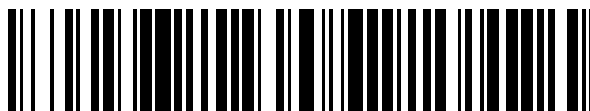


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 373 878**

51 Int. Cl.:  
**C12N 15/30** (2006.01)  
**C07K 14/44** (2006.01)  
**C12N 15/63** (2006.01)  
**C12N 5/10** (2006.01)  
**A61K 39/008** (2006.01)  
**A61K 48/00** (2006.01)  
**G01N 33/569** (2006.01)  
**C12Q 1/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04000341 .0**  
96 Fecha de presentación: **12.02.1998**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1422238**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **26.05.2004**

54 Título: **ANTÍGENOS DE LEISHMANIA PARA SU USO EN LA TERAPIA Y LA DIAGNOSIS DE LA LEISMANIASIS.**

30 Prioridad:  
**12.02.1997 US 798841**  
**27.08.1997 US 920609**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**09.02.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**09.02.2012**

73 Titular/es:  
**CORIXA CORPORATION**  
**CSC THE UNITED STATES CORPORATION 2711**  
**CENTERVILLE ROAD**  
**WILMINGTON, DE 19808, US**

72 Inventor/es:  
**Campos-Neto, Antonio;**  
**Webb, John R.;**  
**Dillon, Davin C.;**  
**Reed, Steven G. y**  
**Skeiky, Yasir A. W.**

74 Agente: **de Elizaburu Márquez, Alberto**

ES 2 373 878 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**

Antígenos de *Leishmania* para su uso en la terapia y la diagnosis de la leishmaniasis

**REFERENCIA A LAS SOLICITUDES RELACIONADAS****CAMPO TÉCNICO**

5 La presente invención se refiere en general a composiciones y métodos para prevenir, tratar y detectar la leishmaniasis, y para estimular respuestas inmunitarias en pacientes. La invención está relacionada más concretamente con polipéptidos que comprenden una porción inmunogénica de un antígeno de *Leishmania* o una de sus variantes, y a vacunas y composiciones farmacéuticas que comprenden uno o más de tales polipéptidos. Las vacunas y composiciones farmacéuticas se pueden utilizar, por ejemplo, para la prevención y la terapia de la leishmaniasis, así como para la detección de la infección por *Leishmania*.

**ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN**

15 Los organismos de *Leishmania* son parásitos protozoicos intracelulares de macrófagos que causan una amplia gama de enfermedades clínicas en seres humanos y animales domésticos, principalmente perros. En algunas infecciones, el parásito puede permanecer durmiente durante muchos años. En otros casos, el anfitrión puede desarrollar una variedad de formas de leishmaniasis. Por ejemplo, la enfermedad puede ser asintomática o se puede manifestar en forma de leishmaniasis visceral subclínica, que se caracteriza por unos síntomas leves de malestar, diarrea y hepatomegalia intermitente. Los pacientes con enfermedad subclínica o asintomática tienen normalmente bajos títulos de anticuerpo, dificultando de este modo la detección de la enfermedad con las técnicas convencionales. De manera alternativa, la leishmaniasis se puede manifestar en forma de enfermedad cutánea, que es un problema médico grave pero es generalmente auto-limitante, o en forma de una enfermedad de las mucosas altamente destructiva, que no es auto-limitante. Finalmente, y muy gravemente, la enfermedad se puede manifestar en forma de infección visceral aguda que afecta al bazo, al hígado y a los ganglios linfáticos, que no tratada, es generalmente una enfermedad fatal. Los síntomas de leishmaniasis visceral aguda incluyen hepatoesplenomegalia, fiebre, leucopenia, anemia e hipergammaglobulinemia.

25 La leishmaniasis es un problema grave en la mayor parte del mundo, incluyendo Brasil, China, Este de África, India y zonas de Oriente Medio. La enfermedad también es endémica en la región Mediterránea, incluyendo el sur de Francia, Italia, Grecia, España, Portugal y Norte de África. El número de casos de leishmaniasis ha aumentado espectacularmente en los últimos 20 años, y en la actualidad existen millones de casos de esta enfermedad en todo el mundo. Cada año se diagnostican aproximadamente 2 millones de nuevos casos, 25% de los cuales son de leishmaniasis visceral. No obstante, no existen en la actualidad vacunas u otros tratamientos eficaces.

30 Levick et al. (1996, Molecular and Biochemical Parasitology, 76, 1-2, 345-348) han publicado previamente un análisis con etiquetas de secuencias expresadas de una genoteca de ADNc líder empalmado de promastigotas de *Leishmania* mayor. Este documento describe numerosos antígenos de *Leishmania* hipotéticos pero no proporciona datos sobre su inmunogenicidad potencial.

35 Con frecuencia la diagnosis exacta de la leishmaniasis es difícil de lograr. Existen 20 especies de *Leishmania* que infectan a los seres humanos, incluyendo *L. donovani*, *L. chagasi*, *L. infantum*, *L. major*, *L. amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. panamensis*, *L. mexicana*, *L. tropica*, y *L. guyanensis*, y no existen signos o síntomas distintivos que indiquen inequívocamente la presencia de infección por *Leishmania*. Se han utilizado métodos para la detección de los parásitos, pero estos métodos no son sensibles ni prácticos clínicamente. Las pruebas cutáneas actuales utilizan típicamente parásitos completos o lisados. Tales pruebas son generalmente insensibles, irreproducibles y propensas a reacción cruzada con una variedad de otras enfermedades. Además, las preparaciones empleadas en dichas pruebas son a menudo inestables. De este modo, existe la necesidad de métodos mejorados para la detección de la infección por *Leishmania*.

45 Las vacunas experimentales actuales que consisten en organismos completos no han mostrado ser eficaces en seres humanos. Por consiguiente, sigue existiendo la necesidad en la técnica de vacunas para prevenir la leishmaniasis en seres humanos y perros, y de composiciones terapéuticas mejoradas para el tratamiento de la leishmaniasis.

**COMPENDIO DE LA INVENCIÓN**

50 Expuesto brevemente, la presente invención proporciona composiciones y métodos para prevenir, tratar y detectar la leishmaniasis, así como para estimular respuestas inmunitarias en pacientes. En un aspecto, se proporcionan polipéptidos que comprenden al menos una porción inmunogénica de un antígeno de *Leishmania*, que tiene la secuencia de aminoácidos citada en el SEQ ID NO: 24. También se proporcionan las secuencias de ADN que codifican los polipéptidos anteriores, los vectores de expresión recombinantes que comprenden estas secuencias de ADN y las células anfitrionas transformadas o transfectadas con dichos vectores de expresión.

5 En aspectos relacionados, la presente invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden uno o más de los polipéptidos descritos en la presente memoria, o una molécula de ADN que codifica tales polipéptidos, y un portador fisiológicamente aceptable. También se proporcionan vacunas que comprenden uno o más de tales polipéptidos o moléculas de ADN, junto con un intensificador de la respuesta inmunitaria no específica. En realizaciones específicas de estos aspectos, el antígeno de *Leishmania* tiene una secuencia de aminoácidos citada en el SEQ ID No: 24.

10 Se describen en la presente memoria las composiciones farmacéuticas y las vacunas que comprenden al menos dos polipéptidos diferentes, comprendiendo cada polipéptido una porción inmunogénica de un antígeno de *Leishmania* que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las secuencias citadas en los SEQ ID No: 2, 4, 6, 8, 10, 20, 22, 24, 26, 36-38, 41, 50-53, 82, y sus variantes que difieren solamente en sustituciones y/o modificaciones conservativas. Las composiciones farmacéuticas pueden comprender uno o más de los polipéptidos de la invención combinados con un antígeno de *Leishmania* conocido.

Las composiciones farmacéuticas y las vacunas comprenden antígenos de *Leishmania* solubles.

15 En otro aspecto, la presente invención proporciona composiciones farmacéuticas y vacunas como se han descrito antes para inducir inmunidad protectora frente a la leishmaniasis en un paciente.

20 También se describen en la presente memoria métodos y kits de diagnóstico para detectar la infección por *Leishmania* en un paciente. Los métodos comprenden: (a) poner en contacto células dérmicas de un paciente con una composición farmacéutica como se ha descrito más arriba; y (b) detectar una respuesta inmunitaria en la piel del paciente, detectando a partir de allí la infección por *Leishmania* en el paciente. Los kits de diagnóstico comprenden: (a) una composición farmacéutica como se ha descrito más arriba; y (b) un aparato suficiente para poner en contacto la composición farmacéutica con las células dérmicas de un paciente.

También se describen en la presente memoria los métodos para estimular una respuesta inmunitaria celular y/o humoral en un paciente, que comprenden administrar a un paciente una composición farmacéutica o una vacuna como se ha descrito más arriba.

25 Los métodos descritos en la presente memoria son adecuados para tratar a un paciente aquejado de una enfermedad sensible a la estimulación con IL-12, que comprenden administrar a un paciente una composición farmacéutica o una vacuna como se ha descrito más arriba.

Estos y otros aspectos de la presente invención se harán evidentes tras la referencia a la siguiente descripción detallada y a los dibujos adjuntos.

### 30 BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La Figura 1 muestra la estimulación de la proliferación de las células T obtenidas de ratones BALB/c inmunizados para *L. donovani* (representada por el índice de estimulación) por medio de macrófagos infectados con *L. donovani* después de la incubación durante 24, 48 y 72 horas.

35 La Figura 2 ilustra perfiles de HPLC representativos de péptidos aislados de moléculas de MHC de clase II de macrófagos P388D1. El Panel A muestra péptidos aislados de macrófagos no infectados y el panel B muestra péptidos aislados de macrófagos infectados con *L. donovani*. Las flechas del panel B indican picos de péptidos presentes solamente en la preparación de macrófagos infectados.

40 La Figura 3 ilustra la expresión y purificación del antígeno de *Leishmania* Ldp23 en forma de una proteína de fusión recombinante. El Panel A muestra un gel de SDS-PAGE teñido con Azul de Coomassie de *E. coli* lisado sin (calle 1) y con (calle 2) inducción por IPTG de la expresión de Ldp23. La flecha indica la proteína de fusión recombinante. El Panel B muestra la proteína de fusión después de la escisión de un gel de SDS-PAGE preparativa, electroelución, diálisis frente a PBS y SDS-PAGE analítica.

45 La Figura 4 presenta un análisis de transferencia Northern del ARN total preparado a partir de *L. donovani*, *L. major*, *L. amazonensis* y *L. pifanoi* con un gen Ldp23 marcado con P<sup>32</sup>. 1, 2 y 3 hacen referencia al ARN obtenido a partir de promastigotas en la fase de crecimiento logarítmica, promastigotas en la fase de crecimiento estacionaria y formas amastigotas, respectivamente.

La Figura 5 muestra un análisis de transferencia Western de antígenos de promastigotas de *L. donovani* incubados con suero de conejo pre-inmunitario (calle A) o con antisuero de conejo anti-Ldp23 (calle B).

50 La Figura 6 ilustra la expresión en superficie de Ldp23 sobre promastigotas de *L. donovani* vivas. La línea discontinua muestra la inmunofluorescencia indirecta producida utilizando suero de ratón pre-inmune y la línea continua muestra el resultado obtenido con antisuero anti-GST-Ldp23 de ratón. La intensidad de fluorescencia se analizó mediante FACScan.

Figura 7 muestra la estimulación de la proliferación de células T específicas de *Leishmania* por Ldp23. Los resultados se presentan como el número de células relativo como una función de la intensidad de

- 5 fluorescencia. Las células T ( $10^5$ /pocillo) fueron purificadas a partir de ganglios linfáticos de ratones BALB/c inmunizados en la almohadilla de la pata con promastigotas de *L. donovani* en CFA y fueron cultivadas con diferentes concentraciones de Ldp23 recombinante purificado en presencia de  $2 \times 10^5$  células mononucleares de bazo BALB/c normales tratadas con Mitomicina C. La proliferación de las células T se midió a las 27 horas del cultivo. Los valores se expresan como cpm y representan la media de incorporación de [ $^3$ H]TdR de cultivos por triplicado.
- 10 La Figura 8 ilustra la producción de citoquina inducida por Ldp23 por células de ganglios linfáticos de ratones BALB/c. Los cultivos fueron incubados con cantidades variantes de Ldp23 o producto lisado de *Leishmania*, presentado en  $\mu\text{g/mL}$ , y fueron analizados mediante ELISA para determinar la producción de interferón- $\gamma$  (panel A) o interleuquina-4 (panel B), ambos los cuales se muestran en ng/mL.
- 15 La Figura 9 muestra la amplificación por PCR de ARNm de citoquinas aislados de PBMC de un paciente con leismaniasis de las mucosas (Panel A) y leismaniasis cutánea (panel B) y después de la estimulación con polipéptidos representativos de la presente invención. Las calles O y – indican el nivel de productos de PCR al inicio del cultivo y después de 72 horas de cultivo, respectivamente, en ausencia de polipéptido añadido; las calles Lb, 83a y 83b indican el nivel de productos de PCR después de cultivar PBMC con producto lisado de *L. braziliensis*, y los antígenos Lbhsp83a y Lbhsp83b de *Leishmania*, respectivamente.
- 20 La Figura 10 presenta una comparación de los niveles de interferón- $\gamma$  (panel A) y TNF- $\alpha$  (panel B) en los sobrenadantes de cultivos de PBMC de 72 horas de individuos infectados con *Leishmania* y de control en respuesta a la estimulación con producto lisado de parásito o los polipéptidos indicados.
- La Figura 11 ilustra los niveles de IL-10 p40 (en pg/mL) en el sobrenadante de cultivo de PBMC de individuos infectados con *L. braziliensis* y controles no infectados 72 horas después de la estimulación con producto lisado de promastigotas del parásito (Lb), Lbhsp83a o Lbhsp83b.
- 25 La Figura 12 presenta las reactividades de sueros de pacientes infectados con *L. braziliensis* con los polipéptidos representativos de la presente invención en un ELISA convencional. Los valores se expresan como la absorbancia a 405 nm.
- Las Figuras 13A y 13B ilustran el nivel de IL-4 e IFN- $\gamma$  (en pg/mL) secretados estimulados en cultivos de ganglios linfáticos de ratón mediante la adición de los polipéptidos representativos de la presente invención.
- 30 La Figura 14 muestra el nivel de IFN- $\gamma$  (en pg/mL) secretado por PBMC humanas infectadas con *Leishmania* y no infectadas estimuladas por el antígeno M15 de *Leishmania*, en comparación con los niveles estimulados por producto lisado de *L. major* y L-Rack, un antígeno que no parece ser reconocido por seres humanos infectados con *Leishmania*.
- La Figura 15 muestra el nivel de IFN- $\gamma$  (en pg/mL) secretado por PBMC humanas infectadas y no infectadas estimuladas por antígenos de *Leishmania* solubles (antígenos S), en comparación con los niveles estimulados por producto lisado de *L. major* y L-Rack.
- 35 La Figura 16 ilustra la proliferación de cultivos de ganglios linfáticos murinos estimulados mediante la adición de los polipéptidos representativos de la presente invención. Los valores se expresan en cpm.
- La Figura 17 muestra la proliferación de PBMC humanas, preparadas a partir de individuos inmunes a *Leishmania* y no infectados, estimulados por M15 en comparación con la proliferación estimulada por producto lisado de *L. major* y L-Rack. Los valores se expresan en cpm.
- 40 La Figura 18 ilustra la proliferación de PBMC humanas, preparadas a partir de individuos infectados con *Leishmania* y no infectados, estimulados por antígenos de *Leishmania* solubles en comparación con la proliferación estimulada por el medio de cultivo, el producto lisado de *L. major* y L-Rack. Los valores se expresan en cpm.
- 45 La Figura 19 presenta una comparación de una secuencia Lbhsp83 (SEQ ID NO: 6) con secuencias homólogas de *L. amazonensis* (Lahsp83) (SEQ ID NO: 16), *T. cruzi* (Tchsp83) (SEQ ID NO: 17) y humanas (Huhsp89) (SEQ ID NO: 18).
- La Figura 20 ilustra la reactividad de sueros de conejo originados contra antígenos de *Leishmania* solubles con producto lisado de promastigota de *Leishmania* (calle 1) y antígenos de *Leishmania* solubles (calle 2).
- 50 La Figura 21 muestra el ADNc y la secuencia de aminoácidos pronosticada para el antígeno Lmsp1a de *Leishmania*.
- La Figura 22 muestra una transferencia Southern de ADN genómico de *L. major* digerido con un panel de enzimas de restricción (calles 1 a 7) y otras seis especies de *Leishmania* digeridas con PstI (calles 8 a 13) sondeadas con el inserto de ADNc completo de Lmsp1a.

La Figura 23 muestra una transferencia Southern de ADN genómico de *L. major* digerido con un panel de enzimas de restricción, otras seis especies de *Leishmania* digeridas con PstI y los patógenos infecciosos *T. cruzi* y *T. brucei*, sondeadas con el inserto de ADNc completo del antígeno MAPS-1A de *Leishmania*.

5 La Figura 24 ilustra la proliferación de PBMC aisladas de individuos no infectados, pacientes con leishmaniasis de las mucosas activa y pacientes post infección por kala-azar, estimuladas por MAPS-1A.

La Figura 25 ilustra la proliferación de cultivos de ganglios linfáticos murinos estimulados por MAPS-1A.

La Figura 26 ilustra la reactividad de MAPS-1A con sueros de pacientes humanos con leishmaniasis.

La Figura 27 ilustra la reactividad de MAPS-1A con sueros de ratones inmunizados contra y/o infectados con leishmaniasis.

10 La Figura 28 ilustra la eficacia de la inmunización o bien con antígenos solubles de *Leishmania* o bien una mezcla de Ldp23, LbeiF4A y M15 más coadyuvante al conferir protección contra la infección (medida mediante hinchazón de la almohadilla de la pata) en un sistema modelo de leishmaniasis murina, en comparación con la administración de coadyuvante solo.

15 La Figura 29 ilustra la eficacia de la inmunización con MAPS-1A más coadyuvante al conferir protección contra la infección (medida mediante la hinchazón de la almohadilla de la pata) en un sistema modelo de leishmaniasis murina, en comparación con la administración de coadyuvante solo.

Las Figuras 30A y B ilustran la proliferación de cultivos de ganglios linfáticos murinos estimulados con LcgSP8, LcgSP10 o LcgSP3.

#### DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

20 Como se ha indicado más arriba, la presente invención está dirigida generalmente a composiciones y métodos para prevenir, tratar y detectar la leishmaniasis, así como para estimular respuestas inmunitarias en pacientes. Las composiciones de la invención sujeto incluyen polipéptidos que comprenden una porción inmunogénica de un antígeno de *Leishmania* que tiene la secuencia de aminoácidos citada en el SEQ ID NO: 24, las composiciones de la presente invención pueden incluir múltiples polipéptidos seleccionados con el fin de proporcionar un aumento de protección frente a una variedad de especies de *Leishmania*.

25 Los polipéptidos de la presente invención comprenden porciones inmunogénicas de antígenos de *Leishmania* que comprenden la secuencia citada en el SEQ ID NO: 24 (referida en la presente memoria como MAPS-1A). Según se utiliza en la presente memoria, el término "polipéptido" abarca las cadenas de aminoácidos de cualquier longitud, incluyendo proteínas completas (esto es, antígenos), donde los residuos de aminoácido están conectados por medio de enlaces covalentes. De este modo, un polipéptido que comprende una porción inmunogénica de uno de los antígenos anteriores puede consistir exclusivamente en la porción inmunogénica, o puede contener secuencias adicionales. Las secuencias adicionales pueden derivar del antígeno de *Leishmania* nativo o pueden ser heterólogas, y tales secuencias pueden (pero no necesitan) ser inmunogénicas. Un antígeno "que tiene" una secuencia concreta es un antígeno que contiene, en su secuencia completa, la secuencia citada. El antígeno nativo puede, o no, contener secuencias de aminoácidos adicionales.

30 Una porción inmunogénica de un antígeno de *Leishmania* es una porción que es capaz de provocar una respuesta inmunitaria (esto es, celular y/o humoral) en un paciente actualmente o previamente infectado con *Leishmania* (tal como un ser humano o un perro) y/o en cultivos de células de ganglio linfático o células mononucleares de sangre periférica (PBMC) aisladas de individuos actualmente o previamente infectados con *Leishmania*. Las células en las cuales se provoca una respuesta pueden comprender una mezcla de tipos de células o pueden contener células componentes aisladas (incluyendo, pero no limitadas a, células T, células NK, macrófagos, monocitos y/o células B). En particular, las porciones inmunogénicas son capaces de inducir la proliferación de las células T y/o una respuesta de citoquinas de tipo Th1 dominante (p. ej., producción de IL-2, IFN- $\gamma$ , y/o TNF- $\alpha$  por células T y/o células NK; y/o la producción de IL-12 por monocitos, macrófagos y/o células B). Las porciones inmunogénicas de los antígenos descritos en la presente memoria pueden ser identificadas generalmente utilizando mecanismos conocidos por los expertos en la técnica, incluyendo los métodos representativos proporcionados en la presente memoria.

35 Las composiciones y métodos descritos en la presente invención también incluyen variantes de los polipéptidos anteriores. Una "variante" polipeptídica, según se utiliza en la presente memoria, es un polipéptido que difiere del antígeno nativo solamente en sustituciones y/o modificaciones conservativas, de manera que se conserva la capacidad del polipéptido para inducir una respuesta inmunitaria. Las variantes polipeptídicas muestran preferiblemente una identidad de al menos aproximadamente 70%, más preferiblemente al menos aproximadamente 90% y muy preferiblemente al menos aproximadamente 95% con los polipéptidos identificados. De manera alternativa, tales variantes pueden ser identificadas modificando una de las secuencias de polipéptidos anteriores y evaluando las propiedades inmunogénicas del polipéptido modificado utilizando, por ejemplo, los procedimientos representativos descritos en la presente memoria.

Una "sustitución conservativa" es aquella en la que un aminoácido es sustituido por otro aminoácido que tiene propiedades similares, de manera que un experto en la técnica de la química de péptidos espere que la estructura secundaria y la naturaleza hidropática del polipéptido permanezcan esencialmente inalteradas. En general, Los siguientes grupos de aminoácidos representan cambios conservativos: (1) ala, pro, gly, glu, asp, gln, asn, ser, thr; (2) cys, ser, tyr, thr; (3) val, ile, leu, met, ala, phe; (4) lys, arg, his; y (5) phe, tyr, trp, his.

Las variantes pueden también (o alternativamente) ser modificadas, por ejemplo, mediante la delección o adición de aminoácidos que tienen una influencia mínima sobre las propiedades inmunogénicas, la estructura secundaria y la naturaleza hidropática del polipéptido. Por ejemplo, un polipéptido puede ser conjugado con una secuencia señal (o líder) en el extremo N terminal de la proteína que dirige co-traduccionalmente o post-traduccionalmente la transferencia de la proteína. El polipéptido también puede ser conjugado con un conector u otra secuencia para facilitar la síntesis, purificación o identificación del polipéptido (*p. ej.*, poly-His), o para intensificar la unión del polipéptido a un soporte sólido. Por ejemplo, un polipéptido puede ser conjugado con una región Fc de inmunoglobulina.

Una "variante" nucleotídica es una secuencia que difiere de la secuencia de nucleótidos citada por tener una o más delecciones, sustituciones o adiciones de nucleótidos. Dichas modificaciones se pueden introducir fácilmente utilizando mecanismos de mutagénesis convencionales, tales como la mutagénesis específica del sitio dirigida por oligonucleótidos como ilustran, por ejemplo, Adelman et al. (DNA, 2:183, 1983). Las variantes nucleotídicas pueden ser variantes alélicas de origen natural, o variantes de origen no natural. Las variantes nucleotídicas muestran preferiblemente una identidad de al menos aproximadamente 70%, más preferiblemente al menos aproximadamente 80% y muy preferiblemente al menos aproximadamente 90% con la secuencia citada. Tales secuencias nucleotídicas variantes hibridarán generalmente con la secuencia de nucleótidos citada en condiciones restrictivas. Según se utiliza en la presente memoria, "condiciones restrictivas" hace referencia a un prelavado en una solución de 6X SSC, SDS al 0,2%; hibridación a 65°C, 6X SSC, SDS al 0,2% durante la noche; seguido de dos lavados de 30 minutos cada uno en 1X SSC, SDS al 0,1% a 65°C y dos lavados de 30 minutos cada uno en 0,2X SSC, SDS al 0,1% a 65°C.

"Polipéptidos" según se describe en la presente memoria también incluye los polipéptidos combinados. Un "polipéptido combinado" es un polipéptido que comprende al menos una de las porciones inmunogénicas anteriores y una o más secuencias de *Leishmania* inmunogénicas adicionales, que están unidas por medio de un enlace peptídico en una única cadena de aminoácidos. Las secuencias se pueden unir directamente (esto es, sin aminoácidos intermedios) o pueden estar unidas por medio de una secuencia conectora (*p. ej.*, Gly-Cys-Gly) que no disminuye significativamente las propiedades inmunogénicas de los polipéptidos componentes.

En general, los antígenos de *Leishmania* que tienen propiedades inmunogénicas, y las secuencias de ADN que codifican tales antígenos, se pueden preparar utilizando cualquiera de una variedad de procedimientos a partir de una o más especies de *Leishmania* incluyendo, pero no limitadas a, *L. donovani*, *L. chagasi*, *L. infantum*, *L. major*, *L. amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. panamensis*, *L. mexicana*, *L. tropica*, y *L. guyanensis*. Tales especies son asequibles, por ejemplo, de la Colección de Cultivos Tipo Americana (ATCC), Rockville, MD. Por ejemplo, se pueden utilizar péptidos aislados de moléculas del MHC de clase II de macrófagos infectados con una especie de *Leishmania* para rescatar los correspondientes antígenos del donante de *Leishmania*. Las moléculas del MHC de clase II son expresados principalmente por las células del sistema inmunitario, incluyendo los macrófagos. Estas moléculas presentan péptidos, que tienen normalmente 13-17 aminoácidos de longitud, derivados de antígenos foráneos que están degradados en vesículas celulares. Los antígenos peptídicos unidos son reconocidos después por las células T CD4. Por consiguiente, se pueden utilizar péptidos foráneos aislados de moléculas del MHC de clase II de, por ejemplo, macrófagos murinos infectados con *Leishmania* para identificar proteínas de *Leishmania* inmunogénicas.

En resumen, se pueden aislar péptidos derivados de antígenos de *Leishmania* comparando el perfil de la HPLC en fase reversa de los péptidos extraídos de macrófagos infectados con el perfil de péptidos extraídos de células no infectadas. Los péptidos que dan origen a distintos picos de HPLC únicos para macrófagos infectados pueden ser secuenciados después utilizando, por ejemplo, la química de Edman como describen Edman y Berg, en Eur J. Biochem, 80:116-132 (1967). Después se puede amplificar un fragmento de ADN correspondiente a una porción de un gen de *Leishmania* que codifica el péptido a partir de una genoteca de ADNc de *Leishmania* utilizando un cebador efector oligonucleotídico derivado de la secuencia peptídica y un cebador antisentido oligo dT. El fragmento de ADN resultante se puede utilizar después como sonda para escrutar una genoteca de *Leishmania* en busca de un ADNc completo o un clon genómico que codifica el antígeno de *Leishmania*. Tales escrutinios se pueden realizar generalmente utilizando mecanismos bien conocidos por los expertos en la técnica, tales como los descritos por Sambrook et al., en Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratories, Cold Spring Harbor, NY (1989).

Este enfoque se puede utilizar para identificar un antígeno de *Leishmania donovani* de 23 kD (referido en la presente memoria como Ldp23). La secuencia de una molécula de ADN que codifica Ldp23 se proporciona en el SEQ ID NO: 3 y la secuencia de aminoácidos de Ldp23 se proporciona en el SEQ ID NO: 4. Utilizando los métodos descritos en la presente memoria, se ha demostrado que Ldp23 induce una respuesta inmunitaria Th1 en células T preparadas a partir de ratones infectados con *Leishmania*.

Como alternativa, se puede escrutar una genoteca de ADNc o de expresión genómica de *Leishmania* con suero de un individuo infectado con *Leishmania*, utilizando mecanismos bien conocidos por un experto en la técnica. Las moléculas de ADN que codifican antígenos reactivos se pueden utilizar después para expresar el antígeno recombinante para la purificación. Las propiedades inmunogénicas de los antígenos de *Leishmania* purificados se pueden evaluar después utilizando, por ejemplo los métodos representativos descritos en la presente memoria.

Por ejemplo, los sueros de ratones infectados con *Leishmania* se pueden utilizar para escrutar una genoteca de ADNc preparada a partir de amastigotas de *Leishmania*. Los clones reactivos pueden ser expresados después y las proteínas recombinantes pueden ser analizadas para determinar su capacidad para estimular células T o células NK derivadas de individuos inmunes a *Leishmania* (esto es, individuos que tienen evidencia de infección, documentada por una reactividad serológica positiva con anticuerpos específicos de *Leishmania* y/o una respuesta DTH específica de *Leishmania*, sin síntomas clínicos de leishmaniasis). Este procedimiento se puede utilizar para obtener una molécula de ADN recombinante que codifica el antígeno de *Leishmania* denominado M15. La secuencia de dicha molécula de ADN se proporciona en el SEQ ID NO: 1, y la secuencia de aminoácidos de la proteína codificada se proporciona en el SEQ ID NO: 2.

Se puede utilizar un enfoque similar para aislar una molécula de ADN genómico que codifica un antígeno inmunogénico de *Leishmania braziliensis*, referido en presente memoria como Lbhsp83. Más específicamente, se puede aislar un clon genómico que codifica Lbhsp83 escrutando una genoteca de expresión de *L. braziliensis* con sueros de un individuo infectado con *Leishmania*. El ADN que codifica Lbhsp83 es homólogo al gen que codifica la proteína de choque térmico eucariótica de 83 kD. La secuencia de una molécula de ADNc que codifica casi todo Lbhsp83 se presenta en el SEQ ID NO: 5, y la secuencia de aminoácidos codificada se proporciona en el SEQ ID NO: 6. Utilizando los métodos descritos más abajo, se ha encontrado que Lbhsp83 estimula la proliferación, y un perfil de citoquina Th1 y Th2 mixto, en PBMC aisladas de pacientes infectados con *L. braziliensis*. Por consiguiente, Lbhsp83 es un antígeno inmunogénico de *Leishmania*. Se ha descubierto que las regiones de Lbhsp83 que no están conservadas con el gen de mamífero son particularmente potentes para la estimulación de células T y la unión de anticuerpos. Tales regiones pueden ser identificadas, por ejemplo, mediante inspección visual de la comparación de secuencias proporcionada en la Figura 19.

Este enfoque también se puede utilizar para aislar una molécula de ADN que codifica un antígeno inmunogénico de *L. tropica* de 210 kD, referido en la presente memoria como Lt-210. La preparación y caracterización de Lt-210, y sus porciones inmunogénicas (tales como Lt-1 y las secuencias repetidas y no repetidas inmunogénicas), se describen con detalle en la Solicitud de Patente de los Estados Unidos con el Núm. de Serie 08/511.872, presentada el 4 de Agosto de 1995. La secuencia de una molécula de ADN que codifica Lt-1 se proporciona en el SEQ ID NO: 7 y la secuencia de aminoácidos codificada se presenta en el SEQ ID NO: 8.

El enfoque anterior se puede utilizar además para aislar una molécula de ADN que codifica un antígeno de *L. braziliensis* referido en la presente memoria como LbelF4A. En resumen, dicho clon puede ser aislado escrutando una genoteca de expresión de *L. braziliensis* con sueros obtenidos de un paciente aquejado de leishmaniasis de las mucosas, y analizando los antígenos reactivos para determinar la capacidad para estimular las respuestas proliferativas y la producción de citoquina Th1 preferente en PBMC aisladas de pacientes infectados con *Leishmania*, como se describe más abajo. La preparación y caracterización de LbelF4A se describe con detalle en la Solicitud de Patente de los Estados Unidos con los Núms. de Serie 08/454.036 y 08/488.386, que son una continuación de parte de la Solicitud de Patente de los Estados Unidos con el Núm. de Serie 08/232.534, presentada el 22 de Abril de 1994. La secuencia de una molécula de ADN que codifica LbelF4A se proporciona en el SEQ ID NO: 9 y la secuencia de aminoácidos codificada se presenta en SEQ ID NO: 10. También se pueden aislar homólogos de LbelF4A, tales como el encontrado en *L. major*, utilizando este enfoque, y están dentro del alcance de la presente invención.

Las composiciones descritas en la presente invención también pueden contener, o alternativamente, contienen antígenos de *Leishmania* solubles. Según se utiliza en la presente memoria, "antígenos de *Leishmania* solubles" hace referencia a una mezcla de al menos 8 antígenos de *Leishmania* diferentes que pueden ser aislados del sobrenadante de promastigotas de *Leishmania* de cualquier especie desarrolladas durante 8-12 horas en medio sin proteína. En resumen, los organismos se hacen crecer hasta la fase log tardía en medio complejo con suero hasta que alcanzan una densidad de  $2-3 \times 10^7$  organismos viable por mL de medio. Los organismos se lavan cuidadosamente para separar los componentes del medio y se resuspenden a  $2-3 \times 10^7$  organismos viables por mL de medio sin suero definido que consiste en partes iguales de RPMI 1640 y medio 199, ambos de Gibco BRL, Gaithersburg, MD. Después de 8-12 horas, el sobrenadante que contiene antígenos de *Leishmania* solubles se separa, se concentra 10 veces y se somete a diálisis frente a solución salina tamponada con fosfato durante 24 horas. La presencia de al menos ocho antígenos diferentes en la mezcla de antígenos de *Leishmania* se puede confirmar utilizando SDS-PAGE (esto es, por medio de la observación de al menos 8 bandas diferentes). Las propiedades inmunogénicas de los antígenos de *Leishmania* solubles se pueden confirmar evaluando la capacidad de la preparación para lograr una respuesta inmunitaria en cultivos de células de ganglios linfáticos y/o células mononucleares de sangre periférica (PBMC) aisladas de individuos actualmente o previamente infectados con *Leishmania*. Dicha evaluación se puede realizar como se describe más abajo.

Los antígenos individuales presentes en la mezcla de antígenos de *Leishmania* solubles se pueden aislar inmunizando ratones o conejos con sobrenadante de cultivo de *Leishmania*, que contiene antígenos solubles, y empleando el suero resultante para escrutar una genoteca de expresión de ADNc de *Leishmania* como se describe con detalle más abajo. Este procedimiento se puede utilizar para aislar moléculas de ADN recombinantes que codifican los antígenos de *L. major* referidos en la presente memoria como Lmsp1a, Lmsp9a y MAPS-1A. Las secuencias de ADN que codifican Lmsp1a, Lmsp9a y MAPS-1A se proporcionan en los SEQ ID NO: 19, 21 y 23, respectivamente, estando representadas las correspondientes secuencias de aminoácidos pronosticadas en los SEQ ID NO: 20, 22 y 24, respectivamente. De un modo similar, se pueden utilizar sueros de ratones o conejos inmunizados con sobrenadante de cultivo de *L. major* para escrutar una genoteca de ADN genómico de *L. major*. Como se detalla más abajo, este procedimiento se puede utilizar para aislar moléculas de ADN que codifican los antígenos de *L. major* referidos en la presente memoria como LmgSP1, LmgSP3, LmgSP5, LmgSP8, LmgSP9, LmgSP13, LmgSP19, y moléculas de ADN que codifican los antígenos de *L. chagasi* LcgSP1, LcgSP3, LcgSP4, LcgSP8, y LcgSP10. Las secuencias de ADN que codifican estos antígenos se proporcionan en los SEQ ID NO: 29-35 y 44-48, respectivamente, siendo proporcionadas las correspondientes secuencias de aminoácidos en los SEQ ID NO: 36-42 y 49-53. Los antígenos de *L. major* referidos en la presente memoria como 1G6-34, 1E6-44, 4A5-63, 1B11-39, 2A10-37, 4G2-83, 4H6-41 y 8G3-100 pueden ser aislados por medio de la clonación de la expresión de células T CD4+ como se describe más abajo. Las secuencias de ADN que codifican estos antígenos se proporcionan en los SEQ ID NO: 72-79, respectivamente, siendo proporcionadas las correspondientes secuencias de aminoácidos pronosticadas en los SEQ ID NO: 80-87. Las propiedades inmunogénicas de los antígenos de *Leishmania* aislados se pueden evaluar utilizando, por ejemplo, los métodos representativos descritos en la presente memoria.

Con independencia del método de preparación, los antígenos descritos en la presente memoria son inmunogénicos. En otras palabras, los antígenos (y las porciones inmunogénicas de los mismos) son capaces de lograr una respuesta inmunitaria en cultivos de células de ganglios linfáticos y/o células mononucleares de sangre periférica (PBMC) aisladas de individuos actualmente o previamente infectados con *Leishmania*. Más específicamente, los antígenos, y las porciones inmunogénicas de los mismos, tienen la capacidad de inducir la proliferación de las células T y/o lograr una respuesta de citoquinas de tipo Th1 predominantemente (*p. ej.*, producción de IL-2, IFN- $\gamma$ , y/o TNF- $\alpha$  por células T y/o células NK; y/o producción de IL-12 por monocitos, macrófagos y/o células B) en las células aisladas de individuos actualmente o previamente infectados con *Leishmania*. Un individuo infectado con *Leishmania* puede estar aquejado de una forma de leishmaniasis (tal como subclínica, cutánea, de las mucosas o visceral activa) o puede ser asintomático. Tales individuos pueden ser identificados utilizando métodos conocidos para los expertos en la técnica. Los individuos con leishmaniasis pueden ser identificados basándose en descubrimientos clínicos asociados con al menos uno de los siguientes: aislamiento de parásitos a partir de las lesiones, un ensayo cutáneo positivo con producto lisado de *Leishmania* o un ensayo serológico positivo. Los individuos asintomáticos son individuos infectados que no tienen signos o síntomas de la enfermedad. Dichos individuos pueden ser identificados basándose en un ensayo serológico positivo y/o un test cutáneo con producto lisado de *Leishmania*.

El término "PBMC", que hace referencia a una preparación de células nucleadas que consiste principalmente en linfocitos y monocitos que están presentes en la sangre periférica, incluye tanto las mezclas de células como las preparaciones de uno o más tipos de células purificadas. Las PBMC se pueden aislar mediante métodos conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, las PBMC se pueden aislar mediante centrifugación en gradiente por densidad, por ejemplo, a través de Ficoll® (Winthrop Laboratories, Nueva York). Los cultivos de ganglios linfáticos se pueden preparar generalmente inmunizando ratones BALB/c (*p. ej.*, en la almohadilla de la pata trasera) con promastigotas de *Leishmania* emulsionadas en coadyuvante completo de Freund. Los ganglios linfáticos drenados pueden ser extirpados después de la inmunización y las células T pueden ser purificadas en una columna con anti-Ig de ratón para separar las células B, seguido de un pase a través de una columna de Sephadex G10 para separar los macrófagos. De un modo similar, las células de los ganglios linfáticos se pueden aislar de un ser humano después de la biopsia o la extirpación quirúrgica de un ganglio linfático.

La capacidad de un polipéptido (*p. ej.*, un antígeno de *Leishmania* o una porción o una variante del mismo) para inducir una respuesta en cultivos de PBMC o ganglio linfático se puede evaluar poniendo en contacto las células con el polipéptido y midiendo una respuesta adecuada. En general, la cantidad de polipéptido que es suficiente para la evaluación de aproximadamente  $2 \times 10^5$  células oscila entre aproximadamente 10 ng y aproximadamente 100  $\mu$ g, y preferiblemente es de aproximadamente 1-10  $\mu$ g. La incubación del polipéptido con las células se realiza por lo general a 37°C durante aproximadamente 1-3 días. Después de la incubación con el polipéptido, las células se analizan en busca de una respuesta apropiada. Si la respuesta es una respuesta proliferativa, se puede emplear cualquiera de una variedad de mecanismos bien conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, las células se pueden exponer a un pulso de timidina radiactiva y se puede medir la incorporación de la marca al ADN celular. En general, un polipéptido que da como resultado al menos un aumento de tres veces en la proliferación por encima del fondo (esto es, la proliferación observada para las células cultivadas sin polipéptido) se considera capaz de inducir la proliferación.

De manera alternativa, la respuesta que se va a medir puede ser la secreción de una o más citoquinas (tales como interferón- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), interleuquina-4 (IL-4), interleuquina-12 (p70 y/o p40), interleuquina-2 (IL-2) y/o factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )) o el cambio de nivel de ARNm que codifica una o más citoquinas específicas. En particular, la secreción de interferón- $\gamma$ , interleuquina-2, factor de necrosis tumoral- $\alpha$  y/o interleuquina-12 es indicativa de una



- 5 respuesta Th1, que es responsable del efecto protector frente a *Leishmania*. Los análisis de cualquiera de las citoquinas anteriores se pueden realizar en general utilizando métodos conocidos por los expertos en la técnica, tales como el análisis de inmunoabsorción con enzima ligada (ELISA). Los anticuerpos adecuados para su uso en tales análisis se pueden obtener de una variedad de fuentes tales como Chemicon, Temucula, CA y PharMingen, San Diego, CA, y se pueden utilizar generalmente de acuerdo con las instrucciones de los fabricantes. El nivel de ARNm que codifica una o más citoquinas específicas se puede evaluar, por ejemplo, mediante amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR). En general, un polipéptido que es capaz de inducir, en una preparación de aproximadamente  $1-3 \times 10^5$  células, la producción de 30 pg/mL de IL-12, IL-4, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  o IL-12 p40, o 10 pg/mL de IL-12 p70, se considera capaz de estimular la producción de una citoquina.
- 10 Las porciones inmunogénicas de los antígenos descritos en la presente memoria se pueden preparar e identificar utilizando mecanismos bien conocidos, tales como los resumidos por Paul, en *Fundamental Immunology*, 3ª ed., 243-247 (Raven Press, 1993) y referencias allí citadas. Tales técnicas incluyen el escrutinio de polipéptidos derivados del antígeno nativo en busca de propiedades inmunogénicas utilizando, por ejemplo, las técnicas representativas descritas en la presente memoria. Una porción inmunogénica de un polipéptido es una porción que, en tales análisis representativos, genera una respuesta inmunitaria (p. ej., proliferación y/o producción de citoquina) que es esencialmente similar a la generada por el antígeno completo. En otras palabras, una porción inmunogénica de un antígeno puede generar al menos aproximadamente 25%, y preferiblemente al menos aproximadamente 50%, de la respuesta generada por el antígeno completo en los análisis modelo descritos en la presente memoria.
- 15 Se pueden generar porciones y otras variantes de antígenos inmunogénicos de *Leishmania* mediante métodos sintéticos o recombinantes. Los polipéptidos sintéticos que tienen menos de aproximadamente 100 aminoácidos, y generalmente menos de aproximadamente 50 aminoácidos, pueden ser generados utilizando mecanismos bien conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, dichos polipéptidos pueden ser sintetizados utilizando cualquiera de las técnicas en fase sólida disponibles en el mercado, tales como el método de síntesis en fase sólida de Merrifield, en el que se añaden secuencialmente aminoácidos a una cadena de aminoácidos en crecimiento. Véase Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* 85:2149-2146, 1963. El equipamiento para la síntesis automatizada de polipéptidos se encuentra disponible en el mercado de proveedores tales como Perkin Elmer/Applied BioSystems Division, Foster City, CA, y se puede hacer funcionar de acuerdo con las instrucciones del fabricante.
- 20 Los polipéptidos recombinantes que contienen porciones y/o variantes de un antígeno nativo se pueden preparar fácilmente a partir de una secuencia de ADN que codifica el antígeno. Por ejemplo, los sobrenadantes de sistemas de anfitrión/vector adecuados que secretan proteína recombinante al medio de cultivo se pueden concentrar primero utilizando un filtro disponible en el mercado. Tras la concentración, el producto concentrado se puede aplicar a una matriz de purificación adecuada tal como una matriz de afinidad o una resina de intercambio iónico. Finalmente, se pueden emplear una o más etapas de HPLC de fase inversa para purificar adicionalmente una proteína recombinante.
- 25 En general, se puede emplear cualquiera de una variedad de vectores de expresión conocidos por los expertos en la técnica para expresar los polipéptidos recombinantes de esta invención. La expresión se puede lograr en cualquier anfitrión apropiado que haya sido transformado o transfectado con un vector de expresión que contenga una molécula de ADN que codifique un polipéptido recombinante. Las células anfitrionas adecuadas incluyen procariontas, levaduras y células eucarióticas superiores. Preferiblemente, las células anfitrionas empleadas son *E. coli*, levaduras, o una línea celular de mamífero tal como COS o CHO. Las secuencias de ADN expresadas de esta manera pueden codificar antígenos de origen natural, porciones de antígenos de origen natural, u otras variantes de los mismos. Por ejemplo, se pueden preparar generalmente variantes de un antígeno nativo utilizando técnicas de mutagénesis convencionales, tales como mutagénesis específica del sitio dirigida por oligonucleótidos, y se pueden separar secciones de la secuencia de ADN para permitir la preparación de polipéptidos truncados.
- 30 Se describen en la presente memoria secuencias de repetición epitópica o epítomos antigénicos, de un antígeno de *Leishmania*, junto con polipéptidos que comprenden al menos dos de tales epítomos antigénicos contiguos. Según se utiliza en la presente memoria, un "epítomo" es una porción de un antígeno que reacciona con sueros de individuos infectados con *Leishmania* (esto es, un epítomo es unido específicamente por uno o más anticuerpos presentes en tales sueros). Como se ha comentado más arriba, los epítomos de los antígenos descritos en la presente solicitud pueden ser identificados generalmente utilizando mecanismos bien conocidos por los expertos en la técnica.
- 35 Se describen en la presente memoria epítomos antigénicos que comprenden una secuencia de aminoácidos proporcionada en los SEQ ID NO: 43, 56, 57 o 58. Como se comenta con mayor detalle más abajo, los epítomos antigénicos proporcionados en la presente memoria se pueden emplear en la diagnosis y el tratamiento de la infección por *Leishmania*, ya sea solos o combinados con otros antígenos o epítomos antigénicos de *Leishmania*. Los epítomos antigénicos y los polipéptidos que comprenden tales epítomos se pueden preparar mediante métodos sintéticos, como se describe generalmente más arriba y con detalle en el Ejemplo 15.
- 40 En ciertos aspectos de la presente invención, descritos con detalle más abajo, los polipéptidos, epítomos antigénicos y/o antígenos de *Leishmania* solubles pueden ser incorporados a composiciones farmacéuticas o vacunas. Como aclaración, el término "polipéptido" se utilizará cuando se describan realizaciones específicas de las composiciones terapéuticas y los métodos de diagnóstico de la invención. Sin embargo, estará claro para un experto en la técnica
- 45
- 50
- 55
- 60

que los epítomos antigénicos de la presente invención también pueden ser empleados en tales composiciones y métodos.

Las composiciones farmacéuticas comprenden uno o más polipéptidos, cada uno de los cuales puede contener una o más de las secuencias anteriores (o variantes de las mismas), y un portador fisiológicamente aceptable. Las vacunas comprenden uno o más de los polipéptidos anteriores y un intensificador de la respuesta inmunitaria no específica, tal como un coadyuvante (*p. ej.*, Lbelf4A, interleuquina-12 u otras citoquinas) o un liposoma (en el cual se incorpora el polipéptido). Las vacunas pueden contener adicionalmente un vehículo de liberación, tal como una microesfera biodegradable (descrita, por ejemplo, en las Patentes de los Estados Unidos Núms. 4.897.268 y 5.075.109). Las composiciones farmacéuticas y las vacunas dentro del alcance de la presente invención también pueden contener otros antígenos de *Leishmania*, ya sea incorporados a un polipéptido combinado ya sea presentes en uno o más polipéptidos separados.

De manera alternativa, una composición farmacéutica o vacuna puede contener ADN que codifica uno o más de los polipéptidos descritos más arriba, de manera que el polipéptido es generado *in situ*. En tales composiciones farmacéuticas y vacunas, el ADN puede estar presente en cualquiera de una variedad de sistemas de liberación conocidos por los expertos en la técnica, incluyendo sistemas de expresión de ácido nucleico, bacterias y sistemas de expresión virales. Los sistemas de expresión de ácidos nucleicos apropiados contienen las secuencias de ADN necesarias para su expresión en el paciente (tal como un promotor y una señal de terminación adecuados). Los sistemas de liberación bacterianos implican la administración de una bacteria (tal como *Bacillus-Calmette-Guerrin*) que expresa una porción inmunogénica del polipéptido sobre su superficie celular. En una realización preferida, el ADN puede ser introducido utilizando un sistema de expresión viral (*p. ej.*, vaccinia u otro poxvirus, retrovirus, o adenovirus), que puede implicar el uso de un virus de replicación competente, no patógeno (defectuoso). Los mecanismos para incorporar ADN en tales sistemas de expresión son bien conocidos por los expertos en la técnica. El ADN también puede estar "desnudo", como describen, por ejemplo, Ulmer et al., en *Science* 259:1745-1749 (1993) y revisado por Cohen, *Science* 259:1691-1692 (1993). La absorción de ADN desnudo se puede incrementar revistiendo con el ADN cuentas biodegradables, que son eficazmente transportadas a las células.

Si bien se puede emplear cualquier portador adecuado conocido por los expertos en la técnica en las composiciones farmacéuticas de esta invención, el tipo de portador variará dependiendo del modo de administración. Para la administración parenteral, tal como la inyección subcutánea, el portador comprende preferiblemente agua, solución salina, alcohol, una grasa, una cera o un tampón. Para la administración oral, se puede emplear cualquiera de los portadores anteriores o un portador sólido, tal como manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, talco, celulosa, glucosa, sacarosa, y carbonato de magnesio. Las microesferas biodegradables (*p. ej.*, galactida poliláctica) también se pueden emplear como portadores para las composiciones farmacéuticas de esta invención. Las microesferas biodegradables adecuadas se describen, por ejemplo, en las Patentes de los Estados Unidos Núms. 4.897.268 y 5.075.109.

Se puede emplear cualquiera de una variedad de coadyuvantes en las vacunas de esta invención para intensificar de manera no específica la respuesta inmunitaria. La mayor parte de los coadyuvantes contienen una sustancia diseñada para proteger el antígeno del catabolismo rápido, tal como hidróxido de aluminio o aceite mineral, y un estimulador no específico de respuestas inmunitarias, tal como lípido A, *Bordella pertussis* o *Mycobacterium tuberculosis*. Los coadyuvantes adecuados se encuentran disponibles en el mercado, por ejemplo, en forma de Coadyuvante Incompleto y Coadyuvante Completo de Freund (Difco Laboratories, Detroit, Mn), Coadyuvante 65 de Merck (Merck and Company, Inc., Rahway, NJ), alúmina, microesferas biodegradables, lípido A monofosforilado y quil A. Los coadyuvantes preferidos incluyen Lbelf4A, IL-12 y otras citoquinas tales como IFN- $\gamma$  o factor estimulador de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF). En virtud de su capacidad para inducir una respuesta inmunitaria Th1 exclusiva, es particularmente preferido el uso de Lbelf4A, y sus variantes, como coadyuvante en las vacunas de la presente invención.

Las composiciones de la presente invención pueden incluir múltiples polipéptidos seleccionados con el fin de proporcionar una mejor protección contra una variedad de especies de *Leishmania*. Tales polipéptidos se pueden seleccionar basándose en la especie de origen del antígeno nativo o basándose en un alto grado de conservación de la secuencia de aminoácidos entre diferentes especies de *Leishmania*. Una combinación de polipéptidos individuales puede ser particularmente eficaz como vacuna profiláctica y/o terapéutica debido a que (1) la estimulación de la proliferación y/o producción de citoquina por polipéptidos individuales puede ser aditiva, (2) la estimulación de la proliferación y/o la producción de citoquina por polipéptidos individuales puede ser sinérgica, (3) los polipéptidos individuales pueden estimular los perfiles de citoquina de tal manera que sean complementarios entre sí y/o (4) los polipéptidos individuales pueden ser complementarios entre sí cuando algunos de ellos son expresados más abundantemente en la especie individual o cepa de *Leishmania* responsable de la infección. Una combinación preferida contiene polipéptidos que comprenden porciones inmunogénicas de M15, Ldp23, Lbhsp83, Lt-1 y Lbelf4A. De manera alternativa, o además, la combinación puede incluir uno o más polipéptidos que comprenden porciones inmunogénicas de otros antígenos de *Leishmania* descritos en la presente memoria, y/o antígenos de *Leishmania* solubles.

Las composiciones farmacéuticas y vacunas anteriores se pueden utilizar, por ejemplo, para inducir inmunidad protectora contra *Leishmania* en un paciente, tal como un ser humano o un perro, para prevenir la leishmaniasis. Las dosis y los métodos de administración apropiados para estos fines se describen con detalle más abajo.

- 5 Las composiciones farmacéuticas y vacunas descritas en la presente memoria también se pueden utilizar para estimular una respuesta inmunitaria, que puede ser celular y/o humoral, en un paciente. Para los pacientes infectados por *Leishmania*, las respuestas inmunitarias que se pueden generar incluyen una respuesta inmunitaria Th1 preferente (esto es, una respuesta caracterizada por la producción de las citoquinas interleuquina-1, interleuquina-2, interleuquina-12 y/o interferón- $\gamma$ , así como factor de necrosis tumoral- $\alpha$ ). Para pacientes no infectados, la respuesta inmunitaria puede ser la producción de interleuquina-12 y/o interleuquina-2, o la estimulación de células T gamma delta. En cualquier categoría de paciente, la respuesta estimulada puede incluir la producción de IL-12. Tales respuestas también se pueden lograr en muestras biológicas de PBMC o sus componentes derivados de individuos infectados por *Leishmania* o no infectados. Como se ha indicado más arriba, los análisis para cualquiera de las citoquinas anteriores se pueden realizar generalmente utilizando métodos conocidos por los expertos en la técnica, tales como el análisis de inmunoabsorción con enzima ligada (ELISA).
- 10
- 15 Las composiciones farmacéuticas y vacunas adecuadas para su uso en este aspecto de la presente invención son aquellas que contienen al menos un polipéptido que comprende una porción inmunogénica de un antígeno de *Leishmania* que tiene la secuencia de aminoácidos citada en el SEQ ID NO. 24. Preferiblemente, los polipéptidos empleados en las composiciones farmacéuticas y vacunas son complementarios, como se ha descrito más arriba. También se pueden emplear antígenos de *Leishmania* solubles, con o sin polipéptidos adicionales.
- 20
- 25 Las composiciones farmacéuticas y vacunas descritas en la presente memoria también se pueden utilizar para tratar a un paciente aquejado de una enfermedad sensible a la estimulación por IL-12. El paciente puede ser cualquier animal de sangre caliente, tal como un ser humano o un perro. Tales enfermedades incluyen infecciones (que pueden ser, por ejemplo, bacterianas, virales o protozoicas) o enfermedades tales como cáncer. En una realización, la enfermedad es la leishmaniasis, y el paciente puede presentar síntomas clínicos o puede ser asintomático. En general, la sensibilidad de una enfermedad concreta a la estimulación por IL-12 se puede determinar evaluando el efecto del tratamiento con una composición farmacéutica o vacuna de la presente invención sobre las secuelas clínicas de la inmunidad. Por ejemplo, si el tratamiento da como resultado una respuesta Th1 agudizada o la conversión de un perfil Th2 en Th1, acompañadas de una mejora clínica en el paciente tratado, la enfermedad es sensible a la estimulación por IL-12. La administración de polipéptidos puede ser como se describe más abajo, o se puede prolongar durante un período de tiempo más largo, dependiendo de la indicación. Preferiblemente, los polipéptidos empleados en las composiciones farmacéuticas y las vacunas son complementarios, como se ha descrito más arriba. Una combinación particularmente preferida contiene polipéptidos que comprenden porciones inmunogénicas de M15, Ldp23, Lbhsp83, Lt-1 y LbelF4A, Lmsp1a, Lmsp9a, y MAPS-1A. También se pueden emplear antígenos solubles de *Leishmania*, con o sin polipéptidos adicionales.
- 30
- 35 Las rutas y la frecuencia de la administración, así como la dosificación, para los aspectos anteriores de la presente invención variarán de individuo a individuo y pueden ser análogos a los utilizados actualmente en la inmunización frente a otras infecciones, incluyendo infecciones protozoicas, virales y bacterianas. En general, las composiciones farmacéuticas y las vacunas se pueden administrar por medio de inyecciones (*p. ej.*, intracutáneas, intramusculares, intravenosas o subcutáneas), intranasalmente (*p. ej.*, mediante aspiración) u oralmente. Se puede administrar entre 40 1 y 12 dosis a lo largo de un período de 1 año. Para la vacunación terapéutica (esto es, el tratamiento de un individuo afectado), se administran preferiblemente 12 dosis, a intervalos de un mes. Para el uso profiláctico, se administran preferiblemente 3 dosis, a intervalos de 3 meses. En cada caso, se pueden suministrar vacunaciones de refuerzo periódicamente después de eso. Los protocolos alternativos pueden ser apropiados para pacientes individuales. Una dosis adecuada es una cantidad de polipéptido o ADN que, cuando se administra como se ha descrito más arriba, es capaz de originar una respuesta inmunitaria en un paciente inmunizado suficiente para proteger al paciente de la leishmaniasis durante al menos 1-2 años. En general, la cantidad de polipéptido presente en una dosis (o producido *in situ* por el ADN de una dosis) oscila de aproximadamente 100 ng a aproximadamente 1 mg por kg de anfitrión, típicamente de aproximadamente 10  $\mu$ g a aproximadamente 100  $\mu$ g. Los tamaños de las dosis adecuadas variarán con el tamaño del paciente, pero típicamente oscilarán de aproximadamente 0,1 mL a aproximadamente 5 mL.
- 45
- 50 Se describen en la presente memoria los métodos para utilizar uno o más de los polipéptidos descritos más arriba para diagnosticar la infección por *Leishmania* en un paciente utilizando una prueba cutánea. Según se utiliza en la presente memoria, una "prueba cutánea" es cualquier análisis realizado directamente en un paciente en el que se mide la reacción de hipersensibilidad de tipo retardado (DTH) (tal como endurecimiento y enrojecimiento acompañante) después de la inyección intradérmica de uno o más polipéptidos como se ha descrito más arriba. Dicha inyección se puede llevar a cabo utilizando cualquier dispositivo adecuado suficiente para poner en contacto el polipéptido o los polipéptidos con las células de la dermis del paciente, tal como una jeringa para tuberculina o una jeringa de 1 mL. Preferiblemente, la reacción se mide al menos 48 horas después de la inyección, más preferiblemente 72 horas después de la inyección.
- 55
- 60 La reacción DTH es una respuesta inmunitaria mediada por células, que es mayor en pacientes que han sido expuestos previamente al antígeno de ensayo (esto es, una porción inmunogénica de un polipéptido empleado, o

una de sus variantes). La respuesta se puede medir visualmente, utilizando una regla. En general, el endurecimiento que es mayor de aproximadamente 0,5 cm de diámetro, preferiblemente mayor de aproximadamente 1,0 cm de diámetro, es una respuesta positiva, indicativa de infección por *Leishmania*, que se puede manifestar o no en forma de una enfermedad activa.

- 5 Los polipéptidos de esta invención se formulan preferiblemente, para su uso en una prueba cutánea, en forma de composiciones farmacéuticas que contienen al menos un polipéptido y un portador fisiológicamente aceptable, como se ha descrito más arriba. Tales composiciones contienen típicamente uno o más de los polipéptidos anteriores en una cantidad que oscila de aproximadamente 1 µg a 100 µg, preferiblemente de aproximadamente 10 µg a 50 µg en un volumen de 0,1 mL. Preferiblemente, el portador empleado en tales composiciones farmacéuticas es una solución salina con conservantes apropiados, tales como fenol y/o Tween 80®.

- 10 Los polipéptidos de la invención se pueden emplear también combinados con uno o más antígenos de *Leishmania* conocidos en la diagnosis de la leishmaniasis, utilizando, por ejemplo, la prueba cutánea descrita más arriba. Preferiblemente, los polipéptidos individuales se seleccionan de tal manera que sean complementarios entre si. Los ejemplos de los antígenos de *Leishmania* conocidos que se pueden emplear provechosamente junto con los polipéptidos de la invención incluyen K39 (Bums et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1993 90:775-779).

- 15 Los siguientes Ejemplos se ofrecen a modo de ilustración y no a modo de limitación. En la medida en la que los ejemplos se refieren a una materia sujeta que se encuentra fuera de las reivindicaciones, los ejemplos se proporcionan como una pauta general para el experto en la técnica.

## EJEMPLOS

### 20 EJEMPLO 1

#### PREPARACIÓN DE M15

Este Ejemplo ilustra la preparación de un antígeno M15 de *Leishmania*, que tiene la secuencia proporcionada en el SEQ ID NO: 2.

- 25 Se escrutó una genoteca de expresión de ADNc de amastigotas de *L. major* (cepa Friedlan) preparada en el vector λZAP II (Stratagene, La Jolla, CA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante utilizando sueros obtenidos de ratones BALB/c infectados con *L. major* (8 semanas después de la inoculación). Se escrutaron aproximadamente 40.000 placas y se purificaron cuatro clones que expresaban antígenos reactivos hasta la homogeneidad mediante dos rondas consecutivas de escrutinio de baja densidad. Se extirparon insertos de fagémidos Bluescript a partir clones positivos para un análisis adicional. Con posterioridad se utilizó un fragmento de restricción *EcoRI/SstII* desde el extremo 5' de un inserto de ADNc parcial aislado durante el escrutinio de la primera ronda (pLma1-1) como sonda para volver a escrutar en busca de clones que contenían los insertos de ADNc completos. La sonda se marcó para una actividad muy específica ( $10^9$  cpm/µg) con [ $^{32}$ P]dCTP utilizando el método del cebado al azar y se utilizó para escrutar 10.000 placas de la genoteca de expresión de *L. major* descrita más arriba. Los clones positivos se compararon mediante digestión con enzimas de restricción y se seleccionó el clon con el inserto más largo (pflI-1) para el siguiente análisis.

- 35 Se realizaron análisis de la secuencia de ADN en un secuenciador automático de Applied Biosystems utilizando polimerasa de Taq y terminadores ddNTP acoplados a colorante y cebadores de secuenciación marcados con colorante. La secuencia completa del inserto de 2685 pb se determinó utilizando una combinación de cebador-secuenciación dirigida y mediante secuenciación de una serie de subclones de delección con Exonucleasa III solapantes generados utilizando el sistema Erase-abase (Promega, Madison, WI). La secuencia de este inserto se proporciona en el SEQ ID NO: 1, y la secuencia de aminoácidos deducida se proporciona en el SEQ ID NO: 2.

- 40 El inserto completo del clon pflI-1 fue escindido mediante digestión con *BamHI/KpnI* y fue subclonado en marco en pQE31 digerido con *BamHI/KpnI* (QUIAGEN) para generar el constructo pM151A. La *E. coli* que contenía este constructo expresó induciblemente altos niveles del antígeno de *L. major* codificado por pflI-1 (denominado M15) con la adición de una etiqueta de 6-histidinas en el extremo amino. Se indujeron cultivos de gran volumen (500 ml) de células anfitrionas de *E. coli* que contenían el constructo pM151A para que expresaran proteína recombinante mediante la adición de IPTG 2 mM en la fase semi-logarítmica de crecimiento. El crecimiento continuó durante 4 a 5 horas y después se sedimentaron las bacterias y se lavaron una vez con PBS frío. Las bacterias fueron resuspendidas en 20 ml de tampón de lisis ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  50 mM, pH 8,0, NaCl 300 mM, β-mercaptoetanol 10 mM) que contenía 20 mg de lisozima y se lisaron mediante incubación durante 1 hora a 4°C seguido de breve sonicación. El material insoluble se separó mediante centrifugación a 10.000 xg durante 10 minutos y aunque se encontró que la proteína recombinante estaba uniformemente distribuida entre las fracciones solubles e insolubles, se descartó el material insoluble en este punto. La proteína recombinante que contenía la etiqueta de histidina amino terminal se purificó por afinidad utilizando una resina Ni-NTA (QUIAGEN) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. En resumen, se añadieron 8 ml de Ni-NTA resuspendida en tampón de lisis a la fracción de producto lisado soluble y se llevó a cabo la unión con un mezclado constante durante 1 hora a 4°C. Después la mezcla se cargó en una columna de flujo por gravedad y se dejó que el material no unido fluyera. La matriz de Ni-NTA se lavó 3 veces con 25 ml de tampón de lavado ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  50 mM, pH 6,0, NaCl 300 mM, β-mercaptoetanol 10 mM) y el material unido se hizo

eluir en 25 ml de tampón de elución ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  50 mM, pH 5,0, NaCl 300 mM,  $\beta$ -mercaptoetanol 10mM). El material eluido se sometió a diálisis frente a 3 cambios de PBS, se filtró en condiciones estériles y se almacenó a  $-20^\circ\text{C}$ . Se demostró mediante análisis SDS-PAGE que la proteína recombinante purificada estaba libre de cualquier cantidad significativa de proteína de *E. coli*. Se supuso que un pequeño número de bandas de peso molecular inferior eran productos proteolíticos del antígeno de *L. major* basándose en su reactividad mediante análisis de transferencia western. Se generó un antisuero policlonal de título elevado contra M15 en conejos mediante inyección subcutánea repetida de proteína recombinante. El análisis de transferencia Western de los productos lisados de promastigotas y amastigotas de *L. major* utilizando este antisuero indicó que la proteína era expresada constitutivamente a lo largo de todo el ciclo vital del parásito.

## 10 EJEMPLO 2

### PREPARACIÓN DE LDP23

Este Ejemplo ilustra la preparación de un antígeno Ldp23 de *Leishmania*, que tiene la secuencia proporcionada en el SEQ ID NO: 4.

#### 15 A. Purificación de Péptidos asociados a la Clase II del MHC de Macrófagos P388D1 Infectados con *L. donovani*

Para averiguar si la infección *in vitro* de los macrófagos cargaría sus moléculas de la clase II del MHC con péptidos del parásito, se llevaron a cabo experimentos iniciales para someter a ensayo la capacidad de la línea celular P388D1 de macrófagos infectados con *L. donovani* para presentar antígenos del parásito a las células T específicas de *L. donovani*. Esta línea celular de macrófagos se seleccionó porque tiene el mismo haplotipo H-2 que el ratón BALB/c, que es una cepa de ratón moderadamente susceptible a la infección por *L. donovani* y seleccionada para llevar a cabo los experimentos *in vivo*. Utilizando una proporción de 3-5 parásitos por célula y una incubación inicial a la temperatura ambiente durante 4-6 horas seguida de  $37^\circ\text{C}$  durante 24-48 horas, se infectaron casi el 90% de los macrófagos. El nivel de expresión de la molécula de clase II del MHC, determinado mediante análisis FACS, indicó que la infección no causaba efecto sobre los niveles de expresión de la clase II del MHC cuando se comparaban con las células de control no infectadas.

Para someter a ensayo la capacidad de células P388D1 infectadas con *L. donovani* para presentar antígenos del parásito, se infectaron los macrófagos como se ha indicado más arriba y se incubaron a  $26^\circ\text{C}$  durante 6 horas, y después a  $37^\circ\text{C}$  durante 24, 48 ó 72 horas. En cada uno de estos momentos, las células no adherentes y los parásitos libres se lavaron y las células adherentes se soltaron mecánicamente, se lavaron y se fijaron con paraformaldehído. Después se utilizaron estas células como células presentadoras de antígenos (APC) para células T de ganglios linfáticos purificados de ratones BALB/c inmunizados con promastigotas de *L. donovani*. Para generar estas células T específicas anti-*L. donovani*, se inmunizaron ratones BALB/c ( $\text{H-2}^d$ ) de ambos sexos (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) a las 8 - 14 semanas de edad en la almohadilla de la pata trasera con  $5-10 \times 10^6$  promastigotas de *L. donovani* emulsionadas en coadyuvante completo de Freund (CFA) (Difco Laboratories, Madison, MI) como describen Rodrigues et al., en Parasite Immunol. 14:49 (1992). Los ganglios linfáticos drenados se extirparon 8 días después de la inmunización y las células T se purificaron en una columna anti-Ig de ratón para separar las células B, como describen Bunn-Moreno y Campos-Neto, en J. Immunol. 127:427 (1981), seguido de un pase a través de una columna Sephadex G10 para separar los macrófagos.

Se calculó el índice de estimulación dividiendo las cpm obtenidas para las células cultivadas en presencia de macrófagos P388D1 infectados por las cpm obtenidas de las células cultivadas en presencia de macrófagos no infectados, pero sometidas a las mismas condiciones que los macrófagos infectados. Los resultados mostrados en la Figura 1 indican que los macrófagos P388D1 infectados con *L. donovani* procesan los antígenos del parásito y que la presentación óptima se produce después de las 48 horas de infección. No se observó estimulación de las células T por los macrófagos no infectados.

Para aislar la Clase II del MHC asociada con los péptidos de *L. donovani*, se infectaron los macrófagos P388D1 con promastigotas de *L. donovani* para una incubación inicial de 6 horas a la temperatura ambiente. Los cultivos se transfirieron después a  $37^\circ\text{C}$  durante el resto del período de incubación de 48 horas. A una razón de 3-5 parásitos por macrófago cerca del 90% de los macrófagos se infectaron después de 24 horas de incubación a  $37^\circ\text{C}$ .

Las moléculas de la clase II del MHC fueron purificadas después por afinidad. Se utilizaron aproximadamente  $1,5 \times 10^{10}$  macrófagos P388D1 infectados con *L. donovani* o un número igual de no infectados para cada purificación. Las células se cosecharon, se lavaron con PBS y se incubaron durante 30 minutos en tampón de lisis frío (PBS, Nonidet P40 al 1%, yodoacetamida 25 mM, azida de sodio al 0,04%, aprotinina 1 mM y PMSF 1 mM). El material insoluble se separó mediante centrifugación a 40.000 g durante 1 hora y el sobrenadante se recicló durante la noche a  $4^\circ\text{C}$  sobre una columna Sepharose anti-moléculas de clase II del MHC ( $\text{H-2}^d$ ) de 5 ml (columna de Proteína G Sepharose a la cual se había unido el anticuerpo monoclonal MK-D6). Los sobrenadantes de cultivo de las células de hibridoma MK-D6 (Colección de Cultivos Tipo Americana, Rockville, MD) se emplearon como fuente para el anticuerpo monoclonal anti-clase II del MHC ( $\text{H-2}^d$ ). La columna se lavó con 50 ml de tampón de lisis y después con 50 ml de PBS que contenía detergente de octil-glucopiranosido al 0,5%. Las moléculas unidas se hicieron eluir de la columna con ácido

acético 1 M en NaCl al 0,2%. Las molécula de MHC/péptido se separaron de la IgG (anticuerpo monoclonal MK-D6) utilizando una unidad de filtro Centricon 100 (Amicon Division, W.R. Grace & Co., Beverly, MA). Los péptidos se disociaron después de las moléculas de clase II mediante la adición de ácido acético 2,5 M, seguido de separación utilizando una unidad de filtro Centricon 10. La preparación de péptido resultante, presente en la muestra de bajo peso molecular, se secó después utilizando un concentrador Speed Vac (Savant Instrument Inc., Farmingdale, NY).

Los péptidos se redisolviéron en 200 µl de TFA al 0,05% y se separaron mediante cromatografía líquida de alta resolución de fase inversa (RP-HPLC) utilizando una columna C-18 Vydac de 2,1 mm x 25 cm a una velocidad de flujo de 0,15 ml/min empleando un gradiente de acetonitrilo de 1 a 30% (60 min) seguido de un gradiente 30 a 60% (30 min) y después un gradiente 60 a 80% (90-110 min). Las células P388D1 no infectadas fueron procesadas de un modo similar para que sirvieran como control de fondo para los péptidos asociados con la clase II del MHC endógena. La Figura 2 muestra un experimento representativo; se indican cuatro picos distintos que están presentes solamente en el material aislado de macrófagos infectados (panel B), y no en el material aislado de macrófagos no infectados (panel A).

De las tres extracciones de péptidos independientes, se aislaron veinticinco picos de péptidos por HPLC distintos de los macrófagos infectados con *L. donovani* y se sometieron a análisis de la secuencia de proteínas utilizando la degradación de Edman automática en un secuenciador de proteínas en fase gaseosa Applied Biosystems 477. El análisis de la secuencia de proteína y de aminoácidos fue realizado por W. M. Keck Foundation, Biotechnology Resource Laboratory, Yale University, New Haven, CT. Prácticamente en ninguna de las determinaciones, se pudo realizar la asignación para la primera posición. Asimismo, en la mayoría de los casos la definición de los residuos de aminoácidos de las 10-15 posiciones se basó en la dominancia cuantitativa de un residuo sobre los otros. Utilizando este enfoque, las secuencias obtenidas para diversos péptidos mostraron la presencia de 3-6 residuos diferentes en muchos de los 10-15 ciclos de secuencia analizados para cada determinación, reflejando una mezcla de péptidos. Además, no se pudieron obtener secuencias para algunos picos debido a que los péptidos fueron bloqueados. No obstante, se determinaron tres secuencias de péptidos. Se investigaron las secuencias de aminoácidos en busca de la identidad con proteínas de la base de datos GenBank utilizando los programas GENPETP, PIR y SWISSPROT. El análisis de la base de datos de secuencias reveló que uno de los péptidos era muy homólogo a la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa de varias especies. Otro péptido tenía homología con el factor de elongación de varias especies, incluyendo *Leishmania*. La tercera secuencia no estaba claramente relacionada con ninguna de las proteínas conocidas, y se muestra más abajo:

XQXPQ(L/K)VFDEXX (SEQ ID NO:11).

### B. Clonación y Secuenciación del Gen Ldp23

Con el fin de recuperar la proteína de *L. donovani* que había sido procesada en un péptido asociado con las moléculas de clase II del MHC de macrófagos infectados, se seleccionó la secuencia peptídica de origen incierto para guiar la estrategia para clonar el correspondiente gen del parásito. Inicialmente se amplificó un fragmento de ADN a partir de ADNc de promastigota de *L. donovani* por medio de PCR. El cebador efector fue un oligonucleótido derivado del péptido (5' >GGAATTCCCCInCAGCTInGTInTTCGAC < 3') (SEQ ID NO: 12) que contenía un sitio para una endonucleasa de restricción EcoRI (subrayado). Las bases se seleccionaron siguiendo el uso preferente de codones de *L. donovani*, como describen Langford et al., en Exp. Parasitol. 74:360 (1992). Se utilizó inosina para los residuos de las posiciones 4, 6 y 7 debido a la baja garantía del uso de codones para los correspondientes aminoácidos. Además, el ácido L-glutámico carboxi terminal no fue incluido para el diseño del cebador. El cebador antisentido fue un oligonucleótido de poli-timidina (oligo dT, cebador aguas abajo) que contenía un sitio para la endonucleasa de restricción XhoI.

El fragmento génico fue amplificado a partir de una preparación de ADNc de promastigota de *L. donovani* utilizando las siguientes condiciones de reacción: un ciclo de 3 min a 94°C seguido inmediatamente de 35 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 45°C y 1 min a 72°C. El ADNc de *L. donovani* se preparó a partir de 5 x 10<sup>7</sup> formas promastigotas lavadas recogidas en la fase de crecimiento log (3 días de cultivo). El ADNc se obtuvo utilizando un kit Invitrogen cDNA Cycle<sup>®</sup> (Invitrogen Co., San Diego, CA). Los cebadores oligonucleotídicos fueron sintetizados por el Laboratorio de Síntesis de ADN, Departamento de Patología, Facultad de Medicina de la Universidad de Yale.

Los productos de la PCR se analizaron mediante electroforesis en gel. Solamente se obtuvo una banda de aproximadamente 300 pb. Este fragmento se clonó y su secuencia confirmó la secuencia del cebador basado en el péptido incluyendo el codón de ácido glutámico, deliberadamente no incluido en la secuencia del cebador.

El fragmento del gen amplificado por PCR se ligó en el vector pCR<sup>®</sup> utilizando el sistema de clonación de TA (Invitrogen Co., San Diego, CA). Los transformantes se seleccionaron en medio LB que contenía 100 µg/ml de ampicilina y se aisló el ADN plasmídico utilizando el kit de purificación de ADN Wizard<sup>®</sup> Minipreps (Promega Co., Madison, WI). El ADN del inserto fue liberado con las enzimas de restricción EcoRI y XhoI (New England Biolabs, Beverly, MA), purificado de una electroforesis en gel de agarosa y marcado con P<sup>32</sup> utilizando un método de cebado al azar (Megaprime Labeling Kit, Amersham Life Science, Buckinghamshire, Inglaterra).

Este fragmento de ADN se utilizó como sonda para escrutar una genoteca de ADNc de promastigota de *L. donovani* como describen Skeiky et al., en *Infect. Immun.* 62:1643 (1994). Se escindió un ADNc de aproximadamente 650 pb (Ldp23) del fagémido mediante escisión *in vivo* utilizando el protocolo de Stratagene. Se realizó la secuenciación del ADN utilizando el sistema Sequenase versión 2 (kit de secuenciación de ADN) en presencia o ausencia de 7-desaza-GTP (United States Biochemical, Cleveland, OH). La secuencia se proporciona como el SEQ ID NO: 3, y muestra la completa homología con el fragmento de PCR de 300 pb original. Se identificó un marco de lectura abierto de 525 pb que contenía un codón ATG que sigue a las últimas 4 bases de la secuencia líder empalmada y 3 codones de terminación adyacentes a la cola de poli A. Este marco también codifica la secuencia carboxi terminal (KVFDE) (SEQ ID NO: 13) del péptido asociado a la clase II del MHC purificado. El análisis de la secuencia de la secuencia de proteínas deducida reveló un sitio de glicosilación potencial (Asn-Cys-Ser) en las posiciones 68-70.

Se realizó un análisis de la secuencia utilizando los Programas de University of Wisconsin Genetics Computer Group y las bases de datos GenBank y EMBL de secuencias de proteínas y ADN. La búsqueda de homología del gen Ldp23 con secuencias conocidas no reveló ninguna homología significativa.

### C. Expresión Bacteriana y Purificación de la Proteína Recombinante

La proteína donadora del péptido de *L. donovani* recombinante se produjo en *E. coli* transformada con el vector de expresión pGEX 2T en el que se había subclonado en marco el gen Ldp23. Se utilizó la PCR para subclonar el gen clonado en marco en el vector de expresión pGEX 2T. Los cebadores que contenían las enzimas de los sitios de restricción apropiados, los codones de inicio y terminación fueron: 5' >GGATCCATGGTCAAGTCCCCTACATCTGC <3' (SEQ ID NO: 14) para el cebador aguas arriba y 5' >GAATTCAGACCGGATAGAAATAAGCCAATGAAA <3' (SEQ ID NO: 15) para el cebador aguas abajo (los sitios de restricción de *Bam*HI y *Eco*RI están subrayados respectivamente). Las condiciones de la PCR fueron las indicadas más arriba para la amplificación del fragmento de ADN relacionado con el péptido original. El molde utilizado fue el plásmido pBluescript que contenía el gen clonado de la genoteca de ADNc.

La expresión en exceso de la proteína de fusión recombinante se completó desarrollando la *E. coli* (DH5 $\alpha$ ) transformada e induciendo el promotor *tac* con isopropil- $\beta$ -tiogalactopiranosido (IPTG) 1 mM (Stratagene, La Jolla, CA). Se recogieron las células, se centrifugaron, y se analizaron para determinar la presencia de la proteína de fusión por medio de SDS-PAGE. Se produjo una proteína de fusión con glutation-S-transferasa de 43-44 kD, indicando una proteína de Leishmania de aproximadamente 18 kD, ya que la glutation-S-transferasa (GST) tiene un PM de 26 kD. Sin embargo, la proteína de fusión fue muy insoluble y por lo tanto no pudo ser purificada mediante cromatografía de afinidad utilizando una columna de glutatión. El uso de bajas concentraciones de detergentes como SDS, sarcosilo, desoxicolato, y octilglucopiranosido durante las etapas de extracción fue eficaz para solubilizar la proteína pero desafortunadamente evitó su unión a la columna de glutatión. Otras maniobras, tales como el desarrollo de *E. coli* y la incubación e inducción del promotor *tac* con IPTG a 33°C, no mejoraron la solubilidad de la proteína. Sin embargo, se logró la purificación mediante SDS-PAGE preparativa. La banda se visualizó con KCl 0,1 M, se cortó y se sometió a electroelución a partir del gel seguido de diálisis exhaustiva frente a PBS y concentración sobre filtros Centricon 10.

Se obtuvieron aproximadamente 500  $\mu$ g de proteína purificada. La proteína purificada se muestra en la Figura 3. En el panel A, se hizo crecer la *E. coli* (DH5 $\alpha$ ) transformada con el vector de expresión pGEX 2T que contenía el gen Ldp23 en medio LB y se indujo el promotor *tac* con IPTG durante 3 horas. Las células se sedimentaron, se resuspendieron en tampón de carga y se sometieron a SDS-PAGE (10%) en condiciones reductoras. El gel se tiñó con azul de Coomassie. La calle 1 muestra la *E. coli* no inducida y la calle 2 muestra la *E. coli* inducida. La flecha indica la proteína recombinante. El panel B muestra la proteína preparada como en el panel A y sometida a SDS-PAGE preparativa. La banda correspondiente a la proteína de fusión recombinante expresada en exceso se identificó mediante KCl, corte, electroelución de la tira de gel, se sometió a diálisis frente a PBS y se sometió a SDS-PAGE analítica (12%). Los números del lado izquierdo indican los pesos moleculares de los marcadores. Los intentos para purificar la proteína de Leishmania escindiéndola de la proteína de fusión con GST con trombina fueron infructuosos.

### D. Expresión de Ldp23

Para averiguar si el péptido Ldp23 es expresado en organismos de *Leishmania*, se realizó una transferencia Northern utilizando un ARN preparado a partir de diferentes fases de crecimiento de promastigotas (logarítmico y estacionario) y de la forma amastigota de estos parásitos.

El ARN se preparó a partir de  $2 \times 10^7$  células de parásito utilizando el kit de aislamiento de ARN Micro (Stratagene, La Jolla, CA) de acuerdo con las instrucciones recomendadas por la compañía. El ARN se preparó a partir de promastigotas de *L. donovani* (fase de crecimiento logarítmica); a partir de promastigotas de *L. major* (fases de crecimiento logarítmica y estacionaria); a partir de *L. amazonensis*, tanto promastigotas (fases de crecimiento logarítmica y estacionaria) como amastigotas purificadas de ratones infectados CBA/J; y a partir de *L. pifanoi*, tanto promastigotas (fases de crecimiento logarítmica y estacionaria) como amastigotas (de medio de cultivo axénico). Las promastigotas de *L. donovani* (cepa 1S), *L. amazonensis* (MHOMBR/77/LTB0016), *L. major* (MHOM/IR/79/LRC-L251) y *L. pifanoi* (MHOM/VE/60/Ltrod) se hicieron crecer y se mantuvieron a 26°C en medio de Schneider que

contenía FCS al 20% y 50 µg/ml de gentamicina. Las formas amastigotas de *L. amazonensis* se obtuvieron mediante centrifugación diferencial de una lesión de la almohadilla de "tipo pus" de un ratón CBA/J infectado durante 6 meses con este parásito. Se obtuvieron amastigotas de *L. pifanoi* de cultivo axénico como han informado previamente Pan et al., en J. Euk. Microbiol. 40:213 (1993).

- 5 La hibridación se llevó a cabo a 45°C en presencia de formamida al 50%, 5x solución de Denhardt, SDS al 0,1%, 100 µg/ml de ADN de esperma de salmón de hebra sencilla y 5x SSPE utilizando filtros de membrana de 0,45 µm Nytran (Schleicher & Schuell, Keene, NH). La sonda fue el gen Ldp23 marcado con P<sup>32</sup>.

10 La Figura 4 demuestra que se observaba una única banda de ARN de 680 pb para todas las fases de crecimiento y formas de todas las *Leishmania* sometidas a ensayo. En la Figura 4, los números 1, 2 y 3 hacen referencia al ARN obtenido de promastigotas en la fase de crecimiento logarítmico, promastigotas en la fase de crecimiento estacionario y formas amastigotas, respectivamente, y los números del lado izquierdo indican los pesos moleculares de los marcadores en pares de bases. Este resultado coincide con el tamaño del gen correspondiente (525 pb) y con el peso molecular de la proteína expresada y los puntos de distribución ubicua y de expresión de este gen dentro del género *Leishmania*.

### 15 **E. Inducción de una Respuesta de Anticuerpos Anti-*L. donovani* en Ratones y Conejos por Proteína Recombinante Purificada**

20 Con el fin de evaluar la inmunogenicidad de la proteína de *Leishmania* recombinante, y para investigar su expresión en los parásitos, se inmunizaron ratones y conejos con la proteína de fusión con GST en CFA. Se inmunizaron ratones BALB/c en la almohadilla de la pata trasera con 5-10 µg de proteína emulsionada en CFA. Se determinó la concentración de proteína utilizando el reactivo Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA). Los ratones se reforzaron 7 días más tarde con 5-10 µg de proteína emulsionada en coadyuvante incompleto de Freund (IFA) inoculados en la cavidad peritoneal. Los ratones se desangraron 7 días después de la segunda inmunización. Se inmunizaron conejos blancos New Zealand (Millbrook Farm, Anihurst, MA) de acuerdo con el siguiente protocolo: una inyección intramuscular (IM) de 25-30 µg de proteína recombinante purificada emulsionada en CFA en cada muslo el día uno; una inyección IM de 25-30 µg de proteína purificada emulsionada en IFA en cada hombro el día 7; el día 15, se inyectaron en el tejido subcutáneo 25-30 µg de la proteína purificada en PBS. El conejo se desangró 7 días después de la última inmunización.

30 Se prepararon sueros y se midió la respuesta de anticuerpos *anti-Leishmania* mediante análisis de transferencia Western y mediante FACScan. En ambos casos se utilizaron promastigotas de *L. donovani* como antígeno. Se hicieron crecer aproximadamente  $2 \times 10^6$  promastigotas de *L. donovani* en medio de Schneider durante 3 días (fase log), se lavaron con PBS, se lisaron con tampón de carga para SDS-PAGE y se sometieron a electroforesis en condiciones reductoras utilizando un gel de poliacrilamida al 15%. Las proteínas se transfirieron sobre la membrana de transferencia Immobilon-P de 0,45 µ (Millipore Co., Bedford, MA) utilizando un aparato de electrotransferencia de tipo húmedo (Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell, Bio Rad Life Science Division, Richmond, CA) durante 2 horas a 50 V. Las membranas se bloquearon durante la noche a la temperatura ambiente con PBS que contenía suero de cabra normal al 3% (NGS), Tween-20 al 0,2% y azida de sodio al 0,05%, seguido de 3 lavados con PBS. Las transferencias se incubaron después durante 3-4 horas a 4°C con una dilución 1/200 de suero de conejo pre-inmune (calle A, Figura 5) o con la misma dilución de antisuero de conejo anti-proteína de fusión (calle B, Figura 5). Los sueros fueron absorbidos previamente 2x con *Mycobacterium tuberculosis* H-37 RA desecado no viable (Difco Laboratories, Detroit, MI) y fueron diluidos en PBS que contenía NGS al 1% y leche bovina desnatada en polvo al 5% (Carnation, Nestlé Food Company, Glendale, CA). Las membranas se lavaron después con PBS, se incubaron durante 1 hora a la temperatura ambiente con anticuerpo anti-IgG de conejo de cabra conjugado con fosfatasa alcalina (Promega, Madison, WI), se lavaron una vez con PBS y 2x tampón Veronal pH 9,4. La reacción se visualizó utilizando la mezcla sustrato de 5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato y nitroazul de tetrazolio (Kirkegaard & Perry Laboratories Inc., Gaithersburg, MD) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

45 La Figura 5 demuestra que el antisuero anti-proteína recombinante de conejo detecta una única proteína de 23 kDa (Ldp23) en la preparación de antígeno de extracto bruto de *Leishmania*. No se observaron bandas cuando se utilizó un antisuero anti-GST (no mostrado). Por otra parte, el análisis FACScan (Figura 6) demuestra que el anticuerpo inducido por el Ldp23 recombinante reacciona con promastigotas de *L. donovani* vivas intactas, indicando de este modo una expresión en la superficie celular de esta molécula sobre estos organismos. La línea discontinua de la Figura 6 muestra la inmunofluorescencia indirecta producida utilizando suero de ratón pre-inmune y la línea continua de la Figura 6 muestra el resultado obtenido con antisuero anti-GST-Ldp23 de ratón. Ambos sueros fueron diluidos 1/100. Los parásitos se lavaron con tampón de tinción y se incubaron con anticuerpo anti-inmunoglobulina de ratón de cabra conjugado con FITC. La intensidad de fluorescencia se analizó mediante FACScan.

### 55 **F. Reconocimiento de Ldp23 Recombinante por Células T de Ganglio Linfático Específicas de *Leishmania***

Para someter a ensayo la sensibilidad de las células T a la proteína Ldp23, se realizaron dos grupos de experimentos. En el primer experimento, se estimularon células T de ganglios linfáticos ( $10^5$ /pocillo) de ratones BALB/c inmunizados con promastigotas de *L. donovani* (como se ha descrito más arriba) para que proliferaran con  $2 \times 10^5$  células de bazo mononucleares normales tratadas con Mitomicina C (APC) y se pulsaron con la proteína de



fusión recombinante purificada. Se midió la proliferación de las células T a las 72 horas de cultivo. Los valores se expresan en la Figura 7 en forma de cpm y representan la media de la incorporación de [<sup>3</sup>H]TdR de cultivos por triplicado. Las cpm de las células del fondo (células T + APC) cultivadas en presencia de medio solo fueron 1291. La Figura 7 demuestra que las células T específicas de *Leishmania* proliferan bien y de una manera dependiente de la dosis para Ldp23 recombinante. No se observó respuesta cuando se añadió GST purificada en lugar de la proteína de fusión recombinante ni cuando se estimuló la proliferación de las células T de ganglio linfático de ratones inmunizados con CFA sola en presencia de la proteína de fusión de *Leishmania* (no mostrado).

El reconocimiento de la proteína Ldp23 recombinante por células T específicas para *Leishmania* también se sometió a ensayo utilizando dos modelos murinos de leismaniasis, los ratones BALB/c altamente susceptibles a *L. major* y los ratones CBA/J susceptibles a *L. amazonensis* como describen Champsi y McMahon-Pratt, en Infect. Immun. 56:3272 (1988). Estos modelos fueron seleccionados para investigar el patrón de citoquinas inducido por Ldp23. En el modelo de leismaniasis en ratón, la resistencia está asociada con las citoquinas Th 1 mientras la susceptibilidad está ligada a las respuestas Th 2.

Se obtuvieron células de ganglio linfático 3 semanas después del inicio de la infección de ratones BALB/c con *L. major* y se midió la capacidad de estas células para reconocer la Ldp23 recombinante por la proliferación y por la producción de las citoquinas IFN- $\gamma$  e IL-4. Se cultivaron  $2 \times 10^6$  células del ganglio linfático poplíteo drenado de ratones infectados durante 72 horas en presencia de Ldp23 recombinante o producto lisado de *Leishmania*. Se midieron los niveles de IFN- $\gamma$  e IL-4 en los sobrenadantes de cultivo por medio de ELISA como se ha descrito previamente (Chatelain et al., J Immunol. 148:1172 (1992), Curry et al., J. Immunol. Meth. 104:137 (1987), y Mossman y Fong, J. Immunol. Meth. 116:151 (1989)) usando anticuerpos monoclonales anti IFN- $\gamma$  e IL-4 específicos (PharMingen, San Diego, CA).

Ldp23 estimuló la proliferación de estas células (no mostrado) e indujo un tipo de respuesta de citoquina Th 1 típico como indicó la producción de elevados niveles de IFN- $\gamma$  (panel A de la Figura 8) y no de IL-4 (panel B de la Figura 8). La estimulación de estas células con un producto lisado bruto de *Leishmania* produjo un perfil de citoquinas Th mixto. Se obtuvo exactamente el mismo patrón de producción de citoquina de los ratones CBA/J infectados con *L. amazonensis* (no mostrado). Estos resultados indican claramente que Ldp23 es un activador potente y selectivo de las citoquinas Th 1 por células de ratón.

### EJEMPLO 3

#### PREPARACIÓN DE HSP83

Este Ejemplo ilustra la preparación de un antígeno de *Leishmania* Hsp83, que tiene la secuencia proporcionada en el SEQ ID NO: 6.

Se construyó una genoteca de expresión genómica con ADN sometido a cizalla de *L. braziliensis* (MBOM/BR/75/M2903) en el bacteriófago  $\lambda$ ZAP II (Stratagene, La Jolla, CA). La genoteca de expresión se escrutó con suero preadsorbido con *Escherichia coli* de un individuo con ML infectado por *L. braziliensis*. Se purificaron las placas inmunorreactivas, y el fagémido pBSK(-) se escindió por medio de los protocolos sugeridos por el fabricante. Se realizaron deleciones anidadas con exonucleasa III para generar deleciones solapantes para preparaciones de molde de hebra sencilla y secuenciación. Se aislaron moldes de hebra sencilla después de la infección con el fago coadyuvante VCSM13 como recomienda el fabricante (Stratagene, La Jolla, CA) y se secuenciaron mediante el método de terminación de la cadena dideoxi o mediante el sistema Taq Dye Terminator utilizando el secuenciador automático de Applied Biosystems modelo 373A.

Los antígenos recombinantes producidos por estos clones fueron purificados a partir de 500 ml de cultivos inducidos por isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosido (IPTG) como describen Skeiky et al., en J. Exp. Med. 176:201-211 (1992). Después estos antígenos fueron analizados para determinar su capacidad para estimular en PBMC de individuos infectados con *Leishmania* la proliferación y secreción de citoquinas. Se obtuvo sangre periférica de individuos que vivían en una zona (Corte de Pedra, Bahia, Brasil) donde es endémica *L. braziliensis* y donde se han realizado estudios epidemiológicos, clínicos, e inmunológicos durante más de una década, y se aislaron PBMC de sangre completa mediante centrifugación en gradiente de densidad a través de Ficoll (Winthrop Laboratories, Nueva York, N.Y.). Para los análisis de proliferación *in vitro*, se cultivaron de  $2 \times 10^5$  a  $4 \times 10^5$  células por pocillo en medio completo (RPMI 1640 con un suplemento de gentamicina, 2-mercaptoetanol, L-glutamina, y suero humano A+ seleccionado combinado al 10%; Trimar, Hollywood, Calif.) en placas de fondo redondo de 96 pocillos con o sin 10  $\mu$ g de los antígenos indicados por ml o 5  $\mu$ g de ficohemaglutinina por ml (Sigma Immunochemicals, St. Louis, Mo.) durante 5 días. Después las células se pulsaron con 1  $\mu$ Ci de [<sup>3</sup>H]timidina durante las 18 horas finales del cultivo. Para la determinación de la producción de citoquina se cultivaron de 0,5 a 1 ml de PBMC de  $1 \times 10^6$  a  $2 \times 10^6$  células por ml con o sin los antígenos de *Leishmania* durante 48 y 72 h.

Los sobrenadantes y las células se cosecharon y se analizaron para determinar la citoquina o los ARNm de citoquina secretados. Se sometieron a análisis alícuotas de los sobrenadantes en busca de interferón-gamma (IFN- $\gamma$ ), factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), interleuquina-4 (IL-4), e IL-10 como describen Skeiky et al., en J. Exp. Med. 181:1527-1537 (1995). Para el análisis por PCR del ARNm de citoquina, se aisló el ARN total de las PBMC y

5 se sintetizó ADNc utilizando poli(dT) (Pharmacia, Piscataway, NJ) y transcriptasa inversa de virus de la micoblastosis aviar. Después de la normalización con respecto a  $\beta$ -actina, se amplificó el ADNc diluido mediante PCR utilizando polimerasa *Taq* (Perkin-Elmer Cetus, Foster City, CA) con concentraciones 0,2  $\mu$ M de los respectivos cebadores externos 5' y 3' en un volumen de reacción de 50  $\mu$ l. Las secuencias de nucleótidos de los pares primarios y las condiciones de PCR utilizadas fueron las descritas por Skeiky et al., en *J. Exp. Med.* 181:1527-1537 (1995). Los autores de la presente invención verificaron que sus condiciones de PCR estaban dentro del intervalo semicuantitativo realizando inicialmente diluciones seriadas de los ADNc y variando el número de ciclos utilizados para la PCR. Los plásmidos que contenían las secuencias humanas para IL-2, IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-10, y  $\beta$ -actina fueron digeridos, y los insertos de ADN fueron purificados después de la separación sobre geles de agarosa al 1%. Se prepararon sondas radiomarcadas con  $P^{32}$  mediante el método de cebado al azar. Se analizaron los productos de la PCR mediante electroforesis sobre geles de agarosa al 1,5%, se transfirieron a membranas de nailon, y se sondearon con el inserto de ADN marcado con  $P^{32}$  apropiado.

15 Se identificó un clon recombinante en el análisis anterior que, después de la comparación de secuencias de su secuencia de aminoácidos pronosticada con las secuencias de otras proteínas, fue identificado como un homólogo de la proteína de choque térmico de 83 kD eucariótica de *Leishmania braziliensis* (Lbhs83). La secuencia del clon se proporciona en el SEQ ID NO: 5 y la secuencia de la proteína deducida se proporciona en el SEQ ID NO: 6. Basándose en la homología, este clon, denominado Lbhs83a, parece carecer de los primeros 47 residuos de los 703 residuos de aminoácido completos. Lbhs83 tiene una homología global del 94% (identidad del 91% y 3% de sustituciones conservativas), 91% (identidad del 84% y 7% de sustituciones conservativas) y 77% (identidad del 61% y 16% de sustituciones conservativas) con hsp83 de *L. amazonensis*, hsp83 de *T. cruzi* y hsp89 humano, respectivamente. También se aisló un segundo clon (denominado Lbhs83b), que contenía la porción C-terminal de 43 kD de hsp83 (residuos 331 a 703). La Figura 19 presenta una comparación de la secuencia de Lbhs83 con hsp83 de *L. amazonensis* (Lahsp83), hsp83 de *T. cruzi* (Tchsp83) y hsp89 humano (Huhsp89).

25 Los resultados de los análisis de proliferación utilizando Lbhs83a se muestran en la Tabla 1. Las células de todos los pacientes con leishmaniasis de la mucosa (ML) proliferaron fuertemente en respuesta a Lbhs83a, con índices de estimulación (IE) que oscilaban entre 19 y 558 (en comparación con 20 a 1.634 para el producto lisado de parásito). La proliferación de PBMC a partir de pacientes con leishmaniasis cutánea (CL) fue variable y excepto para los niveles de dos pacientes (IV y VII), los niveles fueron significativamente inferiores a los de los pacientes con ML. Como comparación, las respuestas proliferativas de los individuos con CL autocurable a Lbhs83a fueron similares a las de los individuos con ML. Sin embargo, las respuestas de los seis individuos autocurables a Lbhs83 fueron sistemáticamente superiores a las respuestas a Lbhs83b. Esto sugiere que las PBMC de pacientes con CL autocurable reconocen preferentemente uno o más epítopos de las células T localizados dentro de la porción amino de Lbhs83.

Tabla 1

Proliferación <i>In vitro</i> de PMBC de Individuos Infeccionados con <i>L. braziliensis</i> en Respuesta a Lbhsp83			
Grupo y Paciente	Incorporación de [ <sup>3</sup> H]timidina media [ $10^3$ cpm (DT)], IE con:		
	Producto lisado	Lbhsp83a	Lbhsp83b
<b>ML</b>			
I	41,3, (1,3), 294	32,5, (6,6), 221	46,7, (1,4), 318
II	44,2, (0,5), 104	20, (3,7), 47	36,7, (0,76), 86
III	27,4, (1,5), 150	8,1, (1,7), 44	9,9, (0,32), 54
IV	52,7, (3,3), 138	54,1, (6,2), 142	32,0, (1,3), 84
V	140,6, (7,6), 308	151,8, (57), 333	150,4, (7,9), 331
VI	15,8, (1,8), 20	21,3, (4,4), 28	14,4, (1,3), 19
VII	300,1, (9,4), 1634	102,1, (7,6), 558	41,7, (4,9), 228
<b>CL</b>			
I	0,26, (0,0), 1,5	0,57, (0,3), 3,3	0,43, (0,17), 3,3
II	55,63, (8,6), 218	0,42, (0,0), 1,6	0,8, (0,14), 3,2
III	0,39, (0,5), 4,0	3,4, (0,5), 9	2,6, (0,9), 6,6
IV	19,14, (1,3), 87	7,17, (0,6), 32	5,9, (0,9), 27
V	0,32, (0,2), 3,0	1,47, (0,5), 14	0,3, (0,1), 3,0
VI	0,77, (0,1), 4,7	1,44, (0,2), 9	1,3, (0,6), 8,0
VII	4,01, (1,0), 2,0	60,3, (8,5), 15	66,7, (3,9), 16,6
<b>CL autocurable</b>			
I	19,7, (4,4), 94	61,3, (4,6), 293	5,0, (2,0), 24
II	0,6, (0,1), 6,5	7,0, (2,0), 79	1,2, (0,8), 13
III	59,6, (7,1), 519	49,4, (3,1), 429	21,4, (3,7), 186
IV	0,2, (0,1), 1,6	13,1, (1,7), 108	0,6, (0,1), 5
V	27,1, (2,0), 225	6,3, (2,6), 52	3,0, (1,5), 25
VI	130,3, (14), 340	28,2, (2,9), 74	7,7, (3,8), 20
Proliferación <i>In vitro</i> de PMBC de Individuos Infeccionados con <i>L. braziliensis</i> en Respuesta a Lbhsp83			
Grupo y Paciente	Incorporación de [ <sup>3</sup> H]timidina media [ $10^3$ cpm (SD)], SI con:		
	Producto lisado	Lbhsp83a	Lbhsp83b
<b>Control (no infectado)</b>			
I	0,19, (0,0), 1,4	0,18, (0,0), 1,3	0,40, (0,16), 2,8
II	0,31, (0,1), 1,7	0,19, (0,0), 1,0	0,27, (0,0), 1,5
III	0,44, (0,2), 4,1	0,48, (0,1), 5,0	0,51, (0,2), 5,2
IV	0,4, (0,1), 3,2	0,52, (0,2), 5,1	0,50, (0,1), 5,0

- 5 Se realizó un análisis más detallado de los patrones de citoquinas de las PBMC de pacientes con ML mediante PCR con transcriptasa inversa. Se evaluaron los ARNm de citoquinas en las células antes del cultivo (Figura 9, calles O) o después del cultivo en ausencia (calles -) o presencia del antígeno indicado durante 48 y 72 h. La Figura 4A muestra los resultados de cinco de los seis pacientes con ML cuyas PBMC fueron analizadas. En aproximadamente la mitad de los pacientes con ML, las PBMC no cultivadas (en reposo) tuvieron niveles detectables de ARNm para IFN- $\gamma$ , IL-2, e IL-4 pero no para IL-10. Las PBMC de los pacientes con CL, no obstante, tuvieron ARNm para IL-10 en el estado de reposo además de los ARNm para las otras citoquinas sometidas a ensayo (Figura 4B). Después del
- 10

cultivo *in vitro* sin antígeno, los niveles de ARNm para IFN- $\gamma$ , IL-2, e IL-4 en las células en reposo de pacientes con ML disminuyeron a los niveles de fondo mientras los niveles de ARNm de IL-10 aumentaron. Por el contrario, las PBMC de la mayor parte de los pacientes con CL tuvieron ARNm para IL-10 estable o incrementado, mientras los ARNm para IL-2, IFN- $\gamma$ , e IL-4 fueron reducidos a niveles apenas detectables en ausencia de estimulación de antígeno.

En las PBMC de tres pacientes con ML, la estimulación con el producto lisado dio como resultado un incremento de la expresión del ARNm para IFN- $\gamma$ , IL-2, e IL-4 pero no para IL-10. En comparación, ambos polipéptidos Lbhs83 lograron la producción de ARNm para IFN- $\gamma$  e IL-2 a partir de las PBMC de todos los pacientes con ML sometidas a ensayo. Por el contrario, los perfiles de ARNm para IL-10 e IL-4 difirieron para los dos polipéptidos hsp83. Lbhs83a estimuló la producción de ARNm de IL-10 pero no de IL-4 (pacientes I, II, III, y IV), mientras Lbhs83b estimuló la producción de ARNm de IL-4 pero no de IL-10 en los seis pacientes.

Todos los pacientes con CL sometidos a ensayo respondieron a ambos polipéptidos Lbhs83 así como al producto lisado de parásito regulando al alza la síntesis de los ARNm para IL-2 e IFN- $\gamma$ , y en dos de cuatro pacientes (I y IV), el nivel de ARNm para IL-4 también se incrementó, indicando la estimulación de ambas citoquinas Th1 y Th2. Curiosamente y como en el caso de PBMC no cultivadas de pacientes con ML que no tenían niveles detectables de ARNm de IL-10, Lbhs83a y no Lbhs83b estimularon la síntesis de ARNm de IL-10 en las PBMC de un paciente con CL (IV). No obstante, en los otros tres pacientes (I, II, y III) con niveles en reposo de ARNm de IL-10, ambos polipéptidos rLbhs83 así como el producto lisado de parásito regularon a la baja la expresión del ARNm de IL-10.

También se analizaron los sobrenadantes de PBMC para determinar la presencia de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-4, e IL-10 secretados. Las células de todos los pacientes con ML y CL autocurable (siete y seis pacientes, respectivamente) y de cuatro de siete pacientes con CL se analizaron para determinar el IFN- $\gamma$  secretado después de la estimulación con ambos polipéptidos rLbhs83, producto lisado de parásito y Lbhs70, una proteína homóloga de *L. braziliensis* a la proteína de choque térmico de 70 kD eucariótica (Figura 10A). En general, rLbhs83a estimuló la secreción de niveles superiores de IFN- $\gamma$  en las PBMC del paciente que rLbhs83b (0,2 a 36 y 0,13 a 28 ng/ml, respectivamente). La presencia de IFN- $\gamma$  secretado se correspondía con el correspondiente ARNm detectado por la PCR.

Las PBMC de cuatro de los cinco pacientes con ML (I, II, V, y VII) tuvieron niveles de TNF- $\alpha$  en el sobrenadante superiores (0,8 a 2,2 ng/ml) a los detectados en los cultivos de PBMC de controles no infectados después de la estimulación con producto lisado de parásito (Figura 10B). De un modo similar, las mismas PBMC fueron estimuladas por rLbhs83 para producir niveles de TNF- $\alpha$  en el sobrenadante que oscilaban de 0,61 a 2,9 ng/ml. En comparación con los de los controles no infectados, las PBMC de tres (I, V, y VI), cinco (I, II, IV, V, y VI), y dos (II y V) de seis individuos analizados produjeron niveles superiores de TNF- $\alpha$  en respuesta al producto lisado de parásito, rLbhs83a, y rLbhs83b, respectivamente. Los niveles de TNF- $\alpha$  producidos por las PBMC de pacientes con CL en respuesta a producto lisado de parásito fueron comparables a los producidos por los controles no infectados. No obstante, rLbhs83 estimuló la producción de TNF- $\alpha$  en las PBMC de dos de estos pacientes. rLbhs83a estimuló niveles superiores de producción de TNF- $\alpha$  que rLbhs83b. En ausencia de estimulación con antígeno, solamente las PBMC de pacientes con ML (cinco o seis) produjeron niveles detectables de TNF- $\alpha$  en el sobrenadante (60 a 190 pg/ml).

En concordancia con el ARNm para IL-10, se detectó IL-10 por medio de ELISA en los sobrenadantes de cultivo de PBMC estimuladas con antígeno de pacientes con ML y CL. Los niveles (49 a 190 pg) fueron significativamente superiores (hasta 10 veces) después de la estimulación con rLbhs83a en comparación con los posteriores a la estimulación de forma paralela de las mismas células con rLbhs83b (Figura 11). El producto lisado de parásito también estimuló la producción de IL-10 en las PMBC de algunos de los pacientes. Aunque rLbhs83 estimuló la producción de IL-10 en las PMBC de individuos no infectados, con una excepción, los niveles fueron inferiores a los observados con las PBMC de los pacientes. No se detectó IL-4 en ninguno de los sobrenadantes analizados. Por lo tanto, el nivel de cualquier IL-4 secretada está por debajo del límite de detección del ELISA empleado (50 pg/ml). Tomados juntos, los resultados demuestran que un perfil de citoquina de tipo Th1 predominante está asociado con las PBMC de individuos infectados con *L. braziliensis* después de la estimulación con polipéptidos rLbhs83.

Para determinar la correlación entre las respuestas observadas de las células T y la producción de anticuerpo para Lbhs83, los autores de la presente invención compararon las reactividades de los anticuerpos (inmunoglobulina G) para Lbhs83 en sueros de los tres grupos de pacientes (Figura 12). Las reactividades en ELISA de los sueros de pacientes que tienen ML con rLbhs83a fueron comparables a las observadas con el producto lisado de parásito, y en general, existía una correlación directa entre el título de anticuerpo anti-Lbhs83 de pacientes con ML y la proliferación de células T. De las 23 muestras de suero de los pacientes con ML analizadas, 22 fueron positivas (~96%) con valores de absorbancia de 0,20 a >3,0. Once de las muestras de suero de pacientes con ML tuvieron valores de densidad óptica que fueron >1. En general, los pacientes con CL tuvieron títulos de anticuerpo anti-

Lbhs83 significativamente inferiores ( $\bar{x} = 0,74$ ; desviación típica de la media [ETM] = 0,1) en comparación con las de los pacientes con ML. Por lo tanto, los títulos de anticuerpos anti-rhsp83 de pacientes con ML y CL se correspondían con sus respectivas respuestas proliferativas de las células T. Los títulos de anticuerpo anti-rLbhs83 fueron significativamente superiores en pacientes con ML ( $\bar{x} = 1,5$ ; ETM = 0,2) que en pacientes con CL

autocurable ( $\bar{x} = 0,35$ ; ETM = 0,056), aunque sus respuestas proliferativas de las células T fueron similares. De hecho los títulos de anticuerpo anti-Lbhsp83 en los pacientes con CL autocurable fueron comparables a los de los controles no infectados ( $\bar{x} = 0,24$ ; ETM = 0,028). Utilizando 2 desviaciones típicas mayores que el valor de absorbancia media del control no infectado (0,484) como un criterio para la reactividad positiva para Lbhsp83, ocho de nueve de las muestras de suero de pacientes autocurables fueron negativas.

#### EJEMPLO 4

##### PREPARACIÓN DE CLONES QUE CODIFICAN LT-210

Este Ejemplo ilustra la preparación de clones que codifican porciones del antígeno de *Leishmania* Lt-210, y que tiene la secuencia proporcionada en el SEQ ID NO: 8.

Se construyó una genoteca de expresión a partir de ADN genómico de *L. tropica* (MHOM/SA/91/WR1063C). El ADN fue aislado solubilizando promastigotas de *L. tropica* en Tris-HCl 10 mM, pH 8,3, EDTA 50 mM, SDS al 1% y tratamiento con 100 µg/ml de ARNasa A y 100 µg/ml de proteinasa K. Después la muestra se extrajo secuencialmente con un volumen igual de fenol, fenol:cloroformo (1:1), y Cloroformo. El ADN se hizo precipitar añadiendo 0,1 volúmenes de acetato de sodio 3M (pH 5,2) y 2,5 volúmenes de etanol del 95%. El producto precipitado se resuspendió en Tris 10 µM, EDTA 1 mM. El ADN se sometió a cizalla mediante el pase a través de una aguja de calibre 30 a un intervalo de tamaño de 2-6 kilobases, y se reparó mediante incubación con DNA Poll en presencia de dATP, dCTP, dGTP, y dTTP, 100 µM cada uno. Se ligaron adaptadores de *EcoRI* a los fragmentos de ADN. Tras la eliminación de los adaptadores no ligados por medio del pase sobre una columna Sephadex® G-25, se insertaron los fragmentos en Lambda ZapII cortado con *EcoRI* (Stratagene, La Jolla, CA).

Se cultivaron en placa aproximadamente 43.000 pfu y se escrutaron con sueros aislados de pacientes con leishmaniasis viscerotrópica (VTL). Los sueros de los pacientes con VTL fueron recibidos de los Drs. M. Grogl y A. Magill. El grupo de pacientes con VTL incluía ocho individuos a partir de los cuales se aislaron los parásitos y se cultivaron, siete de los cuales tenían una infección confirmada por *L. tropica*. Cuatro de los otros pacientes fueron negativos para el cultivo, pero todavía se consideró que estaban infectados basándose en el análisis por PCR o en un frotis de anticuerpo monoclonal positivo (Dr. Max Grogl, comunicado personal). Las muestras de suero de los 11 pacientes infectados se reunieron y la reactividad anti-*E. coli* se eliminó mediante cromatografía de afinidad (Sambrook et al., *supra*, págs. 12.27-12.28). Los fagos lambda que expresaban proteínas reactivas fueron detectados después de la unión al anticuerpo por proteína A – peroxidasa de rábano picante y sustrato ABTS.

Se identificaron y se purificaron tres clones, Lt-1, Lt-2, y Lt-3, que contenían una porción del gen Lt-210. Los clones tenían un tamaño que oscilaba de 1,4 a 3,3 kb y codificaban polipéptidos de 75 kD, 70 kD, y 120 kD, respectivamente. Estos tres clones contienen secuencias parciales del gen Lt-210. Lt-1 y Lt-2 son clones solapantes y fueron seleccionados para su estudio adicional.

Se determinaron las secuencias de ADN de Lt-1 y Lt-2. Se utilizó la digestión con exonucleasa III para crear deleciones solapantes de los clones (Heinikoff, Gene 28:351-359, 1984). Se preparó un molde de hebra sencilla y se determinó la secuencia con el Secuenciador Automático de Applied Biosystems modelo 373A o mediante secuenciación didesoxi de Sanger. Se determinó la secuencia de ambas hebras de la porción codificante del clon Lt-1. Se determinó la secuencia parcial de una hebra del clon Lt-2.

El SEQ ID NO: 7 presenta la secuencia de ADN de Lt-1, y el SEQ ID NO: 8 proporciona la secuencia de aminoácidos pronosticada del marco de lectura abierto. La secuencia de ADN de la porción codificante del clon Lt-1 incluye una secuencia de nucleótidos repetida en la porción 5' del clon que contiene ocho copias de una repetición de 99 pb, tres copias de una unidad de repetición de 60 pb, que es parte de la repetición de 99 pb más grande, y 800 pb de secuencia no repetida. La secuencia de aminoácidos deducida de la repetición de 99 pb contiene degeneraciones limitadas. La masa de la proteína recombinante pronosticada es de 67.060 Dalton. Una búsqueda en la base de datos de PIR con la secuencia de aminoácidos pronosticada del marco de lectura abierto dio una homología no significativa con las secuencias sometidas previamente. La estructura secundaria pronosticada de la porción repetida del clon es completamente  $\alpha$ -helicoidal.

El análisis de la secuencia de Lt-2 reveló que la porción 3' del clon consistía en una mezcla de repeticiones de 60 y 99 pb que eran idénticas, exceptuando las degeneraciones ocasionales, a las repeticiones de 60 y 99 pb observadas en Lt-1. En conjunto, los datos de secuenciación sugieren que Lt-1 y Lt-2 son porciones diferentes del mismo gen, estando Lt-2 aguas arriba de Lt-1, posiblemente con un pequeño solapamiento.

El análisis de hibridación confirmó que rLt-2 y rLt-1 contienen secuencias solapantes. Los ADN genómicos de varias especies de *Leishmania* fueron tratados con una variedad de enzimas de restricción, separados mediante electroforesis en gel de agarosa, y transferidos a un filtro de membrana Nytran (Schleicher & Schuell, Keene, NH). Los insertos de rLt-1 y rLt-2 se marcaron con <sup>32</sup>P-CTP por medio de transcriptasa inversa a partir de cebadores oligonucleotídicos al azar y se utilizaron como sondas después de la separación de los nucleótidos no incorporados sobre una columna Sephadex G-50. Las hibridaciones utilizando la sonda rLt-1 o rLt-2 se realizaron en NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,2

M/NaCl 3,6 M a 65°C, mientras la hibridación utilizando la sonda rLt-Ir se realiza en NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,2 M/NaCl 3,6 M/EDTA 0,2 M a 60°C durante la noche. Los filtros se lavan en NaCl 0,075 M/citrato de sodio 0,0075 M pH 7,0 (NaCl 0,15 M/citrato de sodio 0,0150 M para la sonda Lt-Ir), más SDS al 0,5% a la misma temperatura que la hibridación.

5 Se analizaron los ADN genómicos de numerosas especies de *Leishmania* incluyendo *L. tropica* por medio de transferencias Southern como se ha descrito más arriba utilizando los insertos Lt-1, Lt-2, y Lt-1r por separado como sondas. En conjunto, varios productos digeridos de ADN de *L. tropica* indican que este gen tiene un bajo número de copias. Se observó un patrón de solapamiento similar utilizando el inserto Lt-1 o Lt-2 como sonda, de acuerdo con la premisa de que estos dos clones contienen secuencias próximas o solapantes entre sí. Además, las secuencias que hibridan con estos clones están presentes en otras especies de *Leishmania*.

10 Los productos aislados de *L. tropica* tienen una heterogeneidad limitada. Se realizaron los análisis Southern del ADN genómico digerido de cuatro cepas de parásito *L. tropica* aisladas de pacientes con VTL y tres cepas de parásito *L. tropica* aisladas de casos de CL (dos humanos, uno canino). El inserto Lt-Ir descrito más abajo se marcó y se utilizó como sonda. Los siete productos aislados de *L. tropica* diferentes dieron intensidades y patrones de restricción similares, solamente con un único polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción entre los productos aislados. Estos datos, junto con los análisis de Southern con enzimas adicionales, indican una heterogeneidad limitada en esta región entre los productos aislados de *L. tropica*.

15 Las proteínas recombinantes de Lt-1 y Lt-2 se expresaron y se purificaron. El ajuste de delección anidada de Lt-1 formado para la secuenciación incluía un clon referido como Lt-Ir, que contiene una y un tercio de las repeticiones. Este polipéptido también fue expresado y purificado. La escisión *in vivo* del fagémido pBluescript SK<sup>+</sup> de Lambda Zap II se realizó de acuerdo con el protocolo del fabricante. Las partículas de virus del fagémido se utilizaron para infectar *E. coli* XL-1 Blue. Se indujo la producción de proteína por medio de la adición de IPTG. La proteína se recuperó primero los sedimentos de la bacteria inducida en tampón (LB, Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, NaCl 100 mM, EDTA 10 mM) utilizando una combinación de lisozima (750 µg/mL) y sonicación. Se recuperaron rLt-1, rLt-2, y rLt-1r, a partir de los cuerpos de inclusión después de la solubilización en urea 8 M (rLt-1 y rLt-2) o urea 4M (rLt-1r).  
20 Las proteínas rLt-1 y rLt-2 se enriquecieron y se separaron mediante precipitación con sulfato de amonio al 25%-40% y se enriqueció rLt-1r mediante precipitación con sulfato de amonio al 10%-25%. Las proteínas se purificaron adicionalmente mediante electroforesis en gel preparativa en SDS-PAGE al 10%. Las proteínas recombinantes se hicieron eluir de los geles y se sometieron a diálisis en solución salina tamponada con fosfato (PBS). Se midió la concentración mediante el análisis BCA de Pierce (Rockford, IL), y se evaluó la pureza mediante tinción con azul de Coomassie después de la SDS-PAGE.

## EJEMPLO 5

### PREPARACIÓN DE LBEIF4A

Este ejemplo ilustra la clonación molecular de una secuencia de ADN que codifica el antígeno ribosomal LbeIF4A de *L. braziliensis*.

35 Se construyó una genoteca de expresión genómica con ADN sometido a cizalla de *L. braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903) en bacteriófago λZAPII (Stratagene, La Jolla, CA). La genoteca de expresión se escrutó con suero de paciente pre-adsorbido en *E. coli* de un individuo infectado con leishmaniasis de las mucosas infectado con *L. braziliensis*. Se purificaron las placas que contenían antígenos recombinantes inmunorreactivos, y se escindió el fagémido pBSK(-) utilizando los protocolos del fabricante. Se realizaron delecciones anidadas con Exonucleasa III  
40 para generar delecciones solapantes para las preparaciones de moldes de hebra sencilla y secuenciación. Se aislaron moldes de hebra sencilla después de la infección con el fago coadyuvante VCSM13 como recomienda el fabricante (Stratagene, La Jolla, CA) y se secuenciaron mediante el método de terminación de la cadena didesoxi o mediante el sistema de colorante-terminador de Taq utilizando el Secuenciador Automático de Applied Biosystems Modelo 373A.

45 Los antígenos recombinantes inmunorreactivos se analizaron después en análisis con células T de pacientes para determinar su capacidad para estimular una producción proliferativa y de citoquinas, como se describe en los Ejemplos 7 y 8 más abajo.

Se identificó un clon recombinante en los análisis anteriores que, después de la comparación de secuencias de su secuencia de aminoácidos pronosticada con las secuencias de otras proteínas, fue identificado como un homólogo del factor de iniciación eucariótico 4A de *Leishmania braziliensis* (eIF4A). El clon aislado (pLeIF.1) carecía de los primeros 48 residuos de aminoácido (144 nucleótidos) de la secuencia de la proteína completa. El inserto pLeIF.1 se utilizó con posterioridad para aislar la secuencia genómica completa.

50 El SEQ ID NO: 9 muestra toda la secuencia de nucleótidos del polipéptido LbeIF4A completo. El marco de lectura abierto (nucleótidos 115 a 1323) codifica una proteína de 403 aminoácidos con un peso molecular pronosticado de 45,3 kD. Una comparación de la secuencia de la proteína pronosticada de LbeIF4A con las proteínas homólogas de tabaco (TeIF4A), ratón (MeIF4A), y levadura (YeIF4A) muestra una exhaustiva homología de secuencia, siendo los primeros 20-30 aminoácidos los más variables. Las longitudes (403, 413, 407, y 395 aminoácidos), los pesos moleculares (45,3, 46,8, 46,4, y 44,7 kDa), y los puntos isoeléctricos (5,9, 5,4, 5,5, y 4,9) de LbeIF4A, TeIF4A,

MelF4A y YelF4A, respectivamente, son similares. LbelF4A muestra una homología global del 75,5% (identidad de 57%, 18,5% de sustituciones conservativas) con TelF4A, 68,6% (identidad de 50%, 18,6% de sustituciones conservativas) con MelF4A y 67,2% (identidad de 47,6%, 19,6% de sustituciones conservativas) con YelF4A.

#### EJEMPLO 6

### 5 PREPARACIÓN DE ANTÍGENOS DE *LEISHMANIA* SOLUBLES

Este Ejemplo ilustra la preparación de antígenos de *Leishmania* solubles a partir de un sobrenadante de cultivo de *L. major*. Se hicieron crecer promastigotas de *L. major* hasta la fase log tardía en medio complejo con suero hasta que alcanzó una densidad de  $2-3 \times 10^7$  organismos viables por mL de medio. Los organismos se lavaron cuidadosamente para separar los componentes del medio y se resuspendieron a  $2-3 \times 10^7$  organismos viables por mL de medio sin suero definido que consistía en partes iguales de medio RPMI 1640 y medio 199, ambos de Gibco BRL, Gaithersburg, MD. Después de 8-12 horas, se separó el sobrenadante, se concentró 10 veces y se sometió a diálisis frente a solución salina tamponada con fosfato durante 24 horas. Después se determinó la concentración de proteína y la presencia de al menos ocho antígenos diferentes se confirmó mediante SDS-PAGE. Esta mezcla es referida en la presente memoria como "antígenos de *Leishmania* solubles".

#### 15 EJEMPLO 7

### COMPARACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE INTERLEUQUINA-4 E INTERFERÓN- $\gamma$ ESTIMULADA POR ANTÍGENOS DE *LEISHMANIA*

Este Ejemplo ilustra las propiedades inmunogénicas de los antígenos preparados de acuerdo con los Ejemplos 1, 2, 5 y 6, determinadas por su capacidad para estimular IL-4 e IFN- $\gamma$  en cultivos de ganglio linfático de ratones infectados y en preparaciones de PBMC humanas. Los cultivos de ganglios linfáticos para su uso en estos estudios se prepararon a partir de ratones BALB/c infectados con *L. major* 10 días después de la infección, como se describe en el Ejemplo 2. Se prepararon PBMC utilizando sangre periférica obtenida de individuos con infecciones curadas por *L. donovani* que eran sensibles inmunológicamente a *Leishmania*. La diagnosis de los pacientes se realizó mediante descubrimientos clínicos asociados al menos con uno de los siguientes: aislamiento de parásitos de las lesiones, un ensayo cutáneo positivo con producto lisado de *Leishmania* o un ensayo serológico positivo. Los individuos no infectados fueron identificados basándose en la carencia de signos o síntomas clínicos, una carencia de historial de exposición o viaje a zonas endémicas, y la ausencia de respuesta serológica o celular a antígenos de *Leishmania*. La sangre periférica se recogió y se aislaron las PBMC mediante centrifugación en gradiente de densidad a través de Ficoll® (Winthrop Laboratories, Nueva York).

Se analizaron los sobrenadantes de cultivo para determinar los niveles de IL-4 e IFN- $\gamma$  secretados. Se cuantificó el IFN- $\gamma$  mediante un doble ELISA sándwich utilizando mAb anti-IFN- $\gamma$  humano (Chemicon, Temucula, CA) y suero anti-IFN- $\gamma$  humano de conejo policlonal. Se utilizó rIFN- $\gamma$  humano (Genentech Inc., San Francisco, CA) para generar una curva patrón. Se cuantificó la IL-4 de los sobrenadantes por medio de un doble ELISA sándwich utilizando mAb anti-IL-4 humana de ratón (M1) y un suero anti-IL-4 humana de conejo (P3). Se utilizó IL-4 humana (Immunex Corp., Seattle, WA) para generar una curva patrón que oscila de 50 pg/ml a 1 ng/ml.

Las Figuras 13A y 13B, ilustran el nivel medio de IL-4 y IFN- $\gamma$  secretados, respectivamente, 72 horas después de la adición de 10  $\mu$ g/mL de cada uno de los siguientes antígenos a un cultivo de ganglios linfáticos preparado como se ha descrito más arriba: antígeno de *Leishmania* soluble (esto es, un extracto preparado a partir de promastigotas rotas que contiene antígenos de membrana e internos (SLA)), Ldp23, LbelF4A (LeIF), Lbhsp83, M15 y LmelF (el homólogo de LbelF4A de *L. major*). También se muestran los niveles de IL-4 e IFN- $\gamma$  secretados al medio solo (esto es, no estimulado). Si bien SLA logró una respuesta Th2 predominantemente a partir de células de ganglio linfático de ratones infectados con *Leishmania*, Ldp23, LbelF4A, Lbhsp83 y M15 lograron cantidades relativamente pequeñas de IL-4 y grandes de IFN- $\gamma$ , de acuerdo con un perfil de respuesta Th1.

La Figura 14 muestra el nivel de IFN- $\gamma$  secretado en un producto filtrado de cultivo de preparaciones de PBMC humanas infectadas y no infectadas 72 horas después de la adición de 10  $\mu$ g/mL de producto lisado de *L. major*, M15 o L-Rack, un antígeno de *Leishmania* inmunodominante en la leishmaniasis murina. De un modo similar, la Figura 15 ilustra el nivel de IFN- $\gamma$  secretado en producto filtrado de cultivo de preparaciones de PBMC humanas infectadas y no infectadas 72 horas después de la adición de 10  $\mu$ g/mL de producto lisado de *L. major*, antígenos de *Leishmania* solubles (preparados como se describe en el Ejemplo 6) o L-Rack. Estos resultados indican que los antígenos de *Leishmania* M15 y solubles, pero no L-Rack, son potentes estimuladores de la producción de IFN- $\gamma$  en PBMC de pacientes, pero no en PBMC de individuos no infectados. De este modo, los antígenos de *Leishmania* M15 y solubles logran un perfil de citoquina Yh1 dominante tanto en ratones como en seres humanos infectados con *Leishmania*.

**EJEMPLO 8****COMPARACIÓN DE LA PROLIFERACIÓN ESTIMULADA POR ANTÍGENOS DE *LEISHMANIA***

Este Ejemplo ilustra las propiedades inmunogénicas de los antígenos preparados de acuerdo con los Ejemplos 1, 2, 5 y 6, determinadas por su capacidad para estimular la proliferación en cultivos de ganglio linfático de ratones infectados y en preparaciones de PBMC humanas.

- 5 Para los análisis de proliferación *in vitro*, se cultivaron 2 - 4 x 10<sup>5</sup> células/pocillo en medio completo (RPMI 1640 con un suplemento de gentamicina, 2-ME, L-glutamina, y suero humano A+ seleccionado combinado al 10%; Trimar, Hollywood, CA) en placas de fondo plano de 96 pocillos con o sin 10 µg/ml de los antígenos indicados o 5 µg/ml de PHA (Sigma Immunochemicals, St. Louis, MO) durante cinco días. Las células se pulsaron después con 1 µCi de [<sup>3</sup>H]-timidina durante las 18 horas finales del cultivo.
- 10 La Figura 16 ilustra la proliferación observada después de la adición de 10 µg/mL o 20 µg/mL de cada uno de los siguientes antígenos a un cultivo de ganglios linfáticos preparado como se describe en el Ejemplo 7: SLA, Ldp23, LbelF4A, Lbhsp83, y M15. También se muestra el nivel de proliferación sin la adición de antígeno. Los datos se representan como las cpm medias. Estos resultados demuestran que una variedad de antígenos de *Leishmania* son capaces de estimular la proliferación de células de los ganglios linfáticos de ratones infectados con *Leishmania*.
- 15 Las Figuras 17 y 18 ilustran la proliferación observada en preparaciones de PBMC humanas de individuos inmunes a *Leishmania* y no infectados después de la adición de 10 µg/mL de antígenos de *Leishmania* M15 y solubles, respectivamente. Estos valores se comparan con la proliferación observada después de la adición de medio de cultivo, producto lisado de *L. major* o L-Rack. Los resultados demuestran que los antígenos de *Leishmania* M15 y solubles estimulan la proliferación en PBMC inmunes a *Leishmania*, pero no en PBMC obtenidas de individuos no infectados, demostrando que los antígenos M15 y soluble (pero no L-Rack) son reconocidos por las PBMC de individuos inmunes a *Leishmania* debido a una infección previa.
- 20

**EJEMPLO 9****PREPARACIÓN DE LMSP1A Y LMSP9A**

Este Ejemplo ilustra la preparación de dos antígenos de *Leishmania* solubles, Lmsp1a y Lmsp9a.

**25 A. Purificación de Lmsp1a y Lmsp9a a partir de una mezcla de antígenos de *L. major* solubles**

- Se originó un suero de conejo de título elevado contra antígenos solubles de *L. major*, preparados como se ha descrito más arriba en el Ejemplo 6. Específicamente, se inmunizó subcutáneamente un conejo blanco New Zealand en múltiples sitios con 180 µg de antígenos solubles de *L. major* en una suspensión que contenía 100 µg de muramil dipéptido y coadyuvante incompleto de Freund al 50%. Seis semanas más tarde se administró al conejo un refuerzo subcutáneo de 100 µg de la misma preparación de antígeno soluble en coadyuvante incompleto de Freund. Esto estuvo seguido de dos refuerzos intravenosos espaciados dos semanas, cada uno con 100 µg de la preparación de antígeno soluble. Se recogió el suero de conejo 11 días después del refuerzo final.
- 30

- Se eliminaron las reactividades de los anticuerpos anti-*E. coli* de los sueros de conejo mediante pre-adsorción sobre filtros de nitrocelulosa que contenían *E. coli* lisada. Los sueros adsorbidos se evaluaron mediante análisis de transferencia Western utilizando 10 µg de producto lisado de promastigotas de *Leishmania* (calle 1) y 1 µg de mezcla de antígenos solubles de *L. major* (calle 2). Como se muestra en la Figura 20, se encontró que el suero de conejo era reactivo con siete antígenos dominantes de la mezcla de antígenos solubles de *L. major* con pesos moleculares que oscilaban de 18 a >200 kDa. Una exposición cuatro veces más prolongada de la misma transferencia reveló tres especies inmunorreactivas adicionales con pesos moleculares menores de 18 kDa. El mismo suero reaccionó con aproximadamente 10 antígenos del producto lisado de promastigota, pero con un patrón significativamente diferente del observado con los antígenos solubles de *L. major* (Figura 20). Esto parece indicar una potencial modificación post-traducciona del mismo antígeno antes (localización intracelular) y después de la secreción/eliminación. Tales modificaciones pueden incluir la escisión de una secuencia líder y/o la adición de moléculas de carbohidratos a los antígenos secretados/eliminados.
- 35
- 40

- 45 El suero de conejo descrito más arriba se utilizó con posterioridad para escrutar una genoteca de expresión de ADNc de *L. major* preparada a partir de ARN de promastigota de *L. major* utilizando el kit Lambda ZAP unidireccional (uni-ZAP) (Stratagene) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Se escrutaron un total de 70.000 pfu de la genoteca de ADNc amplificada con el suero de conejo a una dilución 1:250. Se confirmaron 19 clones positivos en el escrutinio terciario. Los fagémidos fueron escindidos y el ADN de cada uno de los 19 clones fue secuenciado utilizando un secuenciador automático Perkin Elmer/Applied Biosystems Division Modelo 373A. Se encontró que los 19 clones representaban dos secuencias distintas, referidas como Lmsp1a y Lmsp9a. Las secuencias de ADNc determinadas para Lmsp1a y Lmsp9a se proporcionan en los SEQ ID NO: 19 y 21, respectivamente, proporcionándose las correspondientes secuencias de aminoácidos en los SEQ ID NO: 20 y 22, respectivamente.
- 50



**B. Caracterización de Lmsp1a y Lmsp9a**

La Fig. 21 muestra el ADNc completo (SEQ ID NO: 19) y la secuencia de aminoácidos pronosticada (SEQ ID NO: 20) para el antígeno Lmsp1a. El inserto EcoRI/XhoI tiene 1019 pb y contiene los siguientes rasgos: a) los últimos 17 nt de la secuencia líder empalmada característica de todos los ARNm codificados nuclearmente por Trypanosoma; b) 39 nt de secuencia no traducida 5'; c) un marco de lectura abierto de 453 nt de longitud que codifica una secuencia de aminoácidos deducida de 151 con una masa molecular pronosticada de 16.641 kDa; y d) 471 nt de la secuencia no traducida 3' que termina con una cola de poliA. La secuencia de aminoácidos pronosticada contiene los tres sitios potenciales de fosforilación en los residuos de aminoácido 3, 85 y 102. Además, Lmsp1a contiene una secuencia RGD en el residuo 104, una secuencia que puede jugar un papel en la invasión por parásitos del macrófago. Se ha demostrado que las secuencias RGD median la unión de varias proteínas de adherencia a sus receptores de la superficie celular. No existe una secuencia líder obvia (señal secretora) en la porción amino terminal sugiriendo que la proteína podría ser eliminada o excretada. Lmsp1a parece ser uno de los antígenos más abundantes encontrados en el sobrenadante de cultivo de promastigotas vivas, puesto que 17 de los 19 clones contienen secuencias de longitudes variables idénticas a Lmsp1a.

La comparación de la secuencia de aminoácidos de Lmps1a con secuencias conocidas utilizando el sistema DNA STAR (Versión 87) reveló que Lmsp1a comparte entre 65% y 70% de homología con la proteína nucleósido difosfato quinasa eucariótica, también referida en ratón y ser humano como gen inhibidor de la metástasis tumoral.

El análisis de transferencia Southern del ADN genómico de *L. major* (cepa Friedlander) digerido con un panel de enzimas de restricción (calles 1 a 7) y otras seis especies de *Leishmania* de diferentes localizaciones geográficas digerido con PstI (calles 8 a 13) utilizando el inserto de ADNc completo de Lmps1a, demostró que Lmsp1a está presente en todas las especies caracterizadas por un alto grado de conservación (Fig. 22). Esto sugiere una trascendencia evolutiva para el mantenimiento de Lmsp1a y la existencia de especies homólogas entre todas las especies de *Leishmania*.

Los dos clones de ADNc restantes aislados de la mezcla de antígenos solubles de *L. major* representan secuencias idénticas (referidas como Lmsp9a; SEQ ID NO: 21), sugiriendo que las dos copias resultan de la amplificación de la genoteca primaria. La secuenciación del ADNc de Lmsp9a reveló que el clon no contiene la secuencia 5' completa puesto que carece tanto del líder empalmado como de las secuencias no traducidas 5'. El extremo 3' del ADNc contiene un tramo de poliA, como cabría esperar para un ARNm de *Leishmania*. De la secuencia traducida pronosticada (SEQ ID NO: 22), 34 de los 201 aminoácidos (17%) representan residuos de cisteína. La comparación de la secuencia de la proteína pronosticada con las de las proteínas conocidas, como se ha descrito más arriba, reveló cierta homología con otras proteínas ricas en cisteína tales como el antígeno superficial principal de trofozoito de *Giardia lamblia* y furina proteasas.

**EJEMPLO 10****PREPARACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE MAPS-1A**

Este Ejemplo ilustra la preparación y caracterización del antígeno de *Leishmania* MAPS-1A (SEQ ID NO: 24).

Se obtuvo una reserva de suero a partir de 5 ratones BALB/c a los que se había administrado una inmunización primaria y dos refuerzos con sobrenadante de cultivo de promastigotas de *L. major* bruto como se describe más abajo en el Ejemplo 12. Con posterioridad se demostró que estos ratones estaban protegidos cuando se sensibilizaron con una dosis de promastigotas de *L. major* vivas que se ha encontrado que son letales por lo general. Los sueros de ratones obtenidos de este modo se utilizaron para escrutar una genoteca de expresión de ADNc de amastigotas de *L. major* preparada como se ha descrito en el Ejemplo 1. Se aislaron varios clones sero-reactivos y se secuenciaron utilizando un secuenciador automático Perkin Elmer/Applied Biosystems Division Modelo 373A (Foster City, CA).

Se encontró que uno de estos clones, referido en la presente memoria como MAPS-1A, estaba completo. La comparación del ADNc y de las secuencias de aminoácidos deducidas para MAPS-1A (SEQ ID No: 23 y 24, respectivamente) con secuencias conocidas del banco de genes utilizando el sistema DNA STAR no reveló homología significativa con las secuencias de *Leishmania* conocidas, aunque se encontró cierta similitud de secuencia con un grupo de proteínas, conocidas como antioxidantes específicos de tiol, encontrados en otros organismos.

Se preparó la proteína MAPS-1A recombinante que tiene una etiqueta HIS amino terminal utilizando un sistema de expresión de *E. coli* de alto nivel y se purificó una proteína recombinante mediante cromatografía de afinidad como se ha descrito en el Ejemplo 1. El análisis de transferencia Southern del ADN genómico de *L. major* digerido con un panel de enzimas de restricción, otras siete especies de *Leishmania* digeridas con PstI, y otros dos patógenos de enfermedades infecciosas (*T. cruzi* y *T. brucei*), utilizando el inserto completo de MAPS-1A, demostró que MAPS-1A está presente en las ocho especies de *Leishmania* sometidas a ensayo (Figura 23). El análisis de transferencia Northern de ARN de promastigota y amastigota de *L. major* indicó que MAPS-1A es expresada constitutivamente.

Utilizando cebadores oligonucleotídicos (SEQ ID NO: 27 y 28) basados en la secuencia de ADNc de MAPS-1A proporcionada en el SEQ ID NO: 23, se aisló el gen correspondiente a partir de *L. tropica* por medio de PCR (utilizando 30 ciclos de la siguiente secuencia de etapas de temperatura: 94°C, 1 minuto; 50°C, 1 minuto; 72°C, 1 minuto). La secuencia de ADNc determinada para la proteína MAPS-1A de *L. tropica* se proporciona en el SEQ ID NO: 25, proporcionándose la correspondiente secuencia de aminoácidos en el SEQ ID NO: 26.

La capacidad de MAPS-1A recombinante para estimular la proliferación celular se investigó como sigue. Se prepararon como se ha descrito más arriba en el Ejemplo 7, PBMC de 3 pacientes infectados con *L. braziliensis* que tenían leishmaniasis de las mucosas activa, de 4 pacientes después de infección con kala-azar (previamente infectados con *L. chagasi* y/o *L. donovani*) y de 3 individuos no infectados. Se determinó la capacidad de MAPS-1A para estimular la proliferación de estas PBMC como se ha descrito en el Ejemplo 8 anterior. Como se muestra en la Figura 24, se observaron niveles significativos de proliferación de PBMC específica de MAPS-1A en 2 de los 7 pacientes con *Leishmania*.

Se determinó la capacidad de MAPS-1A para estimular la proliferación en cultivos de ganglio linfático de ratones como se ha descrito en el Ejemplo 8. La Figura 25 muestra la cantidad de proliferación estimulada por MAPS-1A (a 25 µg/ml, 5 µg/ml y 1 µg/ml) en comparación con la estimulada por el control positivo ConA y por proteínas del sobrenadante de promastigotas de *L. major* bruto, 20 días después de la infección con *L. major*. Las células aisladas 20 días después de la infección fueron altamente sensibles a MAPS-1A, mientras las células aisladas 10 días después de la infección no fueron sensibles.

#### EJEMPLO 11

##### INMUNORREACTIVIDAD DE ANTÍGENOS DE *LEISHMANIA* SOLUBLES CON SUEROS DE PACIENTES INFECTADOS CON *LEISHMANIA*

La reactividad de MAPS-1A con sueros de individuos no infectados, de pacientes con leishmaniasis humana con infección cutánea, de pacientes humanos con leishmaniasis visceral aguda, y de ratones BALB/c infectados con *L. major* se determinó como sigue.

Los análisis se realizaron en placas de 96 pocillos revestidas con 200 ng de antígeno diluido hasta 50 µL en tampón de revestimiento de carbonato, pH 9,6. Los pocillos se revistieron durante la noche a 4°C (o 2 horas a 37°C). Los contenidos de la placa se eliminaron a continuación y los pocillos se bloquearon durante 2 horas con 200 µL de PBS/BSA al 1%. Después de la etapa de bloqueo, los pocillos se lavaron cinco veces con PBS/Tween 20<sup>®</sup> al 0,1%. A continuación se añadieron 50 µL de suero, diluido 1:100 en PBS/Tween 20<sup>®</sup> al 0,1%/BSA al 0,1%, a cada pocillo y se incubó durante 30 minutos a la temperatura ambiente. Las placas se lavaron a continuación de nuevo cinco veces con PBS/Tween 20<sup>®</sup> al 0,1%.

El producto conjugado enzimático (peroxidasa de rábano picante - Proteína A, Zymed, San Francisco, CA) se diluyó a continuación 1:10.000 en PBS/Tween 20<sup>®</sup> al 0,1%/BSA al 0,1%, y se añadieron a cada pocillo 50 µL del producto conjugado diluido y se incubó durante 30 minutos a la temperatura ambiente. Después de la incubación, los pocillos se lavaron cinco veces con PBS/Tween 20<sup>®</sup> al 0,1%. Se añadieron 100 µL de sustrato de tetrametilbenzidina-peroxidasa (TMB) (Kirkegaard and Perry Laboratories, Gaithersburg, MD), no diluido, y se incubó durante aproximadamente 15 minutos. La reacción se detuvo con la adición de 100 µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 N a cada pocillo, y las placas se leyeron a 450 nm.

Como se muestra en la Figura 26, aproximadamente 50% de las muestras de pacientes con leishmaniasis humana mostraron reactividades con MAPS-1A recombinante sustancialmente por encima del fondo. La Figura 27 muestra la reactividad de MAPS-1A con diluciones crecientes de sueros de ratones BALB/c a los que se había administrado previamente (i) solución salina; (ii) coadyuvante *B. pertussis*; (iii) antígenos de *Leishmania* solubles más *B. pertussis*; (iv) promastigotas de *L. major* vivas o (v) antígenos de *Leishmania* solubles más *B. pertussis* seguido de promastigotas de *L. major* vivas (como se describe más abajo en el Ejemplo 12). Se observaron absorbancias considerablemente mayores con sueros de ratones infectados con promastigotas de *L. major* vivas y con ratones infectados con promastigotas de *L. major* vivas después de la inmunización con antígenos de *Leishmania* solubles más *B. pertussis*, que con sueros de los otros tres grupos de ratones, indicando que los títulos de anticuerpos anti-MAPS-1A se incrementan después de la infección por *Leishmania*.

#### EJEMPLO 12

##### USO DE ANTÍGENOS DE *LEISHMANIA* PARA LA VACUNACIÓN CONTRA LA INFECCIÓN POR *LEISHMANIA*

Este ejemplo ilustra la eficacia de los antígenos de *Leishmania* para conferir protección contra una enfermedad en el sistema modelo de leishmaniasis murina experimental. Para una discusión del sistema modelo de leishmaniasis murina véase, por ejemplo, Reiner et al. Annu. Rev. Immunol., 13:151-77, 1995.

La eficacia de (i) antígenos de *Leishmania* solubles brutos, (ii) MAPS-1A, y (iii) una mezcla de Ldp23, LbelF4A y M15, como vacunas contra la infección por *Leishmania* se determinó como sigue. Se inmunizaron ratones BALB/c (5 por grupo) intra-peritonealmente tres veces a intervalos bisemanales con (i) 30 µg de antígenos de *Leishmania*

solubles brutos, (ii) 20 µg de MAPS-1A o (iii) una mezcla que contenía 10 µg de cada uno de LelF, Ldp23 y M15, junto con 100 µg del coadyuvante *C. parvum*. Dos grupos de control se inmunizaron con solución salina o con *C. parvum* solo. Dos semanas después de la última inmunización, los ratones se sensibilizaron con  $2 \times 10^5$  promastigotas de *L. major* en la fase logarítmica tardía. La infección se controló semanalmente midiendo la hinchazón de la almohadilla de la pata. La cantidad de hinchazón de la almohadilla de la pata observada en los ratones inmunizados con antígenos de *Leishmania* solubles brutos, una mezcla de Ldp23, LbeiF4A y M15 (Figura 28), o MAPS-1A (Figura 29) fue significativamente menor que la observada en ratones inmunizados con *C. parvum* solo. Estos resultados demuestran que los antígenos de *Leishmania* de la presente invención son eficaces para conferir protección contra la infección por *Leishmania*.

## 10 EJEMPLO 13

### **AISLAMIENTO DE ADN QUE CODIFICA ANTÍGENOS SOLUBLES DE UNA GENOTECA DE ADN GENÓMICO DE *L. MAJOR***

Este ejemplo, ilustra el aislamiento de siete genes de antígenos de *Leishmania* solubles de una genoteca de ADN genómico de *L. major*.

15 Se preparó una genoteca de expresión de ADN genómico de *L. major* a partir de promastigotas de *L. major* utilizando el kit Lambda ZAP unidireccional (uni-ZAP) (Stratagene) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Esta genoteca se escrutó con un suero de conejo de alto título originado contra antígenos de *L. major* solubles, como se ha descrito más arriba en el Ejemplo 9. Se identificaron siete clones positivos. El fagémido se escindió y el ADN de cada uno de los siete clones se secuenció utilizando un secuenciador automático Perkin Elmer/Applied Biosystems  
20 Division Modelo 373A. Las secuencias de ADN para estos antígenos, referidos como LmgSP1, LmgSP3, LmgSP5, LmgSP8, LmgSP9, LmgSP13, LmgSP19, se proporcionan en los SEQ ID NO: 29-35, respectivamente, proporcionándose las secuencias de aminoácidos correspondientes en los SEQ ID NO: 36-42, respectivamente. Se encontró que LmgSP13 contenía una secuencia repetida de 39 aminoácidos mostrada en el SEQ ID NO: 43.

25 Estudios posteriores dieron como resultado el aislamiento de una secuencia completa para LmgSP9. La secuencia de ADN completa se proporciona en el in SEQ ID NO: 54, proporcionándose la secuencia de aminoácidos pronosticada correspondiente en el SEQ ID NO: 55. Se encontró que la secuencia de aminoácidos contenía seis unidades repetidas de 14 aminoácidos (SEQ ID NO: 56), proporcionándose cada unidad dividida adicionalmente en 7 unidades de aminoácidos, en los SEQ ID NO: 57 y 58.

30 La comparación de las secuencias de ADN y aminoácidos de los antígenos aislados descritos como se ha descrito más arriba, reveló homologías no significativas para LmgSP1, LmgSP3, y LmgSP13. Se encontró que LmgSP5 estaba relacionado con la familia PSA2 conocida. Se encontró que LmgSP8 guardaba cierta homología con una secuencia identificada previamente en *E. coli* (ácido 2-succinil-6-hidroxi-2,4-ciclohexadien-1-carboxílico sintasa). Se encontró que LmgSP9 y LmgSP19 eran homólogas a una proteína de superficie hidrófila de *L. major* referida como Gene B (Flinn, H.M. et al. Mol. Biochem. Parasit. 65:259-270, 1994), y a la ubiquitina, respectivamente. Hasta donde  
35 tienen conocimiento los autores de la presente invención, no se ha mostrado previamente que ninguno de estos antígenos logre respuestas en células T o B.

La reactividad de LmgSP9 recombinante con sueros de pacientes con leishmaniasis visceral, (tanto de Sudán como de Brasil) y de donantes normales se evaluó mediante ELISA como se ha descrito más arriba. Los valores de absorbancia se compararon con los obtenidos utilizando el antígeno K39 de *Leishmania* conocido descrito  
40 anteriormente, empleándose producto lisado de *L. chagasi* como control positivo. Los resultados representativos de estos análisis se proporcionan más abajo en la Tabla 2, donde todos los pacientes de Brasil y los de Sudán designados "VL" fueron infectados con leishmaniasis visceral. Los resultados demostraron que LmgSP9 detecta específicamente el anticuerpo en la mayoría de los individuos con leishmaniasis visceral, independientemente de la localización geográfica. En algunos casos, los valores de absorbancia de la reactividad del anticuerpo con LmgSP9  
45 fueron comparables con los observados con K39. Además, LmgSP9 detectó varios casos de leishmaniasis que no se detectaron utilizando K39. Estos resultados indican que LmgSP9 se puede utilizar para complementar la reactividad de K39.

Tabla 2

REACTIVIDAD DE LmgSP9 CON SUEROS DE PACIENTES CON LEISHMANIA			
Paciente Núm.	Producto lisado de <i>L. chagasi</i>	K39	LmgSP9
Muestras Sudanesas:			
B19	1,067	0,306	0,554
B25	1,884	3,435	0,974
B43	1,19	3,225	0,86
B47	2,405	2,892	0,375
B50	0,834	0,748	0,432
B58	0,921	0,235	0,92
B63	1,291	0,303	0,764
B70	0,317	0,089	3,056
VL4	1,384	3,035	2,965
VL11	0,382	0,144	0,142
VL12	0,277	0,068	0,098
VL13	0,284	0,12	0,194
Muestras Brasileñas:			
105	3,508	3,53	0,374
106	2,979	3,373	2,292
107	2,535	3,444	0,46
109	1,661	3,415	3,319
111	3,595	3,537	0,781
112	2,052	3,469	0,63
113	3,352	3,429	0,963
114	2,316	3,437	1,058
115	2,073	3,502	1,186
116	3,331	3,461	0,96
Donantes Normales:			
129	0,157	0,104	0,08
130	0,195	0,076	0,095
131	0,254	0,134	0,086
132	0,102	0,035	0,043

5 Con el fin de obtener una especificidad superior para la detección de anticuerpos en sueros de pacientes de leishmaniasis visceral, se aisló un homólogo de LmgSP9 de *L. chagasi*, uno de los agentes causantes de la leishmaniasis visceral. Se escrutaron un total de 80.000 pfu de una genoteca genómica de *L. chagasi* amplificada con la región codificante completa de LmgSP9 (amplificado a partir del ADN genómico de *L. major*). Siete clones que hibridaron se purificaron hasta la homogeneidad. Las secuencias de ADN determinadas para dos de estos clones, referidos como Lc Gene A y Lc Gene B, se proporcionan en los SEQ ID NO: 59 y 60, respectivamente, proporcionándose las secuencias de aminoácidos pronosticadas correspondientes en los SEQ ID NO: 61 y 62, respectivamente. Se encontró que el marco de lectura abierto para Lc Gene A mostraba alguna homología con Gene A/C, aislado previamente de *L. major* (McKlean et al., Mol. Bio. Parasitol., 85:221-231, 1997). El marco de lectura abierto para Lc Gene B mostró alguna homología con Gene B de *L. major*, comentado anteriormente, y se encontró

10

que contenía once repeticiones de una unidad repetida de 14 aminoácidos (SEQ ID NO: 63), estando cada repetición dividida adicionalmente en dos unidades de 7 aminoácidos, proporcionadas en los SEQ ID NO: 64 y 65.

Los potenciales diagnósticos de Lc Gene A y Lc Gene B se evaluaron mediante ELISA como se ha descrito más arriba utilizando sueros de pacientes con leishmaniasis visceral de Sudán y Brasil, y de controles no infectados. Los valores de absorbancia se compararon con los obtenidos utilizando LmgSP9. Se obtuvieron valores de absorbancia mucho mayores con Lc Gene A y Lc Gene B que con LmgSP9, con Lc Gene B parecía ser más eficaz que con Lc Gene A en la detección de anticuerpos en algunos casos. Estos resultados indican que Lc Gene B es muy eficaz en la diagnosis de la leishmaniasis visceral.

Con el fin de evaluar el potencial diagnóstico de las repeticiones encontradas en Lc Gene B, se sintetizaron una serie de 6 péptidos (SEQ ID NO: 66-71; referidos como Pep 1-6), que diferían en un residuo R o H. Se llevó a cabo un ELISA utilizando la proteína Lc Gene B completa y los seis péptidos. Los valores de absorbancia obtenidos con Pep 3 fueron superiores a los obtenidos con los otros 5 péptidos, sin embargo no fueron tan altos como los obtenidos con la proteína completa.

#### EJEMPLO 14

#### 15 AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DEL ADN QUE CODIFICA ANTÍGENOS SOLUBLES DE UNA GENOTECA DE ADN GENÓMICO DE *L. CHAGASI*

Este ejemplo, ilustra la preparación de cinco genes de antígenos de *Leishmania* solubles de una genoteca de ADN genómico de *L. chagasi*.

Se preparó una genoteca de expresión de ADN genómico de *L. chagasi* a partir de promastigotas de *L. chagasi* utilizando el kit Lambda ZAP unidireccional (uni-ZAP) (Stratagene) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Esta genoteca se escrutó con un suero de conejo de alto título originado contra antígenos de *L. major* solubles, como se ha descrito más arriba en el Ejemplo 9. Se identificaron cinco clones positivos. El fagémido se escindió y el ADN de cada uno de los Cinco clones se secuenció utilizando un secuenciador automático Perkin Elmer/Applied Biosystems Division Modelo 373A. Las secuencias de ADN para estos antígenos, referidos como LcgSP1, LcgSP3, LcgSP4, LcgSP8, y LcgSP10, se proporcionan en los SEQ ID NO: 44-48, respectivamente, proporcionándose las secuencias de aminoácidos correspondientes en los SEQ ID NO: 49-53, respectivamente.

La comparación de estas secuencias con secuencias conocidas en el banco de genes como se ha descrito más arriba, no reveló homologías conocidas con LcgSP3, LcgSP4, LcgSP8 y LcgSP10. Se encontró que LcgSP1 era homólogo con el antígeno conocido HSP70.

Las Figuras 30A y B ilustran la respuesta proliferativa de ganglios linfáticos murinos a LcgSP8, LcgSP10 y LcgSP3 recombinantes. También se recogieron los ganglios linfáticos de ratones BALB/c 17 días después de la infección con *L. major*. La infección se produjo por medio de inyección en la almohadilla de la pata de  $2 \times 10^6$  parásitos/almohadilla de la pata. Las células se estimularon con antígeno recombinante y la proliferación se midió a las 72 horas utilizando  $^3\text{H}$ -timidina. La Figura 30A muestra las CPM, una medición directa de la actividad mitótica en respuesta a los antígenos, y la Figura 30B muestra en índice de estimulación, que mide la respuesta proliferativa relativa al control negativo.

#### EJEMPLO 15

#### 40 AISLAMIENTO DE ADN QUE CODIFICA LOS ANTÍGENOS DE *L. MAJOR* MEDIANTE CLONACIÓN DE EXPRESIÓN DE CÉLULAS T CD4+

Este ejemplo, ilustra el aislamiento de antígenos de células T de *L. major* utilizando un enfoque de escrutinio de células T directo.

Las líneas de células T CD4+ específicas de *Leishmania* se obtuvieron de PBMC de un individuo que dio resultado positivo en una prueba cutánea para *Leishmania* pero no tenía historia clínica de enfermedad. Estas líneas de células T se utilizaron para escrutar una genoteca de expresión de ADNc de amastigota de *L. major* preparada como se ha descrito en el Ejemplo 1. Los clones inmunorreactivos se aislaron y secuenciaron como se ha descrito más arriba. Las secuencias de ADNc determinadas para los 8 clones aislados referidas como 1G6-34, 1E6-44, 4A5-63, 1B11-39, 2A10-37, 4G2-83, 4H6-41, 8G3-100 se proporcionan en los SEQ ID NO: 72-79, respectivamente, proporcionándose las secuencias de aminoácidos pronosticadas correspondientes en los SEQ ID NO: 80-87, respectivamente. Se cree que las secuencias de ADNc proporcionadas para 1E6-44, 2A10-37, 4G2-83, 4H6-41 y 8G3-100 representan clones parciales. Se encontró que todos estos clones estimulan la proliferación de células T.

La comparación de estas secuencias con las del banco de genes como se ha descrito más arriba no reveló homologías conocidas con el antígeno 4A5-63. Se encontró que 1G6-34 tenía alguna homología con la histona H2B identificada previamente en *L. enrietti*. Los antígenos 1E6-44, 1B11-39 y 8G3-100 mostraron alguna homología con las secuencias identificadas previamente en otros eucariotas, en particular *Saccharomyces cerevisiae*. Se encontró que 2A10-37 y 4H6-41 eran homólogos a las dos proteínas alfa tubulina identificadas previamente de *L. donovani*

beta tubulina de *L. major*, respectivamente, y se encontró que 4G2-83 era homólogo al factor 2 de iniciación de la elongación identificado previamente en *T. cruzi*.

## EJEMPLO 15

### SÍNTESIS DE POLIPÉPTIDOS

5 Los polipéptidos se pueden sintetizar en un sintetizador de péptidos de Perkin Elmer/Applied Biosystems Division 430A utilizando la química FMOC con activación mediante HPTU (hexafluorofosfato de O-Benzotriazol-N,N,N',N'-tetrametiluronio). Se puede anclar una secuencia Gly-Cys-Gly al extremo amino del péptido para proporcionar un método de conjugación, unión a una superficie inmovilizada, o marcaje del péptido. La escisión de los péptidos del soporte sólido se puede llevar a cabo utilizando la siguiente mezcla de escisión: ácido trifluoroacético:etanoditiol:tioanisol:agua:fenol (40:1:2:2:3). Después de escindirlos durante 2 horas, los péptidos se pueden precipitar en metil-t-butil-éter frío. Los sedimentos peptídicos se pueden disolver a continuación en agua que contiene ácido trifluoroacético al 0,1% (TFA) y liofilizar antes de la purificación por medio de HPLC de fase inversa C 18. Se puede utilizar un gradiente de acetonitrilo de 0% a 60% (conteniendo TFA al 0,1%) en agua (conteniendo TFA al 0,1%) para eluir los péptidos. Después de la liofilización de las fracciones puras, los péptidos se pueden caracterizar utilizando electropulverización u otros tipos de espectrometría de masas y por medio de análisis de aminoácidos.

Listado de secuencias

#### 20 (1) INFORMACIÓN GENERAL:

(i) SOLICITANTE: Corixa Corporation

(ii) TÍTULO DE LA INVENCIÓN: ANTÍGENOS DE *LEISHMANIA* PARA USO EN LA TERAPIA Y LA DIAGNOSIS DE LEISHMANIASIS

(iii) NÚMERO DE SECUENCIAS

#### 25 (iv) DIRECCIÓN PARA LA CORRESPONDENCIA

(A) DESTINATARIO: SEED and BERRY LLP

(B) CALLE: 6300 Columbia Center, 701 Fifth Avenue

(C) CIUDAD: Seattle

(D) ESTADO: Washington

30 (E) PAÍS: USA

(F) ZIP: 98104-7092

(v) FORMA LEGIBLE POR ORDENADOR:

(A) TIPO DE MEDIO: Disquete

(B) ORDENADOR: IBM PC compatible

35 (C) SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS/MS-DOS

(D) APLICACIÓN: Patent In Release #1.0, Version #1.30

(vi) DATOS ACTUALES DE LA SOLICITUD:

(A) NÚMERO DE SOLICITUD: US

(B) FECHA DE PRESENTACIÓN: 12-FEB-1998

40 (C) CLASIFICACIÓN:

(viii) DATOS DEL ABOGADO/AGENTE:

(A) NOMBRE: Maki, David J.

(B) NÚMERO DE REGISTRO: 31,392

(C) REFERENCIA/NÚMERO DEL EXPEDIENTE: 210121.42001PC

(ix) DATOS PARA TELECOMUNICACIÓN:

(A) TELÉFONO: (206) 622-4900

(B) TELEFAX: (206) 682-6031

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:1:

5

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 3134 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

10

(ix) CARACTERÍSTICA:

(A) NOMBRE / CLAVE: CDS

(B) LOCALIZACIÓN: 421..2058

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:1:

ES 2 373 878 T3

CAAGTGTGCGA AGGACAGTGT TCNCCGTGTG AGATCGCCGG CTGTGCGTGT GAAGGCGGTG	60
CCATCGGANA AACAAACACCG GTGGANCCGC AGGAAACCAT CTTTCTCCGC AGGTCTCTTT	120
TTGTGTGCGA TTGAGAGTGC NCCAAACCCT GCTGGTGCCC TTCTCACATA TCATGTTTTT	180
CGTTGTGCGC TCGCTTTGCC TTTCCTCTCC TTCCCTCTC TTCCGTGGTG CCGTGATAC	240
TTCTGGCACC CGCTACGTCA CTTCGCTGGT TTGAACAGAA CCACTGTGAA CACCCACGGG	300
CGATCGCACA CATAACATC CCTCACTCAC ACACACAGCT ACATCTATCC TACATAAAGC	360
TGAAAAAAA GTCTACGAAC AATTTTGTTT TTACAGTGCG TTGCCGACA TTTCTCCGTA	420
ATG GAC GCA ACT GAG CTG AAG AAC AAG GGG AAC GAA GAG TTC TCC GCC	468
Met Asp Ala Thr Glu Leu Lys Asn Lys Gly Asn Glu Glu Phe Ser Ala	
1 5 10 15	
GGC CGC TAT GTG GAG GCG GTG AAC TAC TTC TCA AAG GCG ATC CAG TTG	516
Gly Arg Tyr Val Glu Ala Val Asn Tyr Phe Ser Lys Ala Ile Gln Leu	
20 25 30	
GAT GAG CAG AAC AGT GTC CTC TAC AGC AAC CGC TCC GCC TGT TTT GCA	564
Asp Glu Gln Asn Ser Val Leu Tyr Ser Asn Arg Ser Ala Cys Phe Ala	
35 40 45	
GCC ATG CAG AAA TAC AAG GAC GCG CTG GAC GAC GCC GAC AAG TGC ATC	612
Ala Met Gln Lys Tyr Lys Asp Ala Leu Asp Asp Ala Asp Lys Cys Ile	
50 55 60	
TCG ATC AAG CCG AAT TGG GCC AAG GGC TAC GTG CGC CGA GGA GCA GCT	660
Ser Ile Lys Pro Asn Trp Ala Lys Gly Tyr Val Arg Arg Gly Ala Ala	
65 70 75 80	
CTC CAT GGC ATG CGC CGC TAC GAC GAT GCC ATT GCC GCG TAT GAA AAG	708
Leu His Gly Met Arg Arg Tyr Asp Asp Ala Ile Ala Ala Tyr Glu Lys	
85 90 95	
GGG CTC AAG GTG GAC CCT TCC AAC AGC GGC TGC GCG CAG GGC GTG AAG	756
Gly Leu Lys Val Asp Pro Ser Asn Ser Gly Cys Ala Gln Gly Val Lys	
100 105 110	
GAC GTG CAG GTA GCC AAG GCC CGC GAA GCA CGT GAC CCC ATC GCT CGC	804
Asp Val Gln Val Ala Lys Ala Arg Glu Ala Arg Asp Pro Ile Ala Arg	
115 120 125	
GTC TTC ACC CCG GAG GCG TTC CGC AAG ATC CAA GAG AAT CCC AAG CTG	852
Val Phe Thr Pro Glu Ala Phe Arg Lys Ile Gln Glu Asn Pro Lys Leu	
130 135 140	
TCT CTA CTT ATG CTG CAG CCG GAC TAC GTG AAG ATG GTA GAC ACC GTC	900
Ser Leu Leu Met Leu Gln Pro Asp Tyr Val Lys Met Val Asp Thr Val	



ES 2 373 878 T3

145	150	155	160		
ATC CGC GAC CCT TCG CAG GGC CGG CTG TAC ATG GAA GAC CAG CGC TTT				948	
Ile Arg Asp Pro Ser Gln Gly Arg Leu Tyr Met Glu Asp Gln Arg Phe	165	170	175		
GCC CTG ACG CTC ATG TAC CTG AGC GGA ATG AAG ATT CCC AAC GAT GGT				996	
Ala Leu Thr Leu Met Tyr Leu Ser Gly Met Lys Ile Pro Asn Asp Gly	180	185	190		
GAT GGC GAG GAG GAG GAA CGT CCG TCT GCG AAG GCG GCA GAG ACA GCG				1044	
Asp Gly Glu Glu Glu Arg Pro Ser Ala Lys Ala Ala Glu Thr Ala	195	200	205		
AAG CCA AAA GAG GAG AAG CCT CTC ACC GAC AAC GAG AAG GAG GCC CTG				1092	
Lys Pro Lys Glu Glu Lys Pro Leu Thr Asp Asn Glu Lys Glu Ala Leu	210	215	220		
GCG CTC AAG GAG GAG GGC AAC AAG CTG TAC CTC TCG AAG AAG TTT GAG				1140	
Ala Leu Lys Glu Glu Gly Asn Lys Leu Tyr Leu Ser Lys Lys Phe Glu	225	230	235	240	
GAG GCG CTG ACC AAG TAC CAA GAG GCG CAG GTG AAA GAC CCC AAC AAC				1188	
Glu Ala Leu Thr Lys Tyr Gln Glu Ala Gln Val Lys Asp Pro Asn Asn	245	250	255		
ACT TTA TAC ATT CTG AAC GTG TCG GCC GTG TAC TTC GAG CAG GGT GAC				1236	
Thr Leu Tyr Ile Leu Asn Val Ser Ala Val Tyr Phe Glu Gln Gly Asp	260	265	270		
TAC GAC AAG TGC ATC GCC GAG TGC GAG CAC GGT ATC GAG CAC GGT CGC				1284	
Tyr Asp Lys Cys Ile Ala Glu Cys Glu His Gly Ile Glu His Gly Arg	275	280	285		
GAG AAC CAC TGC GAC TAC ACA ATC ATT GCG AAG CTC ATG ACC CGG AAC				1332	
Glu Asn His Cys Asp Tyr Thr Ile Ile Ala Lys Leu Met Thr Arg Asn	290	295	300		
GCC TTG TGC CTC CAG AGG CAG AGG AAG TAC GAG GCT GCT ATC GAC CTT				1380	
Ala Leu Cys Leu Gln Arg Gln Arg Lys Tyr Glu Ala Ala Ile Asp Leu	305	310	315	320	
TAC AAG CGC GCC CTT GTC GAG TGG CGT AAC CCT GAC ACC CTC AAG AAG				1428	
Tyr Lys Arg Ala Leu Val Glu Trp Arg Asn Pro Asp Thr Leu Lys Lys	325	330	335		
CTG ACG GAG TGC GAG AAG GAG CAC CAA AAG GCG GTG GAG GAA GCC TAC				1476	
Leu Thr Glu Cys Glu Lys Glu His Gln Lys Ala Val Glu Glu Ala Tyr	340	345	350		
ATC GAT CCT GAG ATC GCG AAG CAG AAG AAA GAC GAA GGT AAC CAG TAC				1524	
Ile Asp Pro Glu Ile Ala Lys Gln Lys Lys Asp Glu Gly Asn Gln Tyr	355	360	365		
TTC AAG GAG GAT AAG TTC CCC GAG GCC GTG GCA GCG TAC ACG GAG GCC				1572	

ES 2 373 878 T3

Phe	Lys	Glu	Asp	Lys	Phe	Pro	Glu	Ala	Val	Ala	Ala	Tyr	Thr	Glu	Ala		
	370					375						380					
ATC	AAG	CGC	AAC	CCT	GCC	GAG	CAC	ACC	TCC	TAC	AGC	AAT	CGC	GCG	GCC	1620	
Ile	Lys	Arg	Asn	Pro	Ala	Glu	His	Thr	Ser	Tyr	Ser	Asn	Arg	Ala	Ala		
	385				390					395				400			
GCG	TAC	ATC	AAG	CTT	GGA	GCC	TTC	AAC	GAC	GCC	CTC	AAG	GAC	GCG	GAG	1668	
Ala	Tyr	Ile	Lys	Leu	Gly	Ala	Phe	Asn	Asp	Ala	Leu	Lys	Asp	Ala	Glu		
				405					410					415			
AAG	TGC	ATT	GAG	CTG	AAG	CCC	GAC	TTT	GTT	AAG	GGC	TAC	GCG	CGC	AAG	1716	
Lys	Cys	Ile	Glu	Leu	Lys	Pro	Asp	Phe	Val	Lys	Gly	Tyr	Ala	Arg	Lys		
			420					425					430				
GGT	CAT	GCT	TAC	TTT	TGG	ACC	AAG	CAG	TAC	AAC	CGC	GCG	CTG	CAG	GCG	1764	
Gly	His	Ala	Tyr	Phe	Trp	Thr	Lys	Gln	Tyr	Asn	Arg	Ala	Leu	Gln	Ala		
		435					440					445					
TAC	GAT	GAG	GGC	CTC	AAG	GTG	GAC	CCG	AGC	AAT	GCG	GAC	TGC	AAG	GAT	1812	
Tyr	Asp	Glu	Gly	Leu	Lys	Val	Asp	Pro	Ser	Asn	Ala	Asp	Cys	Lys	Asp		
	450					455					460						
GGG	CGG	TAT	CGC	ACA	ATC	ATG	AAG	ATT	CAG	GAG	ATG	GCA	TCT	GGC	CAA	1860	
Gly	Arg	Tyr	Arg	Thr	Ile	Met	Lys	Ile	Gln	Glu	Met	Ala	Ser	Gly	Gln		
	465				470					475				480			
TCC	GCG	GAT	GGC	GAC	GAG	GCG	GCG	CGC	CGG	GCC	ATG	GAC	GAT	CCT	GAA	1908	
Ser	Ala	Asp	Gly	Asp	Glu	Ala	Ala	Arg	Arg	Ala	Met	Asp	Asp	Pro	Glu		
				485					490					495			
ATC	GCG	GCA	ATC	ATG	CAA	GAT	AGC	TAC	ATG	CAA	CTA	GTG	TG	AAG	GAG	1956	
Ile	Ala	Ala	Ile	Met	Gln	Asp	Ser	Tyr	Met	Gln	Leu	Val	Leu	Lys	Glu		
			500					505					510				
ATG	CAG	AAC	GAT	CCC	ACG	CGC	ATT	CAG	GAG	TAC	ATG	AAG	GAC	TCC	GGG	2004	
Met	Gln	Asn	Asp	Pro	Thr	Arg	Ile	Gln	Glu	Tyr	Met	Lys	Asp	Ser	Gly		
		515					520					525					
ATC	TCA	TCG	AAG	ATC	AAC	AAG	CTG	ATT	TCA	GCT	GGC	ATC	ATT	CGT	TTT	2052	
Ile	Ser	Ser	Lys	Ile	Asn	Lys	Leu	Ile	Ser	Ala	Gly	Ile	Ile	Arg	Phe		
	530					535					540						
GGT	CAG	TAGACTTCTA	CGCTGCCTCA	TCTTTTCCGT	GTCTTTGCGT	CGGCGGGTAT										2108	
Gly	Gln																
	545																
CGTAAAGCAC	AATAAAGCAG	CGATTCACAT	GCACGAGTAA	AGTGCTGCGC	CTCTCAAACA											2168	
CGACGTCGAG	GCTGTGGTGC	AGATGCGCGT	CCTGCATGAA	GGTAGTGAAG	AGGAAAAGTAA											2228	
GGGATGTTGT	TTGTGGGCCT	TCGTGGCTGC	GCACACACCT	CTTATCTCCT	TCGCTTGGTA											2288	
CCTTCCCT	TTTCGTCTT	CACCCCTT	TCTTCTCA	CGCTCCCT	GGCGGGTG											2348	

TGCAACGATT TCGTTTTATT TACGTCTGTG TAGCTCCTCT ATTCAACGGT GCGATGACGC 2408  
 TAACGAAGCT GGCCTGTATT CGGCTAAGGC GAAGGCCAAA GACTAGGAGG GGGGGGGGAA 2468  
 GGAGACGGCG TGACCATCAC TGCGAAGAAA CAAGCCGAAG AAAAGGCCCC GAACGCCTGC 2528  
 ATTTCCGCGC GCCCTCGCCC GCCTTCCTTC CTTCTTCGC TCTCTCTCTC TCTCTCTCTC 2588  
 GCTATCTTCT CAACGGAGAC ATGAAAGGCG TTTGTTAGGA AAAGAGGGGG GGGGAAGAG 2648  
 TGGGACGACG CGCTGCGTCT TTTGGGCACT GGTACGTGC GTCACCCTCT TTTTTATCT 2708  
 CTATTGGCAC TGTCTGTTTT CTTTTCCCTT TCCTATCATA CGCGTCTCGC AAACGACTCC 2768  
 GCGCTGAGCA GCCATGTGCT GCGGCGTGGA GGAAGTACAC AGACATCACG GATGCATATG 2828  
 TCGCGTCCG TGTACGCGCT TGTATGGGGC TTCTAACAGC GCCTGTGTGT GTTTGTGTGT 2888  
 GTGTGTGTGT GTGTGTCTGT GTATTTGAG CGTCTGTATG CTATTCTATT AAGCACCGAA 2948  
 GAAGAGACAC ACACGACAGC GAAGGAGATG GTGTCGGCTT TTCGGCTAAT CACTCCCTTC 3008  
 CATAGCTTCT CTGAAGGAGG CTCTCTTCCA GAGGAATAGA CTGCAGATGG GGTCCACGTT 3068  
 TATCTGAGGA GTCAACGGAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA 3128  
 CTCGAG 3134

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:2:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 546 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:2:

Met Asp Ala Thr Glu Leu Lys Asn Lys Gly Asn Glu Glu Phe Ser Ala  
 1 5 10 15  
 Gly Arg Tyr Val Glu Ala Val Asn Tyr Phe Ser Lys Ala Ile Gln Leu  
 20 25 30  
 Asp Glu Gln Asn Ser Val Leu Tyr Ser Asn Arg Ser Ala Cys Phe Ala  
 35 40 45  
 Ala Met Gln Lys Tyr Lys Asp Ala Leu Asp Asp Ala Asp Lys Cys Ile  
 50 55 60  
 Ser Ile Lys Pro Asn Trp Ala Lys Gly Tyr Val Arg Arg Gly Ala Ala  
 65 70 75 80

5

ES 2 373 878 T3

Leu His Gly Met Arg Arg Tyr Asp Asp Ala Ile Ala Ala Tyr Glu Lys  
 85 90 95  
 Gly Leu Lys Val Asp Pro Ser Asn Ser Gly Cys Ala Gln Gly Val Lys  
 100 105 110  
 Asp Val Gln Val Ala Lys Ala Arg Glu Ala Arg Asp Pro Ile Ala Arg  
 115 120 125  
 Val Phe Thr Pro Glu Ala Phe Arg Lys Ile Gln Glu Asn Pro Lys Leu  
 130 135 140  
 Ser Leu Leu Met Leu Gln Pro Asp Tyr Val Lys Met Val Asp Thr Val  
 145 150 155 160  
 Ile Arg Asp Pro Ser Gln Gly Arg Leu Tyr Met Glu Asp Gln Arg Phe  
 165 170 175  
 Ala Leu Thr Leu Met Tyr Leu Ser Gly Met Lys Ile Pro Asn Asp Gly  
 180 185 190  
 Asp Gly Glu Glu Glu Glu Arg Pro Ser Ala Lys Ala Ala Glu Thr Ala  
 195 200 205  
 Lys Pro Lys Glu Glu Lys Pro Leu Thr Asp Asn Glu Lys Glu Ala Leu  
 210 215 220  
 Ala Leu Lys Glu Glu Gly Asn Lys Leu Tyr Leu Ser Lys Lys Phe Glu  
 225 230 235 240  
 Glu Ala Leu Thr Lys Tyr Gln Glu Ala Gln Val Lys Asp Pro Asn Asn  
 245 250 255  
 Thr Leu Tyr Ile Leu Asn Val Ser Ala Val Tyr Phe Glu Gln Gly Asp  
 260 265 270  
 Tyr Asp Lys Cys Ile Ala Glu Cys Glu His Gly Ile Glu His Gly Arg  
 275 280 285  
 Glu Asn His Cys Asp Tyr Thr Ile Ile Ala Lys Leu Met Thr Arg Asn  
 290 295 300  
 Ala Leu Cys Leu Gln Arg Gln Arg Lys Tyr Glu Ala Ala Ile Asp Leu  
 305 310 315 320  
 Tyr Lys Arg Ala Leu Val Glu Trp Arg Asn Pro Asp Thr Leu Lys Lys  
 325 330 335  
 Leu Thr Glu Cys Glu Lys Glu His Gln Lys Ala Val Glu Glu Ala Tyr  
 340 345 350  
 Ile Asp Pro Glu Ile Ala Lys Gln Lys Lys Asp Glu Gly Asn Gln Tyr  
 355 360 365  
 Phe Lys Glu Asp Lys Phe Pro Glu Ala Val Ala Ala Tyr Thr Glu Ala

```

370          375          380
Ile Lys Arg Asn Pro Ala Glu His Thr Ser Tyr Ser Asn Arg Ala Ala
385          390          395          400
Ala Tyr Ile Lys Leu Gly Ala Phe Asn Asp Ala Leu Lys Asp Ala Glu
405          410          415
Lys Cys Ile Glu Leu Lys Pro Asp Phe Val Lys Gly Tyr Ala Arg Lys
420          425          430
Gly His Ala Tyr Phe Trp Thr Lys Gln Tyr Asn Arg Ala Leu Gln Ala
435          440          445
Tyr Asp Glu Gly Leu Lys Val Asp Pro Ser Asn Ala Asp Cys Lys Asp
450          455          460
Gly Arg Tyr Arg Thr Ile Met Lys Ile Gln Glu Met Ala Ser Gly Gln
465          470          475
Ser Ala Asp Gly Asp Glu Ala Ala Arg Arg Ala Met Asp Asp Pro Glu
485          490          495
Ile Ala Ala Ile Met Gln Asp Ser Tyr Met Gln Leu Val Leu Lys Glu
500          505          510
Met Gln Asn Asp Pro Thr Arg Ile Gln Glu Tyr Met Lys Asp Ser Gly
515          520          525
Ile Ser Ser Lys Ile Asn Lys Leu Ile Ser Ala Gly Ile Ile Arg Phe
530          535          540
Gly Gln
545

```

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:3:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 676 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ix) CARACTERÍSTICA:

- (A) NOMBRE / CLAVE: CDS
- (B) LOCALIZACIÓN: 26..550

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:3:

```

AATTCGGCAC GAGGCATTGT GCATA ATG GTC AAG TCC CAC TAC ATC TGC GCG
Met Val Lys Ser His Tyr Ile Cys Ala
550          555

```

52

GGC CGC CTG GTG CGC ATC CTG CGT GGC CCC CGC CAG GAC CGC GTT GGT Gly Arg Leu Val Arg Ile Leu Arg Gly Pro Arg Gln Asp Arg Val Gly 560 565 570	100
GTG ATC GTC GAC ATT GTC GAC GCG AAC CGC GTG CTG GTG GAG AAC CCG Val Ile Val Asp Ile Val Asp Ala Asn Arg Val Leu Val Glu Asn Pro 575 580 585	148
GAG GAC GCG AAG ATG TGG CGC CAC GTG CAG AAC CTG AAG AAC GTG GAG Glu Asp Ala Lys Met Trp Arg His Val Gln Asn Leu Lys Asn Val Glu 590 595 600	196
CCG CTG AAG TAC TGC GTG AGC GTC AGC CGC AAC TGC AGC GCG AAG GCG Pro Leu Lys Tyr Cys Val Ser Val Ser Arg Asn Cys Ser Ala Lys Ala 605 610 615	244
CTG AAG GAT GCG CTG GCC TCG TCG AAG GCG CTG GAG AAG TAC GCG AAG Leu Lys Asp Ala Leu Ala Ser Ser Lys Ala Leu Glu Lys Tyr Ala Lys 620 625 630 635	292
ACG CGC ACT GCT GCG CGC GTG GAG GCG AAG AAG GCG TGC GCC GCG TCG Thr Arg Thr Ala Ala Arg Val Glu Ala Lys Lys Ala Cys Ala Ala Ser 640 645 650	340
ACG GAC TTC GAG CGC TAC CAG CTG CGC GTT GCG CGC CGT TCT CGC GCG Thr Asp Phe Glu Arg Tyr Gln Leu Arg Val Ala Arg Arg Ser Arg Ala 655 660 665	388
CAC TGG GCG CGC AAG GTG TTC GAC GAG AAG GAC GCG AAG ACG CCC GTG His Trp Ala Arg Lys Val Phe Asp Glu Lys Asp Ala Lys Thr Pro Val 670 675 680	436
TCG TGG CAC AAG GTT GCG CTG AAG AAG ATG CAG AAG AAG GCC GCA AAG Ser Trp His Lys Val Ala Leu Lys Lys Met Gln Lys Lys Ala Ala Lys 685 690 695	484
ATG GAC TCG ACC GAG GGC GCT AAG AGG CGC ATG CAG AAG GCG ATC GCT Met Asp Ser Thr Glu Gly Ala Lys Arg Arg Met Gln Lys Ala Ile Ala 700 705 710 715	532
GCC CGC AAG GCG AAA AAG TAAGGCCATA CCCTCACTTC GCTTGTTTCG Ala Arg Lys Ala Lys Lys 720	580
TGATTTTTCG TGGGAGTCGG TGGCCCTACC AGCGGTCTTT CATTGGCTTA TTTCTATCCG	640
GTCTGAAAGA GGTACAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAA	676

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:4:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 175 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:4:

ES 2 373 878 T3

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

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:5:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 2040 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ix) CARACTERÍSTICA:

- (A) NOMBRE / CLAVE: CDS
- (B) LOCALIZACIÓN: 62..2029

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:5:

ES 2 373 878 T3

CGCGGTGGCG GCCGCTCTAG AACTAGTGGG TCCCCCGGGC TGCAGGAATT CGGCACGAGA	60
G AGC CTG ACG GAC CCG GCG GTG CTG GGC GAG GAG ACT CAC CTG CGC	106
Ser Leu Thr Asp Pro Ala Val Leu Gly Glu Thr His Leu Arg	
180 185 190	
GTC CGC GTG GTG CCG GAC AAG GCG AAC AAG ACG CTG ACG GTG GAG GAT	154
Val Arg Val Val Pro Asp Lys Ala Asn Lys Thr Leu Thr Val Glu Asp	
195 200 205	
AAC GGC ATC GGC ATG ACC AAG GCG GAC CTC GTG AAC AAT CTG GGC ACG	202
Asn Gly Ile Gly Met Thr Lys Ala Asp Leu Val Asn Asn Leu Gly Thr	
210 215 220	
ATC GCG CGC TCC GGC ACG AAG GCT TTC ATG GAG GCA CTG GAG GCC GGC	250
Ile Ala Arg Ser Gly Thr Lys Ala Phe Met Glu Ala Leu Glu Ala Gly	
225 230 235	
GGC GAC ATG AGC ATG ATC GGC CAG TTC GGT GTC GGC TTC TAC TCC GCG	298
Gly Asp Met Ser Met Ile Gly Gln Phe Gly Val Gly Phe Tyr Ser Ala	
240 245 250	
TAC CTT GTG GCG GAC CGC GTG ACG GTG GTG TCG AAG AAC AAC TCG GAC	346
Tyr Leu Val Ala Asp Arg Val Thr Val Val Ser Lys Asn Asn Ser Asp	
255 260 265 270	
GAG GCG TAC TGG GAA TCG TCT GCG GGG GGC ACG TTC ACC ATC ACG AGC	394
Glu Ala Tyr Trp Glu Ser Ser Ala Gly Gly Thr Phe Thr Ile Thr Ser	
275 280 285	
GTG CAG GAG TCG GAC ATG AAG CGC GGC ACG AGT ACA ACG CTG CAC CTA	442
Val Gln Glu Ser Asp Met Lys Arg Gly Thr Ser Thr Thr Leu His Leu	
290 295 300	
AAG GAG GAC CAG CAG GAG TAC CTG GAG GAG CGC CGG GTG AAG GAG CTG	490
Lys Glu Asp Gln Gln Glu Tyr Leu Glu Glu Arg Arg Val Lys Glu Leu	
305 310 315	
ATC AAG AAG CAC TCC GAG TTC ATC GGC TAC GAC ATC GAG CTG ATG GTG	538
Ile Lys Lys His Ser Glu Phe Ile Gly Tyr Asp Ile Glu Leu Met Val	
320 325 330	
GAG AAG ACG GCG GAG AAG GAG GTG ACG GAC GAG GAC GAG GAG GAC	586
Glu Lys Thr Ala Glu Lys Glu Val Thr Asp Glu Asp Glu Glu Glu Asp	
335 340 345 350	
GAG TCG AAG AAG AAG TCC TGC GGG GAC GAG GGC GAG CCG AAG GTG GAG	634
Glu Ser Lys Lys Lys Ser Cys Gly Asp Glu Gly Glu Pro Lys Val Glu	
355 360 365	
GAG GTG ACG GAG GGC GGC GAG GAC AAG AAG AAG AAG ACG AAG AAG GTG	682
Glu Val Thr Glu Gly Gly Glu Asp Lys Lys Lys Lys Thr Lys Lys Val	
370 375 380	



ES 2 373 878 T3

AAG GAG GTG AAG AAG ACG TAC GAG GTC AAG AAC AAG CAC AAG CCG CTC	730
Lys Glu Val Lys Lys Thr Tyr Glu Val Lys Asn Lys His Lys Pro Leu	
385 390 395	
TGG ACG CGC GAC ACG AAG GAC GTG ACG AAG GAG GAG TAC GCG GCC TTC	778
Trp Thr Arg Asp Thr Lys Asp Val Thr Lys Glu Glu Tyr Ala Ala Phe	
400 405 410	
TAC AAG GCC ATC TCC AAC GAC TGG GAG GAC ACG GCG GCG ACG AAG CAC	826
Tyr Lys Ala Ile Ser Asn Asp Trp Glu Asp Thr Ala Ala Thr Lys His	
415 420 425 430	
TTC TCG GTG GAG GGC CAG CTG GAG TTC CGC GCG ATC GCG TTC GTG CCG	874
Phe Ser Val Glu Gly Gln Leu Glu Phe Arg Ala Ile Ala Phe Val Pro	
435 440 445	
AAG CGC GCG CCG TTC GAC ATG TTC GAG CCG AAC AAG AAG CGC AAC AAC	922
Lys Arg Ala Pro Phe Asp Met Phe Glu Pro Asn Lys Lys Arg Asn Asn	
450 455 460	
ATC AAG CTG TAC GTG CGC CGC GTG TTC ATC ATG GAC AAC TGC GAG GAC	970
Ile Lys Leu Tyr Val Arg Arg Val Phe Ile Met Asp Asn Cys Glu Asp	
465 470 475	
CTG TGC CCG GAC TGG CTC GGC TTC GTG AAG GGC GTC GTG GAC AGC GAG	1018
Leu Cys Pro Asp Trp Leu Gly Phe Val Lys Gly Val Val Asp Ser Glu	
480 485 490	
GAC CTG CCG CTG AAC ATC TCG CGC GAG AAC CTG CAG CAG AAC AAG ATC	1066
Asp Leu Pro Leu Asn Ile Ser Arg Glu Asn Leu Gln Gln Asn Lys Ile	
495 500 505 510	
CTG AAG GTG ATC CGC AAG AAC ATC GTG AAG AAG TGC CTG GAG CTG TTC	1114
Leu Lys Val Ile Arg Lys Asn Ile Val Lys Lys Cys Leu Glu Leu Phe	
515 520 525	
GAA GAG ATA GCG GAG AAC AAG GAG GAC TAC AAG CAG TTC TAC GAG CAG	1162
Glu Glu Ile Ala Glu Asn Lys Glu Asp Tyr Lys Gln Phe Tyr Glu Gln	
530 535 540	
TTC GGC AAG AAC ATC AAG CTG GGC ATC CAC GAG GAC ACG GCG AAC CGC	1210
Phe Gly Lys Asn Ile Lys Leu Gly Ile His Glu Asp Thr Ala Asn Arg	
545 550 555	
AAG AAG CTG ATG GAG TTG CTG CGC TTC TAC AGC ACC GAG TCG GGG GAG	1258
Lys Lys Leu Met Glu Leu Leu Arg Phe Tyr Ser Thr Glu Ser Gly Glu	
560 565 570	
GAG ATG ACG ACA CTG AAG GAC TAC GTG ACG CGC ATG AAG CCG GAG CAG	1306
Glu Met Thr Thr Leu Lys Asp Tyr Val Thr Arg Met Lys Pro Glu Gln	
575 580 585 590	
AAG TCG ATC TAC TAC ATC ACT GGC GAC AGC AAG AAG AAG CTG GAG TCG	1354
Lys Ser Ile Tyr Tyr Ile Thr Gly Asp Ser Lys Lys Lys Leu Glu Ser	
595 600 605	

ES 2 373 878 T3

TCG CCG TTC ATC GAG AAG GCG AGA CGC TGC GGG CTC GAG GTG CTG TTC	1402
Ser Pro Phe Ile Glu Lys Ala Arg Arg Cys Gly Leu Glu Val Leu Phe	
610 615 620	
ATG ACG GAG CCG ATC GAC GAG TAC GTG ATG CAG CAG GTG AAG GAC TTC	1450
Met Thr Glu Pro Ile Asp Glu Tyr Val Met Gln Gln Val Lys Asp Phe	
625 630 635	
GAG GAC AAG AAG TTC GCG TGC CTG ACG AAG GAA GGC GTG CAC TTC GAG	1498
Glu Asp Lys Lys Phe Ala Cys Leu Thr Lys Glu Gly Val His Phe Glu	
640 645 650	
GAG TCC GAG GAG GAG AAG AAG CAG CGC GAG GAG AAG AAG GCG GCG TGC	1546
Glu Ser Glu Glu Glu Lys Lys Gln Arg Glu Glu Lys Lys Ala Ala Cys	
655 660 665 670	
GAG AAG CTG TGC AAG ACG ATG AAG GAG GTG CTG GGC GAC AAG GTG GAG	1594
Glu Lys Leu Cys Lys Thr Met Lys Glu Val Leu Gly Asp Lys Val Glu	
675 680 685	
AAG GTG ACC GTG TCG GAG CGC CTG TTG ACG TCG CCG TGC ATC CTG GTG	1642
Lys Val Thr Val Ser Glu Arg Leu Leu Thr Ser Pro Cys Ile Leu Val	
690 695 700	
ACG TCG GAG TTT GGG TGG TCG GCG CAC ATG GAA CAG ATC ATG CGC AAC	1690
Thr Ser Glu Phe Gly Trp Ser Ala His Met Glu Gln Ile Met Arg Asn	
705 710 715	
CAG GCG CTG CGC GAC TCC AGC ATG GCG CAG TAC ATG GTG TCC AAG AAG	1738
Gln Ala Leu Arg Asp Ser Ser Met Ala Gln Tyr Met Val Ser Lys Lys	
720 725 730	
ACG ATG GAG GTG AAC CCC GAC CAC CCC ATC ATC AAG GAG CTG CGC CGC	1786
Thr Met Glu Val Asn Pro Asp His Pro Ile Ile Lys Glu Leu Arg Arg	
735 740 745 750	
CGC GTG GAG GCG GAC GAG AAC GAC AAG GCC GTG AAG GAC CTC GTC TTC	1834
Arg Val Glu Ala Asp Glu Asn Asp Lys Ala Val Lys Asp Leu Val Phe	
755 760 765	
CTG CTC TTC GAC ACG TCG CTG CTC ACG TCC GGC TTC CAG CTG GAT GAC	1882
Leu Leu Phe Asp Thr Ser Leu Leu Thr Ser Gly Phe Gln Leu Asp Asp	
770 775 780	
CCC ACC GGC TAC GCC GAG CGC ATC AAC CGC ATG ATC AAG CTC GGC CTG	1930
Pro Thr Gly Tyr Ala Glu Arg Ile Asn Arg Met Ile Lys Leu Gly Leu	
785 790 795	
TCG CTC GAC GAG GAG GAG GAG GAG GTC GCC GAG GCG CCG CCG GCC GAG	1978
Ser Leu Asp Glu Glu Glu Glu Glu Val Ala Glu Ala Pro Pro Ala Glu	
800 805 810	
GCA GCC CCC GCG GAG GTC ACC GCC GGC ACC TCC AGC ATG GAG CAG GTG	2026
Ala Ala Pro Ala Glu Val Thr Ala Gly Thr Ser Ser Met Glu Gln Val	
815 820 825 830	
GAC TGAGCCGTA A	2040
Asp	

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:6:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

5

(A) LONGITUD: 656 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:6:

Ser Leu Thr Asp Pro Ala Val Leu Gly Glu Glu Thr His Leu Arg Val  
 1 5 10 15

Arg Val Val Pro Asp Lys Ala Asn Lys Thr Leu Thr Val Glu Asp Asn  
 20 25 30

Gly Ile Gly Met Thr Lys Ala Asp Leu Val Asn Asn Leu Gly Thr Ile  
 35 40 45

Ala Arg Ser Gly Thr Lys Ala Phe Met Glu Ala Leu Glu Ala Gly Gly  
 50 55 60

Asp Met Ser Met Ile Gly Gln Phe Gly Val Gly Phe Tyr Ser Ala Tyr  
 65 70 75 80

Leu Val Ala Asp Arg Val Thr Val Val Ser Lys Asn Asn Ser Asp Glu  
 85 90 95

Ala Tyr Trp Glu Ser Ser Ala Gly Gly Thr Phe Thr Ile Thr Ser Val  
 100 105 110

Gln Glu Ser Asp Met Lys Arg Gly Thr Ser Thr Thr Leu His Leu Lys  
 115 120 125

Glu Asp Gln Gln Glu Tyr Leu Glu Glu Arg Arg Val Lys Glu Leu Ile  
 130 135 140

Lys Lys His Ser Glu Phe Ile Gly Tyr Asp Ile Glu Leu Met Val Glu  
 145 150 155 160

Lys Thr Ala Glu Lys Glu Val Thr Asp Glu Asp Glu Glu Glu Asp Glu  
 165 170 175

Ser Lys Lys Lys Ser Cys Gly Asp Glu Gly Glu Pro Lys Val Glu Glu  
 180 185 190

Val Thr Glu Gly Gly Glu Asp Lys Lys Lys Lys Thr Lys Lys Val Lys

ES 2 373 878 T3

	195					200						205			
Glu	Val	Lys	Lys	Thr	Tyr	Glu	Val	Lys	Asn	Lys	His	Lys	Pro	Leu	Trp
	210					215					220				
Thr	Arg	Asp	Thr	Lys	Asp	Val	Thr	Lys	Glu	Glu	Tyr	Ala	Ala	Phe	Tyr
	225				230						235				240
Lys	Ala	Ile	Ser	Asn	Asp	Trp	Glu	Asp	Thr	Ala	Ala	Thr	Lys	His	Phe
				245					250					255	
Ser	Val	Glu	Gly	Gln	Leu	Glu	Phe	Arg	Ala	Ile	Ala	Phe	Val	Pro	Lys
			260					265					270		
Arg	Ala	Pro	Phe	Asp	Met	Phe	Glu	Pro	Asn	Lys	Lys	Arg	Asn	Asn	Ile
		275					280						285		
Lys	Leu	Tyr	Val	Arg	Arg	Val	Phe	Ile	Met	Asp	Asn	Cys	Glu	Asp	Leu
	290					295					300				
Cys	Pro	Asp	Trp	Leu	Gly	Phe	Val	Lys	Gly	Val	Val	Asp	Ser	Glu	Asp
	305				310					315					320
Leu	Pro	Leu	Asn	Ile	Ser	Arg	Glu	Asn	Leu	Gln	Gln	Asn	Lys	Ile	Leu
			325						330					335	
Lys	Val	Ile	Arg	Lys	Asn	Ile	Val	Lys	Lys	Cys	Leu	Glu	Leu	Phe	Glu
			340					345						350	
Glu	Ile	Ala	Glu	Asn	Lys	Glu	Asp	Tyr	Lys	Gln	Phe	Tyr	Glu	Gln	Phe
		355					360					365			
Gly	Lys	Asn	Ile	Lys	Leu	Gly	Ile	His	Glu	Asp	Thr	Ala	Asn	Arg	Lys
	370					375					380				
Lys	Leu	Met	Glu	Leu	Leu	Arg	Phe	Tyr	Ser	Thr	Glu	Ser	Gly	Glu	Glu
	385				390					395					400
Met	Thr	Thr	Leu	Lys	Asp	Tyr	Val	Thr	Arg	Met	Lys	Pro	Glu	Gln	Lys
			405						410					415	
Ser	Ile	Tyr	Tyr	Ile	Thr	Gly	Asp	Ser	Lys	Lys	Lys	Leu	Glu	Ser	Ser
			420					425					430		
Pro	Phe	Ile	Glu	Lys	Ala	Arg	Arg	Cys	Gly	Leu	Glu	Val	Leu	Phe	Met
		435					440					445			
Thr	Glu	Pro	Ile	Asp	Glu	Tyr	Val	Met	Gln	Gln	Val	Lys	Asp	Phe	Glu
	450					455					460				
Asp	Lys	Lys	Phe	Ala	Cys	Leu	Thr	Lys	Glu	Gly	Val	His	Phe	Glu	Glu
	465				470					475					480
Ser	Glu	Glu	Glu	Lys	Lys	Gln	Arg	Glu	Glu	Lys	Lys	Ala	Ala	Cys	Glu
				485					490					495	

Lys Leu Cys Lys Thr Met Lys Glu Val Leu Gly Asp Lys Val Glu Lys  
 500 505 510

Val Thr Val Ser Glu Arg Leu Leu Thr Ser Pro Cys Ile Leu Val Thr  
 515 520 525

Ser Glu Phe Gly Trp Ser Ala His Met Glu Gln Ile Met Arg Asn Gln  
 530 535 540

Ala Leu Arg Asp Ser Ser Met Ala Gln Tyr Met Val Ser Lys Lys Thr  
 545 550 555 560

Met Glu Val Asn Pro Asp His Pro Ile Ile Lys Glu Leu Arg Arg Arg  
 565 570 575

Val Glu Ala Asp Glu Asn Asp Lys Ala Val Lys Asp Leu Val Phe Leu  
 580 585 590

Leu Phe Asp Thr Ser Leu Leu Thr Ser Gly Phe Gln Leu Asp Asp Pro  
 595 600 605

Thr Gly Tyr Ala Glu Arg Ile Asn Arg Met Ile Lys Leu Gly Leu Ser  
 610 615 620

Leu Asp Glu Glu Glu Glu Glu Val Ala Glu Ala Pro Pro Ala Glu Ala  
 625 630 635 640

Ala Pro Ala Glu Val Thr Ala Gly Thr Ser Ser Met Glu Gln Val Asp  
 645 650 655

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:7:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

5

- (A) LONGITUD: 1771 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ix) CARACTERÍSTICA:

10

- (A) NOMBRE / CLAVE: CDS
- (B) LOCALIZACIÓN: 1..1698

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:7:

CAG	GCC	CGC	GTC	CAG	GCC	CTC	GAG	GAG	GCA	GCG	CGT	CTC	CGC	GCG	GAG	48
Gln	Ala	Arg	Val	Gln	Ala	Leu	Glu	Glu	Ala	Ala	Arg	Leu	Arg	Ala	Glu	
1				5					10					15		
CTG	GAG	GCG	GCC	GAG	GAG	GCG	GCC	CGC	CTG	GAT	GTC	ATG	CAT	GCG	GCC	96
Leu	Glu	Ala	Ala	Glu	Glu	Ala	Ala	Arg	Leu	Asp	Val	Met	His	Ala	Ala	
			20					25					30			

ES 2 373 878 T3

GAG CAG GCC CGT GTC CAG GCC CTC GAG GAG GCA GCG CGT CTC CGC GCG	144
Glu Gln Ala Arg Val Gln Ala Leu Glu Glu Ala Ala Arg Leu Arg Ala	
35 40 45	
GAG CTG GAG GAG GCC GAG GAG GCG GCC CGC CTG GAT GTC ATG CAT GCG	192
Glu Leu Glu Glu Ala Glu Glu Ala Ala Arg Leu Asp Val Met His Ala	
50 55 60	
GCC GAG CAG GCC CGC GTC CAG GCC CTC GAG GAG GCA GCG CGT CTC CGC	240
Ala Glu Gln Ala Arg Val Gln Ala Leu Glu Glu Ala Ala Arg Leu Arg	
65 70 75 80	
GCG GAG CTG GAG GCT GCC GAG GAG GCG GCG CGC CTG GAG GCC ATG CAC	288
Ala Glu Leu Glu Ala Ala Glu Glu Ala Ala Arg Leu Glu Ala Met His	
85 90 95	
GAG GCC GAG CAG GCC CGC TCC CAG GCC CTC GAG GAG GCA GCG CGT CTC	336
Glu Ala Glu Gln Ala Arg Ser Gln Ala Leu Glu Glu Ala Ala Arg Leu	
100 105 110	
CGC GCG GAG CTG GAG GAA GCC GAG GAG GCG GCC CGC CTG GAT GTC ATG	384
Arg Ala Glu Leu Glu Glu Ala Glu Glu Ala Ala Arg Leu Asp Val Met	
115 120 125	
CAT GCG GCC GAG CAG GCC CGC GTC CAG GCC CTC GAG GAG GCA GCG CGT	432
His Ala Ala Glu Gln Ala Arg Val Gln Ala Leu Glu Glu Ala Ala Arg	
130 135 140	
CTC CGC GCG GAG CTG GAG GAG GCC GAG GAG GCG GCC CGC CTG GAG GCC	480
Leu Arg Ala Glu Leu Glu Glu Ala Glu Glu Ala Ala Arg Leu Glu Ala	
145 150 155 160	
ATG CAC GAG GCC GAG CAG GCC CGC TCC CAG GCC CTC GAG GAG GCA GCG	528
Met His Glu Ala Glu Gln Ala Arg Ser Gln Ala Leu Glu Glu Ala Ala	
165 170 175	
CGT CTC CGC GCG GAG CTG GAG GCG GCC GAG GAG GCG GCC CGC CTG GAT	576
Arg Leu Arg Ala Glu Leu Glu Ala Ala Glu Glu Ala Ala Arg Leu Asp	
180 185 190	
GTC ATG CAC GAG GCC GAG CAG GCC CGT GTC CAG GCC CTC GAG GAG GCG	624
Val Met His Glu Ala Glu Gln Ala Arg Val Gln Ala Leu Glu Glu Ala	
195 200 205	
GCG CGC CTG GAT GTC ATG CAC GAG GCC GAG CAG GCC CGC GTC CAG GCC	672
Ala Arg Leu Asp Val Met His Glu Ala Glu Gln Ala Arg Val Gln Ala	
210 215 220	
CTC GAG GAG GCA GCG CGT CTC CGC GCG GAG CTG GAG GCG GCC GAG GAG	720
Leu Glu Glu Ala Ala Arg Leu Arg Ala Glu Leu Glu Ala Ala Glu Glu	
225 230 235 240	
GCG GCC CGC CTG GAT GTC ATG CAC GAG GCC GAG CAG GCC CGC GTC CAG	768
Ala Ala Arg Leu Asp Val Met His Glu Ala Glu Gln Ala Arg Val Gln	

ES 2 373 878 T3

				245					250					255		
GCC	CTC	GAG	GAG	GCA	GCG	CGT	CTC	CGC	GCG	GAG	CTG	GAG	GCG	GCC	GAG	816
Ala	Leu	Glu	Glu	Ala	Ala	Arg	Leu	Arg	Ala	Glu	Leu	Glu	Ala	Ala	Glu	
				260					265					270		
GAG	GCG	GCC	CGC	CTG	GAT	GTC	ATG	CAC	GAG	GGC	GAG	CAG	GCC	CGT	GTC	864
Glu	Ala	Ala	Arg	Leu	Asp	Val	Met	His	Glu	Gly	Glu	Gln	Ala	Arg	Val	
				275					280					285		
CAG	GCC	CTC	GAG	GAG	GCG	GCC	CGC	CTG	GAG	GCC	ATG	CAC	GAG	GCC	GAG	912
Gln	Ala	Leu	Glu	Glu	Ala	Ala	Arg	Leu	Glu	Ala	Met	His	Glu	Ala	Glu	
				290					295					300		
CAG	GCC	CGC	TCC	CAG	GCC	CTC	GAG	GAG	GCA	GCG	CGT	CTC	TGC	GCG	GAG	960
Gln	Ala	Arg	Ser	Gln	Ala	Leu	Glu	Glu	Ala	Ala	Arg	Leu	Cys	Ala	Glu	
				305					310					315	320	
CTG	GAG	GCT	GAG	GAG	GAG	GAA	AAA	GAT	GAG	CGG	CCG	GCG	ACG	TCG	AGC	1008
Leu	Glu	Ala	Glu	Glu	Glu	Glu	Lys	Asp	Glu	Arg	Pro	Ala	Thr	Ser	Ser	
				325					330					335		
TAC	AGC	GAG	GAG	TGC	AAA	GGG	CGA	CTG	CTA	TCG	AGG	GCG	CGG	CCG	GAT	1056
Tyr	Ser	Glu	Glu	Cys	Lys	Gly	Arg	Leu	Leu	Ser	Arg	Ala	Arg	Pro	Asp	
				340					345					350		
CCG	CGG	AGG	CCG	CTG	CCG	CGG	CCG	TTC	ATT	GGG	ATG	TCA	CTG	TTG	GAG	1104
Pro	Arg	Arg	Pro	Leu	Pro	Arg	Pro	Phe	Ile	Gly	Met	Ser	Leu	Leu	Glu	
				355					360					365		
GAT	GTG	GAG	AAG	AGT	ATT	CTC	ATT	GTG	GAC	GGG	CTC	TAC	AGG	GAT	GGG	1152
Asp	Val	Glu	Lys	Ser	Ile	Leu	Ile	Val	Asp	Gly	Leu	Tyr	Arg	Asp	Gly	
				370					375					380		
CCG	GCG	TAC	CAG	ACG	GGC	ATC	CGC	CTC	GGG	GAT	GTC	CTC	TTG	CGT	ATC	1200
Pro	Ala	Tyr	Gln	Thr	Gly	Ile	Arg	Leu	Gly	Asp	Val	Leu	Leu	Arg	Ile	
				385					390					395	400	
GCG	GGG	GTT	TAC	GTG	GAT	TCA	ATA	GCG	AAG	GCG	AGG	CAG	GTG	GTC	GAT	1248
Ala	Gly	Val	Tyr	Val	Asp	Ser	Ile	Ala	Lys	Ala	Arg	Gln	Val	Val	Asp	
				405					410					415		
GCG	CGT	TGC	CGC	TGC	GGC	TGC	GTC	GTT	CCC	GTG	ACG	CTG	GCG	ACG	AAG	1296
Ala	Arg	Cys	Arg	Cys	Gly	Cys	Val	Val	Pro	Val	Thr	Leu	Ala	Thr	Lys	
				420					425					430		
ATG	AAC	CAG	CAG	TAC	AGC	GTG	GCT	CTG	TAT	ATC	ATG	ACG	GTG	GAT	CCG	1344
Met	Asn	Gln	Gln	Tyr	Ser	Val	Ala	Leu	Tyr	Ile	Met	Thr	Val	Asp	Pro	
				435					440					445		
CAG	CAC	AAC	GAC	AAG	CCC	TTT	TTT	TTT	GAT	GTG	CAC	ATC	CAC	CAC	CGC	1392
Gln	His	Asn	Asp	Lys	Pro	Phe	Phe	Phe	Asp	Val	His	Ile	His	His	Arg	
				450					455					460		
ATC	GAG	AGC	TCG	CAC	ATG	GGG	AAG	AAG	GCG	CAG	TGG	ATG	GAA	GTT	CTT	1440

ES 2 373 878 T3

Ile	Glu	Ser	Ser	His	Met	Gly	Lys	Lys	Ala	Gln	Trp	Met	Glu	Val	Leu	
465					470					475					480	
GAG	AGC	CCA	TCC	GTA	TCT	TCG	GCT	GCC	ACC	ACC	CCT	CTC	GTG	CCG	CTC	1488
Glu	Ser	Pro	Ser	Val	Ser	Ser	Ala	Ala	Thr	Thr	Pro	Leu	Val	Pro	Leu	
				485				490					495			
TTG	CGT	GAG	CCG	ACG	CCG	CGT	AGG	GGC	TCA	GAG	CTG	CAG	TCA	AGT	GCT	1536
Leu	Arg	Glu	Pro	Thr	Pro	Arg	Arg	Gly	Ser	Glu	Leu	Gln	Ser	Ser	Ala	
			500					505					510			
CGT	TCC	GCC	TTC	GTT	GCC	ACG	TCT	TAC	TTC	TCG	AGC	GCG	CGC	AGG	TCG	1584
Arg	Ser	Ala	Phe	Val	Ala	Thr	Ser	Tyr	Phe	Ser	Ser	Ala	Arg	Arg	Ser	
		515					520					525				
GTC	AGC	TCA	GAA	AGT	GAG	CGA	CCG	CGC	GGG	TCC	TCT	AGC	GTG	GCT	ATG	1632
Val	Ser	Ser	Glu	Ser	Glu	Ala	Pro	Arg	Gly	Ser	Ser	Ser	Val	Ala	Met	
		530				535					540					
GCG	GAG	GAG	GCG	ATC	GCG	CTG	GCG	CCG	CAA	GGG	TAT	ACC	CCA	CCC	AAC	1680
Ala	Glu	Glu	Ala	Ile	Ala	Leu	Ala	Pro	Gln	Gly	Tyr	Thr	Pro	Pro	Asn	
545				550					555						560	
CAA	GTG	CGC	GGC	CGT	AGT	TGACGTCTCT	GTGTGAGTGT	GTGTGCTCTCC								1728
Gln	Val	Arg	Gly	Arg	Ser											
				565												
GTCTCCTCC	TTTTTCGTCA	TGTGTTTTAT	TCATTTCTTT	TTC												1771

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:8:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 566 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:8:

Gln	Ala	Arg	Val	Gln	Ala	Leu	Glu	Glu	Ala	Ala	Arg	Leu	Arg	Ala	Glu
1				5					10					15	
Leu	Glu	Ala	Ala	Glu	Glu	Ala	Ala	Arg	Leu	Asp	Val	Met	His	Ala	Ala
			20					25					30		
Glu	Gln	Ala	Arg	Val	Gln	Ala	Leu	Glu	Glu	Ala	Ala	Arg	Leu	Arg	Ala
		35					40					45			
Glu	Leu	Glu	Glu	Ala	Glu	Glu	Ala	Ala	Arg	Leu	Asp	Val	Met	His	Ala
	50					55				60					
Ala	Glu	Gln	Ala	Arg	Val	Gln	Ala	Leu	Glu	Glu	Ala	Ala	Arg	Leu	Arg
65					70					75					80

5



ES 2 373 878 T3

Ala Glu Leu Glu Ala Ala Glu Glu Ala Ala Arg Leu Glu Ala Met His  
85 90 95

Glu Ala Glu Gln Ala Arg Ser Gln Ala Leu Glu Glu Ala Ala Arg Leu  
100 105 110

Arg Ala Glu Leu Glu Glu Ala Glu Glu Ala Ala Arg Leu Asp Val Met  
115 120 125

His Ala Ala Glu Gln Ala Arg Val Gln Ala Leu Glu Glu Ala Ala Arg  
130 135 140

Leu Arg Ala Glu Leu Glu Glu Ala Glu Glu Ala Ala Arg Leu Glu Ala  
145 150 155 160

Met His Glu Ala Glu Gln Ala Arg Ser Gln Ala Leu Glu Glu Ala Ala  
165 170 175

Arg Leu Arg Ala Glu Leu Glu Ala Ala Glu Glu Ala Ala Arg Leu Asp  
180 185 190

Val Met His Glu Ala Glu Gln Ala Arg Val Gln Ala Leu Glu Glu Ala  
195 200 205

Ala Arg Leu Asp Val Met His Glu Ala Glu Gln Ala Arg Val Gln Ala  
210 215 220

Leu Glu Glu Ala Ala Arg Leu Arg Ala Glu Leu Glu Ala Ala Glu Glu  
225 230 235 240

Ala Ala Arg Leu Asp Val Met His Glu Ala Glu Gln Ala Arg Val Gln  
245 250 255

Ala Leu Glu Glu Ala Ala Arg Leu Arg Ala Glu Leu Glu Ala Ala Glu  
260 265 270

Glu Ala Ala Arg Leu Asp Val Met His Glu Gly Glu Gln Ala Arg Val  
275 280 285

Gln Ala Leu Glu Glu Ala Ala Arg Leu Glu Ala Met His Glu Ala Glu  
290 295 300

Gln Ala Arg Ser Gln Ala Leu Glu Glu Ala Ala Arg Leu Cys Ala Glu  
305 310 315 320

Leu Glu Ala Glu Glu Glu Glu Lys Asp Glu Arg Pro Ala Thr Ser Ser  
325 330 335

Tyr Ser Glu Glu Cys Lys Gly Arg Leu Leu Ser Arg Ala Arg Pro Asp  
340 345 350

Pro Arg Arg Pro Leu Pro Arg Pro Phe Ile Gly Met Ser Leu Leu Glu  
355 360 365

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

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:9:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 1618 pares de bases

5

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: cDNA

(ix) CARACTERÍSTICA:

10

(A) NOMBRE / CLAVE: CDS

(B) LOCALIZACIÓN: 115..1323

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:9:

ES 2 373 878 T3

CCACTCTCTC	GGTCGTCTGT	CTCCCACGCG	CGCACGCAGT	TGATTTCCGC	CTTCTTAAAC	60
GCTCTCTTTT	TTTTTATTTT	TCACCTGACC	AACCGCACCA	CGTCGGCCTC	CATC ATG	117
					Met	
					1	
TCG CAG CAA GAC CGA GTT GCC CCA CAG GAC CAG GAC TCG TTC CTC GAC	165					
Ser Gln Gln Asp Arg Val Ala Pro Gln Asp Gln Asp Ser Phe Leu Asp						
5 10 15						
GAC CAG CCC GGC GTC CGC CCG ATC CCG TCC TTC GAT GAC ATG CCG TTG	213					
Asp Gln Pro Gly Val Arg Pro Ile Pro Ser Phe Asp Asp Met Pro Leu						
20 25 30						
CAC CAG AAC CTT CTG CGC GGC ATC TAC TCG TAC GGC TTC GAG AAA CCG	261					
His Gln Asn Leu Leu Arg Gly Ile Tyr Ser Tyr Gly Phe Glu Lys Pro						
35 40 45						
TCC AGC ATC CAG CAG CGC GCC ATC GCC CCC TTC ACG CGC GGC GGC GAC	309					
Ser Ser Ile Gln Gln Arg Ala Ile Ala Pro Phe Thr Arg Gly Gly Asp						
50 55 60 65						
ATC ATC GCG CAG GCG CAG TCC GGT ACC GGC AAG ACG GGC GCC TTC TCC	357					
Ile Ile Ala Gln Ala Gln Ser Gly Thr Gly Lys Thr Gly Ala Phe Ser						
70 75 80						
ATC GGC CTG CTG CAG CGC CTG GAC TTC CGC CAC AAC CTG ATC CAG GGC	405					
Ile Gly Leu Leu Gln Arg Leu Asp Phe Arg His Asn Leu Ile Gln Gly						
85 90 95						
CTC GTG CTC TCC CCG ACC CGC GAG CTG GCC CTG CAG ACG GCG GAG GTG	453					
Leu Val Leu Ser Pro Thr Arg Leu Ala Leu Gln Thr Ala Glu Val						
100 105 110						
ATC AGC CGC ATC GGC GAG TTC CTG TCG AAC AGC GCG AAG TTC TGT GAG	501					
Ile Ser Arg Ile Gly Glu Phe Leu Ser Asn Ser Ala Lys Phe Cys Glu						
115 120 125						
ACC TTT GTG GGT GGC ACG CGC GTG CAG GAT GAC CTG CGC AAG CTG CAG	549					
Thr Phe Val Gly Gly Thr Arg Val Gln Asp Asp Leu Arg Lys Leu Gln						
130 135 140 145						
GCT GGC GTC GTC GTC GCC GTG GGG ACG CCG GGC CGC GTG TCC GAC GTG	597					
Ala Gly Val Val Val Ala Val Gly Thr Pro Gly Arg Val Ser Asp Val						
150 155 160						
ATC AAG CGC GGC GCG CTG CGC ACC GAG TCC CTG CGC GTG CTG GTG CTC	645					
Ile Lys Arg Gly Ala Leu Arg Thr Glu Ser Leu Arg Val Leu Val Leu						
165 170 175						
GAC GAG GCT GAT GAG ATG CTG TCT CAG GGC TTC GCG GAT CAG ATT TAC	693					
Asp Glu Ala Asp Glu Met Leu Ser Gln Gly Phe Ala Asp Gln Ile Tyr						
180 185 190						

ES 2 373 878 T3

GAG ATC TTC CGC TTC CTG CCG AAG GAC ATC CAG GTC GCG CTC TTC TCC Glu Ile Phe Arg Phe Leu Pro Lys Asp Ile Gln Val Ala Leu Phe Ser 195 200 205	741
GCC ACG ATG CCG GAG GAG GTG CTG GAG CTG ACA AAG AAG TTC ATG CGC Ala Thr Met Pro Glu Glu Val Leu Glu Leu Thr Lys Lys Phe Met Arg 210 215 220 225	789
GAC CCC GTA CGC ATT CTC GTG AAG CGC GAG AGC CTG ACG CTG GAG GGC Asp Pro Val Arg Ile Leu Val Lys Arg Glu Ser Leu Thr Leu Glu Gly 230 235 240	837
ATC AAG CAG TTC TTC ATC GCC GTC GAG GAG GAG CAC AAG CTG GAC ACG Ile Lys Gln Phe Phe Ile Ala Val Glu Glu His Lys Leu Asp Thr 245 250 255	885
CTG ATG GAC CTG TAC GAG ACC GTG TCC ATC GCG CAG TCC GTC ATC TTC Leu Met Asp Leu Tyr Glu Thr Val Ser Ile Ala Gln Ser Val Ile Phe 260 265 270	933
GCC AAC ACC CGC CGC AAG GTG GAC TGG ATC GCC GAG AAG CTG AAT CAG Ala Asn Thr Arg Arg Lys Val Asp Trp Ile Ala Glu Lys Leu Asn Gln 275 280 285	981
AGC AAC CAC ACC GTC AGC AGC ATG CAC GCC GAG ATG CCC AAG AGC GAC Ser Asn His Thr Val Ser Ser Met His Ala Glu Met Pro Lys Ser Asp 290 295 300 305	1029
CGC GAG CGC GTC ATG AAC ACC TTC CGC AGC GGC AGC TCC CGC GTG CTC Arg Glu Arg Val Met Asn Thr Phe Arg Ser Gly Ser Ser Arg Val Leu 310 315 320	1077
GTA ACG ACC GAC CTC GTG GCC CGC GGC ATC GAC GTG CAC CAC GTG AAC Val Thr Thr Asp Leu Val Ala Arg Gly Ile Asp Val His His Val Asn 325 330 335	1125
ATC GTC ATC AAC TTC GAC CTG CCG ACG AAC AAG GAG AAC TAC CTG CAC Ile Val Ile Asn Phe Asp Leu Pro Thr Asn Lys Glu Asn Tyr Leu His 340 345 350	1173
CGC ATT GGC CGC GGC GGC CGC TAC GGC GTA AAG GGT GTT GCC ATC AAC Arg Ile Gly Arg Gly Gly Arg Tyr Gly Val Lys Gly Val Ala Ile Asn 355 360 365	1221
TTC GTG ACG GAG AAA GAC GTG GAG CTG CTG CAC GAG ATC GAG GGG CAC Phe Val Thr Glu Lys Asp Val Glu Leu Leu His Glu Ile Glu Gly His 370 375 380 385	1269
TAC CAC ACG CAG ATC GAT GAG CTC CCG GTG GAC TTT GCC GCC TAC CTC Tyr His Thr Gln Ile Asp Glu Leu Pro Val Asp Phe Ala Ala Tyr Leu 390 395 400	1317
GGC GAG TGA GCGGGCCCT GCCCCCTTC CCTGCCCCC TCTCGCGACG Gly Glu	1366
AGAGAACGCA CATCGTAACA CAGCCACGCG AACGATAGTA AGGGCGTGCG GCGGCGTTCC	1426
CCTCCTCTG CCAGCGGCC CCCTCCGAG CGCTTCTCTT TTGAGAGGGG GGCAGGGGA	1486
GGCGCTGCGC CTGGCTGGAT GTGTGCTTGA GCTTGCAATC CGTCAAGCAA GTGCTTTGTT	1546
TTAATTATGC GCGCCGTTTT GTTGCTCGTC CCTTTCGTTG GTGTTTTTTC GGCCGAAACG	1606
GCGTTTAAAG CA	1618

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:10:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 403 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGÍA: lineal

5

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:10:

```

Met Ser Gln Gln Asp Arg Val Ala Pro Gln Asp Gln Asp Ser Phe Leu
 1                               5 10 15
Asp Asp Gln Pro Gly Val Arg Pro Ile Pro Ser Phe Asp Asp Met Pro
 20 25 30
Leu His Gln Asn Leu Leu Arg Gly Ile Tyr Ser Tyr Gly Phe Glu Lys
 35 40 45
Pro Ser Ser Ile Gln Gln Arg Ala Ile Ala Pro Phe Thr Arg Gly Gly
 50 55 60
Asp Ile Ile Ala Gln Ala Gln Ser Gly Thr Gly Lys Thr Gly Ala Phe
 65 70 75 80
Ser Ile Gly Leu Leu Gln Arg Leu Asp Phe Arg His Asn Leu Ile Gln
 85 90 95
Gly Leu Val Leu Ser Pro Thr Arg Glu Leu Ala Leu Gln Thr Ala Glu
 100 105 110
Val Ile Ser Arg Ile Gly Glu Phe Leu Ser Asn Ser Ala Lys Phe Cys
 115 120 125
Glu Thr Phe Val Gly Gly Thr Arg Val Gln Asp Asp Leu Arg Lys Leu
 130 135 140
Gln Ala Gly Val Val Val Ala Val Gly Thr Pro Gly Arg Val Ser Asp
 145 150 155 160
Val Ile Lys Arg Gly Ala Leu Arg Thr Glu Ser Leu Arg Val Leu Val

```

ES 2 373 878 T3

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

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:11:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 12 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (C) CADENA:
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ix) CARACTERÍSTICA:

- (A) NOMBRE / CLAVE: Sitio modificado
- (B) LOCALIZACIÓN: 6

(D) INFORMACIÓN ADICIONAL: /nota= "Cuando Xaa es o bien un resto Leu o un resto Lys"

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:11:

5

10

**Xaa Gln Xaa Pro Gln Xaa Val Phe Asp Glu Xaa Xaa**  
**1 5 10**

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:12:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 26 pares de bases

5 (B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ix) CARACTERÍSTICA:

(A) NOMBRE / CLAVE: -

10 (B) LOCALIZACIÓN: 11

(D) INFORMACIÓN ADICIONAL: /nota= "Cuando n es inosina"

(ix) CARACTERÍSTICA:

(A) NOMBRE / CLAVE: -

15 (B) LOCALIZACIÓN: 17

(D) INFORMACIÓN ADICIONAL: /nota= "Cuando n es inosina"

(ix) CARACTERÍSTICA:

(A) NOMBRE / CLAVE: -

20 (B) LOCALIZACIÓN: 20

(D) INFORMACIÓN ADICIONAL: /nota= "Cuando n es inosina"

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:12:

GGAATTCCCC NCAGCTNGTN TTCGAC 26

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:13:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 5 aminoácidos

25 (B) TIPO: aminoácido

(C) CADENA:

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:13:

**Lys Val Phe Asp Glu**  
**1 5**

30 (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:14:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 30 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:14:

GGATCCATGG TCAAGTCCCA CTACATCTGC 30

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:15:

5

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA :

(A) LONGITUD: 33 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

10

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:15:

GAATTCAGAC CGGATAGAAA TAAGCCAATG AAA 33

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:16:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 701 aminoácidos

15

(B) TIPO: aminoácido

(C) CADENA:

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:16:

Met Thr Glu Thr Phe Ala Phe Gln Ala Glu Ile Asn Gln Leu Met Ser  
1 5 10 15

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



ES 2 373 878 T3

	20						25					30			
Val	Ile	Ser	Asn	Ala	Ser	Asp	Ala	Cys	Asp	Lys	Ile	Arg	Tyr	Gln	Ser
	35						40					45			
Leu	Thr	Asp	Pro	Ala	Val	Leu	Gly	Asp	Ala	Thr	Arg	Leu	Cys	Val	Arg
	50					55					60				
Val	Val	Pro	Asp	Lys	Glu	Asn	Lys	Thr	Leu	Thr	Val	Glu	Asp	Asn	Gly
65					70					75					80
Ile	Gly	Met	Thr	Lys	Ala	Asp	Leu	Val	Asn	Asn	Leu	Gly	Thr	Ile	Ala
				85					90					95	
Arg	Ser	Gly	Thr	Lys	Ala	Phe	Met	Glu	Ala	Leu	Glu	Ala	Gly	Ala	Asp
			100					105						110	
Met	Ser	Met	Ile	Gly	Gln	Phe	Gly	Val	Gly	Phe	Tyr	Ser	Ala	Tyr	Leu
		115					120						125		
Val	Ala	Asp	Arg	Val	Thr	Val	Thr	Ser	Lys	Asn	Asn	Ser	Asp	Glu	Val
	130					135					140				
Tyr	Val	Trp	Glu	Ser	Ser	Ala	Gly	Gly	Thr	Phe	Thr	Ile	Thr	Ser	Ala
145					150					155					160
Pro	Glu	Ser	Asp	Met	Lys	Leu	Pro	Ala	Arg	Ile	Thr	Leu	His	Leu	Lys
				165					170						175
Glu	Asp	Gln	Leu	Glu	Tyr	Leu	Glu	Ala	Arg	Arg	Leu	Lys	Glu	Leu	Ile
			180					185					190		
Lys	Lys	His	Ser	Glu	Phe	Ile	Gly	Tyr	Asp	Ile	Glu	Leu	Met	Val	Glu
		195					200						205		
Lys	Thr	Thr	Glu	Lys	Glu	Val	Thr	Asp	Glu	Asp	Glu	Glu	Glu	Ala	Lys
	210					215					220				
Lys	Ala	Asp	Glu	Asp	Gly	Glu	Glu	Pro	Lys	Val	Glu	Glu	Val	Thr	Glu
225					230				235						240
Gly	Glu	Glu	Asp	Lys	Lys	Lys	Lys	Thr	Lys	Lys	Val	Lys	Glu	Val	Thr
				245				250							255
Lys	Glu	Tyr	Glu	Val	Gln	Asn	Lys	His	Lys	Pro	Leu	Trp	Thr	Arg	Asp
			260				265							270	
Pro	Lys	Asp	Val	Thr	Lys	Glu	Glu	Tyr	Ala	Ala	Phe	Tyr	Lys	Ala	Ile
	275						280						285		
Ser	Asn	Asp	Trp	Glu	Asp	Pro	Pro	Ala	Thr	Lys	His	Phe	Ser	Val	Glu
	290					295					300				
Gly	Gln	Leu	Glu	Phe	Arg	Ala	Ile	Met	Phe	Val	Pro	Lys	Arg	Ala	Pro
305					310					315					320

ES 2 373 878 T3

Phe Asp Met Leu Glu Pro Asn Lys Lys Arg Asn Asn Ile Lys Leu Tyr  
 325 330 335  
 Val Arg Arg Val Phe Ile Met Asp Asn Cys Glu Asp Leu Cys Pro Asp  
 340 345 350  
 Trp Leu Gly Phe Val Lys Gly Val Val Asp Ser Glu Asp Leu Pro Leu  
 355 360 365  
 Asn Ile Ser Arg Glu Asn Leu Gln Gln Asn Lys Ile Leu Lys Val Ile  
 370 375 380  
 Arg Lys Asn Ile Val Lys Lys Cys Leu Glu Met Phe Glu Glu Val Ala  
 385 390 395 400  
 Glu Asn Lys Glu Asp Tyr Lys Gln Phe Tyr Glu Gln Phe Gly Lys Asn  
 405 410 415  
 Ile Lys Leu Gly Ile His Glu Asp Thr Ala Asn Arg Lys Lys Leu Met  
 420 425 430  
 Glu Leu Leu Arg Phe Tyr Ser Thr Glu Ser Gly Glu Val Met Thr Thr  
 435 440 445  
 Leu Lys Asp Tyr Val Thr Arg Met Lys Ala Glu Gln Asn Ser Ile Tyr  
 450 455 460  
 Tyr Ile Thr Gly Asp Ser Lys Lys Lys Leu Glu Ser Ser Pro Phe Ile  
 465 470 475 480  
 Glu Gln Ala Lys Arg Arg Gly Phe Glu Val Leu Phe Met Thr Glu Pro  
 485 490 495  
 Tyr Asp Glu Tyr Val Met Gln Gln Val Lys Asp Phe Glu Asp Lys Lys  
 500 505 510  
 Phe Ala Cys Leu Thr Lys Glu Gly Val His Phe Glu Glu Ser Glu Glu  
 515 520 525  
 Glu Lys Lys Gln Arg Glu Glu Glu Lys Ala Thr Cys Glu Lys Leu Cys  
 530 535 540  
 Lys Thr Met Lys Glu Val Leu Gly Asp Lys Val Glu Lys Val Thr Val  
 545 550 555 560  
 Ser Glu Arg Leu Ser Thr Ser Pro Cys Ile Leu Val Thr Ser Glu Phe  
 565 570 575  
 Gly Trp Ser Ala His Met Glu Gln Met Met Arg Asn Gln Ala Leu Arg  
 580 585 590  
 Asp Ser Ser Met Ala Gln Tyr Met Met Ser Lys Lys Thr Met Glu Leu  
 595 600 605

Asn Pro Lys His Pro Ile Ile Lys Glu Leu Arg Arg Arg Val Glu Ala  
 610 615 620  
 Asp Glu Asn Asp Lys Ala Val Lys Asp Leu Val Phe Leu Leu Phe Asp  
 625 630 635 640  
 Thr Ser Leu Leu Thr Ser Gly Phe Gln Leu Glu Asp Pro Thr Tyr Ala  
 645 650 655  
 Glu Arg Ile Asn Arg Met Ile Lys Leu Gly Leu Ser Leu Asp Glu Glu  
 660 665 670  
 Glu Glu Glu Glu Ala Val Glu Ala Ala Val Ala Glu Thr Ala Pro Ala  
 675 680 685  
 Glu Val Thr Ala Gly Thr Ser Ser Met Glu Leu Val Asp  
 690 695 700

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:17:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 704 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (C) CADENA:
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

5

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:17:

Met Thr Glu Thr Phe Ala Phe Gln Ala Glu Ile Asn Gln Leu Met Ser  
 1 5 10 15  
 Leu Ile Ile Asn Thr Phe Tyr Ser Asn Lys Glu Ile Phe Leu Arg Glu  
 20 25 30  
 Leu Ile Ser Asn Ala Ser Asp Ala Cys Asp Lys Ile Arg Tyr Gln Ser  
 35 40 45  
 Leu Thr Asn Gln Ala Val Leu Gly Asp Glu Ser His Leu Arg Ile Arg  
 50 55 60  
 Val Val Pro Asp Lys Ala Asn Lys Thr Leu Thr Val Glu Asp Thr Gly  
 65 70 75 80  
 Ile Gly Met Thr Lys Ala Glu Leu Val Asn Asn Leu Gly Thr Ile Ala  
 85 90 95  
 Arg Ser Gly Thr Lys Ala Phe Met Glu Ala Leu Glu Ala Gly Gly Asp  
 100 105 110  
 Met Ser Met Ile Gly Gln Phe Gly Val Gly Phe Tyr Ser Ala Tyr Leu  
 115 120 125

ES 2 373 878 T3

Val Ala Asp Arg Val Thr Val Val Ser Lys Asn Asn Asp Asp Glu Ala  
 130 135 140  
 Tyr Thr Trp Glu Ser Ser Ala Gly Gly Thr Phe Thr Val Thr Pro Thr  
 145 150 155 160  
 Pro Asp Cys Asp Leu Lys Arg Gly Thr Arg Ile Val Leu His Leu Lys  
 165 170 175  
 Glu Asp Gln Gln Glu Tyr Leu Glu Glu Arg Arg Leu Lys Asp Leu Ile  
 180 185 190  
 Lys Lys His Ser Glu Phe Ile Gly Tyr Asp Ile Glu Leu Met Val Glu  
 195 200 205  
 Lys Ala Thr Glu Lys Glu Val Thr Asp Glu Asp Glu Asp Glu Ala Ala  
 210 215 220  
 Ala Thr Lys Asn Glu Glu Gly Glu Glu Pro Lys Val Glu Glu Val Lys  
 225 230 235 240  
 Asp Asp Ala Glu Glu Gly Glu Lys Lys Lys Lys Thr Lys Lys Val Lys  
 245 250 255  
 Glu Val Thr Gln Glu Phe Val Val Gln Asn Lys His Lys Pro Leu Trp  
 260 265 270  
 Thr Arg Asp Pro Lys Asp Val Thr Lys Glu Glu Tyr Ala Ala Phe Tyr  
 275 280 285  
 Lys Ala Ile Ser Asn Asp Trp Glu Glu Pro Leu Ser Thr Lys His Phe  
 290 295 300  
 Ser Val Glu Gly Gln Leu Glu Phe Arg Ala Ile Leu Phe Val Pro Lys  
 305 310 315 320  
 Arg Ala Pro Phe Asp Met Phe Glu Pro Ser Lys Lys Arg Asn Asn Ile  
 325 330 335  
 Lys Leu Tyr Val Arg Arg Val Phe Ile Met Asp Asn Cys Glu Asp Leu  
 340 345 350  
 Cys Pro Glu Trp Leu Ala Phe Val Arg Gly Val Val Asp Ser Glu Asp  
 355 360 365  
 Leu Pro Leu Asn Ile Ser Arg Glu Asn Leu Gln Gln Asn Lys Ile Leu  
 370 375 380  
 Lys Val Ile Arg Lys Asn Ile Val Lys Lys Ala Leu Glu Leu Phe Glu  
 385 390 395 400  
 Glu Ile Ala Glu Asn Lys Glu Asp Tyr Lys Lys Phe Tyr Glu Gln Phe  
 405 410 415

ES 2 373 878 T3

Gly Lys Asn Val Lys Leu Gly Ile His Glu Asp Ser Ala Asn Arg Lys  
 420 425 430

Lys Leu Met Glu Leu Leu Arg Phe His Ser Ser Glu Ser Gly Glu Asp  
 435 440 445

Met Thr Thr Leu Lys Asp Tyr Val Thr Arg Met Lys Glu Gly Gln Lys  
 450 455 460

Cys Ile Tyr Tyr Val Thr Gly Asp Ser Lys Lys Lys Leu Glu Thr Ser  
 465 470 475 480

Pro Phe Ile Glu Gln Ala Arg Arg Arg Gly Phe Glu Val Leu Phe Met  
 485 490 495

Thr Glu Pro Ile Asp Glu Tyr Val Met Gln Gln Val Lys Asp Phe Glu  
 500 505 510

Asp Lys Lys Phe Ala Cys Leu Thr Lys Glu Gly Val His Phe Glu Glu  
 515 520 525

Thr Glu Glu Glu Lys Lys Gln Arg Glu Glu Glu Lys Thr Ala Tyr Glu  
 530 535 540

Arg Leu Cys Lys Ala Met Lys Asp Val Leu Gly Asp Lys Val Glu Lys  
 545 550 555 560

Val Val Val Ser Glu Arg Leu Ala Thr Ser Pro Cys Ile Leu Val Thr  
 565 570 575

Ser Glu Phe Gly Trp Ser Ala His Met Glu Gln Ile Met Arg Asn Gln  
 580 585 590

Ala Leu Arg Asp Ser Ser Met Ser Ala Tyr Met Met Ser Lys Lys Thr  
 595 600 605

Met Glu Ile Asn Pro Ala His Pro Ile Val Lys Glu Leu Lys Arg Arg  
 610 615 620

Val Glu Ala Asp Glu Asn Asp Lys Ala Val Lys Asp Leu Val Tyr Leu  
 625 630 635 640

Leu Phe Asp Thr Ala Leu Leu Thr Ser Gly Phe Thr Leu Asp Asp Pro  
 645 650 655

Thr Ser Tyr Ala Glu Arg Ile His Arg Met Ile Lys Leu Gly Leu Ser  
 660 665 670

Leu Asp Asp Glu Asp Asn Gly Asn Glu Glu Ala Glu Pro Ala Ala Ala  
 675 680 685

Val Pro Ala Glu Pro Val Ala Gly Thr Ser Ser Met Glu Gln Val Asp  
 690 695 700

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:18:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 732 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (C) CADENA:
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:18:

ES 2 373 878 T3

Met Pro Glu Glu Thr Gln Thr Gln Asp Gln Pro Met Glu Glu Glu Glu  
1 5 10 15

Val Glu Thr Phe Ala Phe Gln Ala Glu Ile Ala Gln Leu Met Ser Leu  
20 25 30

Ile Ile Asn Thr Phe Tyr Ser Asn Lys Glu Ile Phe Leu Arg Glu Leu  
35 40 45

Ile Ser Asn Ser Ser Asp Ala Leu Asp Lys Ile Arg Tyr Glu Ser Leu  
50 55 60

Thr Asp Pro Ser Lys Leu Asp Ser Gly Lys Glu Leu His Ile Asn Leu  
65 70 75 80

Ile Pro Asn Lys Gln Asp Arg Ala Leu Thr Ile Val Asp Thr Gly Ile  
85 90 95

Gly Met Thr Lys Ala Asp Leu Ile Asn Asn Leu Gly Thr Ile Ala Lys  
100 105 110

Ser Gly Thr Lys Ala Phe Met Glu Ala Leu Gln Ala Gly Ala Asp Ile  
115 120 125

Ser Met Ile Gly Gln Phe Gly Val Gly Phe Tyr Ser Ala Tyr Leu Val  
130 135 140

Ala Glu Lys Val Thr Val Ile Thr Lys His Asn Asp Asp Glu Gln Tyr  
145 150 155 160

Ala Trp Glu Ser Ser Ala Gly Gly Ser Phe Thr Val Arg Thr Asp Thr  
165 170 175

Gly Glu Pro Met Gly Arg Gly Thr Lys Val Ile Leu His Leu Lys Glu  
180 185 190

Asp Gln Thr Glu Tyr Leu Glu Glu Arg Arg Ile Lys Glu Ile Val Lys  
195 200 205

Lys His Ser Gln Phe Ile Gly Tyr Pro Ile Thr Leu Phe Val Glu Lys  
210 215 220

ES 2 373 878 T3

Glu Arg Asp Lys Glu Val Ser Asp Asp Glu Ala Glu Glu Lys Glu Asp  
 225 230 235 240  
 Lys Glu Glu Glu Lys Glu Lys Glu Glu Lys Glu Ser Glu Asp Lys Pro  
 245 250 255  
 Glu Ile Glu Asp Val Gly Ser Asp Glu Glu Asp Glu Lys Lys Asp Gly  
 260 265 270  
 Asp Lys Lys Lys Lys Lys Lys Ile Lys Glu Lys Tyr Ile Asp Lys Glu  
 275 280 285  
 Glu Leu Asn Lys Thr Lys Pro Ile Trp Thr Arg Asn Pro Asp Asp Ile  
 290 295 300  
 Thr Asn Glu Glu Tyr Gly Glu Phe Tyr Lys Ser Leu Thr Asn Asp Trp  
 305 310 315 320  
 Glu Asp His Leu Ala Val Lys His Phe Ser Val Glu Gly Gln Leu Glu  
 325 330 335  
 Phe Arg Ala Leu Leu Phe Val Pro Arg Arg Ala Pro Phe Asp Leu Phe  
 340 345 350  
 Glu Asn Arg Lys Lys Lys Asn Asn Ile Lys Leu Tyr Val Arg Arg Val  
 355 360 365  
 Phe Ile Met Asp Asn Cys Glu Glu Leu Ile Pro Glu Tyr Leu Asn Phe  
 370 375 380  
 Ile Arg Gly Val Val Asp Ser Glu Asp Leu Pro Leu Asn Ile Ser Arg  
 385 390 395 400  
 Glu Met Leu Gln Gln Ser Lys Ile Leu Lys Val Ile Arg Lys Asn Leu  
 405 410 415  
 Val Lys Lys Cys Leu Glu Leu Phe Thr Glu Leu Ala Glu Asp Lys Glu  
 420 425 430  
 Asn Tyr Lys Lys Phe Tyr Glu Gln Phe Ser Lys Asn Ile Lys Leu Gly  
 435 440 445  
 Ile His Glu Asp Ser Gln Asn Arg Lys Lys Leu Ser Glu Leu Leu Arg  
 450 455 460  
 Tyr Tyr Thr Ser Ala Ser Gly Asp Glu Met Val Ser Leu Lys Asp Tyr  
 465 470 475 480  
 Cys Thr Arg Met Lys Glu Asn Gln Lys His Ile Tyr Tyr Ile Thr Gly  
 485 490 495  
 Glu Thr Lys Asp Gln Val Ala Asn Ser Ala Phe Val Glu Arg Leu Arg  
 500 505 510

ES 2 373 878 T3

Lys His Gly Leu Glu Val Ile Tyr Met Ile Glu Pro Ile Asp Glu Tyr  
 515 520 525

Cys Val Gln Gln Leu Lys Glu Phe Glu Gly Lys Thr Leu Val Ser Val  
 530 535 540

Thr Lys Glu Gly Leu Glu Leu Pro Glu Asp Glu Glu Glu Lys Lys Lys  
 545 550 555 560

Gln Glu Glu Lys Lys Thr Lys Phe Glu Asn Leu Cys Lys Ile Met Lys  
 565 570 575

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

Val Thr Ser Pro Cys Cys Leu Val Thr Ser Thr Tyr Gly Trp Thr Ala  
 595 600 605

Asn Met Glu Arg Ile Met Lys Ala Gln Ala Leu Arg Asp Asn Ser Thr  
 610 615 620

Met Gly Tyr Met Ala Ala Lys Lys His Leu Glu Ile Asn Pro Asp His  
 625 630 635 640

Ser Ile Ile Glu Thr Leu Arg Gln Lys Ala Glu Ala Asp Lys Asn Asp  
 645 650 655

Lys Ser Val Lys Asp Leu Val Ile Leu Leu Tyr Glu Thr Ala Leu Leu  
 660 665 670

Ser Ser Gly Phe Ser Leu Glu Asp Pro Gln Thr His Ala Asn Arg Ile  
 675 680 685

Tyr Arg Met Ile Lys Leu Gly Leu Gly Ile Asp Glu Asp Asp Pro Thr  
 690 695 700

Ala Asp Asp Thr Ser Ala Ala Val Thr Glu Glu Met Pro Pro Leu Glu  
 705 710 715 720

Gly Asp Asp Asp Thr Ser Arg Met Glu Glu Val Asp  
 725 730

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:19:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 1019 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: cDNA

(vi) FUENTE ORIGINAL:

- (A) ORGANISMO: Leishmania major

(ix) CARACTERÍSTICA:

- (A) NOMBRE / CLAVE: CDS
- (B) LOCALIZACIÓN: 71..523

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:19:

5

10



ES 2 373 878 T3

GAATTCGGCA CGAGGTTTCT GTACTTTATT GCTTCCAGCC TTTATTCACT CTTCGATTTC	60
CTCTAACACC ATG TCC TCC GAG CGC ACC TTT ATT GCC GTC AAG CCG GAC Met Ser Ser Glu Arg Thr Phe Ile Ala Val Lys Pro Asp 1 5 10	109
GGC GTG CAG CGC GGC CTC GTT GGC GAG ATC ATC GCC CGC TTC GAG CGC Gly Val Gln Arg Gly Leu Val Gly Glu Ile Ile Ala Arg Phe Glu Arg 15 20 25	157
AAG GGC TAC AAG CTC GTC GCC TTG AAG ATA CTG CAG CCG ACG ACG GAG Lys Gly Tyr Lys Leu Val Ala Leu Lys Ile Leu Gln Pro Thr Thr Glu 30 35 40 45	205
CAG GCC CAG GGT CAC TAT AAG GAC CTT TGC TCC AAG CCG TTT TTC CCG Gln Ala Gln Gly His Tyr Lys Asp Leu Cys Ser Lys Pro Phe Phe Pro 50 55 60	253
GCC CTT GTG AAG TAC TTC TCC TCT GGC CCG ATC GTG TGT ATG GTG TGG Ala Leu Val Lys Tyr Phe Ser Ser Gly Pro Ile Val Cys Met Val Trp 65 70 75	301
GAG GGT AAG AAC GTG GTG AAG AGC GGC CGC GTG CTG CTC GGC GCG ACG Glu Gly Lys Asn Val Val Lys Ser Gly Arg Val Leu Leu Gly Ala Thr 80 85 90	349
AAC CCG GCC GAC TCA CAG CCC GGC ACG ATC CGT GGC GAC TTT GCC GTG Asn Pro Ala Asp Ser Gln Pro Gly Thr Ile Arg Gly Asp Phe Ala Val 95 100 105	397
GAT GTG GGC CGC AAC GTG TGC CAC GGG TCC GAC TCT GTG GAG AGC GCG Asp Val Gly Arg Asn Val Cys His Gly Ser Asp Ser Val Glu Ser Ala 110 115 120 125	445
GAG CGC GAG ATC GCC TTT TGG TTC AAG GCG GAT GAG ATC GCG AGC TGG Glu Arg Glu Ile Ala Phe Trp Phe Lys Ala Asp Glu Ile Ala Ser Trp 130 135 140	493
ACG TCG CAC TCC GTG TCC CAG ATC TAT GAG TAACGGTGAT TGCGGACACG Thr Ser His Ser Val Ser Gln Ile Tyr Glu 145 150	543
CTTTGAGGAC GTAGCTGTAC CCCCAATGAA TTCTTCTCTG AAAACCACAT CATAAGCCTC	603
TTAAGAGGTT ATTTTCTTG ATCGATGCC GGTGGTGACC AGCACCATTC CTTTATCGGA	663
TTCACTCACA CTCCTAGCGA ATCATGTAGT GCGGTGAGAG TGGGCTCTGG AGGAGACTGT	723
TGTGTAGCCA TGGCTTCAGG AGAGAAAACA AAATACAAGG AAAGGCAATA TGTAECTATG	783
GGGTTCCCTT TTTTACTATG CAAAGTTTTT ATAACTCTTG ATCGGCAAAA ACAACAACAA	843
CCGCCATACA CCAAGAGCAA ATGCTTCTT CTGCGGACTG TGCTTCTGTT TTTTTTTATG	903
AAGGAGTGAC TCGCGCGATG AAAAGTGTGT GCGTGGGAGA TGTATTTCTT TTTTTTGTTT	963
ATAGTGGCGA CAGCTCACTG TTGACGATGA CAAAAA AAAAATAA CTCGAG	1019

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:20:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

5

(A) LONGITUD: 151 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:20:

```

Met Ser Ser Glu Arg Thr Phe Ile Ala Val Lys Pro Asp Gly Val Gln
 1          5          10
Arg Gly Leu Val Gly Glu Ile Ile Ala Arg Phe Glu Arg Lys Gly Tyr
 20          25          30
Lys Leu Val Ala Leu Lys Ile Leu Gln Pro Thr Thr Glu Gln Ala Gln
 35          40          45
Gly His Tyr Lys Asp Leu Cys Ser Lys Pro Phe Phe Pro Ala Leu Val
 50          55          60
Lys Tyr Phe Ser Ser Gly Pro Ile Val Cys Met Val Trp Glu Gly Lys
 65          70          75          80
Asn Val Val Lys Ser Gly Arg Val Leu Leu Gly Ala Thr Asn Pro Ala
 85          90          95
Asp Ser Gln Pro Gly Thr Ile Arg Gly Asp Phe Ala Val Asp Val Gly
 100          105          110
Arg Asn Val Cys His Gly Ser Asp Ser Val Glu Ser Ala Glu Arg Glu
 115          120          125
Ile Ala Phe Trp Phe Lys Ala Asp Glu Ile Ala Ser Trp Thr Ser His
 130          135          140
Ser Val Ser Gln Ile Tyr Glu
 145          150

```

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:21:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 1523 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: cDNA

(vi) FUENTE ORIGINAL:

- (A) ORGANISMO: Leishmania major

(ix) CARACTERÍSTICA:

- (A) NOMBRE / CLAVE: CDS
- (B) LOCALIZACIÓN: 14..973

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:21:

5

10

ES 2 373 878 T3

GAATTCGGCA CGA GTG CTG CCC GAC ATG ACA TGC TCG CTG ACC GGA CTT	49
Val Leu Pro Asp Met Thr Cys Ser Leu Thr Gly Leu	
1 5 10	
CAG TGC ACA GAC CCG AAC TGC AAG ACC TGC ACA ACT TAC GGT CAG TGC	97
Gln Cys Thr Asp Pro Asn Cys Lys Thr Cys Thr Thr Tyr Gly Gln Cys	
15 20 25	
ACA GAC TGC AAC GAC GGC TAC GGT CTC ACC TCC TCC AGC GTT TGC GTG	145
Thr Asp Cys Asn Asp Gly Tyr Gly Leu Thr Ser Ser Ser Val Cys Val	
30 35 40	
CGC TGC AGT GTA GCG GGC TGC AAG AGC TGC CCC GTC GAC GCT AAC GTC	193
Arg Cys Ser Val Ala Gly Cys Lys Ser Cys Pro Val Asp Ala Asn Val	
45 50 55 60	
TGC AAA GTG TGT CTC GGC GGC AGC GAG CCG ATC AAC AAT ATG TGC CCC	241
Cys Lys Val Cys Leu Gly Gly Ser Glu Pro Ile Asn Asn Met Cys Pro	
65 70 75	
TGC ACC GAC CCC AAC TGC GCC AGC TGC CCC AGC GAC GCT GGC ACG TGC	289
Cys Thr Asp Pro Asn Cys Ala Ser Cys Pro Ser Asp Ala Gly Thr Cys	
80 85 90	
ACT CAG TGC GCG AAC GGC TAC GGT CTC GTG GAC GGC GCC TGT GTG AGA	337
Thr Gln Cys Ala Asn Gly Tyr Gly Leu Val Asp Gly Ala Cys Val Arg	
95 100 105	
TGC CAG GAG CCC AAC TGC TTC AGC TGC GAC AGC GAC GCG AAT AAG TGC	385
Cys Gln Glu Pro Asn Cys Phe Ser Cys Asp Ser Asp Ala Asn Lys Cys	
110 115 120	
ACA CAA TGT GCG CCG AAC TAC TAC CTC ACC CCG CTC TTG ACC TGC TCC	433
Thr Gln Cys Ala Pro Asn Tyr Tyr Leu Thr Pro Leu Leu Thr Cys Ser	
125 130 135 140	
CCG GTG GCC TGC AAC ATC GAG CAC TGC ATG CAG TGC GAC CCA CAG ACG	481

ES 2 373 878 T3

Pro Val Ala Cys Asn Ile Glu His Cys Met Gln Cys Asp Pro Gln Thr	
145	150 155
CCG TCG CGC TGC CAG GAG TGC GTG TCC CCC TAC GTG GTT GAC AGC TAC	529
Pro Ser Arg Cys Gln Glu Cys Val Ser Pro Tyr Val Val Asp Ser Tyr	
160	165 170
GAC GGC CTC TGC AGG CTC TCC GAT GCC TGC TCC GTG CCC AAC TGC AAG	577
Asp Gly Leu Cys Arg Leu Ser Asp Ala Cys Ser Val Pro Asn Cys Lys	
175	180 185
AAG TGC GAG ACC GGT ACC TCC AGG CTC TGC GCC GAG TGC GAC ACC GGC	625
Lys Cys Glu Thr Gly Thr Ser Arg Leu Cys Ala Glu Cys Asp Thr Gly	
190	195 200
TAC AGT CTC TCC GCC GAC GCG ACG AGC TGC AGC AGT CCA ACC ACG CAG	673
Tyr Ser Leu Ser Ala Asp Ala Thr Ser Cys Ser Ser Pro Thr Thr Gln	
205	210 215 220
CCG TGC GAG GTG GAG CAC TGC AAC ACA TGT GTG AAC GGC GAT AGC ACC	721
Pro Cys Glu Val Glu His Cys Asn Thr Cys Val Asn Gly Asp Ser Thr	
225	230 235
CGC TGT GCC TAC TGC AAC ACC GGC TAC TAC GTC TCC GAT GGC AAG TGC	769
Arg Cys Ala Tyr Cys Asn Thr Gly Tyr Tyr Val Ser Asp Gly Lys Cys	
240	245 250
AAG GCC ATG CAG GGC TGC TAC GTG TCG AAC TGC GCG CAG TGC ATG CTG	817
Lys Ala Met Gln Gly Cys Tyr Val Ser Asn Cys Ala Gln Cys Met Leu	
255	260 265
CTT GAC AGC ACC AAG TGC TCC ACG TGC GTG AAA GGG TAC CTG CTC ACG	865
Leu Asp Ser Thr Lys Cys Ser Thr Cys Val Lys Gly Tyr Leu Leu Thr	
270	275 280
TCG TCC TAC AGT TGC GTC TCG CAG AAA GTC ATC AAC AGT GCG GCC GCG	913
Ser Ser Tyr Ser Cys Val Ser Gln Lys Val Ile Asn Ser Ala Ala Ala	
285	290 295 300
CCC TAC TCT CTG TGG GTG GCC GCC GCC GTG CTC CTC ACC TCT TTT GCC	961
Pro Tyr Ser Leu Trp Val Ala Ala Ala Val Leu Leu Thr Ser Phe Ala	
305	310 315
ATG CAC CTA GCA TAGTGCAGC CGGCATGCGA ACAACCCAC TCTCATTCTC	1013
Met His Leu Ala	
320	
CAACATGTGC ATACACACAC ACACAGACAG CGGGGCAGCA CCCCTCCCC ACACACACAC	1073
ACGCACCTCC CCCTTGCTT GTTCTTCTTT CCTCGTTCGC ATTTCTTCT CTCGTGCGCT	1133
GGCGCCGGCC TCCTGCACGT CGCTCCCTC CCCCTAACCT CTATTCTCTC TCTCTCTCTC	1193
TCTCGCCGGC ATCATTGCTT CTTACCCTTT TCTGATCCTT GCTCGCGTGG GCGGACACTG	1253
CCACAGTCCC ACAGCGCAGA CACACGTGTT TAAACGGCGC AGGCATCCCT CCCTATCACT	1313
TCATTTCTCC TAAAGCCACT CACCAAGTCG CACACCGCCC TCCCCATCG GCCGCCCTTC	1373
CGGGCGCAGC TGTGCGGAAT GGGTGTGTGC TCGACCTCGT TCCTGGCAGC TCACTCGCAT	1433
GTGTACAGCC ACTCCAACCA CGAAAGCTCT CTCTGCGCA CATAAAAAA AAAAAAAA	1493
AAAACTCGA GGGGGGCCC GGTACCCAAA	1523

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:22:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 320 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGÍA: lineal

5

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:22:

```

Val Leu Pro Asp Met Thr Cys Ser Leu Thr Gly Leu Gln Cys Thr Asp
 1           5           10           15
Pro Asn Cys Lys Thr Cys Thr Thr Tyr Gly Gln Cys Thr Asp Cys Asn
 20           25           30
Asp Gly Tyr Gly Leu Thr Ser Ser Ser Val Cys Val Arg Cys Ser Val
 35           40           45
Ala Gly Cys Lys Ser Cys Pro Val Asp Ala Asn Val Cys Lys Val Cys
 50           55           60
Leu Gly Gly Ser Glu Pro Ile Asn Asn Met Cys Pro Cys Thr Asp Pro
 65           70           75           80
Asn Cys Ala Ser Cys Pro Ser Asp Ala Gly Thr Cys Thr Gln Cys Ala
 85           90           95
Asn Gly Tyr Gly Leu Val Asp Gly Ala Cys Val Arg Cys Gln Glu Pro
 100          105          110
Asn Cys Phe Ser Cys Asp Ser Asp Ala Asn Lys Cys Thr Gln Cys Ala
 115          120          125
Pro Asn Tyr Tyr Leu Thr Pro Leu Leu Thr Cys Ser Pro Val Ala Cys
 130          135          140
Asn Ile Glu His Cys Met Gln Cys Asp Pro Gln Thr Pro Ser Arg Cys
 145          150          155          160
Gln Glu Cys Val Ser Pro Tyr Val Val Asp Ser Tyr Asp Gly Leu Cys
 165          170          175
    
```

Arg Leu Ser Asp Ala Cys Ser Val Pro Asn Cys Lys Lys Cys Glu Thr  
 180 185 190  
 Gly Thr Ser Arg Leu Cys Ala Glu Cys Asp Thr Gly Tyr Ser Leu Ser  
 195 200 205  
 Ala Asp Ala Thr Ser Cys Ser Ser Pro Thr Thr Gln Pro Cys Glu Val  
 210 215 220  
 Glu His Cys Asn Thr Cys Val Asn Gly Asp Ser Thr Arg Cys Ala Tyr  
 225 230 235 240  
 Cys Asn Thr Gly Tyr Tyr Val Ser Asp Gly Lys Cys Lys Ala Met Gln  
 245 250 255  
 Gly Cys Tyr Val Ser Asn Cys Ala Gln Cys Met Leu Leu Asp Ser Thr  
 260 265 270  
 Lys Cys Ser Thr Cys Val Lys Gly Tyr Leu Leu Thr Ser Ser Tyr Ser  
 275 280 285  
 Cys Val Ser Gln Lys Val Ile Asn Ser Ala Ala Ala Pro Tyr Ser Leu  
 290 295 300  
 Trp Val Ala Ala Ala Val Leu Leu Thr Ser Phe Ala Met His Leu Ala  
 305 310 315 320

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:23:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 797 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: cDNA

(vi) FUENTE ORIGINAL:

- (A) ORGANISMO: Leishmania major

(ix) CARACTERÍSTICA:

- (A) NOMBRE / CLAVE: CDS
- (B) LOCALIZACIÓN: 27..623

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:23:

CTGTACTTTA TTGCCACCAG CCAGCC ATG TCC TGC GGT AAC GCC AAG ATC AAC 53  
 Met Ser Cys Gly Asn Ala Lys Ile Asn  
 1 5  
 TCT CCC GCG CCG TCC TTC GAG GAG GTG GCG CTC ATG CCC AAC GGC AGC 101  
 Ser Pro Ala Pro Ser Phe Glu Glu Val Ala Leu Met Pro Asn Gly Ser  
 10 15 20 25

5

10

15

ES 2 373 878 T3

TTC AAG AAG ATC AGC CTC TCC TCC TAC AAG GGC AAG TGG GTC GTG CTC	149
Phe Lys Lys Ile Ser Leu Ser Ser Tyr Lys Gly Lys Trp Val Val Leu	
30 35 40	
TTC TTC TAC CCG CTC GAC TTT AGC TTC GTG TGC CCG ACA GAG GTC ATC	197
Phe Phe Tyr Pro Leu Asp Phe Ser Phe Val Cys Pro Thr Glu Val Ile	
45 50 55	
GCG TTC TCC GAC AGC GTG AGT CGC TTC AAC GAG CTC AAC TGC GAG GTC	245
Ala Phe Ser Asp Ser Val Ser Arg Phe Asn Glu Leu Asn Cys Glu Val	
60 65 70	
CTC GCG TGC TCG ATA GAC AGC GAG TAC GCG CAC CTG CAG TGG ACG CTG	293
Leu Ala Cys Ser Ile Asp Ser Glu Tyr Ala His Leu Gln Trp Thr Leu	
75 80 85	
CAG GAC CGC AAG AAG GGC GGC CTC GGG ACC ATG GCG ATC CCA ATG CTA	341
Gln Asp Arg Lys Lys Gly Gly Leu Gly Thr Met Ala Ile Pro Met Leu	
90 95 100 105	
GCC GAC AAG ACC AAG AGC ATC GCT CGT TCC TAC GGC GTG CTG GAG GAG	389
Ala Asp Lys Thr Lys Ser Ile Ala Arg Ser Tyr Gly Val Leu Glu Glu	
110 115 120	
AGC CAG GGC GTG GCC TAC CGC GGT CTC TTC ATC ATC GAC CCC CAT GGC	437
Ser Gln Gly Val Ala Tyr Arg Gly Leu Phe Ile Ile Asp Pro His Gly	
125 130 135	
ATG CTG CGT CAG ATC ACC GTC AAT GAC ATG CCG GTG GGC CGC AGC GTG	485
Met Leu Arg Gln Ile Thr Val Asn Asp Met Pro Val Gly Arg Ser Val	
140 145 150	
GAG GAG GTT CTA CGC CTG CTG GAG GCT TTT CAG TTC GTG GAG AAG CAC	533
Glu Glu Val Leu Arg Leu Leu Glu Ala Phe Gln Phe Val Glu Lys His	
155 160 165	
GGC GAG GTG TGC CCC GCG AAC TGG AAG AAG GGC GCC CCC ACG ATG AAG	581
Gly Glu Val Cys Pro Ala Asn Trp Lys Lys Gly Ala Pro Thr Met Lys	
170 175 180 185	
CCG GAA CCG AAT GCG TCT GTC GAG GGA TAC TTC AGC AAG CAG	623
Pro Glu Pro Asn Ala Ser Val Glu Gly Tyr Phe Ser Lys Gln	
190 195	
TAAACCTGTG AGCGTCGCAG GAGTCAGTGT GACCTCACCC GCCTCTGCCA GTGGGTGCCA	683
GAGGGCGTGA GGGATTGTGG GAAGGCTGTT GGATATGATG CAGACAGCGA TGAATGCAAC	743
TCCCACACAC TGGCCCTCCT CAGCCCTCTC CACACAGACA CACGCACGCA TGTC	797

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:24:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 199 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:24:

ES 2 373 878 T3

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

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:25:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 637 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: cDNA

(vi) FUENTE ORIGINAL:

- (A) ORGANISMO: Leishmania tropica

(ix) CARACTERÍSTICA:

- (A) NOMBRE / CLAVE: CDS
- (B) LOCALIZACIÓN: 7..624

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:25:



ES 2 373 878 T3

TTACAT ATG CAT CAC CAC CAC CAC CAC ATG TCC TGC GGT AAC GCC AAG Met His His His His His His Met Ser Ser Cys Gly Asn Ala Lys 1 5 10	48
ATC AAC TCT CCC GCG CCG CCC TTC GAG GAG ATG GCG CTC ATG CCC AAC Ile Asn Ser Pro Ala Pro Pro Phe Glu Glu Met Ala Leu Met Pro Asn 15 20 25 30	96
GGC AGC TTC AAG AAG ATC AGC CTC TCC GCC TAC AAG GGC AAG TGG GTC Gly Ser Phe Lys Lys Ile Ser Leu Ser Ala Tyr Lys Gly Lys Trp Val 35 40 45	144
GTG CTC TTC TTC TAC CCG CTC GAC TTC ACC TTC GTG TGC CCG ACA GAG Val Leu Phe Phe Tyr Pro Leu Asp Phe Thr Phe Val Cys Pro Thr Glu 50 55 60	192
ATC ATC GCG TTC TCC GAC AAC GTG AGT CGC TTC AAC GAG CTC AAC TGC Ile Ile Ala Phe Ser Asp Asn Val Ser Arg Phe Asn Glu Leu Asn Cys 65 70 75	240
GAG GTC CTC GCG TGC TCG ATG GAC AGC GAG TAC GCG CAC CTG CAG TGG Glu Val Leu Ala Cys Ser Met Asp Ser Glu Tyr Ala His Leu Gln Trp 80 85 90	288
ACG CTG CAG GAC CGC AAG AAG GGC GGC CTC GGG GCC ATG GCG ATC CCA Thr Leu Gln Asp Arg Lys Lys Gly Gly Leu Gly Ala Met Ala Ile Pro 95 100 105 110	336
ATG CTG GCC GAC AAG ACT AAG AGC ATC GCT CGT TCC TAC GGC GTG CTG Met Leu Ala Asp Lys Thr Lys Ser Ile Ala Arg Ser Tyr Gly Val Leu 115 120 125	384
GAG GAG AGC CAG GGC GTG GCC TAC CGC GGT CTC TTC ATC ATC GAC CCC Glu Glu Ser Gln Gly Val Ala Tyr Arg Gly Leu Phe Ile Ile Asp Pro 130 135 140	432
CGT GGC ATG GTG CGT CAG ATC ACC GTC AAC GAC ATG CCG GTG GGC CGC Arg Gly Met Val Arg Gln Ile Thr Val Asn Asp Met Pro Val Gly Arg 145 150 155	480
AAC GTG GAG GAG GCT CTG CGC CTG CTG GAG GCT TTG CAG TTC GTG GAG Asn Val Glu Glu Ala Leu Arg Leu Leu Glu Ala Leu Gln Phe Val Glu 160 165 170	528
AAG CAC GGC GAG GTG TGC CCC GCG AAC TGG AAG AAG GGC GCC CCC ACG Lys His Gly Glu Val Cys Pro Ala Asn Trp Lys Lys Gly Ala Pro Thr 175 180 185 190	576
ATG AAG CCG GAA CCG AAG GCG TCT GTC GAG GGA TAC TTC AGC AAG CAG Met Lys Pro Glu Pro Lys Ala Ser Val Glu Gly Tyr Phe Ser Lys Gln 195 200 205	624
TAAGAATTCC ATG	637

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:26:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

5

(A) LONGITUD: 206 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:26:

```

Met His His His His His His Met Ser Cys Gly Asn Ala Lys Ile Asn
 1           5           10           15

Ser Pro Ala Pro Pro Phe Glu Glu Met Ala Leu Met Pro Asn Gly Ser
           20           25           30

Phe Lys Lys Ile Ser Leu Ser Ala Tyr Lys Gly Lys Trp Val Val Leu
           35           40           45

Phe Phe Tyr Pro Leu Asp Phe Thr Phe Val Cys Pro Thr Glu Ile Ile
 50           55           60

Ala Phe Ser Asp Asn Val Ser Arg Phe Asn Glu Leu Asn Cys Glu Val
 65           70           75           80

Leu Ala Cys Ser Met Asp Ser Glu Tyr Ala His Leu Gln Trp Thr Leu
           85           90           95

Gln Asp Arg Lys Lys Gly Gly Leu Gly Ala Met Ala Ile Pro Met Leu
           100          105          110

Ala Asp Lys Thr Lys Ser Ile Ala Arg Ser Tyr Gly Val Leu Glu Glu
           115          120          125

Ser Gln Gly Val Ala Tyr Arg Gly Leu Phe Ile Ile Asp Pro Arg Gly
 130          135          140

Met Val Arg Gln Ile Thr Val Asn Asp Met Pro Val Gly Arg Asn Val
 145          150          155          160

Glu Glu Ala Leu Arg Leu Leu Glu Ala Leu Gln Phe Val Glu Lys His
           165          170          175

Gly Glu Val Cys Pro Ala Asn Trp Lys Lys Gly Ala Pro Thr Met Lys
           180          185          190

Pro Glu Pro Lys Ala Ser Val Glu Gly Tyr Phe Ser Lys Gln
           195          200          205
    
```

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:27:

5 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 51 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

10 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: otro ácido nucleico

(A) DESCRIPCIÓN: /desc = "cebador (MAPS-1-5'His) de 50 PCR para amplificar simultáneamente cDNA de MAPS-1 para ambos L. major y L. tropica mientras se añaden 6 restos Hiz al extremo amino-terminal de la proteína codificada."

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:27:

15 CAATTACATA TGCATCACCA TCACCATCAC ATGTCCTGCG GTAACGCCAA G ' 51

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:28:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 31 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: otro ácido nucleico

- 5 (A) DESCRIPCIÓN: /desc = "cebador (MAPS-1-3ÖR1) de 3' PCR para amplificar simultáneamente cDNA de MAPS-1 para ambos L. major y L. tropica."  
 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:28:

CATGGAATTC TTAGTGCTTG CTGAAATATC C 31

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:29:

- 10 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 520 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: doble

(D) TOPOLOGÍA: lineal

- 15 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

(vi) FUENTE ORIGINAL:

(A) ORGANISMO: Leishmania major

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:29:

```

GGCACGAGCC CTTGCCTACA TTGCTCGCC GATATTCGCG GGGAGTTCTT CAATTTGCGT      60
CGCGTAGAAC TGCTCAATGT CGCGCAACAA GCGCAGCTCG TCGTGGCGCA CGAAGGTGAT      120
GGCCAGTCCA GTGCGGCCCA TGCGGCCAGT GCGGCCGATG CGGTGAATGT ACTGCTCACG      180
CGCGAGCGGC AAATCGTAGC TGAGGACGAG CGAGACGCGC TCCACATCAA TGCCACGCGC      240
CCACAGGTCC GTTGTAATGA NCACGCGGCT GTGTCCATTA CGGAATGCCG CATAATCTCG      300
TCGCGCTCCG CCTGGGGCAT GTCGCCGTGC ATGGCGGACA CAGCGAAATT CTCGCGCGTC      360
ATCTTCTTGG CAAGCTGCTC CACCTTTTTC GGGTGTTCG ANAAAACCAC NGCGTGGGCG      420
ATCGTTAAGC TGTCGTACAA ACTCCATCAA GAAATCGAAT TTGTTTTTCT CTTCGTCNAC      480
NGANACAAAN TACTGTTTAA CGCINTCCAC GGTGATCTCA      520
  
```

- 20 (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:30:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 600 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: doble

- 25 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

(vi) FUENTE ORIGINAL:

(A) ORGANISMO: Leishmania major

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:30:

GGCACAAGGT TTTCGGGTTA TCTTCACGCA TGGTGGAGCG CAGATGGGTG AAGTAAATAC 60  
 GCGGACCGAA CTGCTTGATC ATATCAACCA GATCGTTGTC AGCACGCACG CCGTANGAAC 120  
 CGGTGCACAT GGTAAAACCG TNTGCCATGC TGTTFACGGT ATCAACCATC CACTGCATAT 180  
 CTTCAATGGT GGAAACAATG CGCGGCAGGC CGAGGATCCG GCGCGGCTCA TCATNNAGNT 240  
 NATNAACCAN TCGCACGTCT ANTTCTGCAC TAAACTACAA NTATCGGTNA CATATNATAA 300  
 GGCCNATTTT CGGTCCAGGA NTATGTNCTN TCAAAATGCC NCGTTANCA CTCTTAAATG 360  
 TCTCANGNGN AAANTNGTTC TAAAGGGTGT CAAAANNTN NTTACCNTTC CCCNCTTACT 420  
 TCAANANCTC CTCNAATTC CNGGCCCTTN GACNANNATT TNCTATTAAA ANATANAANN 480

TTCAAATTNA TTCCNACCT NCCNTNNCCA AANNTANCNA ATAATCANNC CCCTNTCANN 540  
 ANNTCCANC TTACCCTCCN NTNGNNGGGN MNCCNATTN CCCCANCCC NCNCTAAATA 600

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:31:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 5 (A) LONGITUD: 600 pares de bases  
 (B) TIPO: ácido nucleico  
 (C) CADENA: doble  
 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

10 (vi) FUENTE ORIGINAL:

- (A) ORGANISMO: Leishmania major

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:31:

GGCACGAGCC TCAGTGGAGC TCAATGAAGA TATTGCAGTA TCTTACTCTG GATGGCACTC 60  
 AGGTCTCCGG CACGCTGCCG CCCAGTGGA GCGCGATGGC ATCGGTGCGA ATTCTTAACC 120  
 TGNAGGGTAC TGAGGTCTCT GGTACGCTGC CGCCTGAGTG GATATCNATG ANCAGGCTGC 180  
 AAACTCTGAA TCTGCGGCGC ACGAAANTAT CCGGCACTCT GCCGCCGAA TGGANTTCTA 240  
 TGAACAGCCT GGAGTACTTT CACCTTTATC TTAICTAGGT CTCCGGCAGC CTGCGGCCCG 300  
 AGTGGAGTGG GATGTCNAAG GCCGCATACT TCTGGCTGGA ATACTGCGAC CTGTCCGGCA 360  
 NTCTGCCGCC CNAGTGGTCG TCNATGCCAA AGCTGCGCGG TATCTCACTG ANCGGCAACA 420  
 AATTCTTGCG NGTGTNTNCC NGACTCNTGG GATTGAGAAA GGTGGTCCTT GTTGTGGGGC 480  
 ATCNAAGGAN CAAACCCCAA NGGGCCNCN AATTGCTTGG GCNTGCTTAA GGANTTGAC 540  
 NAACCAACNC CNCCAAAAAC CCCCCCACC NCNAAANNAC NANCCCCAC TTAANNCCCN 600

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:32:

15 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 600 pares de bases  
 (B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: doble

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

(vi) FUENTE ORIGINAL:

5

(A) ORGANISMO: Leishmania major

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:32:

NGCACGAGAA GCGCAACTGG CGCATCGCAT CTGTGACTAT CTGCCTGAAC AGGGGCAATN	60
GT TTGTTGGT AACAGCCTGG TGGTACGTCT GATTGATNCG CTNCGCAAN TTCCGGCAGG	120
TTACCCGGTG TACANCAACC GTGGGGCCAN CGGTATCNAC NGGCTGCTTT CGACCGCCGC	180
CGGNGTTCAN CGGGCAANCG GCAAACCGAC GCTGGCGATT GTGGGCGATC TCTCCGCACT	240
TTACGATCTC AACGCNCTGG CGTTATTGCG TCAGGTTTCT GCGCCGCTGG TATTAATTGT	300
GGTGAACAAC AACGGCNGGG CAAAATTTTC TCGCTGTTGC CAACGCCCCC AAAGCNAGCG	360
TGAAGCGTTT CTATCTGATG CCGCAAACG TCCATTTTGA AACACGCCGC CNCCCATGTT	420
TCGANCTGAA AATATCATCG TCCGCAAAC TGGCANGAAA CTTNGAAAAC CGCATTTTGC	480
CGACNCCCTG GCNCACGCC AACCCACCCA CCGGTTGATT GAAAATGGTG GGTTAACGAA	540
NCCNATGGG TGCCCCAAAN CNCNCCANC CAAATTTCTG GGCCAGGTT AAANCCCTTT	600

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:33:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

10

(A) LONGITUD: 600 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: doble

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

15

(vi) FUENTE ORIGINAL:

(A) ORGANISMO: Leishmania major

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:33:

ACGATGACCA TGCCCCGAAG GAGGATGGCC ATGCGCCGAA GAACGATGAC CATGCCCCGA	60
AGGAGGATGG CCATGCGCCG AAGAACGATG ACCATGCCCC GAAGGAGGAT GGCCATGCGC	120
CGAAGAACGA CGGGGATGTG CAGAANAAGA GCGAAGATGG AGACCAACGTG GGAGAGGGAG	180
GCAAGGGCAA TGAGGATGGT AACGATGATC AGCCGAAGGA GCACGCTGCC GGCAACTAGT	240
GGGCTGCGTC CGGGCTTGTG TGCGANCCGT GCTCTGCACC CCGCCGCTCG TGCATCCTCG	300
CATGTGGACT GCGTGTGTCT CTCCCCTTT GTCTCTCTCC CCCACACAGT GGCTGATGCC	360

TGCACGGGGT TGCTGTGGCT GCACCTCCTG ACCACTGCCA GCTTTCTTGG CTTGCCTCCC	420
CTCTGCGCCT CCGCTCGTGC CGCTCGTGCC GAATTCGATA TCAAGCTTAT CGATACCGTC	480
NACCTCGAAG GGGGGCCCGG TTACCCATTC GCCCTATANT GAGTCNTATT ACAATTCCTG	540
GCGTCGTTTT ACACGTCGTG ACTGGGAAAA ACCCTGGCGT TCCCCACTTA TCGCCTTGCA	600

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:34:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

5

- (A) LONGITUD: 516 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADENA: doble
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

(vi) FUENTE ORIGINAL:

10

- (A) ORGANISMO: Leishmania major

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:34:

AGCTGCAGCA GCGCCTAGAC ACCGCCACGC AGCAGCGCGC CGAGCTGGAG GCACGGGTGG	60
CACGGCTGGC CGCGGACCGC GACGAGGCGC GCCAGCAGCT GGCCGCGAAC GCCGAGGAGC	120
TGCAGCAGCG CCTAGACACC GCCACGCAGC AGCGCGCCGA GCTGGAGGCA CGGGTGGCAC	180
GGCTGGCCGC GGACGGCGAC GAGGCCCGCC AGCAGCTGGC CGCGAACGCC GAGGAGCTGC	240
AGCAGCGCCT AGACACCGCC ACGCAGCAGC GCGCCGAGCT GGAGGCACAG GTGGCACGGC	300
TGGCCGCGAA CGCCGAGGAG CTGCAGCAGC GCCTAGACAC CGCCACGCAG CAGCGCGCCG	360
AGCTGGAGGC ACGGGTGGCA CGGCTGGCCG CGGACCGCGA CGAGGCGCGC CAGCAGCTGG	420
CCGCGAACGC CGAGGAGCTG CAGCAGCGCC TAGACACCGC CACGCAGCAG CGCGCCGAGC	480
TGGARGCACA GGTGGCACGG CTGGCCGCGA AMGCCG	516

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:35:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

15

- (A) LONGITUD: 822 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADENA: doble
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

(vi) FUENTE ORIGINAL:

20

- (A) ORGANISMO: Leishmania major

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:35:

ES 2 373 878 T3

```

GGCACGANAG ATCTTCGTGA AGACGCTGAC CGGCAANACG ATCGCGCTGG AGGTGGAGCC      60
GAGCGACACG ATCGAGAACG TGAAGGCCAA GATCCAGGAC AAGGAGGGCA TCCCGCCGGA      120
CCAGCAGCGC CTGATCTTCG CCGGCAAGCA GGTGGAGGAN GGCCGCACGC TCTCGGACTA      180
CAACATCCAG AAGGAGTCCA CGCTGCACCT GGTGCTGCGC CTGCGCGGCG GCATGCANAT      240
CTTCGTGAAA ACGCTNACCG GCAANACAAT CGCGCTGGAA GTGGAGCCGA ACGACCNATC      300
GAAAACGTGA AGGCCNANAT CCANGACAAG GAAGGCNTCC CGCCGGANCA GCACGCCTGA      360
TCTTCCNCCG GCAACCACTT GANGAAGGGC NCACGCTCTC NGACTIONAC ATCCANAAAG      420
GATTCNCCC TGCACCTTGT TGCTTGCNCC TTGCTCGGGG GGCATGCCNA ATCTTCCTTN      480
AAAACCTCAA CCGCAANAA CAATCCCCCN CNGAAGTTGG AACCCAACCA NCCCATCNA      540
AAACTTTAAA GGCCNNNATT CCNGAACAAAN GAAGGGCTTC CCCCCGGAC CNNCAANCNC      600
CCTGATTNTT CCCCCGNNN NCANTTTGGA ANGAAGGGCC CCNCCCTCCN CCGAATTNCN      660
ACNTCCCNAA ANGGATTCCC CCCCTNCCCT TGNTTTTTCG GCCNNNNNNC GGCNNCNTNC      720
CNAAATTCG NCCNAAGGNC CCCANTANAN CNACTTTCCC NTTCCCCCCC NNNNTTTTGC      780
NTAAANTTTT TNCNCCCNNA AANNTCCCNT TTNCNANTTN AN      822
    
```

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:36:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 146 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (C) CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(vi) FUENTE ORIGINAL:

- (A) ORGANISMO: Leishmania major

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:36:

```

Gly Thr Ser Pro Cys Leu His Leu Leu Ala Asp Ile Arg Gly Glu Phe
1           5           10           15
Phe Asn Leu Arg Arg Val Glu Leu Leu Asn Val Ala Gln Gln Ala Gln
    
```

	20		25		30															
Leu	Val	Val	Ala	His	Glu	Gly	Asp	Gly	Gln	Ser	Ser	Ala	Ala	His	Ala					
		35					40					45								
Ala	Ser	Ala	Ala	Asp	Ala	Val	Asn	Val	Leu	Leu	Thr	Arg	Glu	Arg	Gln					
		50				55					60									
Ile	Val	Ala	Glu	Asp	Glu	Arg	Asp	Ala	Leu	His	Ile	Asn	Ala	Thr	Arg					
		65			70					75					80					
Pro	Gln	Val	Arg	Cys	Asn	Xaa	His	Ala	Ala	Val	Ser	Ile	Thr	Glu	Cys					
				85					90					95						
Arg	Ile	Ile	Ser	Ser	Arg	Ser	Ala	Trp	Gly	Met	Ser	Pro	Cys	Met	Ala					
			100					105					110							
Asp	Thr	Ala	Lys	Phe	Ser	Arg	Val	Ile	Phe	Leu	Ala	Ser	Cys	Ser	Thr					
		115					120					125								
Phe	Leu	Arg	Val	Leu	Xaa	Lys	Thr	Thr	Ala	Trp	Ala	Ile	Val	Lys	Leu					
	130					135					140									
Ser	Tyr																			
	145																			

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:37:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

5

- (A) LONGITUD: 77 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (C) CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(vi) FUENTE ORIGINAL:

10

- (A) ORGANISMO: Leishmania major

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:37:

Ala	Gln	Gly	Phe	Arg	Val	Ile	Phe	Thr	His	Gly	Gly	Ala	Gln	Met	Gly					
1				5					10					15						
Glu	Val	Asn	Thr	Arg	Thr	Glu	Leu	Leu	Asp	His	Ile	Asn	Gln	Ile	Val					
			20					25					30							
Val	Ser	Thr	His	Ala	Val	Xaa	Thr	Gly	Ala	His	Gly	Lys	Thr	Val	Cys					
		35					40					45								
His	Ala	Val	Tyr	Gly	Ile	Asn	His	Pro	Leu	His	Ile	Phe	Asn	Gly	Gly					
		50				55					60									
Asn	Asn	Ala	Arg	Gln	Ala	Glu	Asp	Pro	Ala	Arg	Leu	Ile								
65				70					75											

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:38:

15

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 68 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido



(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(vi) FUENTE ORIGINAL:

5

(A) ORGANISMO: Leishmania major

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:38:

```

His Glu Pro Gln Trp Ser Ser Met Lys Ile Leu Gln Tyr Leu Thr Leu
1           5           10           15

Asp Gly Thr Gln Val Ser Gly Thr Leu Pro Pro Gln Trp Ser Ala Met
          20           25           30

Ala Ser Val Arg Ile Leu Asn Leu Xaa Gly Thr Glu Val Ser Gly Thr
          35           40           45

Leu Pro Pro Glu Trp Ile Ser Met Xaa Arg Leu Gln Thr Leu Asn Leu
          50           55           60

Arg Arg Thr Lys
65
    
```

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:39:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

10

(A) LONGITUD: 65 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

15

(vi) FUENTE ORIGINAL:

(A) ORGANISMO: Leishmania major

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:39:

```

Ala Arg Glu Ala Gln Leu Ala His Arg Ile Cys Asp Tyr Leu Pro Glu
1           5           10           15

Gln Gly Gln Xaa Phe Val Gly Asn Ser Leu Val Val Arg Leu Ile Asp
          20           25           30

Xaa Leu Xaa Gln Xaa Pro Ala Gly Tyr Pro Val Tyr Xaa Asn Arg Gly
          35           40           45

Ala Xaa Gly Ile Xaa Xaa Leu Leu Ser Thr Ala Ala Gly Val Xaa Arg
          50           55           60

Ala
65
    
```

20

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:40:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 78 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

5

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(vi) FUENTE ORIGINAL:

(A) ORGANISMO: Leishmania major

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:40:

```

Asp Asp His Ala Pro Lys Glu Asp Gly His Ala Pro Lys Asn Asp Asp
1           5           10           15

His Ala Pro Lys Glu Asp Gly His Ala Pro Lys Asn Asp Asp His Ala
           20           25           30

Pro Lys Glu Asp Gly His Ala Pro Lys Asn Asp Gly Asp Val Gln Xaa
           35           40           45

Lys Ser Glu Asp Gly Asp Asn Val Gly Glu Gly Gly Lys Gly Asn Glu
50           55           60

Asp Gly Asn Asp Asp Gln Pro Lys Glu His Ala Ala Gly Asn
65           70           75
    
```

10

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:41:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 169 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

15

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(vi) FUENTE ORIGINAL:

(A) ORGANISMO: Leishmania major

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:41:

Leu Gln Gln Arg Leu Asp Thr Ala Thr Gln Gln Arg Ala Glu Leu Glu  
 1 5 10 15  
 Ala Arg Val Ala Arg Leu Ala Ala Asp Arg Asp Glu Ala Arg Gln Gln  
 20 25 30  
 Leu Ala Ala Asn Ala Glu Glu Leu Gln Gln Arg Leu Asp Thr Ala Thr  
 35 40 45  
 Gln Gln Arg Ala Glu Leu Glu Ala Arg Val Ala Arg Leu Ala Ala Asp  
 50 55 60  
 Gly Asp Glu Ala Arg Gln Gln Leu Ala Ala Asn Ala Glu Glu Leu Gln  
 65 70 75 80  
 Gln Arg Leu Asp Thr Ala Thr Gln Gln Arg Ala Glu Leu Glu Ala Gln  
 85 90 95  
 Val Ala Arg Leu Ala Ala Asn Ala Glu Glu Leu Gln Gln Arg Leu Asp  
 100 105 110  
 Thr Ala Thr Gln Gln Arg Ala Glu Leu Glu Ala Arg Val Ala Arg Leu  
 115 120 125  
 Ala Ala Asp Arg Asp Glu Ala Arg Gln Gln Leu Ala Ala Asn Ala Glu  
 130 135 140  
 Glu Leu Gln Gln Arg Leu Asp Thr Ala Thr Gln Gln Arg Ala Glu Leu  
 145 150 155 160  
 Glu Ala Gln Val Ala Arg Leu Ala Ala  
 165

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:42:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 98 aminoácidos

5 (B) TIPO: aminoácido

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(vi) FUENTE ORIGINAL:

10 (A) ORGANISMO: Leishmania major

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:42:

Ala Arg Xaa Ile Phe Val Lys Thr Leu Thr Gly Xaa Thr Ile Ala Leu  
 1 5 10 15  
 Glu Val Glu Pro Ser Asp Thr Ile Glu Asn Val Lys Ala Lys Ile Gln  
 20 25 30  
 Asp Lys Glu Gly Ile Pro Pro Asp Gln Gln Arg Leu Ile Phe Ala Gly  
 35 40 45  
 Lys Gln Leu Glu Xaa Gly Arg Thr Leu Ser Asp Tyr Asn Ile Gln Lys  
 50 55 60  
 Glu Ser Thr Leu His Leu Val Leu Arg Leu Arg Gly Gly Met Xaa Ile  
 65 70 75 80  
 Phe Val Lys Thr Leu Thr Gly Xaa Thr Ile Ala Leu Glu Val Glu Pro  
 85 90 95  
 Asn Asp

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:43:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 39 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (C) CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(vi) FUENTE ORIGINAL:

- (A) ORGANISMO: Leishmania major

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:43:

Leu Gln Gln Arg Leu Asp Thr Ala Thr Gln Gln Arg Ala Glu Leu Glu  
 1 5 10 15  
 Ala Arg Val Ala Arg Leu Ala Ala Asp Arg Asp Glu Ala Arg Gln Gln  
 20 25 30  
 Leu Ala Ala Asn Ala Glu Glu  
 35

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:44:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 600 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADENA: doble
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

(vi) FUENTE ORIGINAL:

- (A) ORGANISMO: Leishmania chagasi

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:44:

```

CGGCCGCCTC AGCGAGGAGG AGATCGAGCG CATGGTGCGC GAGGCTGCCG AGTTCGAGGA      60
TGAGGACCGC AAGGTGCGCG AACGTGTCGA AGCGAAGAAC TCGCTAGAGA GCATCGCGTA      120
CTCGCTTCGC AACCAGATCA ACGACAAGGA CAAGCTTGGT GACAAGCTCG CCGCGGACGA      180
CAAGAAGGCG ATCGAGGAGG CTGTGAAGGA TGCCCTCGAC TTTGTCCACG AGAACCCCAA      240
TGCAGACCGT GAGGAGTTCG AGGCTGCTCG CACGAAGCTG CAGAGTGTGA CGAACCCCAT      300
CATTCAAAAG GTGTACCAGG GCGCCGCCGG CTCTGGTGCA GAAGAGGCGG ACGCGATGGA      360
TGACTIONGTTA GTCGGCCGCG TGAAAAGAAA AACAGGGAAA GCGGGAACAT NCCACAANAA      420
CCNAAGAAGA AAGGGGGTNG CGACACCGCT CGAACACCGA CCGCNCACAT NCNTCATGGG      480
CATGCTCAGC TTTCTCTCTCC CCAACAAACC AGAAGGTTTT CTCCAAACNC CGTCTCNGCN      540
CCCCAAAATAC GGAAANGTTA ANCGAAAAAN CCCCTTCCAC CAATTGNNGT TCTTTTGTTT      600
    
```

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:45:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 1748 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADENA: doble
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

(vi) FUENTE ORIGINAL:

- (A) ORGANISMO: Leishmania chagasi

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:45:

```

CTAGTGGATC CCCCgggGCTG CAGGAATTCA CGGAATACGT ACCTCCTCCC CCTTCTTGGT      60
AGAAGAACAA CAACAACGTT CAAGACGACG CCGCGCCTTC TTGTACCGCA TTTGCTTCTG      120
AGCACGTTC AATCCGTGCCT TGCAAACATG GAGGCGTACA AGAAGCTGGA AACGATCTTT      180
ACGAAGGTCT ACCGCCTGGA CCACTTCCTC GGTCTGGGCA ACTGGGACAT GAACACAAAC      240
    
```

ATGCCCCCA	AGGGCGAGGA	ATCACGCGGT	GAGGCGATGG	CGATGCTCTC	GGAGCTCCGC	300
TTTGGCTTCA	TCACGGCACC	GGAGGTGAAA	AGCCTGATTG	AGAGTGCCAC	CAAGGGCAGC	360
GAGGAGCTGA	ATGCGGTGCA	GCGCGCTAAC	TTGCGGGAGA	TGAGGCGTGC	GTGGAAGAGC	420
GCCACCGCCT	TGCCGGCTGA	GTTTGTGGGC	CGCAAGATGC	GCCTCACGAC	ACACGCGCAC	480
AGCGTGTGGC	GCGACAGCCG	CAAAGCAAAT	GACTTCGCCA	AGTTCCTACC	GGTGCTCAGG	540
GACCTGGTGG	CGCTCGCCCG	TGAGGAGGGC	TCATACCTCG	CCGCCGGCAC	CTCCCTCTCC	600
CCGTATGAGG	CGCTCATGAA	CGAGTACGAG	CCAGGAATCA	CGACACAAA	GCTGGATGAG	660
GTGTACGCAA	ATGTAAGTC	GTGGCTGCCG	CAGCTGCTAA	AGGACATTGT	GCAGAAGCAG	720
TCCGGCGAGT	CGGTGATTGC	GTTCTCGCAT	AAGTTCCCGC	AGGACAAGCA	GGAAGCACTG	780
TGCAAGGAAT	TCATGAAGAT	CTGGCACTTC	GACACCGATG	CCGGTCGCCT	CGACGTCAGC	840
CCCCACCCTT	TCACGGGAAT	GACGAAGGAG	GACTGCCGAC	TCACAACAAA	CTACATCGAA	900
GACACGTTTG	TTCAGAGCTT	GTATGGCGTC	ATCCACGAGA	GTGGGCATGG	CAAGTACGAG	960
CAGAACTGTG	GCCCACGCGA	GCACATCAGG	CAGCCGGTGT	GCAACGCCCG	CTCTCTTGGC	1020
CTGCATGAGA	GCCAGAGCCT	CTTTGCGGAG	TTTCAGATCG	GCCACGCGAC	GCCCTTCATC	1080
GACTACCTCA	CAACTCGCCT	TCCTGAGTTC	TTCGAGGCGC	AGCCAGCGTT	CTCGCAGGAC	1140
AACATGCGCA	AGTCGCTGCA	GCAGGTGAAG	CCGGGCTACA	TTCGCGTCGA	TGCCGATGAG	1200
GTGTGCTACC	CTCTGCACGT	GATCCTGCGC	TACGAGATCG	AGCGCGACTT	GATGGAGGGC	1260
AAAATGGAGG	TGGAAGACGT	GCCGCGCGCG	TGGAACGCAA	AGATGCAGGA	GTAAGTGGGT	1320
CTCTCAACGG	AGGGCCGTGA	CGACGTTGGG	TGCCTGCAGG	ACGTGCATTG	GTCCATGGTG	1380
CGCTCGGCTA	CTCTCCGACG	TACTCGCTCG	GCGCCATGTA	TGCGGCGCAG	ATCATGGCGA	1440
GCATCCGAAA	GGAGCTGGGA	GACGACAAGG	TGGATGAGTG	CCTGCGCACC	GGTGAGCTCG	1500
GCCCCCTCCT	GGAAAAGCAG	CAGGAGAAGA	TCTGGGATCA	TGGGTGCCTG	TACGAGACGG	1560
ACGACCTCAT	GACGCGTGCG	ACGGGCGAGA	CGCTGAACCC	CGAGTACCTG	CGCCGCCACC	1620
TGGAGGCGCG	CTACATAAAC	GCCTGAGTCG	CGAGCGGTTG	ACACACGCGC	TCGCTAGCAC	1680
ATGACGCGTC	TTTATTATTC	TTTGTGTGTC	ATTCGGAATT	CCGCGGAATT	CGATATCAAG	1740
CTTATCGA						1748

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:46:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 560 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: doble

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

(vi) FUENTE ORIGINAL:

(A) ORGANISMO: Leishmania chagasi

5

10

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:46:

```

CGGAAGGAGG ATGGCCATAC ACAGAAAAAT GACGGCGATG GCCCTAAGGA GGACGGCCGT      60
ACACAGAAAA ACGACGACGG TGGCCCTAAG GAGGACGGCC ATACACAGAA AAATGACGGC      120
GATGGCCCTA AGGAGGACGG CCGTACACAG AAAAATAACG GCGATGGCCC TNAGGAGGAC      180
GGCCATACAC AGAAAAATGA CGGCGATGCC CCTNAGGAGG ACGGCCGTAC ACANAAAAAT      240
GACGGCNATG GCCCTNAGGA GGACGGCCGT ACACAGAAAA ATGACNGCCA TGGCCCTTAG      300
GANGACGCCG TACACAGAAA AATGACGCNA TGGCCCTNAG GGAGGACGGC CATACCCANA      360
AAAATTGACG GCNATNGCCC TTAGGANGAC GGCCGTNCCC ANAAANANTG ACNGCGGTNG      420
CCCTTAAGGA AGATGAAAAT CTGCCACCAA AACNATTGGG AATGCNCAGG AAAANAACNA      480
ANATNGACCC CACGTGGGGG ATGGANCTTA CNGCNATTAA NATTGTACC ATTATCNACC      540
NAAGGACNNG TTGCCGNCAA
    
```

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:47:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 5 (A) LONGITUD: 600 pares de bases  
 (B) TIPO: ácido nucleico  
 (C) CADENA: doble  
 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

10 (vi) FUENTE ORIGINAL:

(A) ORGANISMO: Leishmania chagasi

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:47:

```

CGTCCGAGAA ACCCGTACAT GTATGCTGCT GGTAGAAGGC GCAGAGCTGG TCCCTCTGAT      60
GCACAAGCAT GAGGTCTGAC ATTGCCTGGT TCGTCATTTT CCAGAGCACA ACGAGCAGCG      120

TCATCATACA GCATCCAATA GCCGCCAGAG TGAATGCGAT GCGCACACCA AGTCGAAAGT      180
GGTCGACCAG TAGGGGAATG TGACCCTGGC TGGCGTGCAA CATGATCGCC ACGCCAGCGG      240
TGGGCCACAC CACAACAGAG GCGACGAAAG AGAACATGAA CTTGCTCACG AAGCTNACAA      300
TAAGGGCGTC GCTNGTGATG CTAAGAACCA CGCCNAGGTA GACGGCGAAG ANCAAATAA      360
ACACAAGCGT GACGATCCCG AAAAGAAGGA TCTCTGCGGA ATTTTCGTGA GATAGANAAT      420
GCCCGTACTG GAAAAANAAG CCGGCAGGCG CGCGATAACG CTGCAACTTG CCGCTCCTCG      480
CGGGCGCGTT TTCGCTCCTT CTCCGACTTG ATGGCGCNGT CNGNCTTGAC AAAACGGTTA      540
AGCTCCTCAT GCCCCAGCCG ATTCCCAGCT CACGGTCCAC TTCCGGCCAT GCCCACGGAC      600
    
```

15 (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:48:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 1053 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADENA: doble
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

5 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

(vi) FUENTE ORIGINAL:

- (A) ORGANISMO: Leishmania chagasi

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:48:

```

GGGAAAAAAG TGGAGCTCCA CCGCGGTGGC GGCCGCTCTA GAACTAGTGG ATCCCCGGG      60
CTGCAGGAAT TCCGCGGAAT TCCGCGGAAT TCCGCGGAAT TCCGTCCGAC GCGGCACCCG      120
CACAGGGGTC GACAGTGACG CAACCTCCTC CACCACTGCG GCCTACGACG GCGCCGGCTC      180
CGCGCCAGTG ATGTTGACG CCAATGTGAG CCACCCTCCG TAGCGGGGCG ATGACCAAGT      240
GTACATGCAC GTCGGCAAGC CCATCGTGGG CAACACCCTC GACGGATACA ACGGGTGCGT      300
GTTCCCTAC GGGCANACGG GCAGCGGCAA AACCTTCACG ATGCTCGGNT ACGCGCCGAG      360
CACGANCGAC ATCCGCGCTC GCAAAGGGTC CGTCCCCTGC GGGGCCAGCA GCATGGAGAA      420
CAGCACTCCT CTTGACAGCG CTGTGGAGCC GTTTGAGAGC GATGACGGCG ACGACGTGGT      480
GGACAAGACG GGGCTGGATC CGAACGAGCT GCAAGGCATC ATCCCGCGCG CGTGCACGGA      540
CCTGTTTCGAT GGTCTCCGTG CGAAGCGCGC CAAGGACTCC GACTTCACGT ACCGCGTGGA      600
    
```

```

GGTGTCTTAC TACGAGATCT ACAACGAGAA GGTGTTTCGAT CTCATCCGGC CGCAGCGCAA      660
CACGGACCTG AGGATACGTA ACTCGCCCAA CTCCGGTCCA TTTATCGAAG GCCTGACGTG      720
GAAGATGGTG TCCAAGGAGG AAGACGTCGC CCGCGTGATT CGCAAGGGCA TGCAGGAGCG      780
CCACACGGCT GCGACCAAGT TCAACGACCG CAGCAGCCGC AGCCACGCCA TCCTCACCTT      840
CAACATTGTG CAGCTGTGCGA TGGACGACTC CGACAACGCG TTCCAGATGC GCAGCAAGCT      900
GAACCTGGTG GACCTTGCTG GGTCCGAGCG CACTGGTGCG GCCGGAGCCG AGGGCAATGA      960
GTTCCACGAC GGTGTGAAGA TCAACCACTC GCTGACGGTG CTGGGGCGCG TGATCGACCG      1020
TCTGGCGGAC CTCTCGCAGA ACAAGGGAGG GGG                                  1053
    
```

10

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:49:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 136 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (C) CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

15

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(vi) FUENTE ORIGINAL:



(A) ORGANISMO: Leishmania chagasi

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:49:

```

Gly Arg Leu Ser Glu Glu Glu Ile Glu Arg Met Val Arg Glu Ala Ala
1          5          10          15

Glu Phe Glu Asp Glu Asp Arg Lys Val Arg Glu Arg Val Glu Ala Lys
          20          25          30

Asn Ser Leu Glu Ser Ile Ala Tyr Ser Leu Arg Asn Gln Ile Asn Asp
          35          40          45

Lys Asp Lys Leu Gly Asp Lys Leu Ala Ala Asp Asp Lys Lys Ala Ile
          50          55          60

Glu Glu Ala Val Lys Asp Ala Leu Asp Phe Val His Glu Asn Pro Asn
65          70          75          80

Ala Asp Arg Glu Glu Phe Glu Ala Ala Arg Thr Lys Leu Gln Ser Val
          85          90          95

Thr Asn Pro Ile Ile Gln Lys Val Tyr Gln Gly Ala Ala Gly Ser Gly
          100          105          110

Ala Glu Glu Ala Asp Ala Met Asp Asp Leu Leu Val Gly Arg Val Lys

115          120          125

Arg Lys Thr Gly Lys Ala Gly Thr
130          135
    
```

5 (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:50:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 510 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) CADENA: sencilla

10

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(vi) FUENTE ORIGINAL:

(A) ORGANISMO: Leishmania chagasi

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:50:

ES 2 373 878 T3

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

ES 2 373 878 T3

Gly Ser Tyr Leu Ala Ala Gly Thr Ser Leu Ser Pro Tyr Glu Ala Leu  
 180 185 190  
 Met Asn Glu Tyr Glu Pro Gly Ile Thr Thr Gln Lys Leu Asp Glu Val  
 195 200 205  
 Tyr Ala Asn Val Lys Ser Trp Leu Pro Gln Leu Leu Lys Asp Ile Val  
 210 215 220  
 Gln Lys Gln Ser Gly Glu Ser Val Ile Ala Phe Ser His Lys Phe Pro  
 225 230 235 240  
 Gln Asp Lys Gln Glu Ala Leu Cys Lys Glu Phe Met Lys Ile Trp His  
 245 250 255  
 Phe Asp Thr Asp Ala Gly Arg Leu Asp Val Ser Pro His Pro Phe Thr  
 260 265 270  
 Gly Met Thr Lys Glu Asp Cys Arg Leu Thr Thr Asn Tyr Ile Glu Asp  
 275 280 285  
 Thr Phe Val Gln Ser Leu Tyr Gly Val Ile His Glu Ser Gly His Gly  
 290 295 300  
 Lys Tyr Glu Gln Asn Cys Gly Pro Arg Glu His Ile Thr Gln Pro Val  
 305 310 315 320  
 Cys Asn Ala Arg Ser Leu Gly Leu His Glu Ser Gln Ser Leu Phe Ala  
 325 330 335  
 Glu Phe Gln Ile Gly His Ala Thr Pro Phe Ile Asp Tyr Leu Thr Thr  
 340 345 350  
 Arg Leu Pro Glu Phe Phe Glu Ala Gln Pro Ala Phe Ser Gln Asp Asn  
 355 360 365  
 Met Arg Lys Ser Leu Gln Gln Val Lys Pro Gly Tyr Ile Arg Val Asp  
 370 375 380  
 Ala Asp Glu Val Cys Tyr Pro Leu His Val Ile Leu Arg Tyr Glu Ile  
 385 390 395 400  
 Glu Arg Asp Leu Met Glu Gly Lys Met Glu Val Glu Asp Val Pro Arg  
 405 410 415  
 Ala Trp Asn Ala Lys Met Gln Glu Tyr Leu Gly Leu Ser Thr Glu Gly  
 420 425 430  
 Arg Asp Asp Val Gly Cys Leu Gln Asp Val His Trp Ser Met Val Arg  
 435 440 445  
 Ser Ala Thr Leu Arg Arg Thr Arg Ser Ala Pro Cys Met Arg Arg Arg  
 450 455 460  
 Ser Trp Arg Ala Ser Glu Arg Ser Trp Glu Thr Thr Arg Trp Met Ser  
  
 465 470 475 480  
 Ala Cys Ala Pro Val Ser Ser Ala Pro Ser Trp Lys Ser Ser Arg Arg  
 485 490 495  
 Arg Ser Gly Ile Met Gly Ala Cys Thr Arg Arg Thr Thr Ser  
 500 505 510

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:51:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 107 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (C) CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

5

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(vi) FUENTE ORIGINAL:

- (A) ORGANISMO: Leishmania chagasi

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:51:

```

Gly Arg Arg Met Ala Ile His Arg Lys Met Thr Ala Met Ala Leu Arg
1      5      10      15
Arg Thr Ala Val His Arg Lys Thr Thr Thr Val Ala Leu Arg Arg Thr
20      25      30
Ala Ile His Arg Lys Met Thr Ala Met Ala Leu Arg Arg Thr Ala Val
35      40      45
His Arg Lys Ile Thr Ala Met Ala Leu Arg Arg Thr Ala Ile His Arg
50      55      60
Lys Met Thr Ala Met Pro Leu Arg Arg Thr Ala Val His Xaa Lys Met
65      70      75      80
Thr Ala Met Ala Leu Arg Arg Thr Ala Val His Arg Lys Met Thr Ala
85      90      95
Met Ala Leu Arg Xaa Thr Pro Tyr Thr Glu Lys
100      105
    
```

10

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:52:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 63 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (C) CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

15

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(vi) FUENTE ORIGINAL:

- (A) ORGANISMO: Leishmania chagasi

20

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:52:

```

Val Arg Glu Thr Arg Thr Cys Met Leu Leu Val Glu Gly Ala Glu Leu
1           5           10           15

Val Pro Leu Met His Lys His Glu Val Val His Cys Leu Val Arg His
          20           25           30

Phe Pro Glu His Asn Glu Gln Arg His His Thr Ala Ser Asn Ser Arg
          35           40           45

Gln Ser Glu Cys Asp Ala His Thr Lys Ser Lys Val Val Asp Gln
          50           55           60
    
```

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:53:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 324 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(vi) FUENTE ORIGINAL:

(A) ORGANISMO: Leishmania chagasi

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:53:

```

Phe Arg Gly Ile Pro Arg Asn Ser Val Arg Arg Gly Thr Arg Thr Gly
1           5           10           15

Val Asp Ser Asp Ala Thr Ser Ser Thr Thr Ala Ala Tyr Asp Gly Ala
          20           25           30

Gly Ser Ala Pro Val Met Val Asp Ala Asn Val Ser His Pro Pro Tyr
          35           40           45

Ala Gly His Asp Gln Val Tyr Met His Val Gly Lys Pro Ile Val Gly
          50           55           60

Asn Thr Leu Asp Gly Tyr Asn Gly Cys Val Phe Ala Tyr Gly Xaa Thr
          65           70           75           80

Gly Ser Gly Lys Thr Phe Thr Met Leu Gly Tyr Ala Pro Ser Thr Xaa
          85           90           95
    
```

Asp Ile Arg Ala Arg Lys Gly Ser Val Pro Cys Gly Ala Ser Ser Met  
 100 105 110  
 Glu Asn Ser Thr Pro Leu Asp Ser Ala Val Glu Pro Phe Glu Ser Asp  
 115 120 125  
 Asp Gly Asp Asp Val Val Asp Lys Thr Gly Leu Asp Pro Asn Glu Leu  
 130 135 140  
 Gln Gly Ile Ile Pro Arg Ala Cys Thr Asp Leu Phe Asp Gly Leu Arg  
 145 150 155 160  
 Ala Lys Arg Ala Lys Asp Ser Asp Phe Thr Tyr Arg Val Glu Val Ser  
 165 170 175  
 Tyr Tyr Glu Ile Tyr Asn Glu Lys Val Phe Asp Leu Ile Arg Pro Gln  
 180 185 190  
 Arg Asn Thr Asp Leu Arg Ile Arg Asn Ser Pro Asn Ser Gly Pro Phe  
 195 200 205  
 Ile Glu Gly Leu Thr Trp Lys Met Val Ser Lys Glu Glu Asp Val Ala  
 210 215 220  
 Arg Val Ile Arg Lys Gly Met Gln Glu Arg His Thr Ala Ala Thr Lys  
 225 230 235 240  
 Phe Asn Asp Arg Ser Ser Arg Ser His Ala Ile Leu Thr Phe Asn Ile  
 245 250 255  
 Val Gln Leu Ser Met Asp Asp Ser Asp Asn Ala Phe Gln Met Arg Ser  
 260 265 270  
 Lys Leu Asn Leu Val Asp Leu Ala Gly Ser Glu Arg Thr Gly Ala Ala  
 275 280 285  
 Gly Ala Glu Gly Asn Glu Phe His Asp Gly Val Lys Ile Asn His Ser  
 290 295 300  
 Leu Thr Val Leu Gly Arg Val Ile Asp Arg Leu Ala Asp Leu Ser Gln  
 305 310 315 320  
 Asn Lys Gly Gly

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:54:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 1585 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADENA: doble
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:54:

AAAGCTGGAG CTCCACCGCG GTGGCGGCCG CTCTAGAACT AGTGGATCCC CCGGGCTGCA 60  
 GGAATTCGGC ACGAGTGCTG CCCGACATGA CATGCTCGCT GACCGGACTT CAGTGCCACG 120  
 ACCCGAAGCTG CAAGACCTGC ACAACTTACG GTCAGTGAC AGACTGCAAC GACGGCTACG 180  
 GTCTCACCTC CTCCAGCGTT TGCCTGCGCT GCAGTGTAGC GGGCTGCAAG AGCTGCCCCG 240  
 TCGACGCTAA CGTCTGCAA GTGTGTCTCG GCGGCAGCGA GCCGATCAAC AATATGTGCC 300  
 CCTGCACCGA CCCCAACTGC GCCAGCTGCC CCAGCGACGC TGGCACGTGC ACTCAGTGCG 360  
 CGAACGGCTA CGGTCTCGTG GACGGCGCCT GTGTGAGATG CCAGGAGCCC AACTGCTTCA 420  
 GCTGCGACAG CGACGCGAAT AAGTGCACAC AATGTGCGCC GAACTACTAC CTCACCCCGC 480  
 TCTTGACCTG CTCCCCGGTG GCCTGCAACA TCAGACTG CATGCAGTGC GACCCACAGA 540  
 CGCCGTCGCG CTGCCAGGAG TGCCTGTCCC CCTACGTGGT TGACAGCTAC GACGGCCTCT 600  
 GCAGGCTCTC CGATGCCTGC TCCGTGCCCA ACTGCAAGAA GTGCGAGACC GGTACCTCCA 660  
 GGCTCTGCGC CGAGTGCAGC ACCGGCTACA GTCTCTCCGC CGACGCGACG AGCTGCAGCA 720  
 GTCCAACCAC GCAGCCGTGC GAGGTGGAGC ACTGCAACAC ATGTGTGAAC GGCGATAGCA 780  
 CCCGCTGTGC CTAAGTCAAC ACCGGCTACT AGTCTCCGA TGGCAAGTGC AAGGCCATGC 840  
 AGGGCTGCTA CGTGTGCAAC TGCCTGCGAGT GCATGCTGCT TGACAGCACC AAGTGTCTCA 900  
 CGTGCCTGAA AGGGTACCTG CTCACGTCTG CCTACAGTTG CGTCTCGCAG AAAGTCATCA 960  
 ACAGTGCAGC CGCGCCCTAC TCTCTGTGGG TGGCCGCGC CGTGCTCCTC ACCTCTTTTG 1020  
 CCATGCACCT AGCATAGTGC GCAGCGGCAT GCGAACAACC CCACTCTCAT TCTCCAACAT 1080  
 GTGCATACAC ACACACACAG ACAGCGGGGC AGCACCCCT CCCACACAC ACACACGCAC 1140  
 TTCCCCCTG TCTGTCTT CTTCCTCGN TTCGCATTC TTCTCTCGT GCGCTGGCGC 1200  
 CGGCCTCTG CAGTCTGCTC CCCTCCCCCT AACCTCTATT CTCTCTCTCT CTCTCTCTCG 1260  
 CCGGCATCAT TGCTTCTTAC CCTTTTCTGA TCCTTGCTCG CGTGGGCGGA CACTGCCACA 1320  
 GTCCACAGC GCAGACACAG GTGTTTAAAC GGCGCAGGCA TCCCTCCCTA TCACTTCATT 1380  
 TCTCTAAAG CCACTACCA AGTGCACAC CGCCCTCCC CATCGGCCGC CCTTCCGGGC 1440  
 GCAGCTGTGC GGAATGGGTG TGTGCTCGAC CTCGTTCTG GCAGCTCACT CGCATGTGTA 1500

CAGCCACTCC AACCACGAAA GCTCTCTTCT GCGCACATAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA 1560  
 CTCGAGGGGG GGCCCGGTAC CCAA 1585

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:55:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

5

- (A) LONGITUD: 320 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (C) CADENA:
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

ES 2 373 878 T3

(v) TIPO DE FRAGMENTO: interno

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:55:

Val Leu Pro Asp Met Thr Cys Ser Leu Thr Gly Leu Gln Cys Thr Asp  
 1 5 10 15  
 Pro Asn Cys Lys Thr Cys Thr Thr Tyr Gly Gln Cys Thr Asp Cys Asn  
 20 25 30  
 Asp Gly Tyr Gly Leu Thr Ser Ser Ser Val Cys Val Arg Cys Ser Val  
 35 40 45  
 Ala Gly Cys Lys Ser Cys Pro Val Asp Ala Asn Val Cys Lys Val Cys  
 50 55 60  
 Leu Gly Gly Ser Glu Pro Ile Asn Asn Met Cys Pro Cys Thr Asp Pro  
 65 70 75 80  
 Asn Cys Ala Ser Cys Pro Ser Asp Ala Gly Thr Cys Thr Gln Cys Ala  
 85 90 95  
 Asn Gly Tyr Gly Leu Val Asp Gly Ala Cys Val Arg Cys Gln Glu Pro  
 100 105 110  
 Asn Cys Phe Ser Cys Asp Ser Asp Ala Asn Lys Cys Thr Gln Cys Ala  
 115 120 125  
 Pro Asn Tyr Tyr Leu Thr Pro Leu Leu Thr Cys Ser Pro Val Ala Cys  
 130 135 140  
 Asn Ile Glu His Cys Met Gln Cys Asp Pro Gln Thr Pro Ser Arg Cys  
 145 150 155 160  
 Gln Glu Cys Val Ser Pro Tyr Val Val Asp Ser Tyr Asp Gly Leu Cys  
 165 170 175  
  
 Arg Leu Ser Asp Ala Cys Ser Val Pro Asn Cys Lys Lys Cys Glu Thr  
 180 185 190  
 Gly Thr Ser Arg Leu Cys Ala Glu Cys Asp Thr Gly Tyr Ser Leu Ser  
 195 200 205  
 Ala Asp Ala Thr Ser Cys Ser Ser Pro Thr Thr Gln Pro Cys Glu Val  
 210 215 220  
 Glu His Cys Asn Thr Cys Val Asn Gly Asp Ser Thr Arg Cys Ala Tyr  
 225 230 235 240  
 Cys Asn Thr Gly Tyr Tyr Val Ser Asp Gly Lys Cys Lys Ala Met Gln  
 245 250 255  
 Gly Cys Tyr Val Ser Asn Cys Ala Gln Cys Met Leu Leu Asp Ser Thr  
 260 265 270  
 Lys Cys Ser Thr Cys Val Lys Gly Tyr Leu Leu Thr Ser Ser Tyr Ser  
 275 280 285  
 Cys Val Ser Gln Lys Val Ile Asn Ser Ala Ala Ala Pro Tyr Ser Leu  
 290 295 300  
 Trp Val Ala Ala Ala Val Leu Leu Thr Ser Phe Ala Met His Leu Ala  
 305 310 315 320

5 (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:56:



(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 14 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) CADENA:

5

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(v) TIPO DE FRAGMENTO: interno

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:56:

**Pro Lys Glu Asp Gly His Ala Pro Lys Asn Asp Asp His Ala**  
**1 5 10**

10 (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:57:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 7 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) CADENA:

15

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(v) TIPO DE FRAGMENTO: interno

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:57:

**Pro Lys Glu Asp Gly His Ala**  
**1 5**

20 (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:58:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 7 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) CADENA:

25

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(v) TIPO DE FRAGMENTO: interno

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:58:

**Pro Lys Asn Asp Asp His Ala**  
**1 5**

30 (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:59:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 264 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:59:

ATGCACCATC ATCACCATCA CATGGGAAGC TCCTGCACGA AGGACTCCGC AAAGGAGCCC	60
CAGAAGCGTG CTGATAACAT CGATACGACC ACTCGAAGCG ATGAGAAGGA CGGCATCCAT	120
GTCCAGGAGA GCGCCGGTCC TGTGCAGGAG AACTTCGGGG ATGCGCAGGA GAAGAACGAA	180
GATGGACACA ACGTGGGGGA TGGAGCTAAC GACAATGAGG ATGGTAACGA TGATCAGCCG	240

5

AAGGAGCAGG TTGCCGGCAA CTAG

264

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:60:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 744 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

10

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:60:

ATGGGAGCCT ACTGCACGAA GGACTCCGCA AAGGAGCCCC AGAAGCGTGC TGATAACATC	60
CATAAAACCA CTGAGGCCAA TCACAGAGGC GCCGCCGGTG TGCCCCGAA GCACGCCGGC	120
GGTGCATGA ACGACTCTGC CCCGAAGGAG GATGGCCATA CACAGAAAAA TGACGGCGAT	180
GGCCCTAAGG AGGACGGCCG TACACAGAAA AACGACGACG GTGGCCCTAA GGAGGACGGC	240
CATACACAGA AAAATGACGG CGATGGCCCT AAGGAGGACG GCCGTACACA GAAAAATAAC	300
GGCGATGGCC CTAAGGAGGA CGGCCATACA CAGAAAAATG ACGGCGATGC CCCTAAGGAG	360
GACGGCCGTA CACAGAAAAA TGACGGCGAT GGCCCTAAGG AGGACGGCCG TACACAGAAA	420
AATGACGGCG ATGGCCCTAA GGAGGACGGC CGTACACAGA AAAATGACGG CGATGGCCCT	480
AAGGAGGACG GCCGTACACA GAAAAATGAC GGCGATGGCC CTAAGGAGGA CGGCCATACA	540
CAGAAAAATG ACGGCGATGG CCCTAAGGAG GACGGCCGTA CACAGAAAAA TGACGGCGGT	600
GGCCCTAAGG AGGATGAGAA TCTGCAGCAA AACGATGGGA ATGCGCAGGA GAAGAACGAA	660
GATGGACACA ACGTGGGGGA TGGAGCTAAC GGCAATGAGG ATGGTAACGA TGATCAGCCG	720
AAGGAGCAGG TTGCCGGCAA CTAG	744

15 (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:61:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 80 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) CADENA:

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:61:

```

Met Gly Ser Ser Cys Thr Lys Asp Ser Ala Lys Glu Pro Gln Lys Arg
1           5           10           15
Ala Asp Asn Ile Asp Thr Thr Thr Arg Ser Asp Glu Lys Asp Gly Ile
20           25           30
His Val Gln Glu Ser Ala Gly Pro Val Gln Glu Asn Phe Gly Asp Ala
35           40           45
Gln Glu Lys Asn Glu Asp Gly His Asn Val Gly Asp Gly Ala Asn Asp
50           55           60
Asn Glu Asp Gly Asn Asp Asp Gln Pro Lys Glu Gln Val Ala Gly Asn
65           70           75           80
    
```

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:62:

5

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 247 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) CADENA:

(D) TOPOLOGÍA: lineal

10

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:62:

```

Met Gly Ala Tyr Cys Thr Lys Asp Ser Ala Lys Glu Pro Gln Lys Arg
1           5           10           15
Ala Asp Asn Ile His Lys Thr Thr Glu Ala Asn His Arg Gly Ala Ala
20           25           30
Gly Val Pro Pro Lys His Ala Gly Gly Ala Met Asn Asp Ser Ala Pro
35           40           45
Lys Glu Asp Gly His Thr Gln Lys Asn Asp Asp Gly Gly Pro Lys Glu
50           55           60
Asp Gly Arg Thr Gln Lys Asn Asp Asp Gly Gly Pro Lys Glu Asp Gly
65           70           75           80
His Thr Gln Lys Asn Asp Gly Asp Gly Pro Lys Glu Asp Gly Arg Thr
85           90           95
Gln Lys Asn Asn Gly Asp Gly Pro Lys Glu Asp Gly His Thr Gln Lys
100          105          110
Asn Asp Gly Asp Ala Pro Lys Glu Asp Gly Arg Thr Gln Lys Asn Asp
115          120          125
    
```

Gly Asp Gly Pro Lys Glu Asp Gly Arg Thr Gln Lys Asn Asp Gly Asp  
 130 135 140

Gly Pro Lys Glu Asp Gly Arg Thr Gln Lys Asn Asp Gly Asp Gly Pro  
 145 150 155 160

Lys Glu Asp Gly Arg Thr Gln Lys Asn Asp Gly Asp Gly Pro Lys Glu  
 165 170 175

Asp Gly His Thr Gln Lys Asn Asp Gly Asp Gly Pro Lys Glu Asp Gly  
 180 185 190

Arg Thr Gln Lys Asn Asp Gly Gly Gly Pro Lys Glu Asp Glu Asn Leu  
 195 200 205

Gln Gln Asn Asp Gly Asn Ala Gln Glu Lys Asn Glu Asp Gly His Asn  
 210 215 220

Val Gly Asp Gly Ala Asn Gly Asn Glu Asp Gly Asn Asp Asp Gln Pro  
 225 230 235 240

Lys Glu Gln Val Ala Gly Asn  
 245

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:63:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

5

- (A) LONGITUD: 14 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (C) CADENA:
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ix) CARACTERÍSTICA:

10

- (A) NOMBRE / CLAVE: Sitio modificado
- (B) LOCALIZACIÓN: 6
- (D) INFORMACIÓN ADICIONAL: /nota= "Xaa puede ser o bien His o Arg"

(ix) CARACTERÍSTICA:

15

- (A) NOMBRE / CLAVE: Sitio modificado
- (B) LOCALIZACIÓN: 12
- (D) INFORMACIÓN ADICIONAL: /nota= "Xaa puede ser o bien Gly o Asp"

(ix) CARACTERÍSTICA:

20

- (A) NOMBRE / CLAVE: Sitio modificado
- (B) LOCALIZACIÓN: 13
- (D) INFORMACIÓN ADICIONAL: /nota= "Xaa puede ser o bien Asp o Gly"

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:63:

**Pro Lys Glu Asp Gly Xaa Thr Gln Lys Asn Asp Xaa Xaa Gly**  
**1 5 10**

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:64:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 7 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) CADENA:

(D) TOPOLOGÍA: lineal

5

(ix) CARACTERÍSTICA:

(A) NOMBRE / CLAVE: Sitio modificado

(B) LOCALIZACIÓN: 6

(D) INFORMACIÓN ADICIONAL: /nota= "Xaa puede ser o bien His o Arg"

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:64:

**Pro Lys Glu Asp Gly Xaa Thr**  
**1 5**

10

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:65:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 7 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

15

(C) CADENA:

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ix) CARACTERÍSTICA:

(A) NAME/tOrY: Sitio modificado

(B) LOCALIZACIÓN: 5

20

(D) INFORMACIÓN ADICIONAL: /nota= "Xaa puede ser o bien Gly o Asp"

(ix) CARACTERÍSTICA:

(A) NOMBRE / CLAVE: Sitio modificado

(B) LOCALIZACIÓN: 6

(D) INFORMACIÓN ADICIONAL: /nota= "Xaa puede ser o bien Asp o Gly"

25

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:65:

**Gln Lys Asn Asp Xaa Xaa Gly**  
**1 5**

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:66:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 17 aminoácidos

30

(B) TIPO: aminoácido

(C) CADENA:

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:66:

Gly Cys Gly Pro Lys Glu Asp Gly Arg Thr Gln Lys Asn Asp Gly Asp  
 1 5 10 15

Gly

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:67:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 31 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) CADENA:

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:67:

Gly Cys Gly Pro Lys Glu Asp Gly Arg Thr Gln Lys Asn Asp Gly Asp  
 1 5 10 15

Gly Pro Lys Glu Asp Gly Arg Thr Gln Lys Asn Asp Gly Asp Gly  
 20 25 30

10 (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:68:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 45 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) CADENA:

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:68:

Gly Cys Gly Pro Lys Glu Asp Gly Arg Thr Gln Lys Asn Asp Gly Asp  
 1 5 10 15

Gly Pro Lys Glu Asp Gly Arg Thr Gln Lys Asn Asp Gly Asp Gly Pro  
 20 25 30

Lys Glu Asp Gly Arg Thr Gln Lys Asn Asp Gly Asp Gly  
 35 40 45

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:69:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 17 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) CADENA:

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:69:

Gly Cys Gly Pro Lys Glu Asp Gly His Thr Gln Lys Asn Asp Gly Asp  
 1 5 10 15

Gly

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:70:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

5

(A) LENGTH: 31 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) CADENA:

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:70:

Gly Cys Gly Pro Lys Glu Asp Gly His Thr Gln Lys Asn Asp Gly Asp  
 1 5 10 15

Gly Pro Lys Glu Asp Gly His Thr Gln Lys Asn Asp Gly Asp Gly  
 20 25 30

10

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 71:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 45 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) CADENA:

15

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:71:

Gly Cys Gly Pro Lys Glu Asp Gly His Thr Gln Lys Asn Asp Gly Asp  
 1 5 10 15

Gly Pro Lys Glu Asp Gly His Thr Gln Lys Asn Asp Gly Asp Gly Pro  
 20 25 30

Lys Glu Asp Gly His Thr Gln Lys Asn Asp Gly Asp Gly  
 35 40 45

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:72:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

20

(A) LONGITUD: 664 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:72:

ES 2 373 878 T3

GCTGCAGGAA TTCGGCACGA GATTGCTTCC CAGCCCACCT TCGCTATCCA GCCACTCTCG	60
CTCTTCTACA TCTCCCACCC CCTCACACCG CCATGGCTTC TTCCCGCAAG GCTTCCAACC	120
CGCACAAAGTC GCACCGCAAG CCGAAGCGCT CGTGGAACGT GTACGTGGGC CGCTCGCTGA	180
AGGCGATCAA CGCCCAGATG TCGATGTCGC ACCGCACGAT GAAGATCGTG AACTCGTACG	240
TGAACGACGT GATGGAGCGC ATCTGCACTG AGGCCGCGTC GATTGTTCGC GCGAACAAGA	300
AGCGCACGTT GGGTGC CGC GAGGTGCAGA CGGCGGTGCG CATTGTGCTG CCGGCGGAGC	360
TCGCGAAGCA TGCCATGGCT GAGGGCACGA AGGCCGTGTC GAGCGCGTCC CGCTAAAGCG	420
GCTTGCCGGA TGCCGTGTGA GTAGGAGGGT GGCTTGCCGC AAACGCTGAC CTCGGCGATT	480
GCGGCGTGGC GCTCCCCTTC TCCTCCTTGT CCGGCGGTGT GTGTCATGCA TTTGCGTGAC	540
TCCTCCCTCT TATAGATGCA AGCTTTTTTT TTCTCTTGAC GTTTTATTTT CTCCTCCCC	600
TCCCTTAACG TGAAGTGTAT ATGANAGCGT ACTGGACATG ANANAAAAAA AAAANAACT	660
CGAG	664

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:73:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 1432 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:73:

5



GATGAAGAAG AGGAGGACAC CACCATCAAC AACTCCGACG TGGTGGTGCG CTACAAGAAG 60  
 GCCGCAACGT GGTGCAATGA AACGTTGCGC GTGCTTATCG ATGCCACAAA ACCTGGCGCC 120  
 AAGGTGTGCG ACCTGTGCCG CCTCGGTGAT GACACCATCA CCGCCNAGGT CAAGACAATG 180  
 TTCAAAGGCA CGGAAAAGG CATCGCTTTC CCGACCTGCA TCTCGGTCAA CAACTGCGTA 240  
 TGCCACAACA GCCCTGGCGT GTCGGACGAG ACGACGCAGC AAGAGATCGC GATGGGTGAC 300  
 GTCGTGCACT ACGACCTGGG CATCCACGTG GACGGCTACT GCGCCGTCGT CGCGCACACC 360  
 ATTCAGGTGA CAGAGACAA TGAGCTTGGC AAGGACGAGA AGCGCGCGCG CGTCATTACA 420  
 GCGGCGTACA ACATCCTGAA CACGGCGCTG CGCCAGATGC GTCCCGGTAC GACCATCTAC 480  
 CAGGTGACAG ACGTAGTTGA GAAGGCTGCG GAGCACTACA AGGTGACTCC GGTAGACGGC 540  
 GTCCTCTCGC ATATGATGAA GCGCTACATC ATAGACNGAT ACCGCTGTAT CCCGACGCGC 600  
 AAGGTGCGCG AGCACATGGT GCACGACTAC GATCTCGAGA AAGCGCAGGT GTGGACGCTA 660  
 GACATTGTCA TGACCTCCGG CAAGGGCAAG CTGAAGGAGC GCGATGCGCG GCCGTGCGTG 720  
 TTCAAGGTGG CTCTGGACTC CAACTACTCT GTGAAAATGG AAAGCGCGAA GGAGGTTGAG 780  
 AAGGAAATCG ACTCCNAGTA TGCCACCTTC CCCTTTGCCA TCCGCAACCT GGAGGCCAAG 840  
 AAGGCCCGCC TCGGTCTCAA CGAGATGGCG AAGCACGGTG CTGTCATCCC GTACCCTATT 900  
 CTCTTCGAAA AGGAAGGCGA GGTGTCGCC CATTTCAGA TTACGGTGCT CATCAGCAAC 960  
 AAGAAGATTG AGCCGATTAC CGGCCTGAAG CCGCAGAAG CCCCAGCGCT CGAGCCATAC 1020  
 ACGGACGAGA TGCTGCTTGC GACGAACAAG CTCTTCGCTG TCGCTAGAGA AGAAGGCGGC 1080  
 GAAGTAGACG GCCGTGGCAT CCGTGACGCT GACTGCGAG CTITCGTAGG CGTACGCCTC 1140  
 TTGTAGGCGG TACACGTGTG CTGTTTGGCG ACGAGGAGGC ACCCATCTCG TTCCCCTTCT 1200  
 TCGCTAATCT TCGCGTTTCC TCTGACGCTG GCTTCTYTGC CGGAGTGTGG TGAGGCGCGT 1260  
 GGGGGAGAAA CGGCCACTY GCATGCCTGT GCATACGCGA GCACGGTAGG GAGCGCGGTG 1320

- - -

TGTGTGTGTG TGGGGGGGCG TGTTACGAGT ACAAAGAGG CTCGATCTTT GCGATCTTTT 1380  
 CTTTCTGTAA ACAGGAACAT AAGTAACCAA AAAAAAAAAA AAAAAACTCG AG 1432

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:74:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

5

(A) LONGITUD: 873 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:74:

CTTTATTGTC ATCACTGTAA AGCACTGTTT TTTCTTTCAC TTTTCTTGA GTGTTTTCTT	60
CTATTACCA TGAGCATTAT CAAGGAGGAC GACGCCGTGG GCTGCTACAT GACGGTGACC	120
CTCGTGGACG ACACCAAGGT GGAGGTACC ATCTTCACCT ACAATTCCAA GGAGGGCATC	180
ATAGTACTCC TGTCCCTCCG CGACGATCAG ACGAACATGA AGCTAATCCG CACTCCGTAC	240
ATCAAAGACT TCAGCCTTTC ACACGCTGAG GAGGGAGCGC ACCTGCCCCC GGCACTGGAC	300
TCCTTCAACG AGCTTCCGTC CATGCACGCC GGCCGCGACA AGTCCATCTT CAAGCACGCC	360
AGCACGCAGC TCAAGAACGC CGAGGCGAAC CGCGAAAAGC ACTTCAACTC TGTCACGACC	420
GACACACCGA TTGCCACACT TGATGCGTAC CTCAAGCTCC TCGGGCTATA CCCCTTAATT	480
GAGTGGAAAC GCGACGAGGG TGTATCCAG GTCTCGGACA CCGTCATTGT CGTAGGAGAC	540
CCCGACTGGC GGACGCCCAA GGCAATGCTG GTGGACGGCG CCCCTGAGAA GGACAGACCG	600
CTTGTAGATC GCCTGCAGGT TCGGCTCGGM AACGGCAAGA AGTGATTGAG TGTGTAGCGG	660
ACAGAACATC GTGTGCTTGT GTGTCTGTTT GANGTTTGT TGTCTTCTCT TTGTGGTACT	720
GCGTACGACG GCGCCTTCTC CCGGTGGTGG GTGAGTCCAT AAGCAGTTGA GTTCTYGGTT	780
GTAGNAAVGC CTYACYGCCG ACCATATGGG AGAGGGCGAA CAAATNTTTG ATAGAAGTTG	840
AAAATCCCAA AGTYAAAAGA AAAAAAAAAAN AAA	873

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:75:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 1238 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:75:

5

```

TTTCTGTACT TTATTGAACA TCAGTAGAAC ACGTTCCTCC CGCAAAGATG GCCAAGAAGC      60
ACCTCAAGCG CTTGTATGCG CCCAAGGACT GGATGCTGAG CAAGCTGACC GGCGTGTTCG      120
CGCCGCGTCC GCGTCCGGGT CCGCACAAGC TGC GCGAGTG CCTGCCGCTN CTGGTGATCA      180
TCCGCAACCG GCTGAAGTAC GCGCTGAACG CGCGCGAGGG TGAGATGATC CTGCGCCAGG      240
GTCTGGTGCA CGTGACAAC CACCCGCGCC GCGACGGCAA GTATCCCGCC GGTTCATGG      300
ACGTGGTCGA GATCCCGAAG ACGGGCGACC GCTTCCGCCT GATGTACGAC GTCAAGGGCC      360
GCTTCGCGTT GGTGAACCTG TCCGAGGCGG AGGCGCAGAT CAAGCTGATG AAGGTTGTGA      420
ACCTGTACAC GGCCACCGGC CGCGTGCCGG TCGCTGTGAC GCACGACGGC CACCGCATCC      480
GCTACCCGGA CCCGCACACC TCCATGGTG ACACCATCGT GTACAACGTC AAGGAGAAGA      540
AGTGCGTGGA CCTGATCAAG AACCGCCAGG GCAAGCCCGT GATCGTGACC GGTGGCGCCA      600
ACCGCGGCCG CATCGGCGAG ATCGTGAAGG TGGAGTGCCA CCCC GGTCG TTCAACATTG      660
CGCACCTGAA GGACCGCTCC GCGCGCGAGT TCGCCACCCG CGCCGCGAAC ATCTTCGTGA      720
TCGGCAAGGA CCTGAACAAC CTGCAGGTAA CGGTGCCGAA GCAGCAGGGC CTGCGCATGA      780
ACGTGATCCA GGAGCGCGAG GAGCGCCTGA TCGCGCGGGA GGCCCGCAAG AACGCGCCGG      840
CTCGTGGTGC CCGCAGGGCC CGCAAGTGAG GAGGCGATTA CACGCATGCG TGTTTGTGGC      900
TCTGAAGCGA CTTGGCGGGT CGGCTGTGAG GGTTCGAGAG GAGGTGTGTG ATGCGTGTGA      960
AGTCCTTCTC CGTCTCAGC TCTCTCTGTG CTGTAGCTGT GCCTTTCCCC AGATCGCTTT      1020
ACCGCATTG CATACATCTG TGTAGTCGCA TGTGCGTGT TCTGTCTCTC GGTGGGTCTC      1080
CCTCTCCCTC CCTTCTGCC TCTCTCTTG AGTGGGTGTG CATGCGTCGC GCGCGACGGG      1140
CTCCGCTTNA GTGATTCTCT CGTGTTTTAN GGCTGTTTTY TTTCTYAGTT NAGCGTTTTY      1200
GTTTCATGATT TCCTCAGACC CAAAAAAAAA AAAAAAAAAA      1238
    
```

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:76:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 712 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:76:

```

CTGACGGAGT TCCAGACGAA CCTTGTGCCG TACCCGCGCA TCCACTTCGT GCTGACAAGC      60
TACGCTCCGG TGGTGTCTGC CGAGAAGCGC TACCACGAGC AGCTNTCCGT CGCGGACATC      120
ACGAACTCGG TTTTTGAGCC TGCTGGCATG CTNACAAAGT GCGATCCTCG CCACGGCAAG      180
TACATGTCGT GCTGCCTCAT GTACCGCGGT GATGTCGTGC CGAAGGATGT CAACGCCGCG      240
ATTGCGACGA TCAAGACGAA GCGCACAAAT CAGTTCGTGG ACTGGTGCCC GACCGGCTTC      300
AAGTGGGCA TCAACTACCA GCCGCCGACC GTGTGCCCCG GCGGTGACCT CGCGAAGGTG      360
CAGCGCGCCG TGTGCATGAT TGCCAACTCG ACCGCGATCG CTGAGGTGTT TGCCCGCATC      420
GACCACAAGT TCGACCTGAT GTACAGCAAG CGCGCGTTTG TGCACTGGTA CGTGGGTGAG      480
GGCATGGAGG AGGGCGAGTT CTCCGAGGCG CGCGAGGATC TCGCTGCGCT GGAGAAGGAC      540
TACGAGGAGG TTGGCGCCGA GTCGCCGAC GACATGGGCG AGGAGGACGT CGAGGAGTAC      600
TAAGGTAGAC TCGTGCCCGG CGCTGATGAT GTAGGTGCAC GCGTGCGTGT GCTGCAGCGG      660
AGCCGCCGCC ACCGCGACTG TGTGTGTGTG CGCGCGTGAC GACCGGCTCG AG              712
    
```

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:77:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 1086 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:77:

```

CAAGAAGTGG ATCAAGCAGG AGACGAACGC CGATGGCGAG CGCGTGCGCC GCGCGTTCTG      60
CCAGTTCTGC CTAGACCCCA TCTACCAGAT CTTCGACGCT GTGATGAACG AGAAGAAGGA      120
CAAGGTGGAC AAGATGCTCA AGTCGCTGCA CGTGACGCTN ACGGCTGAGG AGCGCGAGCA      180
GGTGCCGAAN AAGCTTCTGA AGACGGTGAT GATGAANTTC CTGCCGGCTG CTGAGACGCT      240
GCTACAGATG ATCGTGGCGC ACCTGCCGTC GCCCAAGAAG GCGCAGGCGT ACCGTGCGGA      300
    
```

GATGCTGTAC TCTGGCGAGG CGTCGCCGGA GGACAAGTAC TTCATGGGTA TCAAGAAGCTG 360  
 CGACCCCGCT GCGCCGCTCA TGCTGTACAT CAGCAAGATG GTGCCGACGG CCGACCGCGG 420  
 CCGCTTCTTC GCCTTTGGCC GCATCTTCTC CGGTAAGGTG CGCAGCGGCC AGAAGGTGCG 480  
 CATCATGGGT AACAACTACG TCTACGGCAA GAAGCAGGAC CTGTACGAGG ACAAGCCTGT 540  
 GCAGCGCTCC GTGCTGATGA TGGGCCGCTA CCAGGAGGCC GTGGAGGACA TGCCGTGCGG 600  
 TAACGTGGTG GGCCTTGTGG GCGTGGACAA GTACATCGTG AAGTCCGCGA CGATCACGGA 660  
 CGATGGCGAG AGCCCGCACC CGTGCGCGA CATGAAGTAC TCTGTGTGCG CCGTGTGCG 720  
 TGTGGCCGTG GAGGCGAAGA ACCCGTCCGA CCTGCCGAAG CTTGTGGAGG GCCTGAAGCG 780  
 CCTTGCCAAG TCCGACCCGC TGGTGGTGTG CAGCATTGAG GAGTCTGGCG AGCACATTGT 840  
 TGCCGGCGCT GCGGAGCTTC ACCTTGAGAT TTGCCTGAAG GATCTCCAGG AGGACTTCAT 900  
 GAACGGCGCG CCGCTNAAGA TCTCCGAGCC GGTGGTGTGCG TTCCGCGAGA CGGTGACGGA 960  
 TGTGTGCTCG CAGCAGTGCC TGTGGAAGTC TGCGAACAAG CACAACCGTC TCTTCTGCGG 1020  
 CCGTGCGCCG CTNACAGAGG ANCTGGCGCT GCGGATNGAN GAAGGCACCG CTGGTCCCGA 1080  
 NGCGGA 1086

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:78:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 447 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

5

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:78:

CGCATCAACG TCTACTTCGA TNAGTCGACG GGAGGCCGCT ACGTGCCGCG CGCCGTGCTG 60  
 ATGGACCTCG AGCCCGGCAC TATGGACTCC GTTCGCGCCG GCCCGTACGG CCAGCTGTTC 120  
 CGCCCGGACA ACTTCATCTT TGGTCAGTCC GCGCTGGCA ACAACTGGGC CAAGGGCCAC 180  
 TACTGAGG GCGCGGAGCT GATCGACTCC GTGCTTGATG TGTGCCGCAA GGAGCGGAG 240  
 AGCTGCGACT GCCTGCAGGG CTTCCAGCTG TCTACTCCC TCGGCGGCGG CACGGGCTCC 300  
 GGCATGGGCA CGCTGCTCAT TTCCAANCTG CGCGANGAGT ACCCGGACCG GATCATGATG 360

ACCTTCTCCG TCATCCCGTC CCCCCGCGTG TCGGATACCG TTGTGGANCC GTACAACACG 420

ACCCTCTCTG TGCACCAGCT CGTGGAA 447

10

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:79:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 375 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADENA: sencilla

15

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:79:

```
GTAACCCGCT GGTGTACGCA TATGTAGACA CAGACGGGCA GCACGAGACG ACGTTCCTCG      60
CGATCCCTGT GGTGCTTGGC ATGAATGGAA TCGAGAAGCG CCTGCCGATT GGTCCGCTGC      120
ACTCGACGGA GGAAACGCTG CTGAAGGCGG CACTGCCGGT GATCAAGAAG AATATCGTGA      180
AGGGCAGCGA GTTCGCGCGC TCACACCTGT AGCACCTCAG CTTTTTTTTT TTGCGTTAAA      240
CGGGCGTGGG AAGCACCTCG ATACTTCGCT TCGCGCTGAC GGACCCGCAC GACATCGTTC      300
GTCATCCCCC TCCCCTCTT CGGCCCTATA CGCATGAAGG AGTGGAAATTA TGCAACAGCA      360
TGTTNATATC AAGTG                                     375
```

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:80:

5 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 107 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) CADENA:

(D) TOPOLOGÍA: lineal

10 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:80:

```
Met Ala Ser Ser Arg Lys Ala Ser Asn Pro His Lys Ser His Arg Lys
 1           5           10           15
Pro Lys Arg Ser Trp Asn Val Tyr Val Gly Arg Ser Leu Lys Ala Ile
 20           25           30
Asn Ala Gln Met Ser Met Ser His Arg Thr Met Lys Ile Val Asn Ser
 35           40           45
Tyr Val Asn Asp Val Met Glu Arg Ile Cys Thr Glu Ala Ala Ser Ile
 50           55           60
Val Arg Ala Asn Lys Lys Arg Thr Leu Gly Ala Arg Glu Val Gln Thr
 65           70           75           80
Ala Val Arg Ile Val Leu Pro Ala Glu Leu Ala Lys His Ala Met Ala
 85           90           95
Glu Gly Thr Lys Ala Val Ser Ser Ala Ser Arg
 100          105
```

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:81:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

15 (A) LONGITUD: 381 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) CADENA:

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:81:

ES 2 373 878 T3

Asp Glu Glu Glu Glu Asp Thr Thr Ile Asn Asn Ser Asp Val Val Val  
 1 5 10 15  
 Arg Tyr Lys Lys Ala Ala Thr Trp Cys Asn Glu Thr Leu Arg Val Leu  
 20 25 30  
 Ile Asp Ala Thr Lys Pro Gly Ala Lys Val Cys Asp Leu Cys Arg Leu  
 35 40 45  
 Gly Asp Asp Thr Ile Thr Ala Xaa Val Lys Thr Met Phe Lys Gly Thr  
 50 55 60  
 Glu Lys Gly Ile Ala Phe Pro Thr Cys Ile Ser Val Asn Asn Cys Val  
 65 70 75 80  
 Cys His Asn Ser Pro Gly Val Ser Asp Glu Thr Thr Gln Gln Glu Ile  
 85 90 95  
 Ala Met Gly Asp Val Val His Tyr Asp Leu Gly Ile His Val Asp Gly  
 100 105 110  
 Tyr Cys Ala Val Val Ala His Thr Ile Gln Val Thr Glu Asp Asn Glu  
 115 120 125  
 Leu Gly Lys Asp Glu Lys Ala Ala Arg Val Ile Thr Ala Ala Tyr Asn  
 130 135 140  
 Ile Leu Asn Thr Ala Leu Arg Gln Met Arg Pro Gly Thr Thr Ile Tyr  
 145 150 155 160

Gln Val Thr Asp Val Val Glu Lys Ala Ala Glu His Tyr Lys Val Thr  
 165 170 175

Pro Val Asp Gly Val Leu Ser His Met Met Lys Arg Tyr Ile Ile Asp  
 180 185 190

Xaa Tyr Arg Cys Ile Pro Gln Arg Arg Val Ala Glu His Met Val His  
 195 200 205

Asp Tyr Asp Leu Glu Lys Ala Gln Val Trp Thr Leu Asp Ile Val Met  
 210 215 220

Thr Ser Gly Lys Gly Lys Leu Lys Glu Arg Asp Ala Arg Pro Cys Val  
 225 230 235 240

Phe Lys Val Ala Leu Asp Ser Asn Tyr Ser Val Lys Met Glu Ser Ala  
 245 250 255

Lys Glu Val Gln Lys Glu Ile Asp Ser Xaa Tyr Ala Thr Phe Pro Phe  
 260 265 270

Ala Ile Arg Asn Leu Glu Ala Lys Lys Ala Arg Leu Gly Leu Asn Glu  
 275 280 285

Met Ala Lys His Gly Ala Val Ile Pro Tyr Pro Ile Leu Phe Glu Lys  
 290 295 300

Glu Gly Glu Val Val Ala His Phe Lys Ile Thr Val Leu Ile Ser Asn  
 305 310 315 320

Lys Lys Ile Glu Pro Ile Thr Gly Leu Lys Pro Gln Lys Ala Pro Ala  
 325 330 335

Leu Glu Pro Tyr Thr Asp Glu Met Leu Leu Ala Thr Asn Lys Leu Phe  
 340 345 350

Ala Val Ala Arg Glu Glu Gly Gly Glu Val Asp Gly Arg Gly Ile Arg  
 355 360 365

Asp Ala Val Leu Arg Ala Phe Val Gly Val Arg Leu Leu  
 370 375 380

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:82:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 191 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (C) CADENA:
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:82:



ES 2 373 878 T3

```

Met Ser Ile Ile Lys Glu Asp Asp Ala Val Gly Cys Tyr Met Thr Val
1           5           10           15

Thr Leu Val Asp Asp Thr Lys Val Glu Gly Thr Ile Phe Thr Tyr Asn
20           25           30

Ser Lys Glu Gly Ile Ile Val Leu Leu Ser Leu Arg Asp Asp Gln Thr
35           40           45

Asn Met Lys Leu Ile Arg Thr Pro Tyr Ile Lys Asp Phe Ser Leu Ser
50           55           60

His Ala Glu Glu Gly Ala His Leu Pro Pro Ala Leu Asp Ser Phe Asn
65           70           75           80

Glu Leu Pro Ser Met His Ala Gly Arg Asp Lys Ser Ile Phe Lys His
85           90           95

Ala Ser Thr Gln Leu Lys Asn Ala Glu Ala Asn Arg Glu Lys His Phe
100          105          110

Asn Ser Val Thr Thr Asp Thr Pro Ile Ala Thr Leu Asp Ala Tyr Leu
115          120          125

Lys Leu Leu Arg Leu Tyr Pro Leu Ile Glu Trp Asn Ser Asp Glu Gly
130          135          140

Val Ile Gln Val Ser Asp Thr Val Ile Val Val Gly Asp Pro Asp Trp
145          150          155          160

Arg Thr Pro Lys Ala Met Leu Val Asp Gly Ala Pro Glu Lys Asp Arg
165          170          175

Pro Leu Val Asp Arg Leu Gln Val Ala Leu Gly Asn Gly Lys Lys
180          185          190

```

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:83:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 273 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (C) CADENA:
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:83:

```

Met Ala Lys Lys His Leu Lys Arg Leu Tyr Ala Pro Lys Asp Trp Met
1           5           10           15

```

5

ES 2 373 878 T3

Leu Ser Lys Leu Thr Gly Val Phe Ala Pro Arg Pro Arg Pro Gly Pro  
 20 25 30

His Lys Leu Arg Glu Cys Leu Pro Leu Leu Val Ile Ile Arg Asn Arg  
 35 40 45

Leu Lys Tyr Ala Leu Asn Ala Arg Glu Gly Glu Met Ile Leu Arg Gln  
 50 55 60

Gly Leu Val His Val Asp Asn His Pro Arg Arg Asp Gly Lys Tyr Pro  
 65 70 75 80

Ala Gly Phe Met Asp Val Val Glu Ile Pro Lys Thr Gly Asp Arg Phe  
 85 90 95

Arg Leu Met Tyr Asp Val Lys Gly Arg Phe Ala Leu Val Asn Leu Ser  
 100 105 110

Glu Ala Glu Ala Gln Ile Lys Leu Met Lys Val Val Asn Leu Tyr Thr  
 115 120 125

Ala Thr Gly Arg Val Pro Val Ala Val Thr His Asp Gly His Arg Ile  
 130 135 140

Arg Tyr Pro Asp Pro His Thr Ser Ile Gly Asp Thr Ile Val Tyr Asn  
 145 150 155 160

Val Lys Glu Lys Lys Cys Val Asp Leu Ile Lys Asn Arg Gln Gly Lys  
 165 170 175

Ala Val Ile Val Thr Gly Gly Ala Asn Arg Gly Arg Ile Gly Glu Ile  
 180 185 190

Val Lys Val Glu Cys His Pro Gly Ala Phe Asn Ile Ala His Leu Lys  
 195 200 205

Asp Ala Ser Gly Ala Glu Phe Ala Thr Arg Ala Ala Asn Ile Phe Val  
 210 215 220

Ile Gly Lys Asp Leu Asn Asn Leu Gln Val Thr Val Pro Lys Gln Gln  
 225 230 235 240

Gly Leu Arg Met Asn Val Ile Gln Glu Arg Glu Glu Arg Leu Ile Ala  
 245 250 255

Ala Glu Ala Arg Lys Asn Ala Pro Ala Arg Gly Ala Arg Arg Ala Arg  
 260 265 270

Lys

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:84:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 200 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) CADENA:

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:84:

```

Leu Thr Glu Phe Gln Thr Asn Leu Val Pro Tyr Pro Arg Ile His Phe
1           5           10           15

Val Leu Thr Ser Tyr Ala Pro Val Val Ser Ala Glu Lys Ala Tyr His
          20           25           30

Glu Gln Leu Ser Val Ala Asp Ile Thr Asn Ser Val Phe Glu Pro Ala
          35           40           45

Gly Met Leu Thr Lys Cys Asp Pro Arg His Gly Lys Tyr Met Ser Cys
          50           55           60

Cys Leu Met Tyr Arg Gly Asp Val Val Pro Lys Asp Val Asn Ala Ala
          65           70           75           80

Ile Ala Thr Ile Lys Thr Lys Arg Thr Ile Gln Phe Val Asp Trp Cys
          85           90           95

Pro Thr Gly Phe Lys Cys Gly Ile Asn Tyr Gln Pro Pro Thr Val Val
          100          105          110

Pro Gly Gly Asp Leu Ala Lys Val Gln Arg Ala Val Cys Met Ile Ala
          115          120          125

Asn Ser Thr Ala Ile Ala Glu Val Phe Ala Arg Ile Asp His Lys Phe
          130          135          140

Asp Leu Met Tyr Ser Lys Arg Ala Phe Val His Trp Tyr Val Gly Glu
          145          150          155          160

Gly Met Glu Glu Gly Glu Phe Ser Glu Ala Arg Glu Asp Leu Ala Ala
          165          170          175

Leu Glu Lys Asp Tyr Glu Glu Val Gly Ala Glu Ser Ala Asp Asp Met
          180          185          190

Gly Glu Glu Asp Val Glu Glu Tyr
          195          200
    
```

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:85:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 361 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (C) CADENA:
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:85:

ES 2 373 878 T3

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

Gly Leu Lys Arg Leu Ala Lys Ser Asp Pro Leu Val Val Cys Ser Ile  
 260 265 270

Glu Glu Ser Gly Glu His Ile Val Ala Gly Ala Gly Glu Leu His Leu  
 275 280 285

Glu Ile Cys Leu Lys Asp Leu Gln Glu Asp Phe Met Asn Gly Ala Pro  
 290 295 300

Leu Lys Ile Ser Glu Pro Val Val Ser Phe Arg Glu Thr Val Thr Asp  
 305 310 315 320

Val Ser Ser Gln Gln Cys Leu Ser Lys Ser Ala Asn Lys His Asn Arg  
 325 330 335

Leu Phe Cys Arg Gly Ala Pro Leu Thr Glu Xaa Leu Ala Leu Ala Xaa  
 340 345 350

Xaa Glu Gly Thr Ala Gly Pro Xaa Ala  
 355 360

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:86:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 149 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (C) CADENA:
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

5

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:86:

Arg Ile Asn Val Tyr Phe Asp Xaa Ser Thr Gly Gly Arg Tyr Val Pro  
 1 5 10 15

Arg Ala Val Leu Met Asp Leu Glu Pro Gly Thr Met Asp Ser Val Arg  
 20 25 30

Ala Gly Pro Tyr Gly Gln Leu Phe Arg Pro Asp Asn Phe Ile Phe Gly  
 35 40 45

Gln Ser Gly Ala Gly Asn Asn Trp Ala Lys Gly His Tyr Thr Glu Gly  
 50 55 60

Ala Glu Leu Ile Asp Ser Val Leu Asp Val Cys Arg Lys Glu Ala Glu  
 65 70 75 80

Ser Cys Asp Cys Leu Gln Gly Phe Gln Leu Ser His Ser Leu Gly Gly  
 85 90 95

Gly Thr Gly Ser Gly Met Gly Thr Leu Leu Ile Ser Xaa Leu Arg Xaa  
 100 105 110

Glu Tyr Pro Asp Arg Ile Met Met Thr Phe Ser Val Ile Pro Ser Pro  
 115 120 125

Arg Val Ser Asp Thr Val Val Xaa Pro Tyr Asn Thr Thr Leu Ser Val  
 130 135 140

His Gln Leu Val Glu  
 145

10

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:87:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 69 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) CADENA:

(D) TOPOLOGÍA: lineal

5

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:87:

```

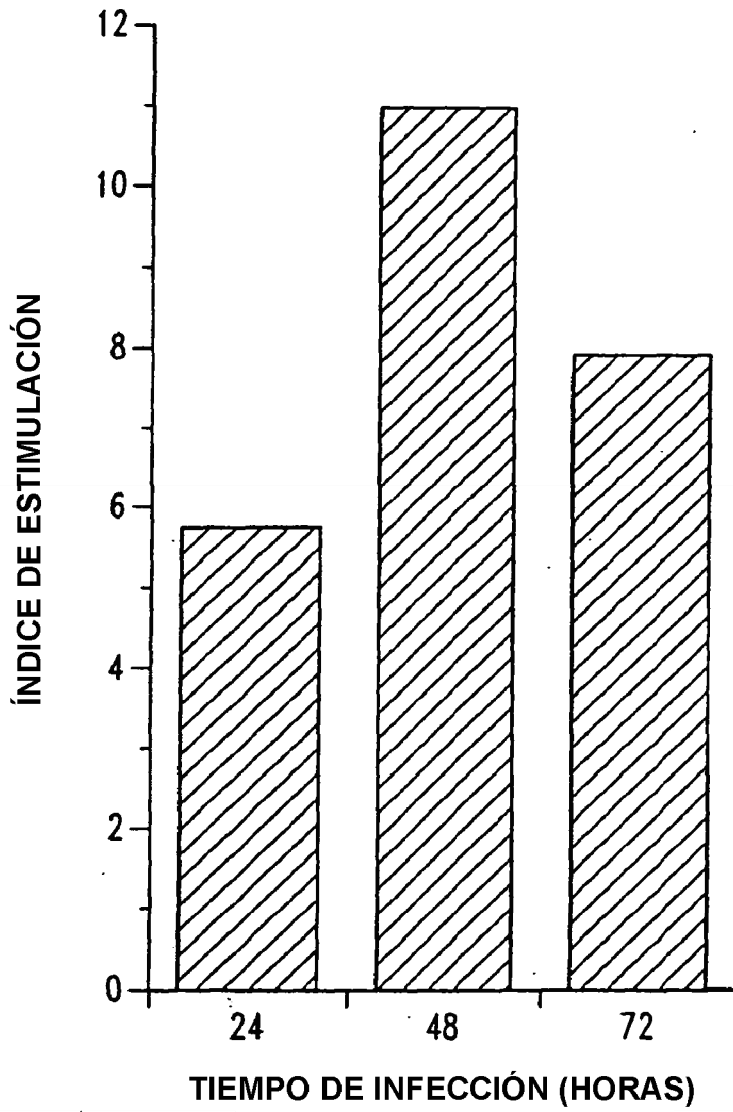
Asn Pro Leu Val Tyr Ala Tyr Val Asp Thr Asp Gly Gln His Glu Thr
1           5           10           15
Thr Phe Leu Ala Ile Pro Val Val Leu Gly Met Asn Gly Ile Glu Lys
          20           25           30
Arg Leu Pro Ile Gly Pro Leu His Ser Thr Glu Glu Thr Leu Leu Lys
          35           40           45
Ala Ala Leu Pro Val Ile Lys Lys Asn Ile Val Lys Gly Ser Glu Phe
          50           55           60
Ala Arg Ser His Leu
          65
    
```

10

**REIVINDICACIONES**

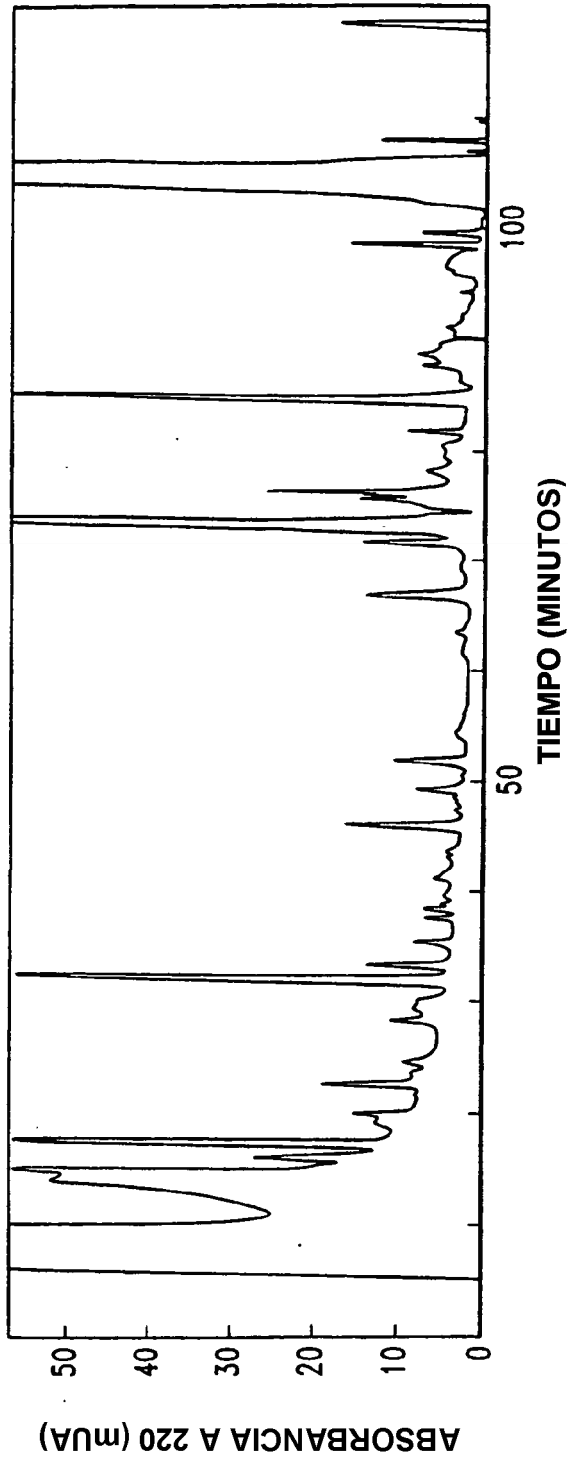
1. Un polipéptido que comprende una porción inmunogénica de un antígeno de *Leishmania*, teniendo el antígeno la secuencia de aminoácidos citada en el SEQ ID NO: 24.
- 5 2. Una molécula de ADN aislada que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1.
3. Un vector de expresión recombinante que comprende la molécula de ADN de la reivindicación 2.
4. Una célula anfitriona transformada o transfectada con el vector de expresión de la reivindicación 3.
5. Una composición farmacéutica que incluye el polipéptido de la reivindicación 1, o la molécula de ADN aislada de la reivindicación 2 y un portador fisiológicamente aceptable.
- 10 6. Una vacuna que incluye el polipéptido de la reivindicación 1 o la molécula de ADN de la reivindicación 2, junto con un intensificador de la respuesta inmunitaria no específico.
7. Una composición farmacéutica de la reivindicación 5 para su uso en la inducción de inmunidad protectora contra la Leismaniasis en un paciente.
- 15 8. La vacuna de la reivindicación 6 para su uso en la inducción de inmunidad protectora contra la Leismaniasis en un paciente.
9. La composición farmacéutica de la reivindicación 5 para su uso en la detección de la infección por *Leishmania* en un paciente.

20

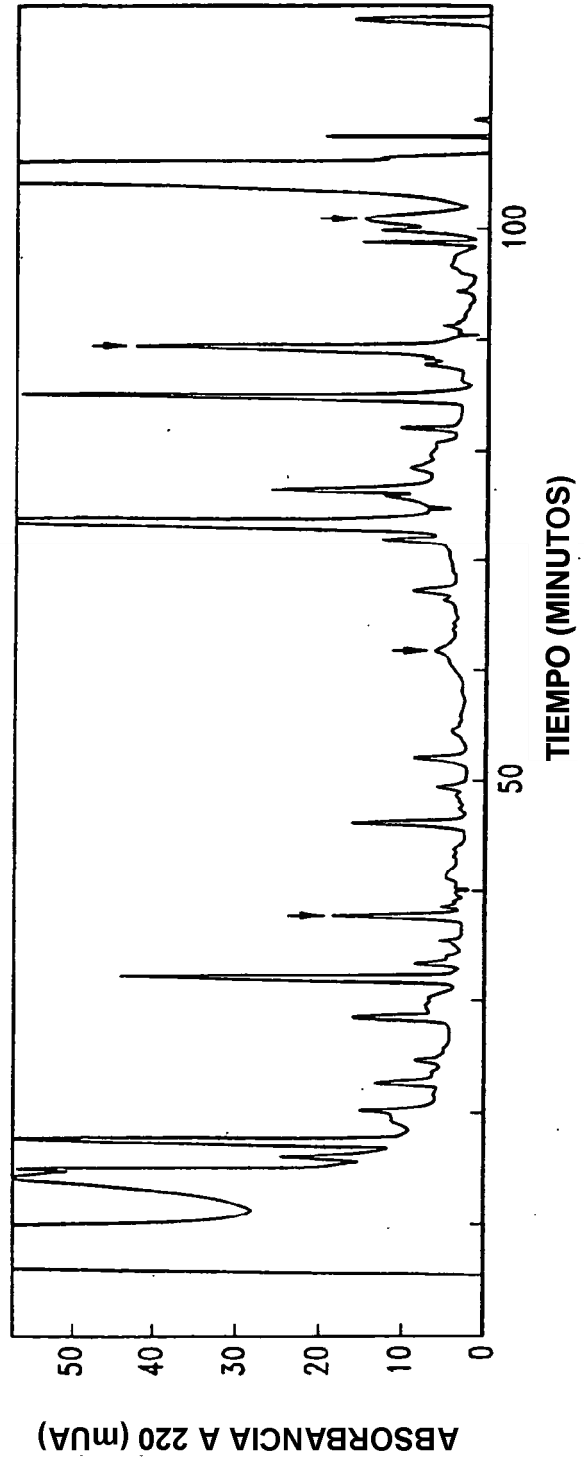


*Fig. 1*

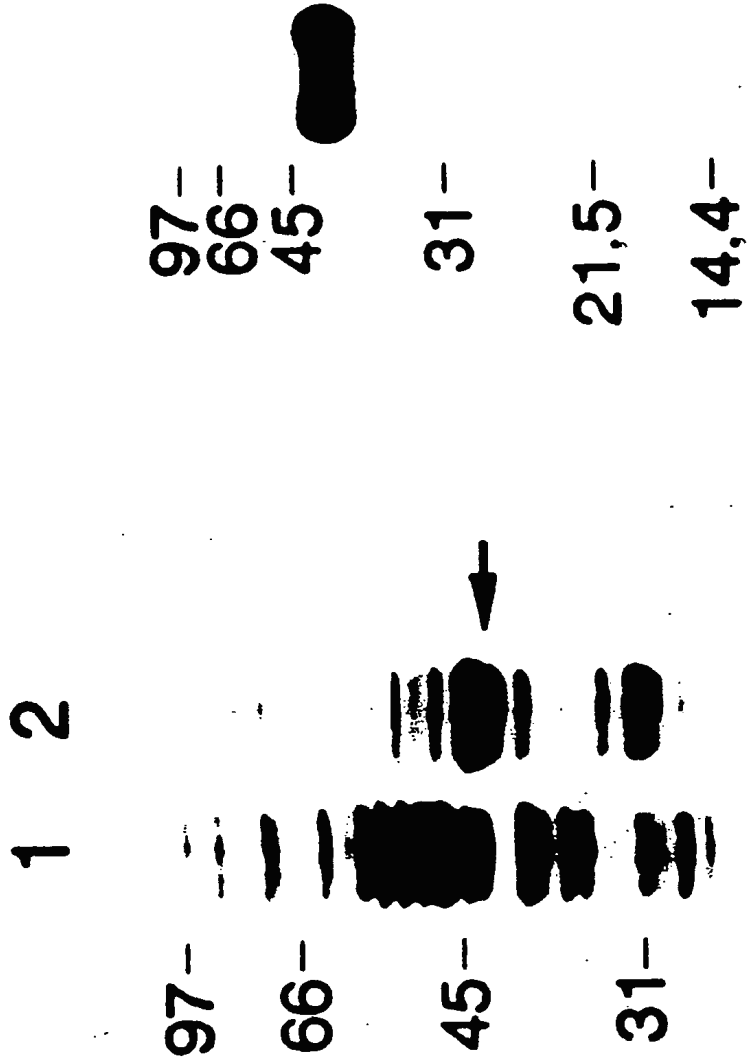




*Fig. 2A*

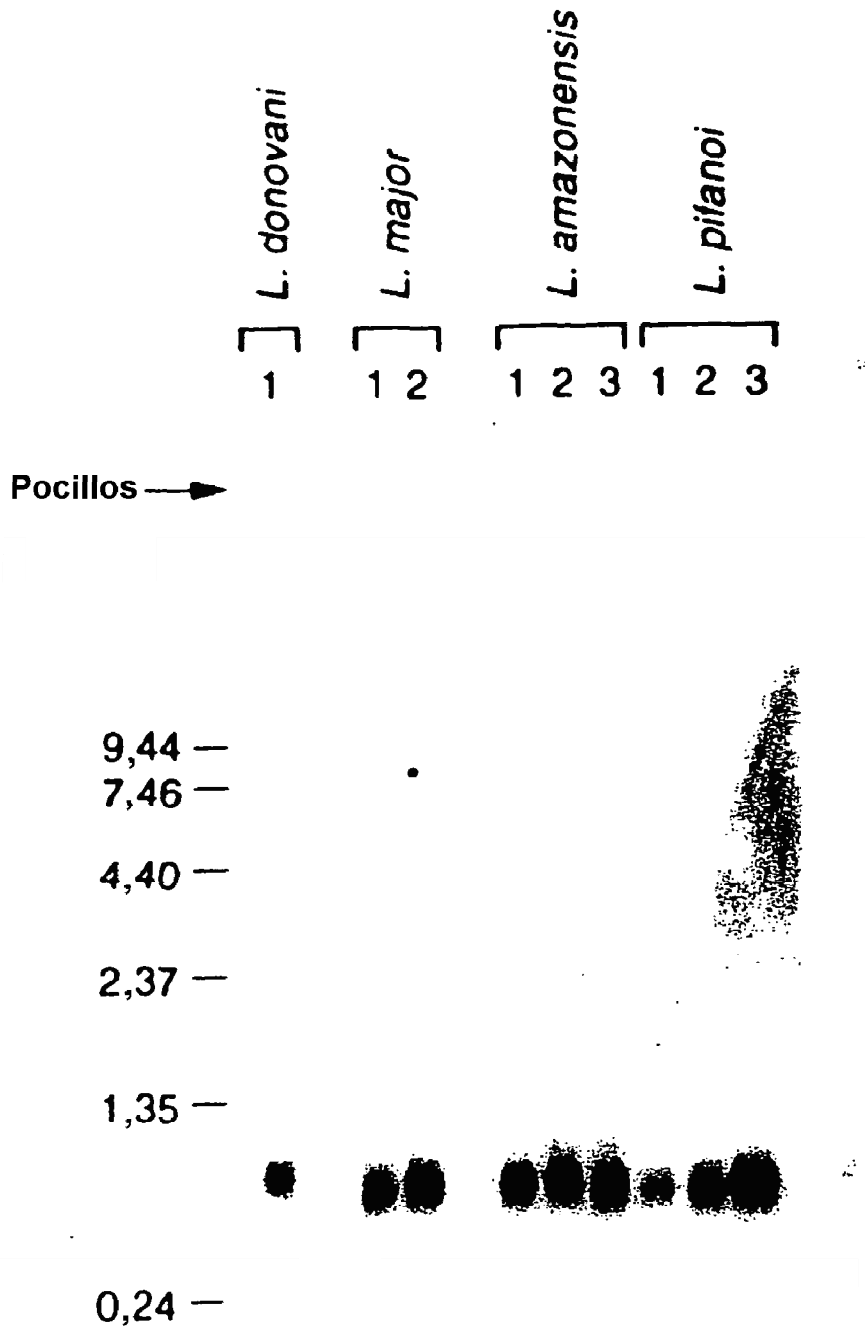


*Fig. 2B*

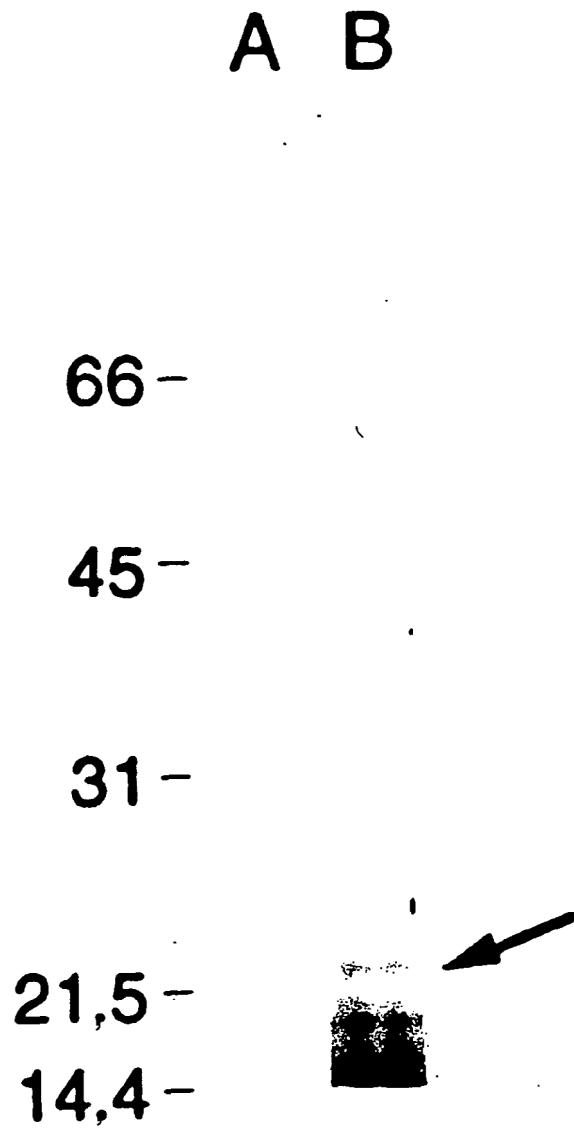


*Fig. 3B*

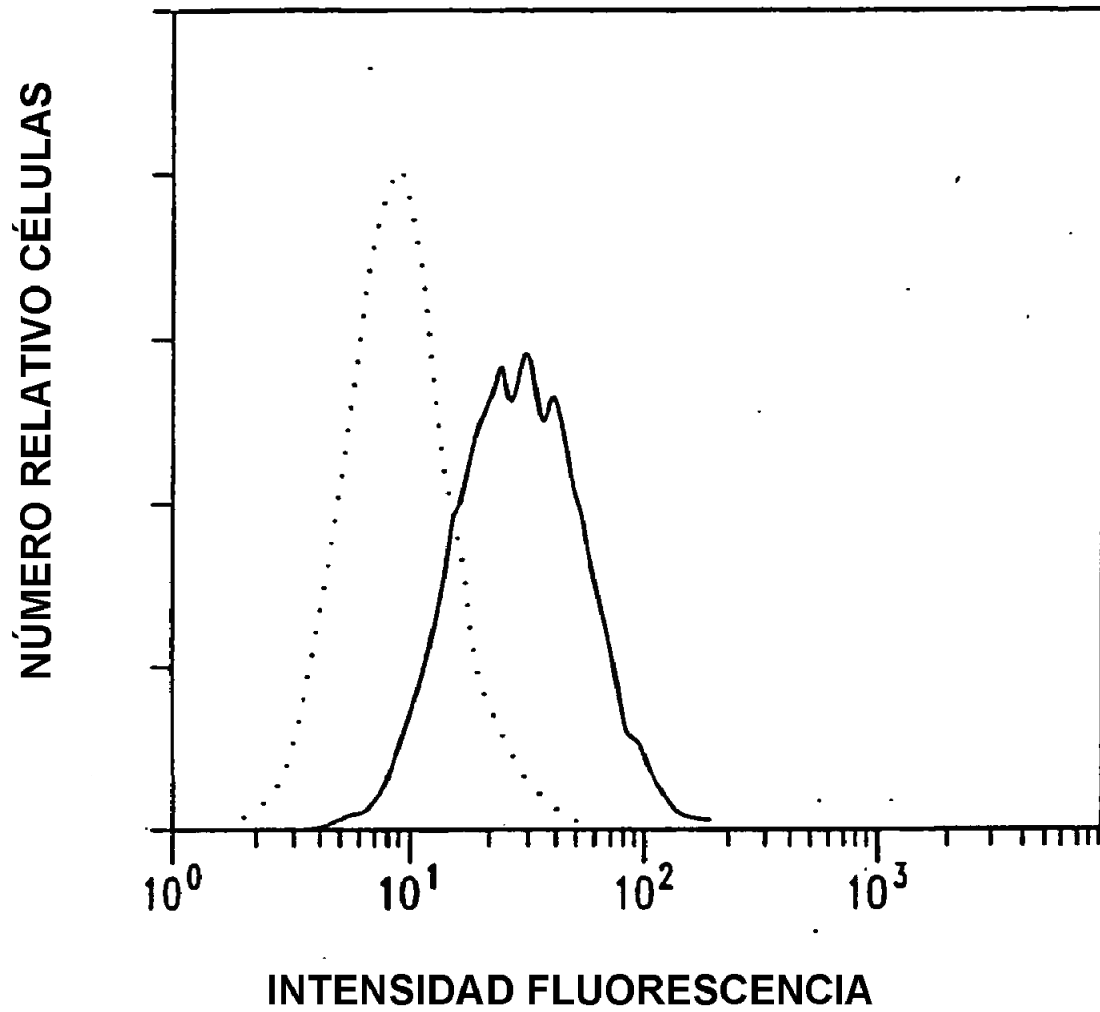
*Fig. 3A*



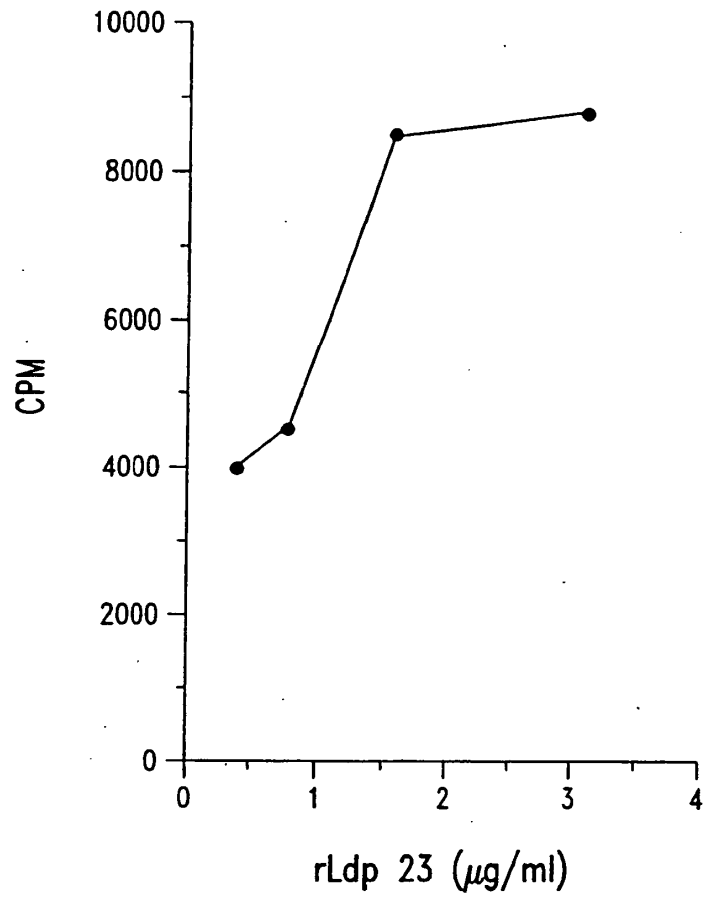
*Fig. 4*



*Fig. 5*



*Fig. 6*



*Fig. 7*

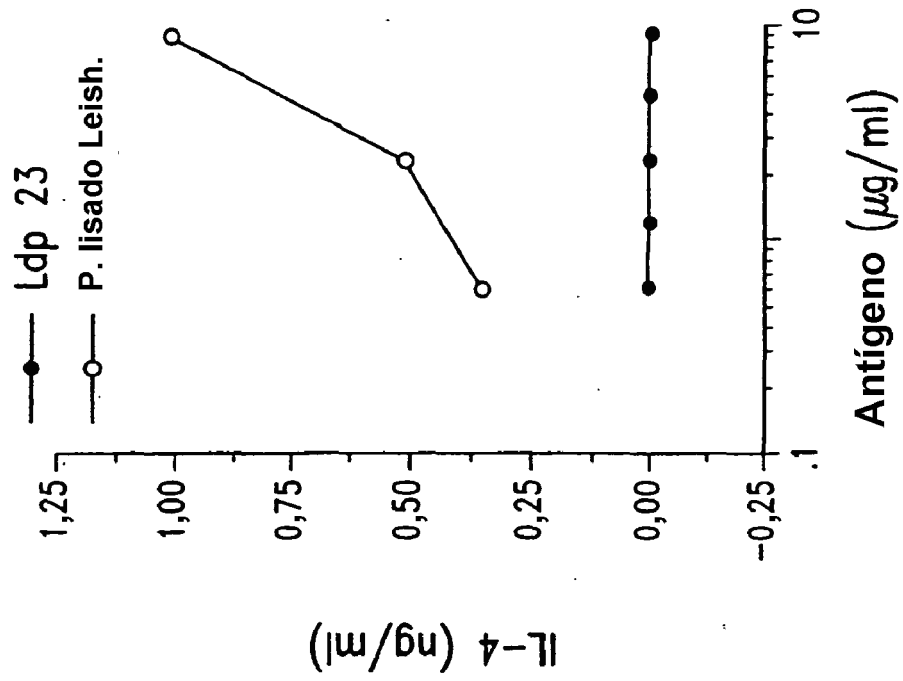


Fig. 8B

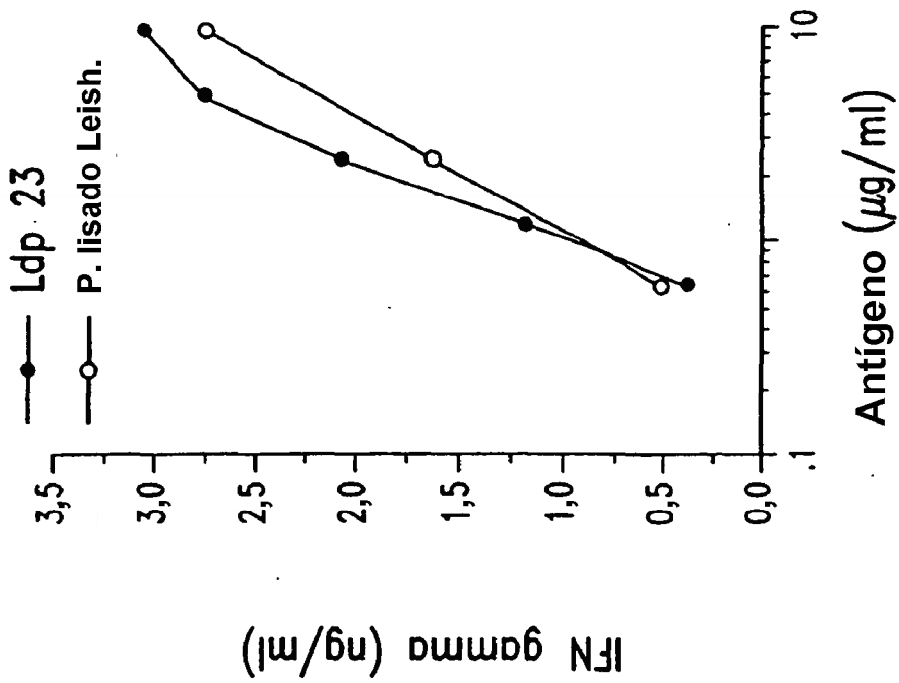


Fig. 8A

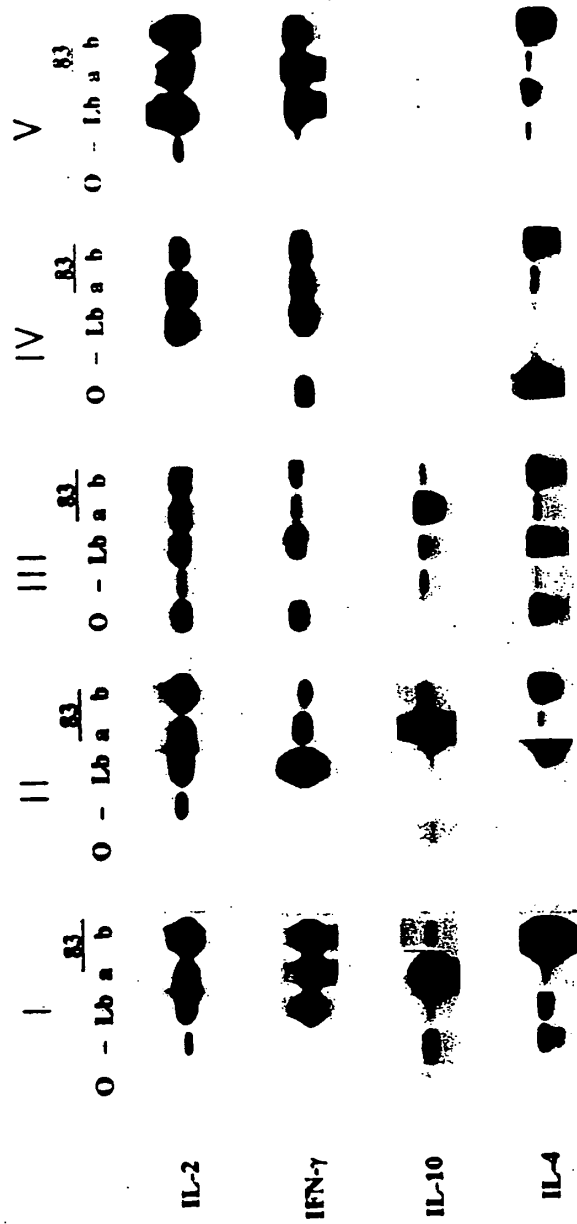
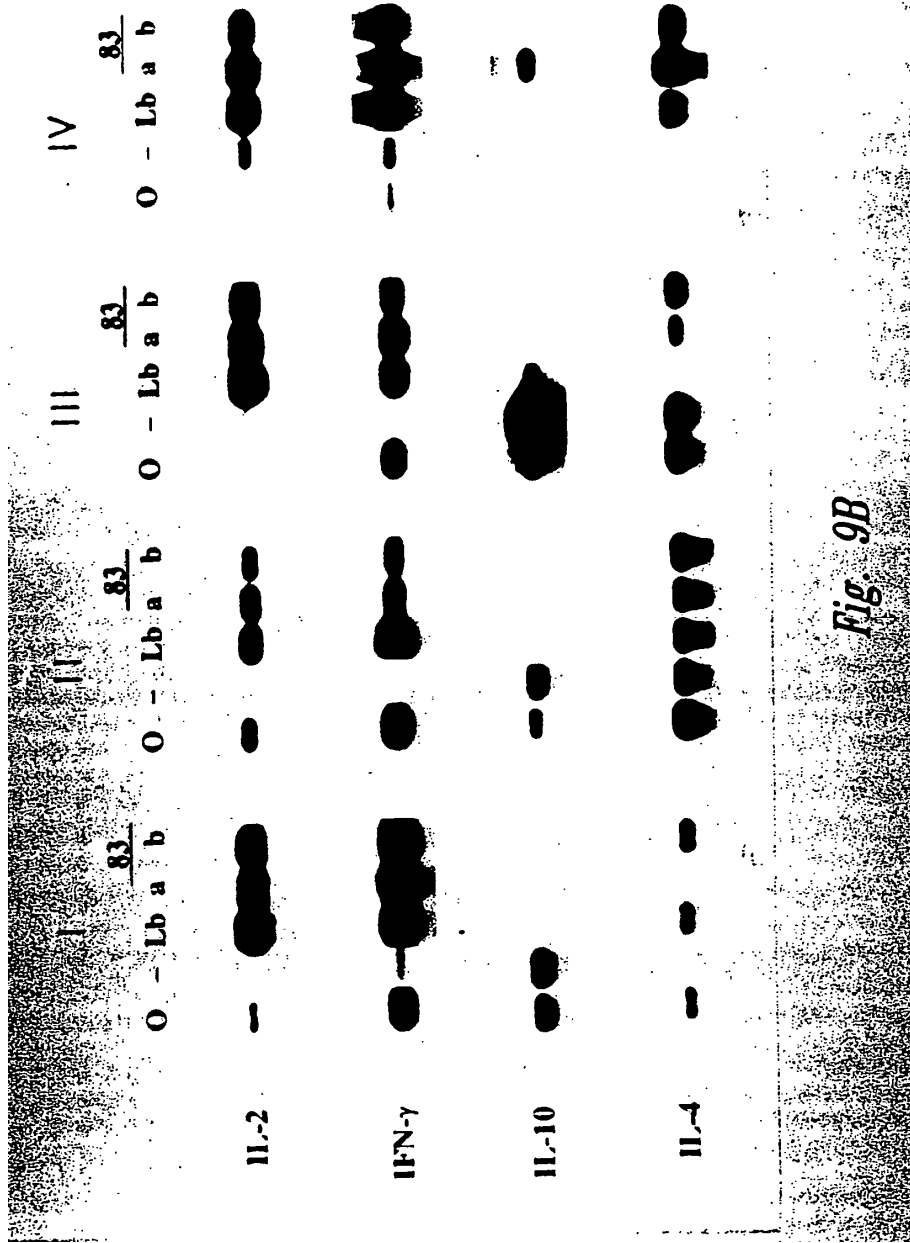
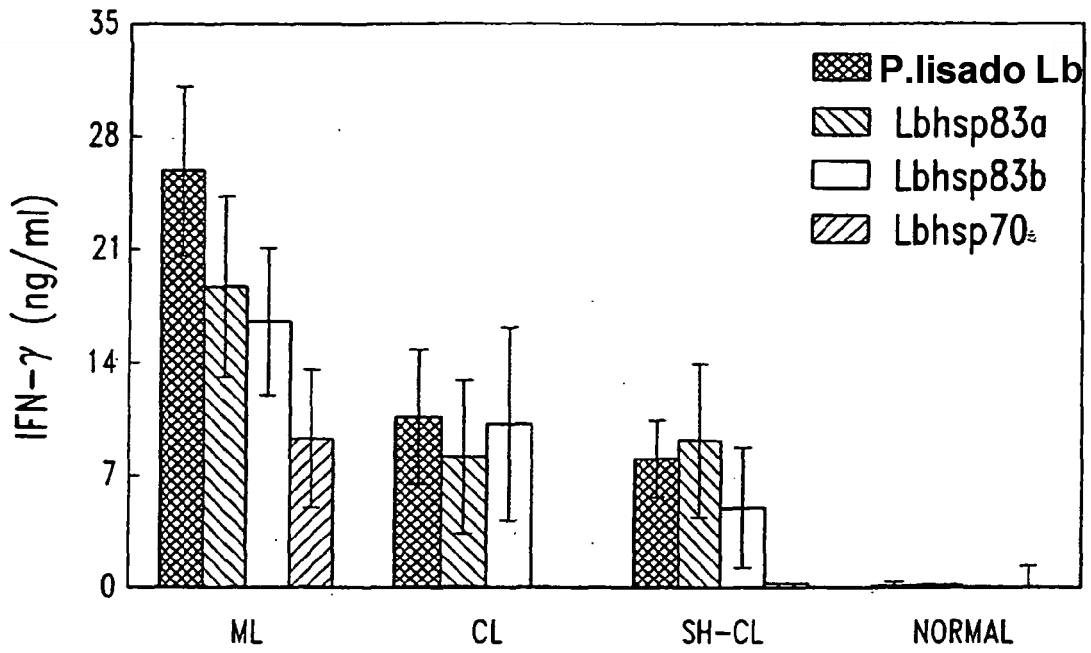


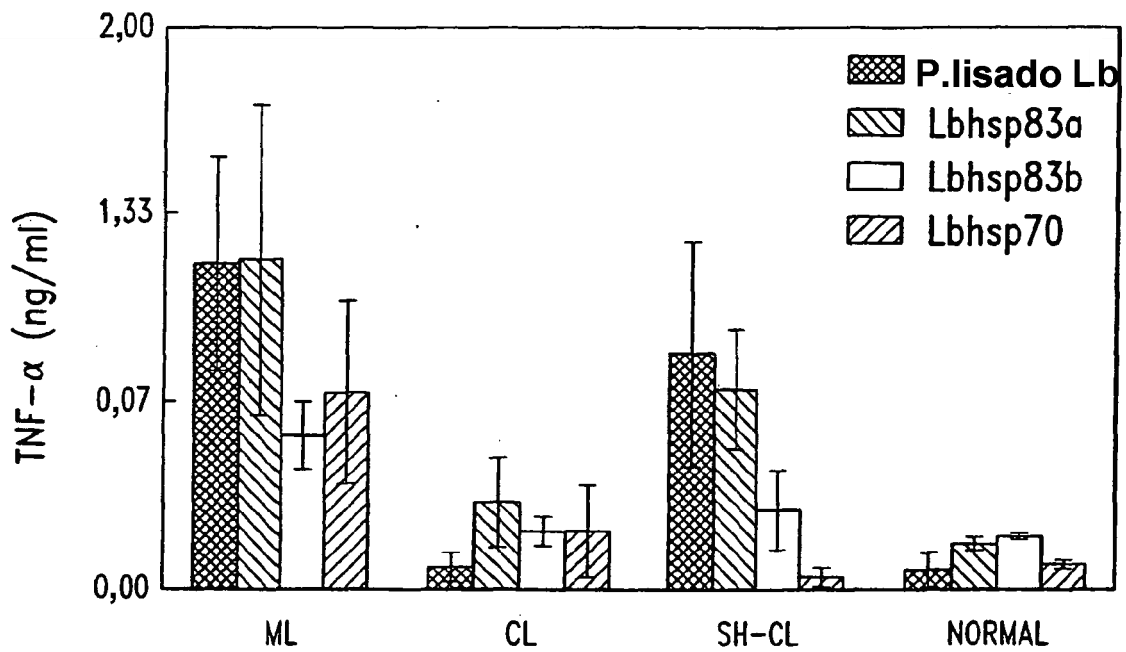
Fig. 9A



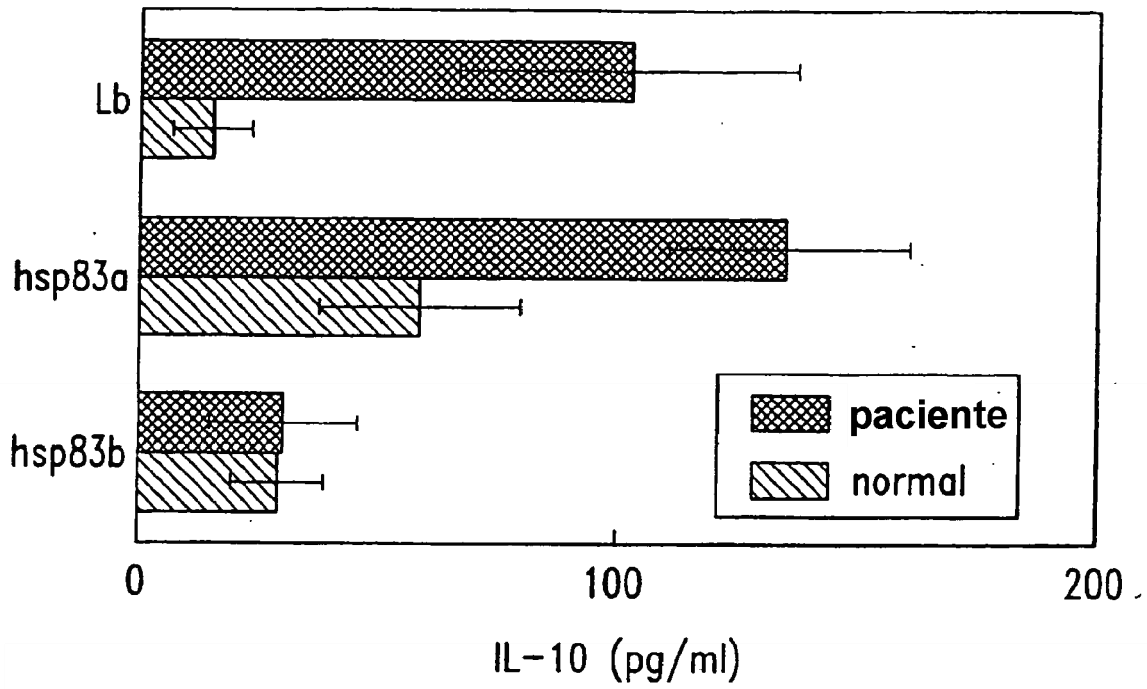




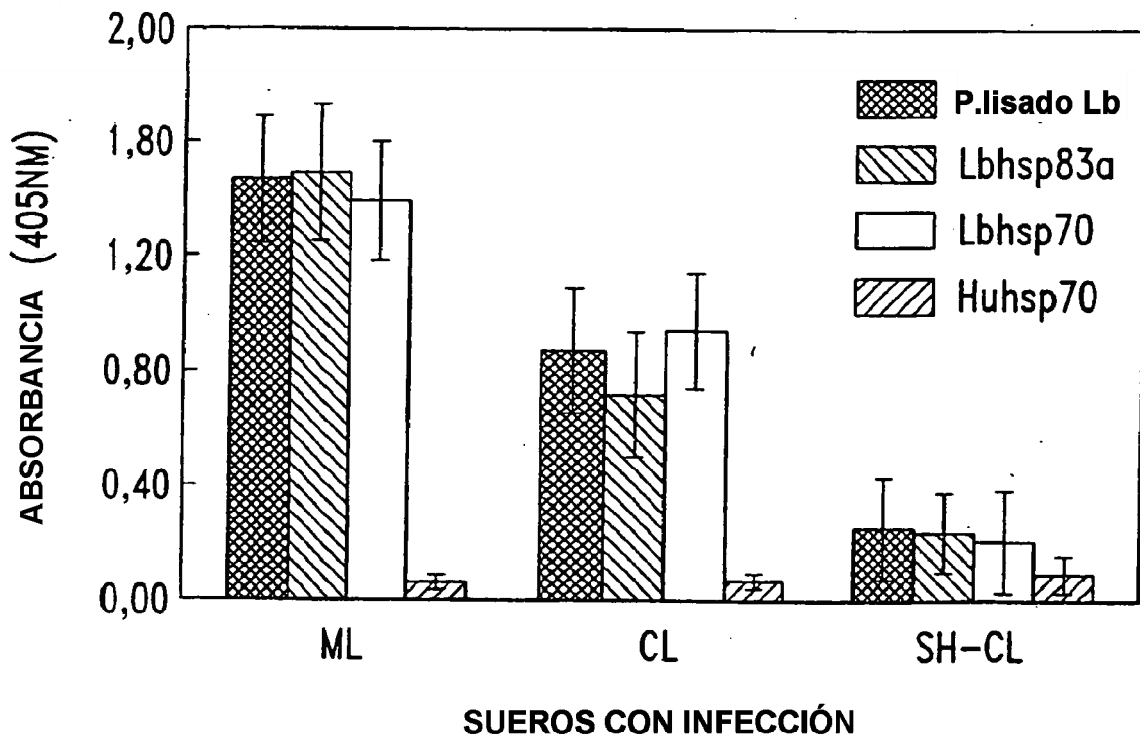
*Fig. 10A*



*Fig. 10B*



*Fig. 11*



*Fig. 12*

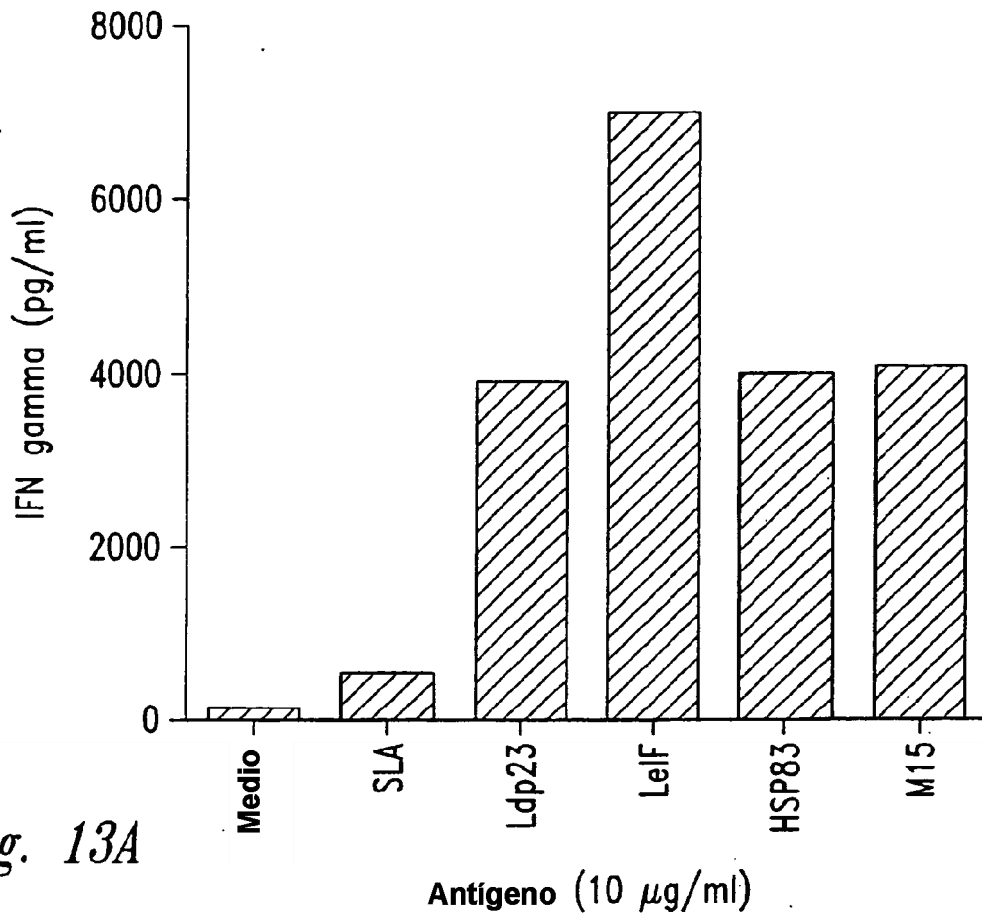


Fig. 13A

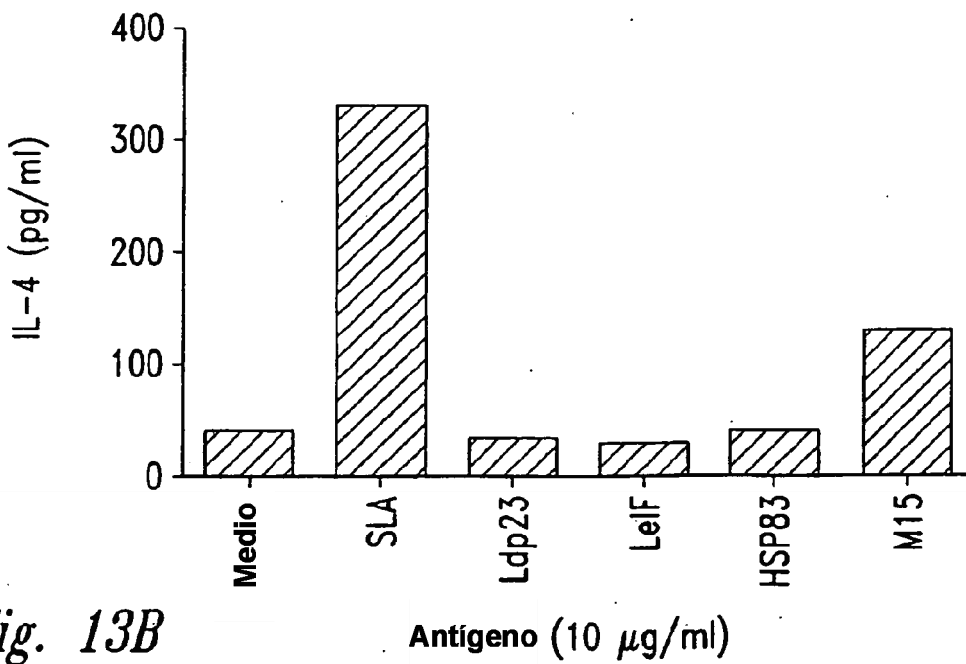
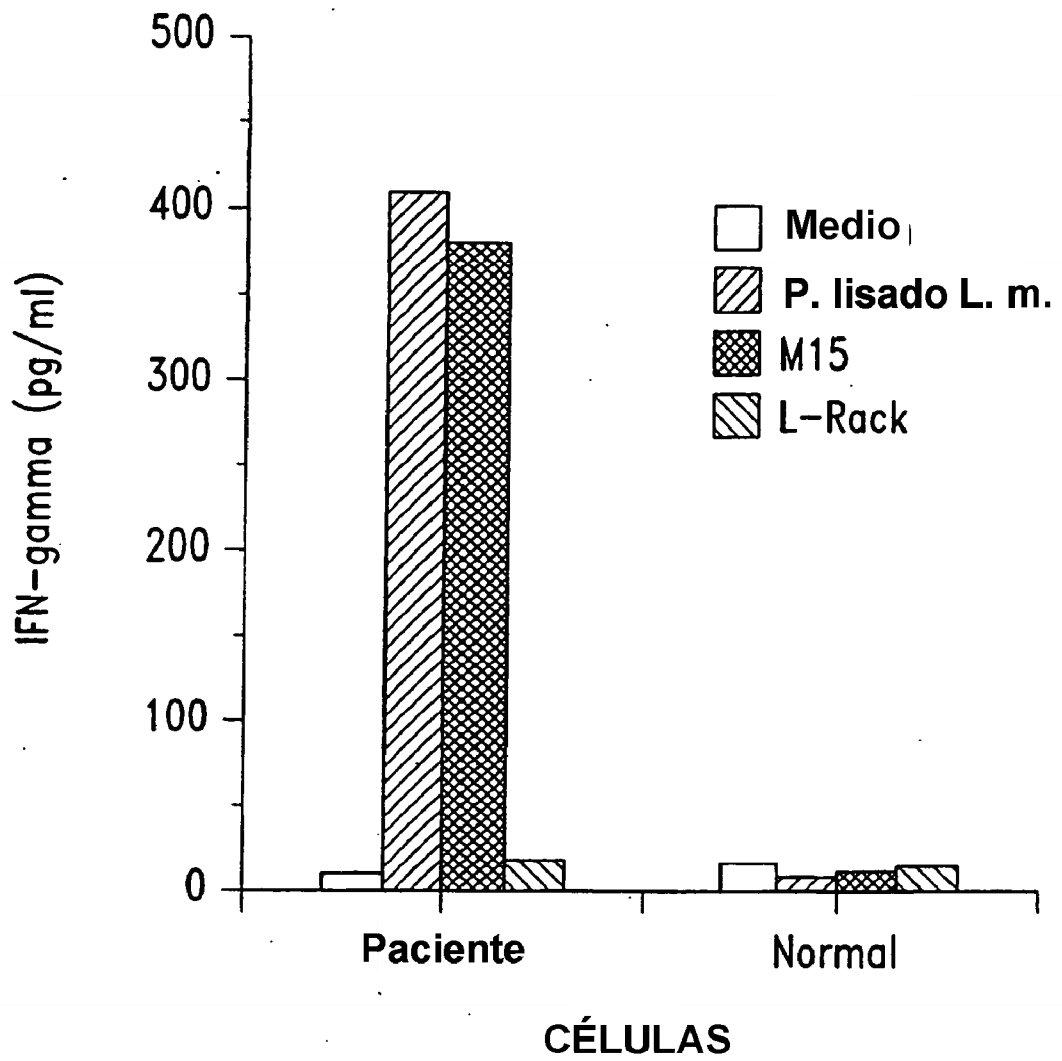
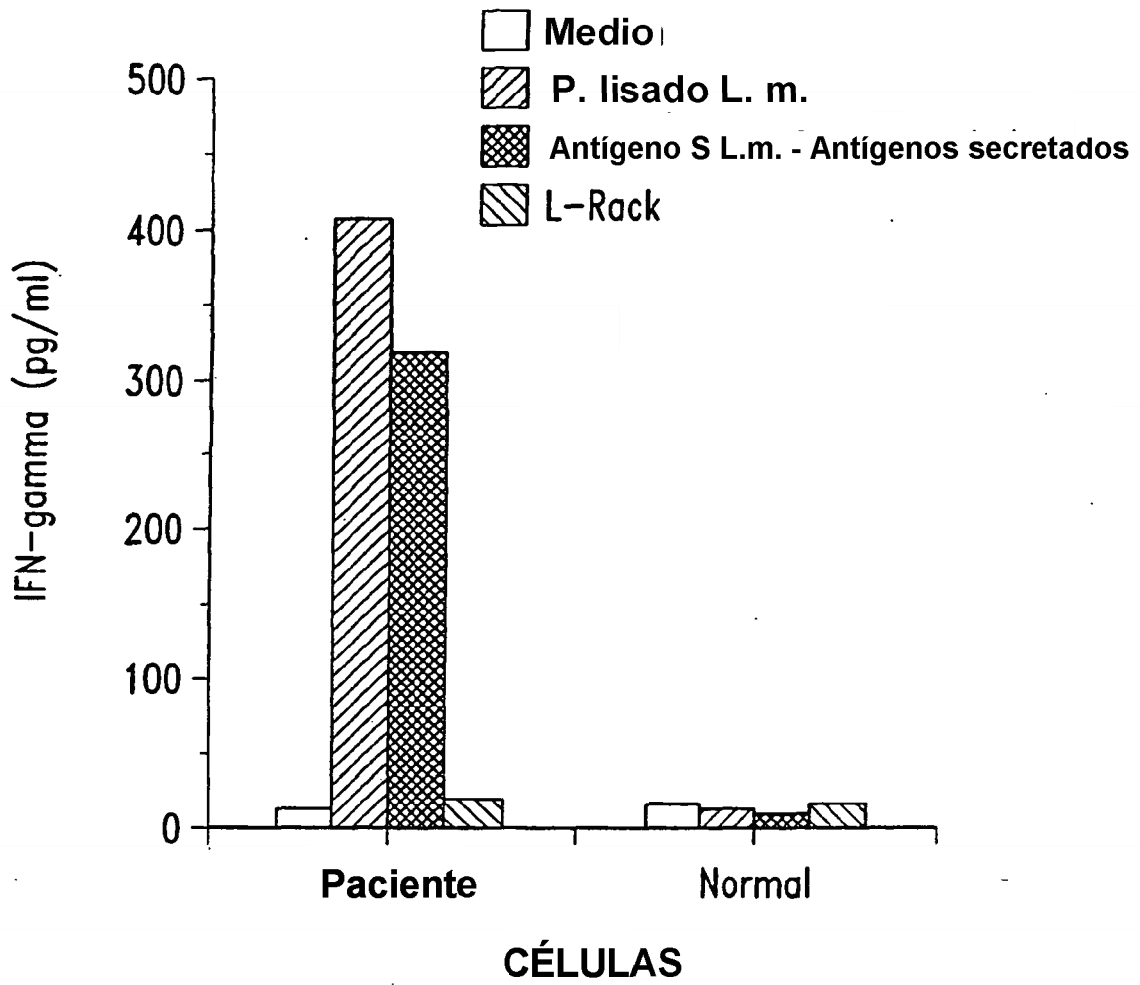


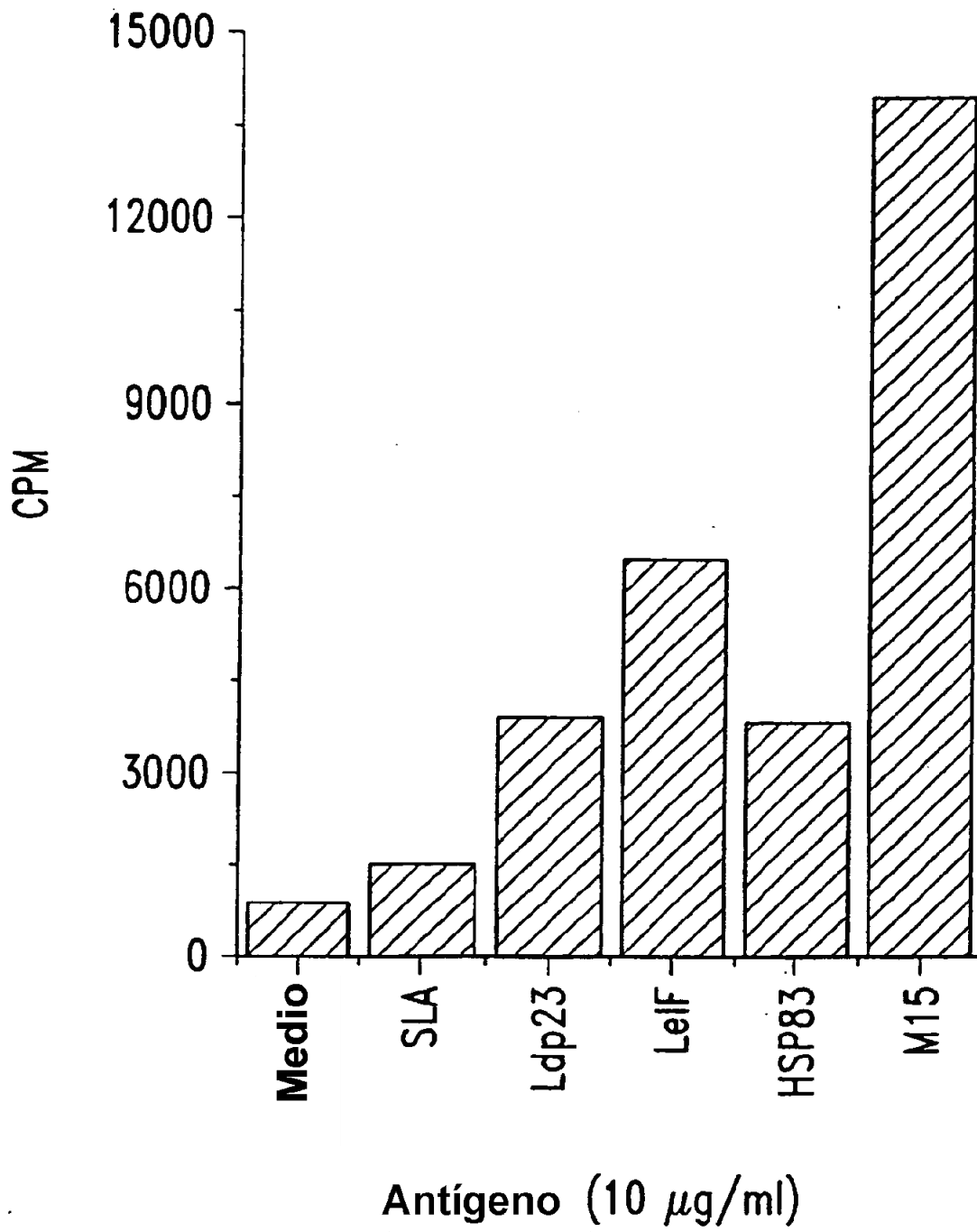
Fig. 13B



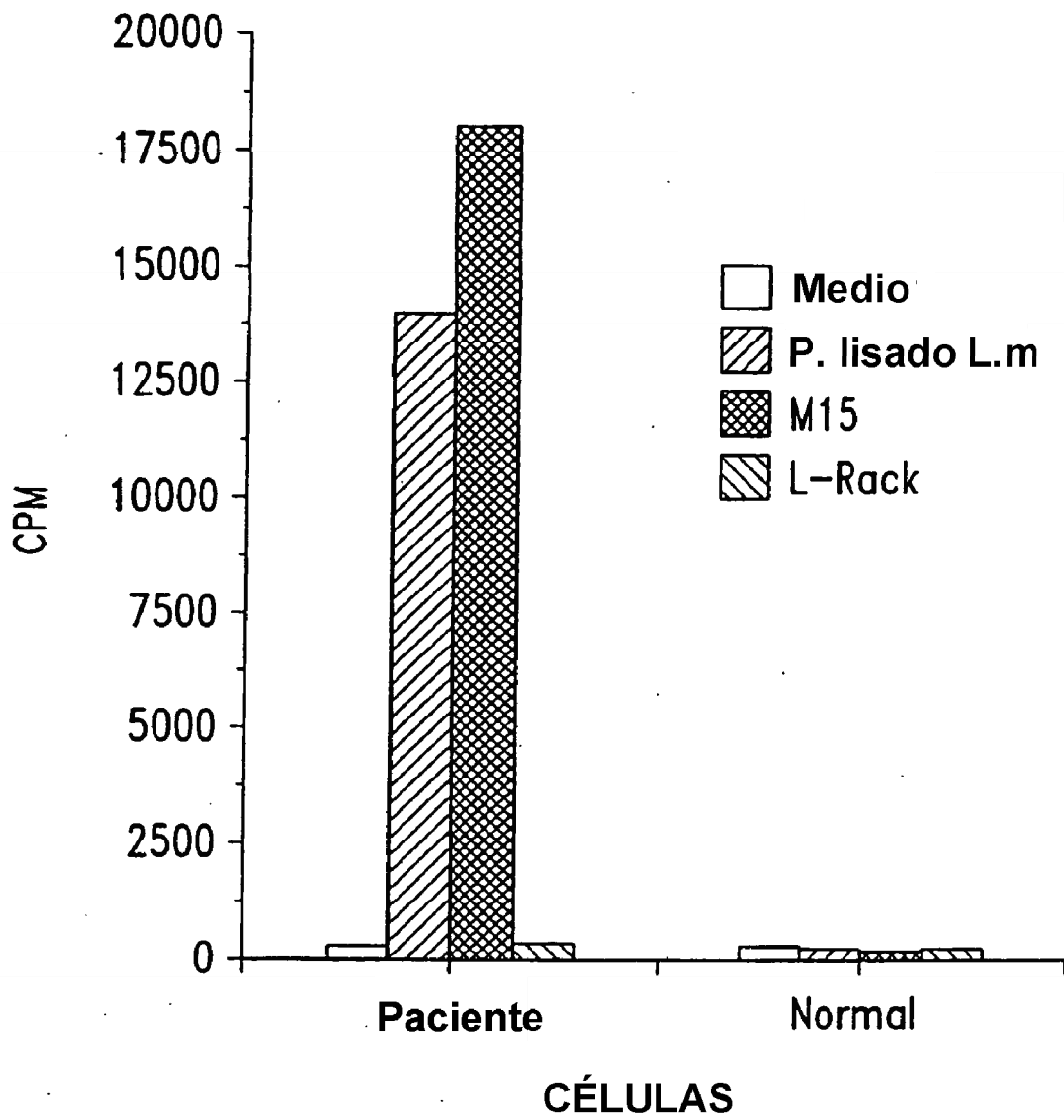
*Fig. 14*



*Fig. 15*

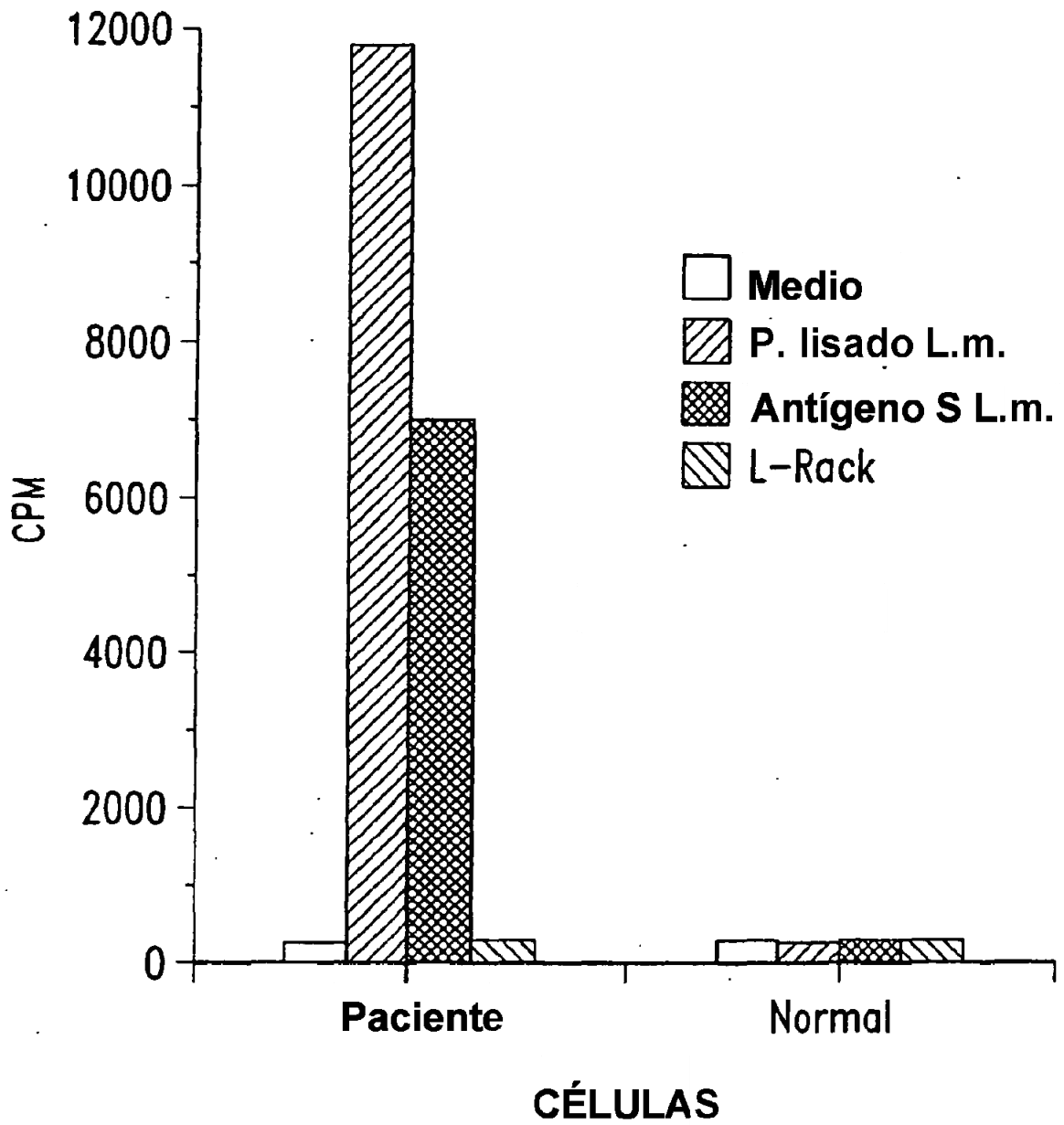


*Fig. 16*



*Fig. 17*

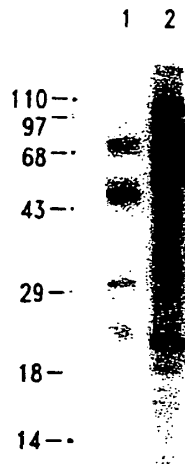




*Fig. 18*

-----SLTDPAVLGEETHLRVRRVVPDKANKTLTVEINGIGHTK	85
MTETFAFQAEINDLMSLTIINTFYSNKEIFLRDVISNASDACDKTRYQ.....DA.R.C.....E.....	85
.....EL.....NQ.....D.S.....I.....T.....	85
MPEETQTQDPMEEEEV.....A.....EL..S..L....E....SK.DSGKE.HINLI.N.QDRA..IV.T.....	100
<b>P</b> <span style="margin-left: 200px;"><b>P</b></span>	
ADLVNNLGTIARSGTKAFMEALEAGGDMSMIGQFVGFYSAYLVADRVTVVSKNNSDEAY-VESSAGGTFITISVQESDMKRGTSSTLHLKEDQOEYLEE	184
.....A.....T.....V.V.....AP.....LPARI.....L...A	185
.E.....D.....T.....V.PTPDC.L.....RIV.....	185
..I.....K.....Q.A.I.....EK..IT.H.D..Q.A.....S.VRTDTGEP.G..KVI.....T.....	200
RRVKELIKKHSEFIGYDIELMVEKTAKEVTDDE---DEEEDSKKSCGDEGEPKVEEVTEGG-ED-KKKKTKKVKVKKT-YEVK---NKHKPLWTRD	274
..L.....T.....---A.ADE.GE.....E.-.....T.E...Q---	272
..L.D.....AT.....D.--AAATKNEEGE.....KDDAE.GE.....TQE-FV.Q---	275
..I..IV...Q...P.T.F...ERD..S.DEAEK.DKE.E.E.EEKESDKEPEI.DVGSDE..E..DGD..K.KKI.EK.ID.EEL..T..I..N	300
<b>Lbhs83b</b>	
TKDVTKEEYAAFYKAI SNDVEDTAATKHF SVEGQLEFRATIAFVPKRAPFDMFEPNKKRNNIKLYVRRVFTMDNCEDLCPDWLGFVKGVWVDSDELPLNISR	374
P.....PP.....M.....L.....	372
P.....EPLS.....L.....S.....E..A..R.....	375
PD.I.N..GE..SLT...HL.V.....LL..R...L..NR..K.....E.I.EY.N.IR.....	400
ENLQGNKILKVIKRNIVKKCLELFEETAEENKEDYQFYEQFGKNIKLGHEDTANRKKLMELLRFYSTESGEMTLKDYVTRMKPEQKSIYYITGDSKK	474
.....M..V.....V.....A.N.....	472
.....A.....K.....V.....S.....H.S...D.....EG..C..V.....	475
..M..S.....L.....T.L.D.N..K...S.....SQ....S...Y.TSA..D..VS...C...EN..H.....ET.D	500
KLESSPFIEKARRCGLEVLFMTEPIDEYVMQVQKDFEDKKFACLTKEGVHFESEEEKKOREEKAACEKLCXTHKEVLGDKVKEKVTVSERLLTSPCILV	574
.....Q.K.R.F.....Y.....E.T.....S.....	572
..T...Q...R.F.....I.....T.....E.T.Y.R..A..D.....V...A.....	575
QVAN.A.V.RL.KH...IY.I.....CV..L.E..G.TLVSV...LELP.D....KQ...TKF.N..I..DI.EK...V..N..V...C..	600
<b>P</b>	
TSEFGWSAHMEQIMRNDALRDSMAQYHYSKKTMEVNPDPHPIIKELRRRVEADENDKAVKQILVFLLFDTSLTSGFQLDDPTGYAERINRMKLGSLDE	674
.....M.....M.....L.K.....E...-	671
.....SA.M.....I.A..V..K.....Y...A...T...S...H.....D	675
..TY..T.N..R..KA...N.TMG..AA..HL..I...S..ET..OKA..K..S...I..YE.A..S...S.E..QTH.N.Y.....GI..	700
EE--EEVA-EAPPAEAAPEVNTAGTSSMEQVD 703 Lbhs83	
..E--.E.V..AV..T.....L.. 701 Lahsp83	
.D--NGNE..E..A.V..PV..... 704 Tchsp83	
DDPTADDTSA.VTE.MP.L.GDDD..R..E.. 734 Huhsp89	

Fig. 19



*Fig. 20*

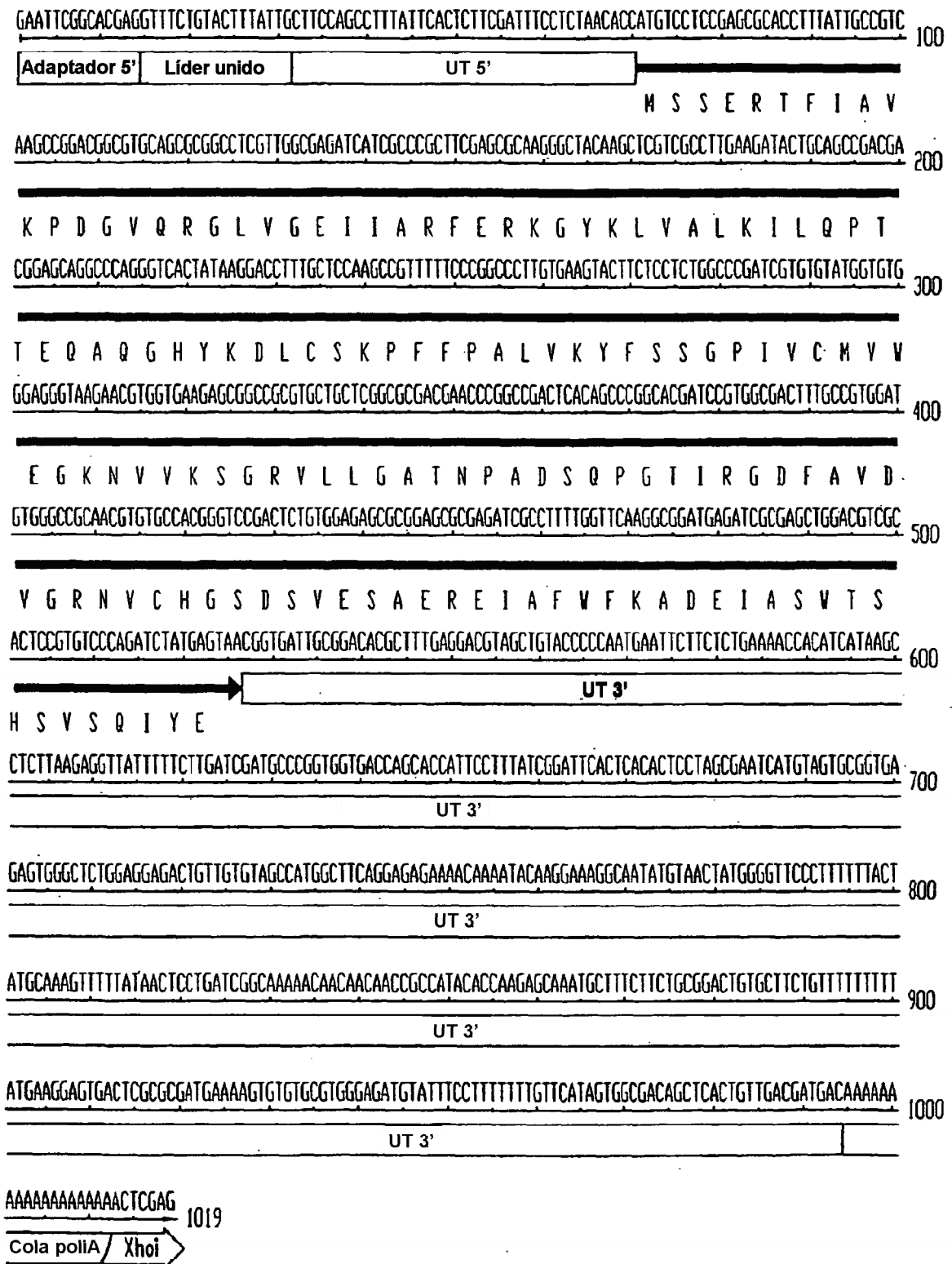
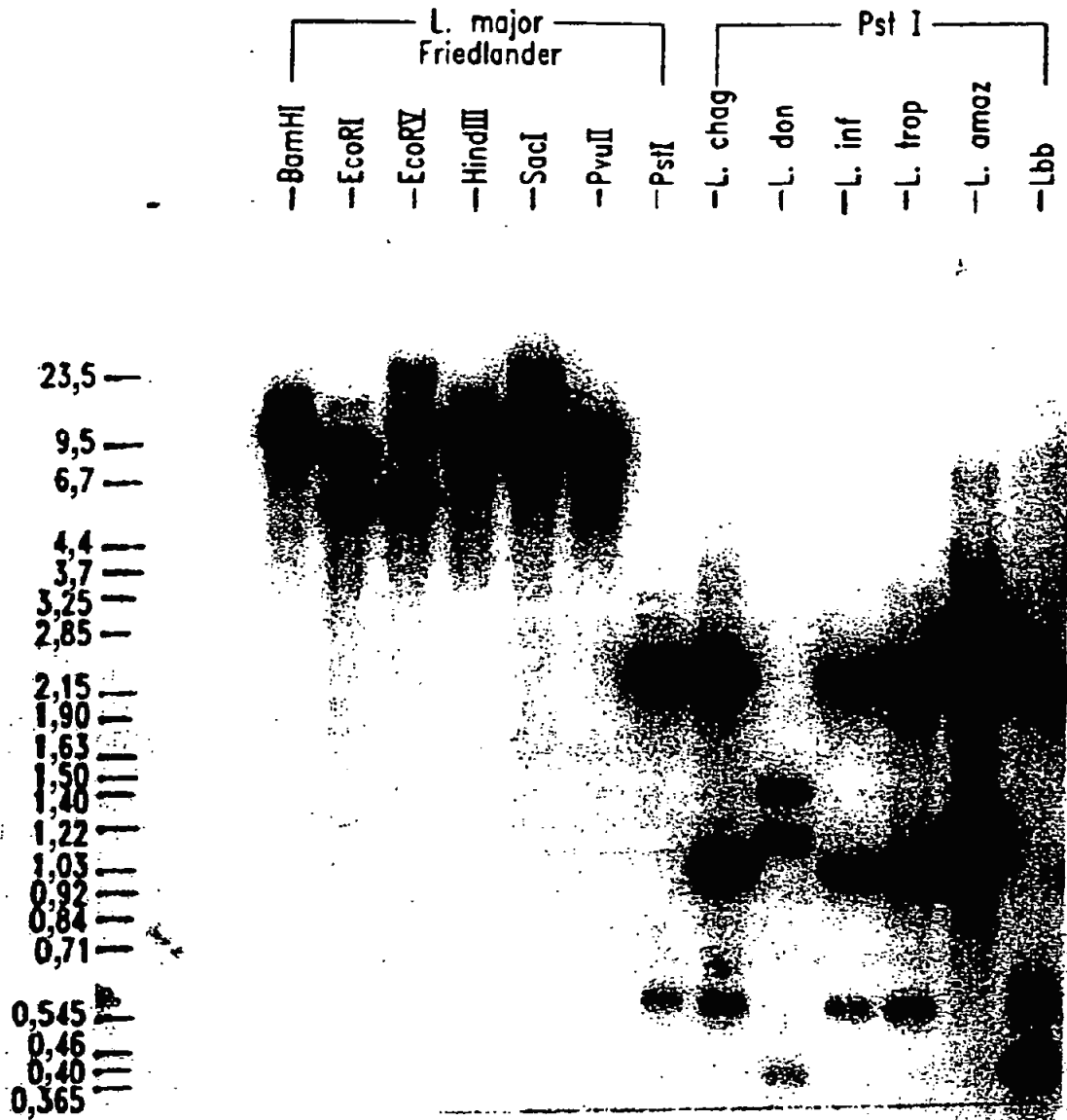
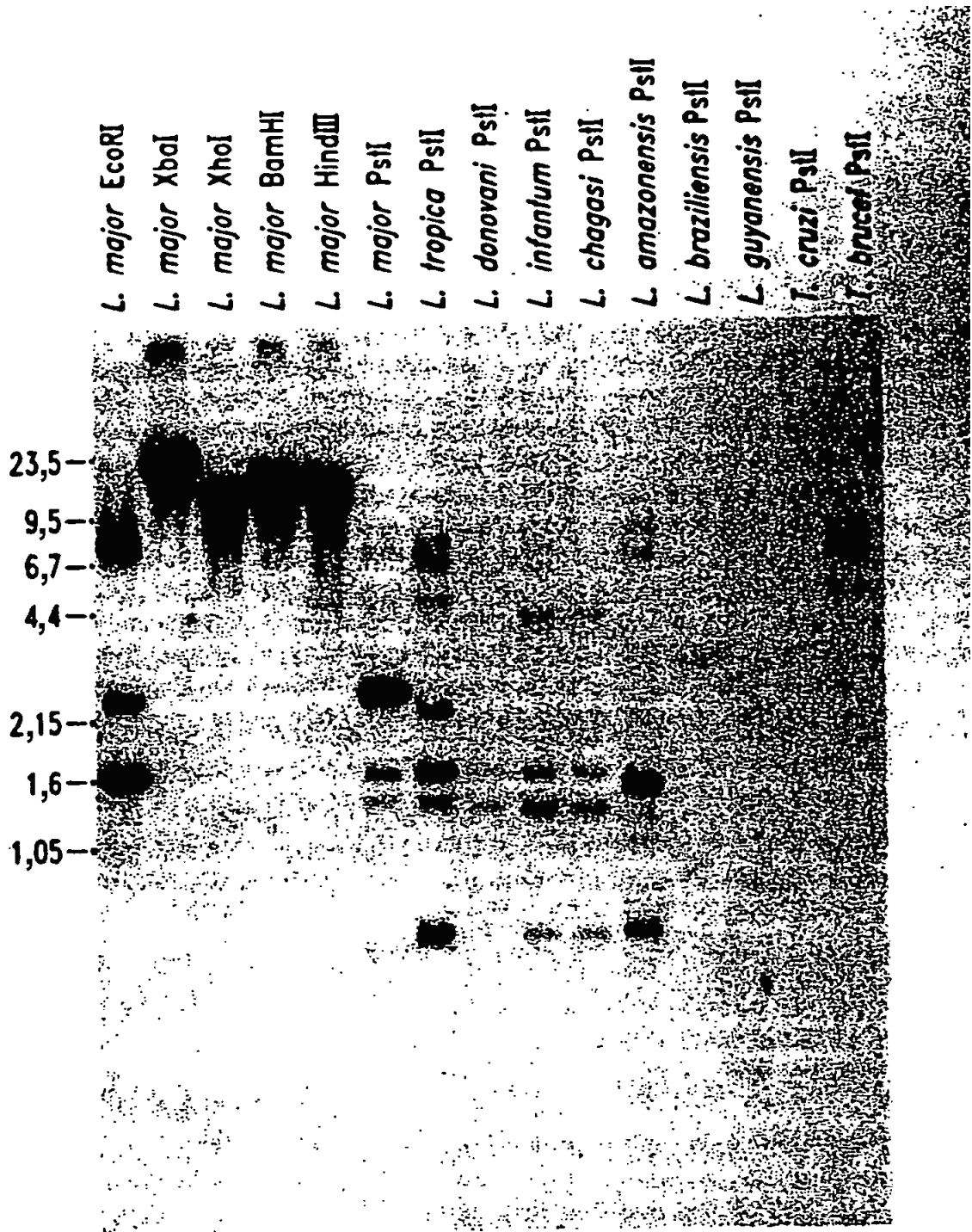


Fig. 21

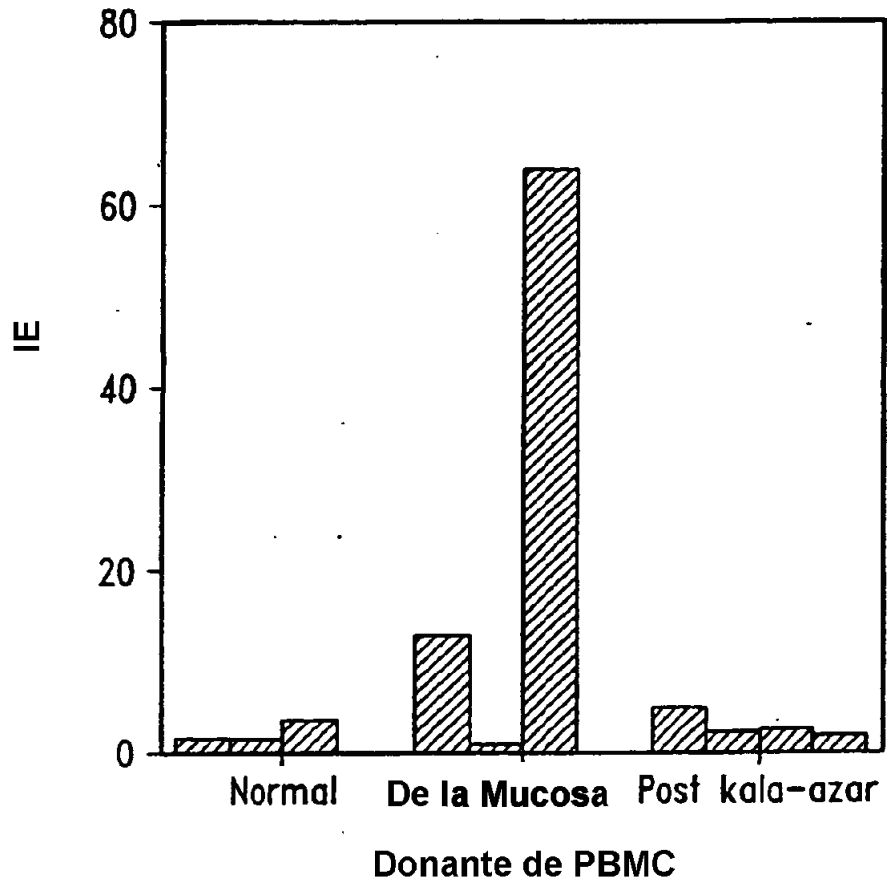


*Fig. 22*



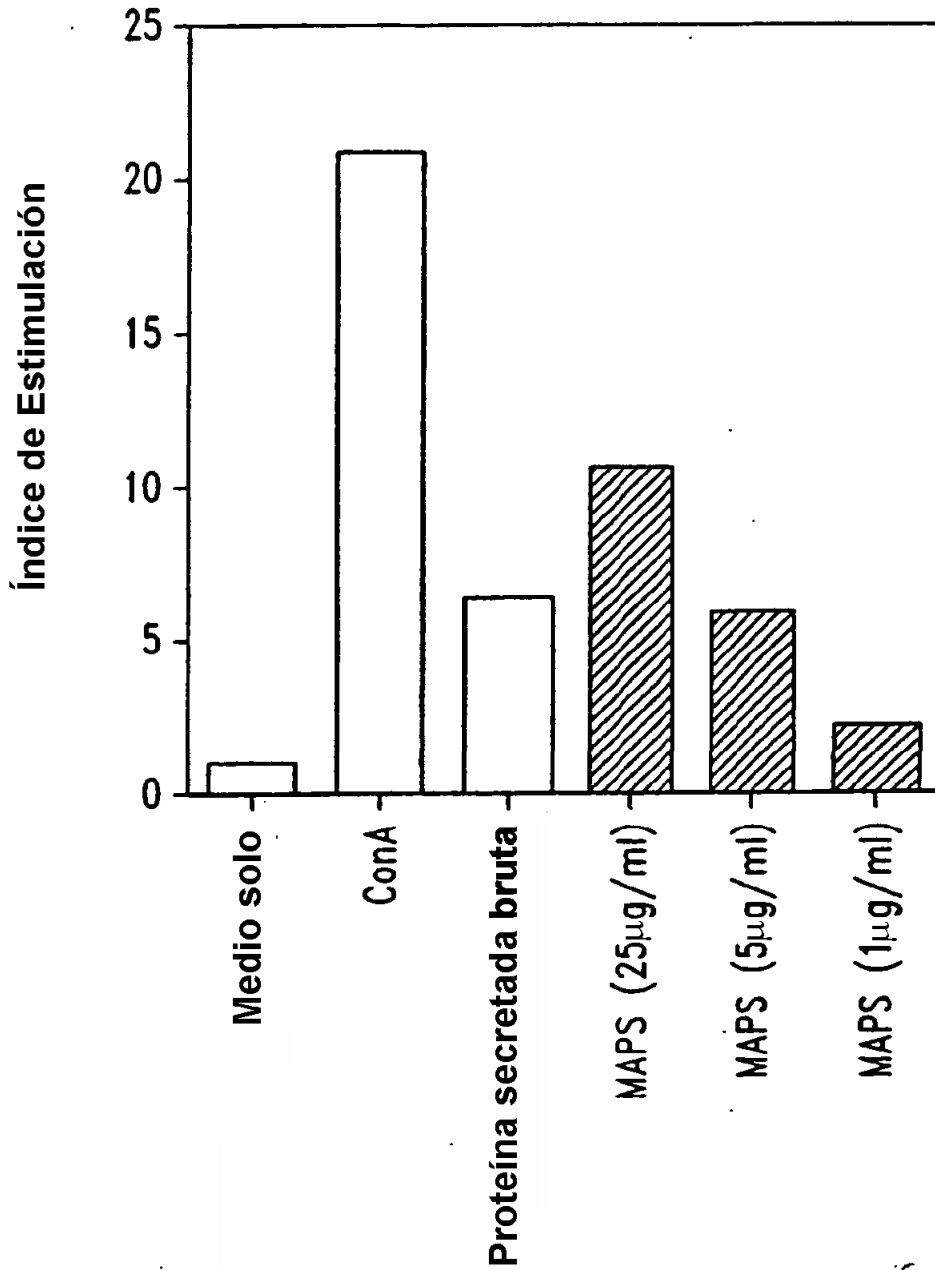
*Fig. 23*

**Respuesta proliferativa de PBMC humanas a MAPS**



*Fig. 24*

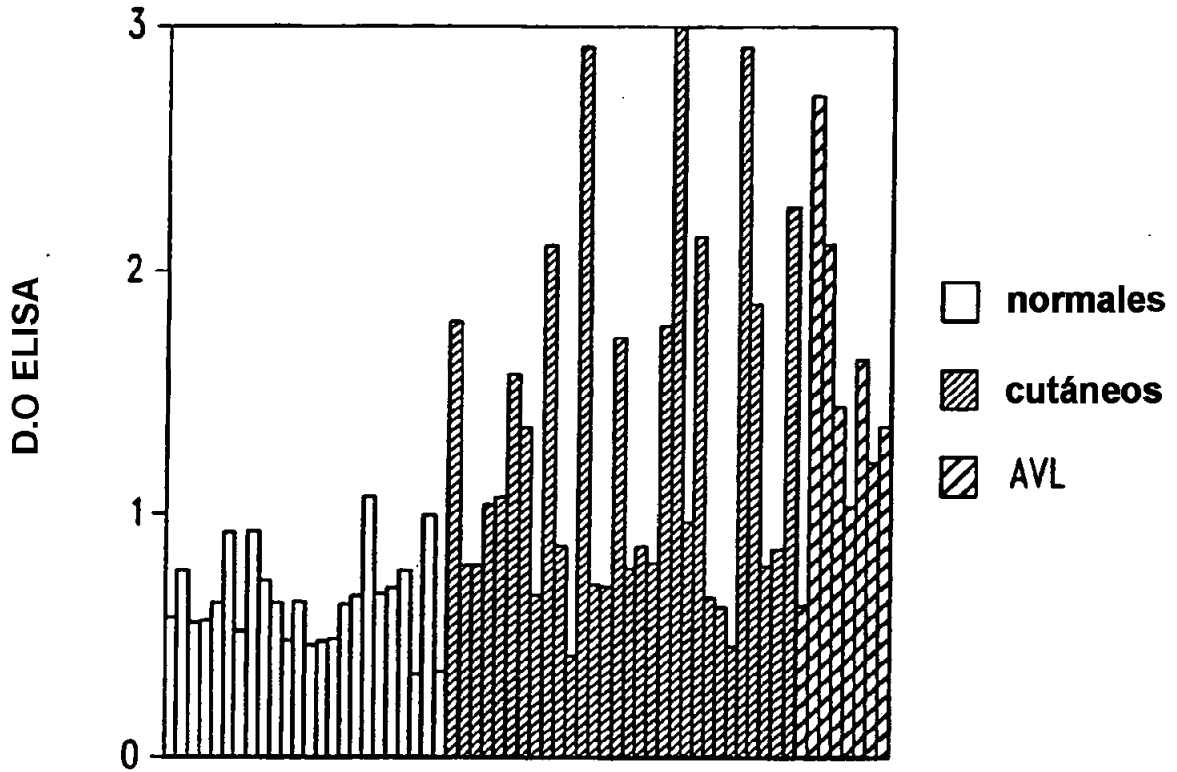
**Respuestas Proliferativas de BALB infectados con  
L. major (20 días después de la infección) a la  
proteína MAPS recombinante**



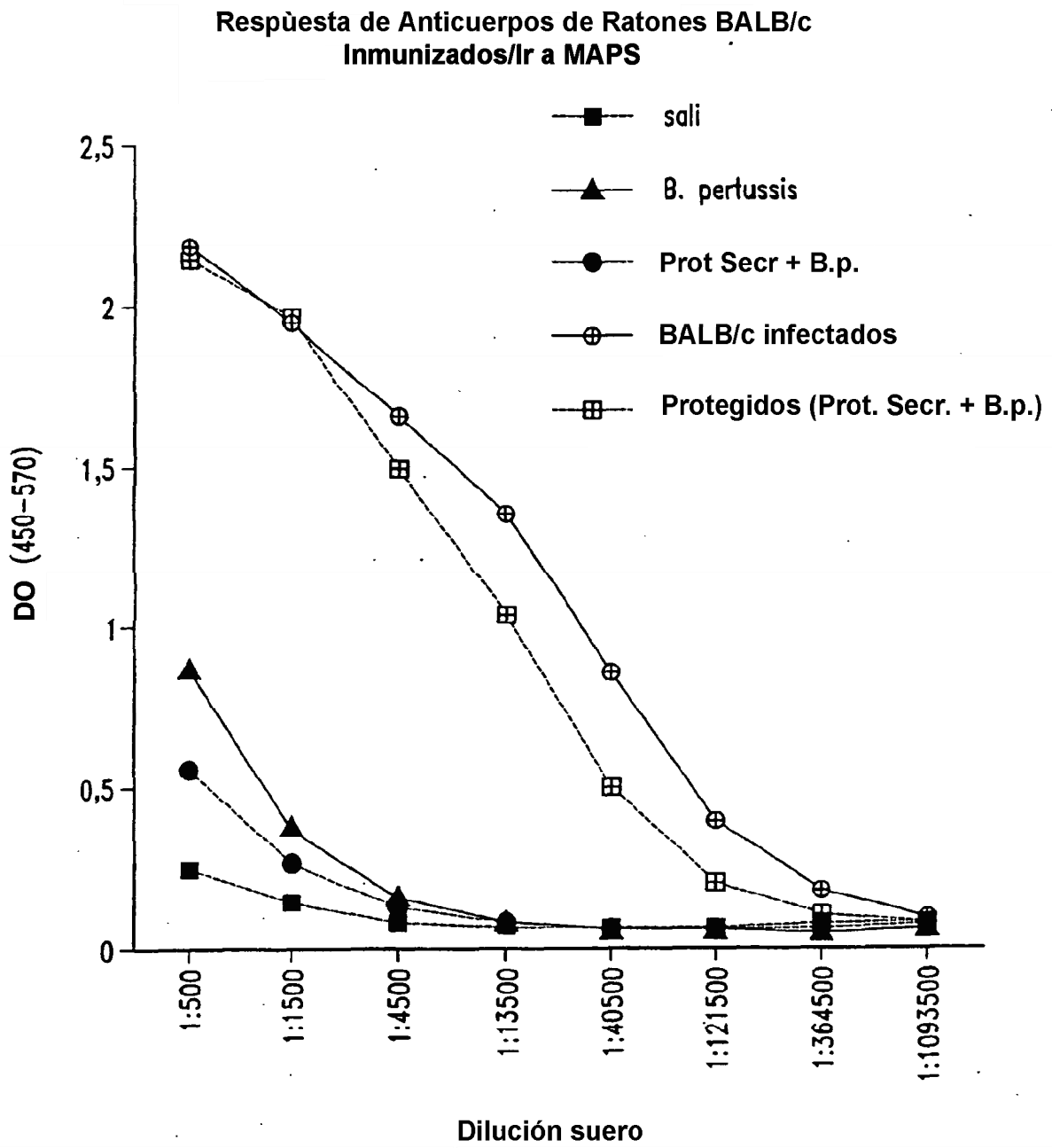
*Fig. 25*



**Análisis ELISA de suero de paciente humano con leishmaniasis con títulos de anticuerpos específicos de MAPS (8/27/96)**



*Fig. 26*



*Fig. 27*

Protección frente a la infección con *L. major* en ratones BALB/c inmunizados con antígenos de *Leishmania*

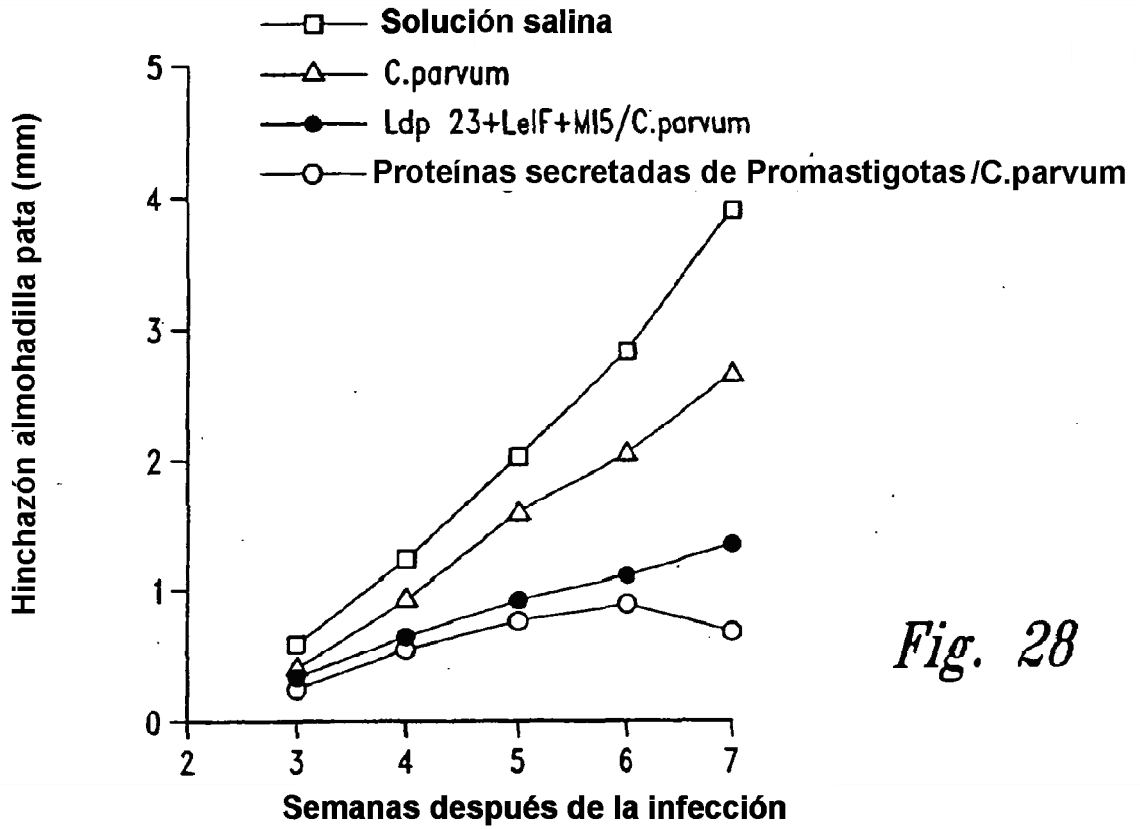


Fig. 28

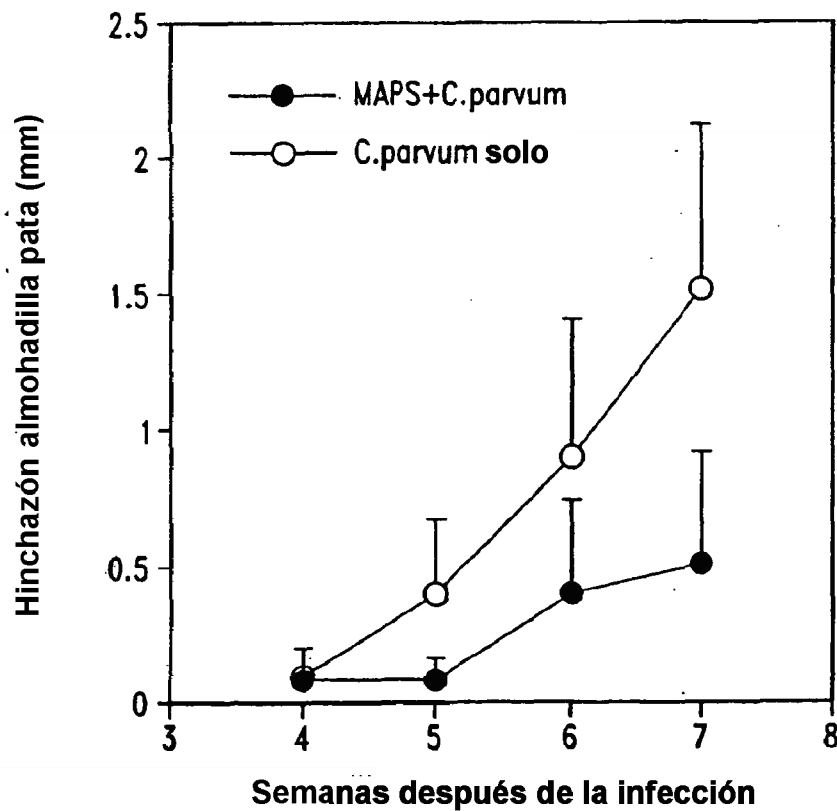
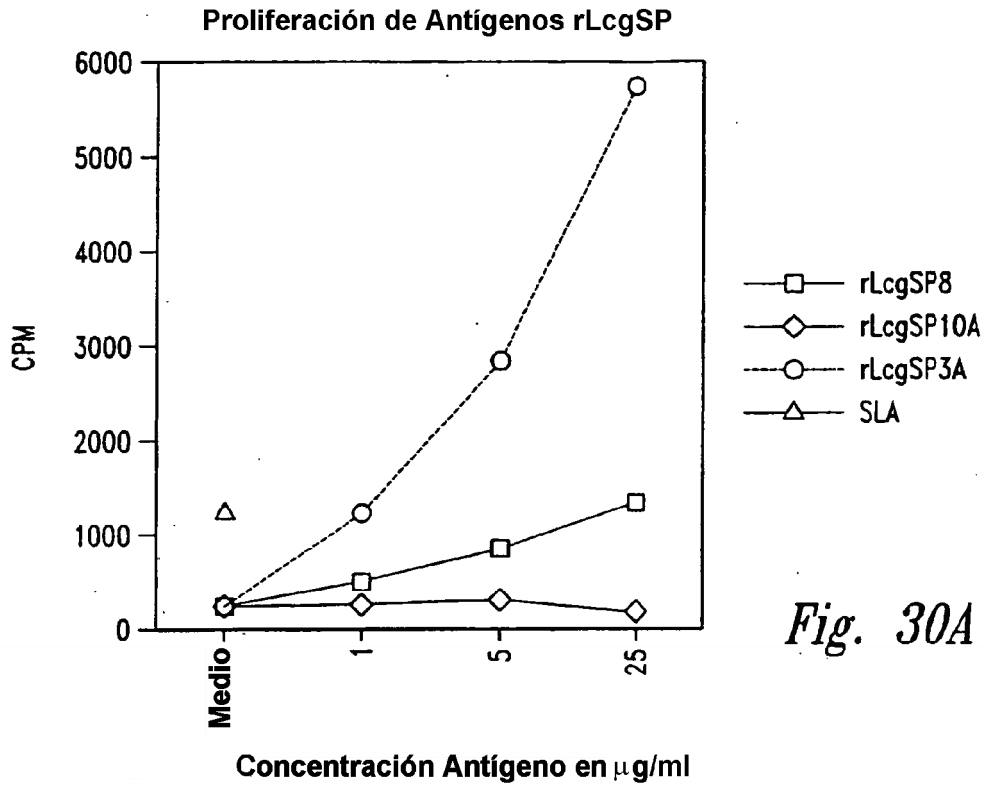
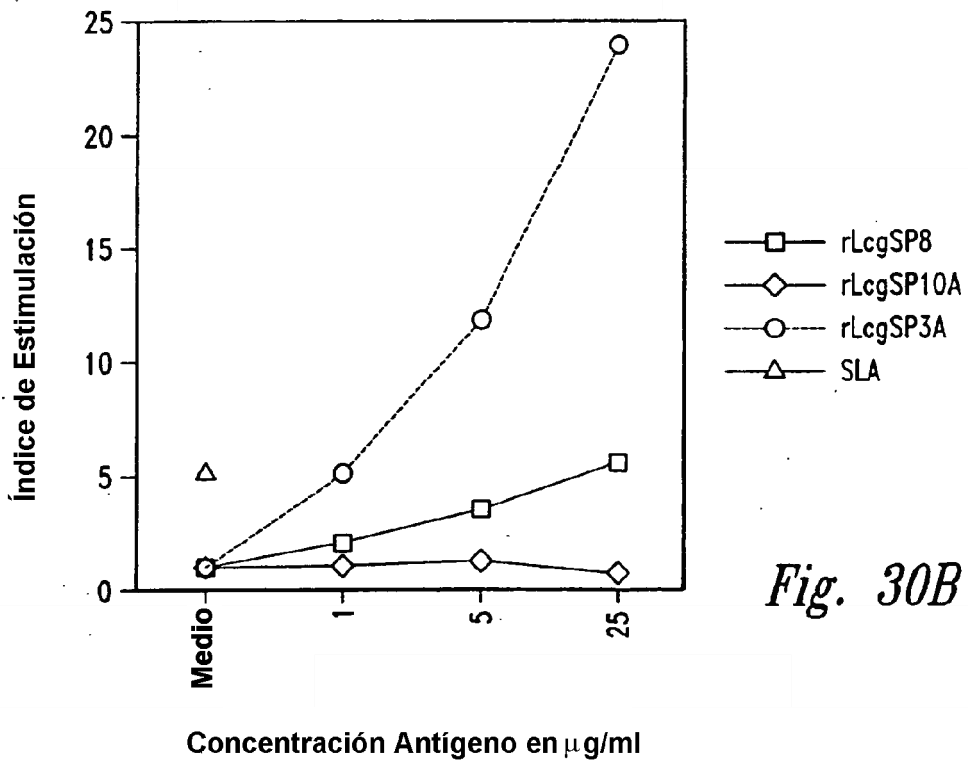


Fig. 29



*Fig. 30A*



*Fig. 30B*