*, 1983, vol. 4, 7279 [0120]
- **Olsson et al.** *Meth. Enzymol.*, 1982, vol. 92, 3-16 [0120]
- **Harlow.** Antibodies. Cold Spring Harbor Press, 1989 [0121]
- **Harlow et al.** Antibodies: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Press, 1988 [0121] [0127]
- **Low et al.** *J Mol Biol*, 1996, vol. 260 (3), 359-368 [0122] [0123]
- 30 • **Winter et al.** *Annu Rev Immunol*, 1994, vol. 12, 433-455 [0122]
- **Green et al.** *Nat. Genet.*, 1994, vol. 7, 13-21 [0123]
- **Wagner et al.** *Eur. J. Immunol.*, 1994, vol. 24 (11), 2672-2681 [0123]
- **Wagner et al.** *Nuc. Acids Res.*, 1994, vol. 22 (8), 1389-1393 [0123]
- **Winter et al.** *Annu Rev. Immunol.*, 1994, vol. 12, 433-455 [0123]
- **Kantor et al.** *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1995, vol. 764, 224-227 [0124]
- **Wang et al.** *J. Immunol. Methods*, 2000, vol. 244, 217-225 [0124]
- **Rost et al.** *Protein*, 1994, vol. 19, 55-72 [0125]
- Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy. **Amon et al.** Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy. Alan R. Liss, Inc, 1985, 243-56 [0126]
- Antibodies For Drug Delivery. **Hellstrom et al.** Controlled Drug Delivery. Marcel Dekker, Inc, 1987, 623-53 [0126]
- Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review. **Thorpe et al.** Monoclonal Antibodies '84 - Biological And Clinical Applications. 1985, 475-506 [0126]
- **Thorpe et al.** The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates. *Immunol. Rev.*, 1982, vol. 62, 119-158 [0126]
- **Sodee et al.** *Clin. Nuc. Med.*, 1997, vol. 21, 759-766 [0126]
- **Kohler ; Milstein.** *Nature*, vol. 256, 495-497 [0128]
- **Harlow et al.** Antibodies: A Laboratory Manual. CSHL, Cold Spring, 1988 [0132]
- **H. Liu et al.** *Cancer Research*, 1998, vol. 58, 4055-4060 [0134]
- **Dugas et al.** Bioorganic Chemistry. Springer-Verlag, 1981, 54-92 [0135]
- **Platt.** *J. Biol. Chem.*, 1994, vol. 269, 28558-28562 [0140]
- **Lam et al.** *Nature*, 1991, vol. 354, 82-84 [0141]
- **Houghten et al.** *Nature*, 1991, vol. 354, 84-86 [0141]
- **Songyang et al.** *Cell*, 1993, vol. 72, 767-778 [0141]
- **Rotivinen et al.** *Acta Pharm. Fenn.*, 1988, vol. 97, 159-166 [0149]
- **McKinaly et al.** *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 1989, vol. 29, 111-122 [0149]
- **Fields et al.** *Nature*, 1989, vol. 340, 245-246 [0151]
- **Abdullah et al.** *Infect. Immunol.*, 1992, vol. 60, 56-62 [0151]
- **Ausubel et al.** Current Protocols in Molecular Biology. John Wiley & Sons, 1994 [0153]
- **Capecchi.** *Science*, 1989, vol. 244, 1288-1292 [0174]
- **Zoraghi et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2002, vol. 99, 4343-4348 [0178] [0192] [0195]
- **Gong et al.** *Mol. Biochem. Parasitol.*, 2001, vol. 116, 229-232 [0178]
- **Rascon et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2002, vol. 99, 4714-4719 [0178]
- **Beverley.** *Nat. Rev. Genet.*, 2003, vol. 4, 11-19 [0180]

5

- **Colicelli et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1993, vol. 90, 11970-11974 [0186] [0187]
- **Johner et al.** *J. Biol. Chem.* [0186]
- **Kunz et al.** *Eur. J. Biochem.*, 2004, vol. 271, 637-647 [0191]
- **Rascon et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2002, vol. 99, 4714-4719 [0192] [0195]
- **Francis et al.** *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.*, 2001, vol. 65, 1-52 [0192]
- **Mou ; Cote.** *J. Biol. Chem.*, 2001, vol. 276, 27527-27534 [0192]
- **Guo et al.** *J. Biol. Chem.*, 2003, vol. 278, 29509-29514 [0193]
- **Zoraghi et al.** *J. Biol. Chem.*, 2001, vol. 276, 11559-11566 [0195]
- **R. Brun ; M. Schonenberger.** *Acta Trop.*, 1979, vol. 36, 289-292 [0197]