

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 528 928**

51 Int. Cl.:

A61K 39/008 (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)

C07K 14/44 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.05.2009 E 09751235 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.11.2014 EP 2300051**

54 Título: **Vacunas de poliproteína recombinante para el tratamiento y diagnóstico de leishmaniosis**

30 Prioridad:

21.05.2008 US 55079 P

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

13.02.2015

73 Titular/es:

**INFECTIOUS DISEASE RESEARCH INSTITUTE
(100.0%)
1124 Columbia Street Suite 400
Seattle, Washington 98104, US**

72 Inventor/es:

**REED, STEVEN G. y
GOTO, YASUYUKI**

74 Agente/Representante:

PONTI SALES, Adelaida

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 528 928 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

Vacunas de poliproteína recombinante para el tratamiento y diagnóstico de leishmaniosis

5 ANTECEDENTES

Campo técnico

[0001] La presente descripción se refiere en general a composiciones y procedimientos para prevenir, tratar y
10 detectar leishmaniosis en pacientes. Más particularmente, la descripción se refiere a composiciones y
procedimientos que comprenden polipéptidos de fusión de *Leishmania*, así como a polinucleótidos que codifican
dichos polipéptidos de fusión.

Descripción de la técnica relacionada

15 **[0002]** Los organismos *Leishmania* son parásitos intracelulares obligados que causan un gran espectro clínico
de enfermedades denominadas leishmaniosis. Los organismos *Leishmania* son parásitos protozoarios intracelulares
del género *Leishmania*. Los organismos *Leishmania* se orientan a macrófagos hospedadores, causando por tanto un
20 amplio espectro de enfermedades clínicas en seres humanos y animales domésticos, principalmente perros. En
algunas infecciones, el parásito puede permanecer latente durante muchos años. En otros casos, el hospedador
puede desarrollar una de una variedad de formas de leishmaniosis. Las leishmaniosis se clasifican a grandes rasgos
en tres tipos de enfermedades, leishmaniosis cutánea (LC), leishmaniosis mucosa (LM) y leishmaniosis visceral (LV),
según las manifestaciones clínicas.

25 **[0003]** La leishmaniosis es un problema grave en gran parte del mundo, incluyendo Brasil, China, África
oriental y zonas de Oriente medio. La enfermedad es también endémica en la región mediterránea, incluyendo el sur
de Francia, Italia, Grecia, España, Portugal y norte de África. El número de casos de leishmaniosis ha aumentado
drásticamente en los últimos 20 años, y existen ahora millones de casos de esta enfermedad en todo el mundo. Se
30 diagnostican aproximadamente 2 millones de casos nuevos cada año, un 25 % de los cuales son de leishmaniosis
visceral.

[0004] La leishmaniosis visceral (LV) se ha reseñado en 88 países, pero aproximadamente un 90 % de los
casos de LV aparecen en Brasil, India, Sudán, Bangladesh y Nepal (Méndez y col. J. Immunol. 2001; 166(8): pág.
5122-8). La incidencia anual se estima que es de aproximadamente 500.000 casos de LV, y la población en riesgo
35 es de 350 millones (Engwerda y col. Eur. J. Immunol. 1998; 28(2): pág. 669-80; Squires y col. J. Immunol. 1989;
143(12): pág. 4244-9). La leishmaniosis visceral, está causada generalmente por especies del complejo *L. donovani*,
concretamente *L. donovani* y *L. infantum (chagasi)*. *L. donovani* es el agente causante de leishmaniosis visceral en
África y Asia, *L. infantum/chagasi* en los países mediterráneos y en el Nuevo Mundo (Piedrafita y col. J. Immunol.
1999; 163(3): pág. 1467-72). La LV es una enfermedad debilitante grave que evoluciona hasta infección visceral que
40 afecta a bazo, hígado y nódulos linfáticos que, no tratada, es generalmente una enfermedad mortal. Los síntomas de
leishmaniosis visceral aguda incluyen hepatoesplenomegalia, fiebre, leucopenia, anemia e hipergammaglobulinemia.
La LV activa es generalmente mortal a menos que se trate apropiadamente.

[0005] Los parásitos de *Leishmania* se transmiten por la picadura de moscas de la arena y los promastigotes
45 infecciosos se diferencian y replican como amastigotes en macrófagos del hospedador mamífero. Al igual que con
otros patógenos intracelulares, las respuestas inmunitarias celulares son críticas para la protección frente a
leishmaniosis. Las respuestas inmunitarias Th1 desempeñan un papel importante en la mediación de la protección
frente a *Leishmania*, incluyendo papeles para linfocitos T CD4+ y CD8+, IFN- γ , IL-12, TNF- α y NO, mientras que se
han reseñado efectos inhibidores para IL-10 y TGF- β (Engwerda y col. Eur. J. Immunol. 1998; 28(2): pág. 669-80;
50 Murphy y col. Eur. J. Immunol. 2001; 31(10): pág. 2848-56; Murray y col. J. Exp. Med. 1999; 189(4): pág. 741-6;
Murray y col. Infect. Immun. 2000; 68(11): pág. 6289-93; Squires y col. J. Immunol. 1989; 143(12): pág. 4244-96;
Taylor y Murray. J. Exp. Med. 1997; 185(7): pág. 1231-9; Kaye y Bancroft. Infect. Immun. 1992; 60(10): pág. 4335-
42; Stern y col. J. Immunol. 1988; 140(11): pág. 3971-7; Wilson y col. J. Immunol. 1998; 161(11): pág. 6148-55).

55 **[0006]** La inmunización contra leishmaniosis en modelos animales puede efectuarse mediante el suministro de
vectores de ADN que codifica antígeno (Gurunathan y col. J. Exp. Med. 1997; 186(7): pág. 1137-47; Piedrafita y col.
J. Immunol. 1999; 163(3): 1467-72; Méndez y col. J. Immunol. 2001; 166(8): pág. 5122-8) o mediante la
administración de proteínas formuladas con coadyuvantes inductores de Th1 incluyendo IL-12 (Afonso y col.
Science. 1994; 263(5144): pág. 235-7; Stobie y col. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2000; 97(15): pág. 8427-32; Kenney
60 y col. J. Immunol. 1999; 163(8): pág. 4481-8) o ligandos de TLR tales como oligonucleótidos CpG (Rhee y col. J.
Exp. Med. 2002; 195(12): pág. 1565-73; Stacey y Blackwell. Infect. Immun. 1999; 67(8): pág. 3719-26; Walker y col.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1999; 96(12): pág. 6970-5) y monofosforil-lípido A (Coler y col. Infect. Immun. 2002;
70(8): pág. 4215-25; Skeiky y col. Vaccine. 2002; 20 (2728): pág. 3292-303).

65 **[0007]** A pesar de algunas pruebas de que las vacunas de subunidades pueden ser eficaces en ciertos
modelos de LV (Basu y col. J. Immunol. 2005; 174(11): pág. 7160-71; Stager y col. J. Immunol. 2000; 165(12): pág.

7064-71; Ghosh y col. *Vaccine*. 2001; 20(12): pág. 59-66; Wilson y col. *Infect. Immun.* 1995; 63(5): pág. 2062-9; Tewary y col. *J. Infect. Dis.* 2005; 191(12): pág. 2130-7; Aguilar-Be y col. *Infect. Immun.* 2005; 73(2): pág. 812-9. Rafati y col. *Vaccine*. 2006; 24(12): 2169-75), faltan progresos hacia la definición de candidatos a antígeno eficaces contra LV *in vivo*.

5

[0008] Las estrategias que emplean vacunas consistentes en organismos enteros para prevenir o tratar leishmaniosis no han sido eficaces en seres humanos. En consecuencia, sigue habiendo una significativa necesidad de composiciones inmunogénicas y vacunas que puedan prevenir y/o tratar eficazmente la leishmaniosis en seres humanos y otros mamíferos (por ejemplo, caninos). La presente descripción satisface estas necesidades y ofrece otras ventajas relacionadas.

10

BREVE SUMARIO

[0009] La presente invención proporciona un péptido de fusión que comprende una porción inmunogénica de al menos cuatro antígenos de *Leishmania*, en el que los antígenos de *Leishmania* son KMP11, SMT, A2 y CPB, en el que el polipéptido de fusión comprende una secuencia aminoacídica exhibida en una cualquiera de las SEQ ID NO: 23, 33 o 37, o una secuencia que tiene al menos un 97 % de identidad con ellas; y en el que el polipéptido de fusión es capaz de inducir una respuesta inmunitaria protectora para prevenir la leishmaniosis o reducir la gravedad de la leishmaniosis en un mamífero.

15

20

[0010] En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un polinucleótido aislado que codifica un polipéptido de fusión de la presente invención.

[0011] En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición que comprende al menos un componente seleccionado del grupo consistente en un polipéptido según la presente invención y un polinucleótido según la presente invención, en combinación con al menos un inmunoestimulante.

25

[0012] La presente invención proporciona, en otro aspecto, la composición según la presente invención para uso en la estimulación de una respuesta inmunitaria contra leishmaniosis en un mamífero.

30

[0013] La presente invención proporciona, en un aspecto adicional, la composición según la presente invención para uso en la inducción de inmunidad protectora frente a leishmaniosis en un mamífero.

[0014] En otro aspecto, la presente invención proporciona la composición según la presente invención para uso en la inducción de inmunidad protectora frente a leishmaniosis en un canino, en la que el inmunoestimulante es GLA y en la que la composición se formula como una emulsión de aceite en agua estable.

35

[0015] En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un procedimiento para detectar infección por *Leishmania* en una muestra biológica, que comprende:

40

a) poner en contacto una muestra biológica con un polipéptido de fusión de la presente invención; y

b) detectar en la muestra biológica la presencia de anticuerpos que se unen al polipéptido de fusión, detectando así la infección por *Leishmania* en una muestra biológica.

45

[0016] En otro aspecto, la presente invención proporciona un kit de diagnóstico para detectar infección por *Leishmania* en una muestra biológica que comprende:

a) un polipéptido de fusión de la presente invención; y

50

b) un reactivo de detección.

[0017] En pocas palabras, la presente descripción proporciona composiciones y procedimientos para prevenir, tratar y detectar leishmaniosis. En un aspecto, se proporcionan polipéptidos de fusión de la descripción que comprenden una porción inmunogénica de al menos dos antígenos de *Leishmania* seleccionados del grupo consistente en KMP11, SMT, A2 y/o CPB, o secuencias que tienen al menos un 90 % de identidad con los mismos. En una realización más particular, los polipéptidos de *Leishmania* KMP11, SMT, A2 y/o CPB, o una porción o variante inmunogénica de los mismos, comprenden una secuencia aminoacídica de una secuencia de KMP11, SMT, A2 y/o CPB de *L. donovani*, *L. infantum* o *L. major*, o una secuencia que tiene al menos un 90 % de identidad con las mismas.

55

60

[0018] En una realización más específica, un polipéptido de fusión de la descripción comprende una secuencia aminoacídica exhibida en la SEQ ID NO: 21 (por ejemplo, polipéptido de fusión KSA) o SEQ ID NO: 23 (por ejemplo, polipéptido de fusión KSAC) o SEQ ID NO: 33 (por ejemplo, KSA_{FLC}, en el que se usa una secuencia de A2 completa).

65

- [0019]** En otra realización de la descripción, se modifica un polipéptido de fusión de la presente memoria reemplazando uno o más de los residuos de cisteína del polipéptido por residuos alternativos, tales como serina o alanina, o cualquier otro residuo incapaz de formación de enlaces disulfuro intercatenarios o intracatenarios, produciendo un polipéptido de fusión de cisteína modificada. En una realización más específica, el polipéptido de fusión de cisteína modificada comprende una secuencia aminoacídica exhibida en una cualquiera de las SEQ ID NO: 37 (por ejemplo, polipéptido de fusión KSAC de cisteína modificada) o SEQ ID NO: 35 (por ejemplo, polipéptido de fusión KSA de cisteína modificada).
- [0020]** En otras realizaciones, se proporcionan composiciones que comprenden polipéptidos de fusión en combinación con inmunoestimulantes. En aún otras realizaciones, se proporcionan también composiciones que comprenden polinucleótidos que codifican los polipéptidos de fusión. Dichas composiciones de la descripción son preferiblemente capaces de proporcionar protección frente a leishmaniosis tal como la causada por infección por *L. major*, *L. infantum* o *L. donovani* en un ensayo *in vivo*.
- [0021]** Se proporcionan también por la descripción vectores de expresión recombinante y suministro que comprenden secuencias polinucleotídicas de la descripción y células hospedadoras transformadas o transfectadas con dichos vectores de expresión.
- [0022]** En otras realizaciones, la presente descripción proporciona procedimientos para estimular una respuesta inmunitaria contra leishmaniosis en un mamífero, que comprende administrar una composición como se describe en la presente memoria.
- [0023]** En todavía otras realizaciones, la presente descripción proporciona procedimientos para inducir inmunidad protectora frente a leishmaniosis en un mamífero, que comprenden administrar una composición como se describe en la presente memoria.
- [0024]** En aún otras realizaciones, la presente descripción contempla procedimientos para detectar infección por *Leishmania* en una muestra biológica, por ejemplo, sueros, sangre, saliva, etc., que comprenden poner en contacto la muestra biológica con un polipéptido de fusión de la invención y detectar en la muestra biológica la presencia de anticuerpos que se unen al polipéptido de fusión, detectando así la infección por *Leishmania* en una muestra biológica. En realizaciones relacionadas, el polipéptido de fusión puede estar opcionalmente unido a un soporte sólido.
- [0025]** Diversas realizaciones de la presente descripción proporcionan también kits para uso en la detección de infección por *Leishmania* en una muestra biológica, que comprenden un polipéptido de fusión o polinucleótido de la invención y un reactivo de detección.
- [0026]** Estos y otros aspectos de la presente invención resultarán evidentes tras la referencia a la siguiente descripción detallada y dibujos adjuntos.
- BREVE DESCRIPCIÓN DE VARIAS VISTAS DE LOS DIBUJOS**
- [0027]**
- La Figura 1 muestra la protección frente a infección por *L. infantum* mediante inmunización con polipéptidos de fusión KSA o KSAC. Se expusieron a *L. infantum* ratones C57BL/6 inoculados con disolución salina solo, SMT+MPL-SE, KSA+MPL-SE o KSAC+MPL-SE, y se midió el número de parásitos en el hígado mediante dilución limitante 4 semanas después de la infección. Se muestran la media y EEM de 5 ratones en cada grupo. $**P<0,01$ y $***P<0,001$ mediante prueba de t no emparejada en comparación con el grupo salino.
- La Figura 2 muestra la protección frente a infección por *L. donovani* mediante inmunización con polipéptidos de fusión KSA o KSAC. Se expusieron a *L. donovani* ratones BALB/c inoculados con disolución salina solo, KSA+MPL-SE o KSAC+MPL-SE y se midió el número de parásitos en el hígado mediante dilución limitante 4 semanas después de la infección. Se muestran media y EEM de 5 ratones en cada grupo. $*P<0,05$ mediante prueba de t no emparejada en comparación con el grupo salino.
- La Figura 3 muestra la protección frente a infección por *L. major* mediante inmunización con un polipéptido de fusión KSAC. Se expusieron a *L. major* por vía intradérmica en ambas orejas derecha e izquierda ratones BALB/c inoculados con disolución salina (círculos/barras blancos) o KSAC+MPL-SE (círculo/barras negros). (A) Se midieron los tamaños de lesión cada semana hasta las 8 semanas. Se muestran la media y EEM de 5 ratones en cada grupo. (B) Se midieron los números de parásitos en las lesiones de oreja a las 8 semanas de la infección por dilución limitante.
- La Figura 4 muestra la secuencia polinucleotídica (SEQ ID NO: 22) que codifica un polipéptido de fusión KSA que comprende una secuencia polinucleotídica de una porción inmunogénica de KMP11 representada por los polinucleótidos 1-276 de SEQ ID NO:29 (en cursiva), que está fusionada con una porción inmunogénica de SMT

representada por los polinucleótidos 1-1056 de SEQ ID NO: 30 (subrayado), que está adicionalmente fusionada con una porción inmunogénica de A2 representada por los polinucleótidos 1345-1974 de SEQ ID NO: 22 (en negrita). Las secuencias polinucleotídicas de ligamiento están en texto simple y delimitadas por paréntesis. El codón de terminación TAA terminal está también en texto simple.

5

Las Figuras 5A-5B muestran la secuencia polinucleotídica (SEQ ID NO: 24) que codifica un polipéptido de fusión KSAC que comprende una secuencia polinucleotídica de una porción inmunogénica de KMP11 representada por los polinucleótidos 1-276 de SEQ ID NO:29 (en cursiva), que está fusionada con una porción inmunogénica de SMT representada por los polinucleótidos 1-1056 de SEQ ID NO: 30 (subrayado), que está adicionalmente fusionada con una porción inmunogénica de A2 representada por los polinucleótidos 1345-1974 de SEQ ID NO: 24 (en negrita), que está adicionalmente fusionada con una porción inmunogénica de CBP representada por los polinucleótidos 1-948 de SEQ ID NO: 32 (texto simple). Las secuencias polinucleotídicas de ligamiento están en texto simple y delimitadas por paréntesis. El codón de terminación TAA terminal está también en texto simple.

10

15 La Figura 6 muestra la secuencia aminoacídica de un polipéptido de fusión KSA (SEQ ID NO: 21) que comprende una secuencia aminoacídica de una porción inmunogénica de KMP11 representada por los aminoácidos 1-92 de SEQ ID NO: 25 (en cursiva), que está fusionada con una porción inmunogénica de SMT representada por los aminoácidos 1-352 de SEQ ID NO: 26 (subrayado), que está adicionalmente fusionada con una porción inmunogénica de A2 representada por los aminoácidos 1-210 de SEQ ID NO: 27 (en negrita). Los aminoácidos de ligamiento están en texto simple y delimitados por paréntesis.

20

La Figura 7 muestra la secuencia polinucleotídica que codifica un polipéptido de fusión KSAC (SEQ ID NO: 23) que comprende la secuencia aminoacídica de una porción inmunogénica de KMP11 representada por los aminoácidos 1-92 de SEQ ID NO: 25 (en cursiva), que está fusionada con una porción inmunogénica de SMT representada por los aminoácidos 1-352 de SEQ ID NO: 26 (subrayado), que está adicionalmente fusionada con una porción inmunogénica de A2 representada por los aminoácidos 1-210 de SEQ ID NO: 27 (negrita), que está adicionalmente fusionada con una porción inmunogénica de CBP representada por los aminoácidos 1-316 de SEQ ID NO: 28 (texto simple). Los aminoácidos de ligamiento están en texto simple y delimitados por paréntesis.

25

30 BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS IDENTIFICADORES DE SECUENCIA

[0028]

La SEQ ID NO: 1 es una secuencia aminoacídica de un polipéptido KMP 11 completo de *L. infantum*.

35

La SEQ ID NO: 2 es una secuencia aminoacídica de un polipéptido KMP 11 completo de *L. donovani*.

La SEQ ID NO: 3 es una secuencia aminoacídica de un polipéptido KMP 11 completo de *L. major*.

40

La SEQ ID NO: 4 es una secuencia aminoacídica de un polipéptido de esteroil 24-c-metiltransferasa (SMT) completo de *L. infantum*.

La SEQ ID NO: 5 es una secuencia aminoacídica de un polipéptido de esteroil 24-c-metiltransferasa (SMT) completo de *L. donovani*.

45

La SEQ ID NO: 6 es una secuencia aminoacídica de un polipéptido de esteroil 24-c-metiltransferasa (SMT) completo de *L. major*.

La SEQ ID NO: 7 es una secuencia aminoacídica de un polipéptido A2 completo de *L. infantum*.

50

La SEQ ID NO: 8 es una secuencia aminoacídica de un polipéptido CBP completo de *L. infantum*.

La SEQ ID NO: 9 es una secuencia aminoacídica de un polipéptido CBP completo de *L. donovani*.

55

La SEQ ID NO: 10 es una secuencia aminoacídica de un polipéptido CBP completo de *L. major*.

La SEQ ID NO: 11 es una secuencia de ácido nucleico que codifica el polipéptido de SEQ ID NO: 1.

La SEQ ID NO: 12 es una secuencia de ácido nucleico que codifica el polipéptido de SEQ ID NO: 2.

60

La SEQ ID NO: 13 es una secuencia de ácido nucleico que codifica el polipéptido de SEQ ID NO: 3.

La SEQ ID NO: 14 es una secuencia de ácido nucleico que codifica el polipéptido de SEQ ID NO: 4.

65

La SEQ ID NO: 15 es una secuencia de ácido nucleico que codifica el polipéptido de SEQ ID NO: 5.

- La SEQ ID NO: 16 es una secuencia de ácido nucleico que codifica el polipéptido de SEQ ID NO: 6.
- La SEQ ID NO: 17 es una secuencia de ácido nucleico que codifica el polipéptido de SEQ ID NO: 7.
- 5 La SEQ ID NO: 18 es una secuencia de ácido nucleico que codifica el polipéptido de SEQ ID NO: 8.
- La SEQ ID NO: 19 es una secuencia de ácido nucleico que codifica el polipéptido de SEQ ID NO: 9.
- La SEQ ID NO: 20 es una secuencia de ácido nucleico que codifica el polipéptido de SEQ ID NO: 10.
- 10 La SEQ ID NO: 21 es una secuencia aminoacídica de un polipéptido de fusión KSA (KMP11, SMT, A2).
- La SEQ ID NO: 22 es una secuencia de ácido nucleico que codifica el polipéptido de SEQ ID NO: 21.
- 15 La SEQ ID NO: 23 es una secuencia aminoacídica de un polipéptido de fusión KSAC (KMP11, SMT, A2, CPB).
- La SEQ ID NO: 24 es una secuencia de ácido nucleico que codifica el polipéptido de SEQ ID NO: 23.
- La SEQ ID NO: 25 es la secuencia aminoacídica de una porción inmunogénica de un polipéptido KMP 11.
- 20 La SEQ ID NO: 26 es la secuencia aminoacídica de una porción inmunogénica de un polipéptido SMP.
- La SEQ ID NO: 27 es la secuencia aminoacídica de una porción inmunogénica de un polipéptido A2.
- 25 La SEQ ID NO: 28 es la secuencia aminoacídica de una porción inmunogénica de un polipéptido CBP.
- La SEQ ID NO: 29 es una secuencia de ácido nucleico que codifica el polipéptido de SEQ ID NO: 25.
- La SEQ ID NO: 30 es una secuencia de ácido nucleico que codifica el polipéptido de SEQ ID NO: 26.
- 30 La SEQ ID NO: 31 es una secuencia de ácido nucleico que codifica el polipéptido de SEQ ID NO: 27.
- La SEQ ID NO: 32 es una secuencia de ácido nucleico que codifica el polipéptido de SEQ ID NO: 28.
- 35 La SEQ ID NO: 33 es una secuencia aminoacídica de una versión alternativa de un polipéptido de fusión KSAC (KMP11, SMT, A2, CPB), en la que se usa la secuencia de A2 completa.
- La SEQ ID NO: 34 es una secuencia de ácido nucleico que codifica el polipéptido de SEQ ID NO: 33.
- 40 La SEQ ID NO: 35 es una secuencia aminoacídica de una versión alternativa de un polipéptido de fusión KSA (KMP11, SMT, A2), en la que los residuos de cisteína presentes en el polipéptido de fusión se han reemplazado por serinas o alaninas.
- La SEQ ID NO: 36 es una secuencia de ácido nucleico que codifica el polipéptido de SEQ ID NO: 35.
- 45 La SEQ ID NO: 37 es una secuencia aminoacídica de una versión alternativa de un polipéptido de fusión KSAC (KMP11, SMT, A2, CPB), en la que los residuos de cisteína presentes en el polipéptido de fusión se han reemplazado por serinas o alaninas.
- 50 La SEQ ID NO: 38 es una secuencia de ácido nucleico que codifica el polipéptido de SEQ ID NO: 37.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

- [0029]** Como se observa anteriormente, la presente descripción está dirigida en general a composiciones y procedimientos para prevenir, tratar y detectar leishmaniosis. Las composiciones de la descripción incluyen, por ejemplo, polipéptidos de fusión y combinaciones de polipéptidos que comprenden al menos dos porciones o fragmentos inmunogénicos/antigénicos de los polipéptidos KMP11, SMT, A2 y/o CPB de *Leishmania* o una variante de dicho polipéptido, en los que la porción o variante retiene sustancialmente las mismas o similares propiedades inmunogénicas que el correspondiente polipéptido completo. Como se demuestra adicionalmente en la presente memoria, las estrategias de inmunización que usan composiciones de la invención proporcionan una protección *in vivo* significativa frente a *L. infantum*, *L. donovani* y *L. major*, que son los agentes causantes de LV en seres humanos y perros. Adicionalmente, el efecto profiláctico conseguido usando composiciones de la presente invención muestra mejoras y ventajas sustanciales respecto a estrategias de vacuna reseñadas anteriormente. La presente descripción contempla también, en otras realizaciones, usar los polipéptidos de fusión descritos en la presente memoria en aplicaciones de diagnóstico incluyendo, pero sin limitación, serodiagnóstico y ensayo en sangre completa en pacientes y perros.
- 55
- 60
- 65

[0030] Como se usa en la presente memoria, el término “polipéptido” engloba cadenas aminoacídicas de cualquier longitud, incluyendo proteínas completas, en el que los residuos aminoacídicos están ligados por enlaces covalentes. Un polipéptido que comprende una porción inmunogénica de un polipéptido de *Leishmania* puede consistir únicamente en una porción inmunogénica, puede contener dos o más porciones inmunogénicas y/o puede contener secuencias adicionales. Las secuencias adicionales pueden derivar de un polipéptido nativo de *Leishmania* o pueden ser heterólogas, y dichas secuencias heterólogas pueden (pero no necesariamente) ser inmunogénicas.

[0031] En diversas realizaciones, las composiciones y procedimientos de la presente invención proporcionan un polipéptido de fusión que comprende dos o más porciones o fragmentos inmunogénicos/antigénicos de los polipéptidos KMP11, SMT, A2 y/o CPB de *Leishmania*, o una variante de los mismos. En realizaciones particulares, un polipéptido de fusión comprende dos o más fragmentos de antígeno de *Leishmania* como se indica en las SEQ ID NO: 1-10 y 25-28. En realizaciones relacionadas, el polipéptido de fusión comprende la secuencia aminoacídica exhibida en una cualquiera de las SEQ ID NO: 21 o 35 (por ejemplo, KSA) o en las SEQ ID NO: 23 o 33 o 37 (por ejemplo, KSAC).

[0032] En otras realizaciones, los polipéptidos de fusión y combinaciones de polipéptidos se modifican para reemplazar los residuos de cisteína contenidos en los mismos por residuos de serina, en las que los polipéptidos de cisteína modificada retienen sustancialmente las mismas o similares propiedades inmunogénicas que los correspondientes polipéptidos no modificados. Por ejemplo, un polipéptido de fusión de cisteína modificada, en ciertas realizaciones específicas, comprende una secuencia aminoacídica exhibida en las SEQ ID NO: 35 (KSA) o 37 (KSAC).

POLIPÉPTIDOS DE FUSIÓN DE *LEISHMANIA* Y USOS DE LOS MISMOS

[0033] En un aspecto, la presente descripción proporciona polipéptidos aislados de *Leishmania*, como se describen en la presente memoria, incluyendo polipéptidos de fusión y composiciones que contienen los mismos. Generalmente, un polipéptido de la presente descripción será un polipéptido aislado y puede comprender un fragmento polipeptídico (por ejemplo, una porción antigénica/inmunogénica), múltiples fragmentos polipeptídicos o un polipéptido completo de una secuencia aminoacídica de dos o más genes de *Leishmania* incluyendo, pero sin limitación, KMP11, SMT, A2 y/o CPB. Un “polipéptido aislado” es aquel que se retira de su entorno original. Por ejemplo, una proteína de origen natural está aislada si está separada de algunos o todos de los materiales coexistentes en el sistema natural. Preferiblemente, dichos polipéptidos son al menos aproximadamente un 90 % puros, más preferiblemente al menos aproximadamente un 95 % puros, y lo más preferiblemente al menos aproximadamente un 99 % puros. Un especialista en la materia apreciaría que los fragmentos polipeptídicos antigénicos podrían obtenerse también a partir de aquellos ya disponibles en la materia. Los polipéptidos de la descripción y fragmentos antigénicos/inmunogénicos de los mismos, y otras variantes, pueden prepararse usando técnicas recombinantes y/o sintéticas convencionales.

[0034] Es una porción inmunogénica de un polipéptido KMP11, SMT, A2 y/o CPB de *Leishmania* una porción que es capaz de desencadenar una respuesta inmunitaria (concretamente, celular y/o humoral) en un paciente infectado actual o anteriormente por *Leishmania* (tal como un ser humano o un perro) y/o en cultivos de células de nódulo linfático o células mononucleares de sangre periférica (PBMC) aisladas de individuos infectados actual o anteriormente por *Leishmania*. Las células en que se desencadena una respuesta pueden comprender una mezcla de tipos celulares o pueden contener células de componentes aislados (incluyendo, pero sin limitación, linfocitos T, linfocitos NK, macrófagos, monocitos y/o linfocitos B). En una realización particular, las porciones inmunogénicas de un polipéptido de fusión que comprende al menos dos polipéptidos antigénicos de *Leishmania* seleccionados de KMP11, SMT, A2 y/o CPB son capaces de inducir la proliferación de linfocitos T y/o una respuesta de citocina predominantemente de tipo Th1 (por ejemplo, producción de IL-2, IFN- γ y/o TNF- α por linfocitos T y/o linfocitos NK y/o producción de IL-12 por monocitos, macrófagos y/o linfocitos B). Las porciones inmunogénicas de los antígenos descritos en la presente memoria pueden identificarse generalmente usando técnicas conocidas por los especialistas en la materia, incluyendo los procedimientos representativos resumidos en Paul, “Fundamental Immunology”, 5ª ed., Lippincott Williams & Wilkins, 2003 y referencias citadas en el mismo. Dichas técnicas incluyen el cribado en polipéptidos de fusión de la capacidad de reaccionar con anticuerpos específicos de antígeno, antisueros y/o líneas o clones de linfocitos T. Como se usan en la presente memoria, los antisueros y anticuerpos son “específicos de antígeno” si se unen específicamente a un antígeno (concretamente, reaccionan con la proteína en un inmunoensayo y no reaccionan detectablemente con proteínas no relacionadas). Dichos antisueros y anticuerpos pueden prepararse como se describe en la presente memoria y usando técnicas bien conocidas.

[0035] Las porciones inmunogénicas de polipéptidos KMP11, SMT, A2 y/o CPB de *Leishmania* pueden ser esencialmente de cualquier longitud, a condición de que retengan una o más de las regiones inmunogénicas de KMP11, SMT, A2 y/o CPB que son responsables de y/o contribuyen a la protección *in vivo* proporcionada frente a leishmaniosis por uno o más polipéptidos de fusión de la descripción, como se dan a conocer en la presente memoria. En una realización, la capacidad de una porción inmunogénica de reaccionar con antisueros específicos de antígeno puede potenciarse o no cambiarse, respecto a la proteína nativa, o puede reducirse en menos de un 50 %, y preferiblemente menos de un 20 %, respecto a la proteína nativa. Las porciones ilustrativas serán generalmente

- de al menos 10, 15, 25, 50, 150, 200, 250, 300 o 350 aminoácidos de longitud, o más, hasta e incluyendo polipéptidos KMP11, SMT, A2 y/o CPB completos. En una realización particular, es una porción inmunogénica de un polipéptido KMP11, SMT, A2 y/o CPB de *Leishmania* aquella que, cuando se usa en combinación, es capaz de proporcionar protección frente a, por ejemplo, en un ensayo *in vivo* como se describe en la presente memoria, o
- 5 serodiagnóstico de, una especie de *Leishmania* tal como *L. donovani*, *L. major* y/o *L. infantum*, que se cree que son los agentes causantes de LV en seres humanos y perros. Además, las composiciones de la invención pueden ser también útiles en el bloqueo de la transmisión del agente causante de LV de perros a seres humanos, por ejemplo, al reducir o eliminar el número de parásitos en la sangre y piel de perros infectados.
- 10 **[0036]** Como reconocería un especialista en la materia, una composición polipeptídica de la descripción puede comprender también uno o más polipéptidos que son inmunológicamente reactivos con linfocitos T y/o anticuerpos generados contra un polipéptido de la invención, particularmente un polipéptido que tiene una secuencia aminoacídica dada a conocer en la presente memoria, o contra un fragmento o variante inmunogénico del mismo. En realizaciones particulares, el polipéptido es un polipéptido de fusión como se describe en la presente memoria.
- 15 **[0037]** En diversas realizaciones de la presente descripción, los polipéptidos de fusión de la presente descripción pueden comprender al menos 2 porciones o fragmentos antigénicos o inmunogénicos de los polipéptidos KMP11, SMT, A2 y/o CPB de *Leishmania*, o una variante dada a conocer en la presente memoria. En algunos casos, se identificarán porciones inmunogénicas preferidas que tienen un nivel de actividad inmunogénica mayor
- 20 que el del correspondiente polipéptido completo, por ejemplo, que tienen más de aproximadamente un 100 % o 150 % o más de actividad inmunogénica. En realizaciones particulares, la inmunogenicidad del polipéptido de fusión completo tendrá una inmunogenicidad aditiva, o más que aditiva, contribuida por cada una de las porciones antigénicas/inmunogénicas contenidas en el mismo.
- 25 **[0038]** En otra realización de la descripción, se proporcionan polipéptidos de fusión que comprenden dos o más porciones inmunogénicas de polipéptidos de *Leishmania* seleccionados de KMP11, SMT, A2 y/o CPB que son capaces de desencadenar linfocitos T y/o anticuerpos que son inmunológicamente reactivos con dos o más polipéptidos descritos en la presente memoria, o dos o más polipéptidos codificados por secuencias polinucleotídicas contiguas contenidas en las secuencias polinucleotídicas dadas a conocer en la presente memoria,
- 30 o fragmentos o variantes inmunogénicas de las mismas, o dos o más secuencias polinucleotídicas que hibridan con dos o más de estas secuencias en condiciones de rigor moderado a alto.
- [0039]** En realizaciones particulares, un polipéptido de fusión de la presente descripción puede comprender al menos 2, al menos 3, al menos 4, al menos 5, al menos 6, al menos 7, al menos 8, al menos 9 o al menos 10
- 35 porciones o fragmentos inmunogénicos/antigénicos de polipéptidos KMP11, SMT, A2 y/o CPB de *Leishmania*, o una variante de dichos polipéptidos, en el que las porciones o fragmentos retienen sustancialmente las mismas o similares propiedades inmunogénicas que el correspondiente polipéptido completo.
- [0040]** En otro aspecto, los polipéptidos de fusión de la presente descripción contienen múltiples copias de
- 40 fragmentos polipeptídicos, repeticiones de fragmentos polipeptídicos o fragmentos polipeptídicos multiméricos, incluyendo fragmentos antigénicos/inmunogénicos tales como los polipéptidos KMP11, SMT, A2 y/o CPB de *Leishmania*, que comprenden al menos aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más fragmentos contiguos, en cualquier orden, e incluyendo todas las longitudes de una composición polipeptídica exhibida en la presente memoria, o aquellos codificados por una secuencia polinucleotídica exhibida en la presente memoria. En otro
- 45 aspecto, los polipéptidos de fusión de la presente descripción pueden comprender dos o más fragmentos de antígeno de *Leishmania* como se indican en las SEQ ID NO: 1-10 y 25-28 o una porción inmunogénica de las mismas. En una realización particular, el polipéptido de fusión comprende una secuencia aminoacídica exhibida en una cualquiera de las SEQ ID NO: 21, 23, 33, 35 o 37.
- 50 **[0041]** En todavía otro aspecto, la presente descripción proporciona polipéptidos de fusión que comprenden dos o más, tres o más o cuatro o más variantes de los polipéptidos KMP11, SMT, A2 y/o CPB de *Leishmania* descritos en la presente memoria. Las variantes polipeptídicas englobadas generalmente por la presente descripción exhibirán típicamente al menos aproximadamente un 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99 % o más
- 55 identidad (determinada como se describe a continuación) a lo largo de su longitud con una secuencia polipeptídica exhibida en la presente memoria.
- [0042]** Las composiciones y procedimientos de la presente descripción engloban también variantes de los polipéptidos anteriores. Ciertas "variantes" polipeptídicas incluyen polipéptidos que difieren de una proteína KMP11, SMT, A2 y/o CPB nativa en una o más sustituciones, deleciones, adiciones y/o inserciones, de tal modo que la
- 60 inmunogenicidad deseada del polipéptido variante no se reduzca sustancialmente respecto a un polipéptido KMP11, SMT, A2 y/o CPB nativo.
- [0043]** Por ejemplo, ciertas variantes de la descripción incluyen polipéptidos de la descripción que se han modificado para reemplazar uno o más residuos de cisteína por residuos alternativos. Se hace referencia a dichos
- 65 polipéptidos de aquí en adelante como polipéptidos de cisteína modificada o polipéptidos de fusión de cisteína modificada. En una realización más específica, los residuos de cisteína se reemplazan por residuos de resina debido

a la similitud en la disposición espacial de sus cadenas laterales respectivas. Sin embargo, resultará evidente para un especialista en la materia que puede usarse como reemplazo para cisteína cualquier aminoácido que sea incapaz de formar un enlace disulfuro intercatenario o intracatenario. Cuando todos o sustancialmente todos los residuos de cisteína de un polipéptido o polipéptido de fusión de esta descripción están reemplazados, la variante de cisteína modificada resultante puede tender menos a la agregación y por tanto ser más fácil de purificar, más homogénea y/u obtenible con mayores rendimientos después de la purificación.

[0044] En una realización, puede potenciarse o no cambiarse la capacidad de una variante de reaccionar con antisueros específicos de antígeno respecto a la proteína nativa, o puede reducirse en menos de un 50 %, y preferiblemente menos de un 20 %, respecto a la proteína nativa. En una realización particular, es una variante de un polipéptido KMP11, SMT, A2 y/o CPB capaz de proporcionar protección, por ejemplo, en un ensayo *in vivo* como se describe en la presente memoria, frente a una especie de *Leishmania* tal como *L. donovani*, *L. infantum* y/o *L. major*.

[0045] En realizaciones particulares, un polipéptido de fusión de la presente descripción comprende al menos 2, al menos 3, al menos 4, al menos 5, al menos 6, al menos 7, al menos 8, al menos 9 o al menos 10 o más variantes de un polipéptido KMP11, SMT, A2 y/o CPB de *Leishmania* que es capaz de proporcionar protección frente a, por ejemplo, en un ensayo *in vivo* como se describe en la presente memoria, o en serodiagnóstico de, especies de *Leishmania* tales como *L. donovani*, *L. major* y/o *L. infantum*.

[0046] Un polipéptido de fusión de la presente descripción comprende dos o más, tres o más, cuatro o más, cinco o más, seis o más, siete o más, ocho o más, nueve o más o diez o más variantes de un polipéptido KMP11, SMT, A2 y/o CPB de *Leishmania* que es capaz serodiagnosticar una especie de *Leishmania* tal como *L. donovani*, *L. major* y/o *L. infantum*.

[0047] En muchos casos, una variante contendrá sustituciones conservativas. Una "sustitución conservativa" es aquella en que se sustituye un aminoácido por otro aminoácido que tiene propiedades similares, de tal modo que un especialista en la materia de la química peptídica esperaría que la estructura secundaria y naturaleza hidropática del polipéptido no cambiaran sustancialmente. Como se describe anteriormente, pueden hacerse modificaciones en la estructura de los polinucleótidos y polipéptidos de la presente descripción y seguir obteniendo una molécula funcional que codifica un polipéptido variante o derivado con características deseables, por ejemplo, con características inmunogénicas. Cuando se desea alterar la secuencia aminoacídica de un polipéptido para crear una variante o porción inmunogénica equivalente, o incluso mejorada, de un polipéptido de la descripción, un especialista en la materia cambiará típicamente uno o más de los codones de la secuencia de ADN codificante según la Tabla 1.

[0048] Por ejemplo, ciertos aminoácidos pueden sustituirse por otros aminoácidos en una estructura proteica sin pérdida apreciable de capacidad de unión interactiva con estructuras tales como, por ejemplo, regiones de unión a antígeno de anticuerpos o sitios de unión a moléculas de sustrato. Puesto que es la capacidad interactiva y naturaleza de una proteína lo que define esa actividad funcional biológica de la proteína, pueden hacerse ciertas sustituciones aminoacídicas en una secuencia proteica y, por supuesto su secuencia de codificación de ADN subyacente, y obtener no obstante una proteína con propiedades similares. Por tanto, se contempla que puedan hacerse diversos cambios en las secuencias peptídicas de las composiciones dadas a conocer o las correspondientes secuencias de ADN que codifican dichos péptidos sin pérdida apreciable de su utilidad o actividad biológica.

Tabla 1

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

Triptófano	Trp	W	UGG
Tirosina	Tyr	Y	UAC UAU

[0049] Al hacer dichos cambios, puede considerarse el índice hidropático de los aminoácidos. La importancia del índice aminoácido hidropático para conferir función biológica interactiva a una proteína se entiende en general en la materia (Kyte y Doolittle, 1982). Se acepta que el carácter hidropático relativo del aminoácido contribuye a la estructura secundaria de la proteína resultante, que a su vez define la interacción de la proteína con otras moléculas, por ejemplo, enzimas, sustratos, receptores, ADN, anticuerpos, antígenos y similares. Cada aminoácido tiene asignado un índice hidropático basado en sus características de hidrofobia y carga (Kyte y Doolittle, 1982). Estos valores son: isoleucina (+4,5); valina (+4,2); leucina (+3,8); fenilalanina (+2,8); cisteína/cistina (+2,5); metionina (+1,9); alanina (+1,8); glicina (-0,4); treonina (-0,7); serina (-0,8); triptófano (-0,9); tirosina (-1,3); prolina (-1,6); histidina (-3,2); glutamato (-3,5); glutamina (-3,5); aspartato (-3,5); asparagina (-3,5); lisina (-3,9) y arginina (-4,5).

[0050] Es conocido en la materia que ciertos aminoácidos pueden sustituirse por otros aminoácidos que tienen un índice o puntuación hidropático similar y seguir dando como resultado una proteína con actividad biológica similar, concretamente, seguir obteniendo una proteína funcionalmente bioequivalente. Al hacer dichos cambios, se prefiere la sustitución de aminoácidos cuyos índices hidropáticos estén a ± 2 , se prefieren particularmente aquellos a ± 1 y se prefieren aún más particularmente a $\pm 0,5$. Se entiende también en la materia que la sustitución de aminoácidos similares puede hacerse eficazmente basándose en la hidrofilia.

[0051] Como se detalla en la patente de EE. UU. nº 4.554.101, se han asignado los siguientes valores de hidrofilia a los residuos aminoácidos: arginina (+3,0); lisina (+3,0); aspartato (+3,0 \pm 1); glutamato (+3,0 \pm 1); serina (+0,3); asparagina (+0,2); glutamina (+0,2); glicina (0); treonina (-0,4); prolina (-0,5 \pm 1); alanina (-0,5); histidina (-0,5); cisteína (-1,0); metionina (-1,3); valina (-1,5); leucina (-1,8); isoleucina (-1,8); tirosina (-2,3); fenilalanina (-2,5); triptófano (-3,4). Se entiende que un aminoácido puede sustituirse por otro que tiene un valor de hidrofilia similar y seguir obteniendo una proteína biológicamente equivalente, y en particular, inmunológicamente equivalente. En dichos cambios, se prefiere la sustitución de aminoácidos cuyos valores de hidrofilia están a ± 2 , se prefieren particularmente aquellos a ± 1 y se prefieren más particularmente aquellos a $\pm 0,5$.

[0052] Como se esboza anteriormente, las sustituciones aminoácidas están generalmente basadas por lo tanto en la similitud relativa de los sustituyentes de cadena lateral aminoácida, por ejemplo, su hidrofobia, hidrofilia, carga, tamaño y similares. Las sustituciones ejemplares que tienen en consideración varias de las características anteriores son bien conocidas por los especialistas en la materia e incluyen: arginina y lisina, glutamato y aspartato, serina y treonina, glutamina y asparagina y valina, leucina e isoleucina.

[0053] Las sustituciones aminoácidas pueden hacerse adicionalmente basándose en la similitud de polaridad, carga, solubilidad, hidrofobia, hidrofilia y/o naturaleza anfipática de los residuos. Por ejemplo, los aminoácidos cargados negativamente incluyen ácido aspártico y ácido glutámico, los aminoácidos cargados positivamente incluyen lisina y arginina y los aminoácidos con grupos de cabeza polares no cargados que tienen valores de hidrofilia similares incluyen leucina, isoleucina y valina; glicina y alanina; asparagina y glutamina y serina, treonina, fenilalanina y tirosina. Otros grupos de aminoácidos que pueden representar cambios conservativos incluyen: (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. Una variante puede contener también, o como alternativa, cambios no conservativos. En una realización preferida, los polipéptidos variantes difieren de la secuencia nativa por sustitución, delección o adición de 5 aminoácidos o menos. Las variantes pueden modificarse también (o como alternativa), por ejemplo, mediante la delección o adición de aminoácidos que tienen una influencia mínima sobre la inmunogenicidad, estructura secundaria y naturaleza hidropática del polipéptido.

[0054] Como se observa anteriormente, los polipéptidos pueden comprender una secuencia señal (o líder) en el extremo N-terminal de la proteína que dirige cotraduccionally o postraduccionally la transferencia de la proteína. El polipéptido puede estar también conjugado con un ligador u otra secuencia para facilitar la síntesis, purificación o identificación del polipéptido (por ejemplo, marcador de polihistidina (6XHis), GST, MBP, TAP/TAG, epítipo FLAG, epítipo MYC, epítipo V5, epítipo VSV-G, etc.) o para potenciar la unión del polipéptido a un soporte sólido. Por ejemplo, un polipéptido puede conjugarse con una región Fc de inmunoglobulina.

[0055] Cuando se comparan secuencias polinucleotídicas o polipeptídicas, se dice que dos secuencias son "idénticas" si la secuencia de nucleótidos o aminoácidos en las dos secuencias es la misma cuando se alinean para correspondencia máxima, como se describe a continuación. Las comparaciones entre dos secuencias se efectúan típicamente comparando las secuencias en una ventana de comparación para identificar y comparar regiones locales de similitud de secuencia. Una "ventana de comparación", como se usa en la presente memoria, hace referencia a un segmento de al menos aproximadamente 20 posiciones contiguas, habitualmente de 30 a aproximadamente 75, de 40 a aproximadamente 50, en que puede compararse una secuencia con una secuencia de referencia del mismo número de posiciones continuas después de alinear óptimamente las dos secuencias.

[0056] El alineamiento de secuencias para comparación puede realizarse usando, por ejemplo, el programa Megalign en el paquete de software de bioinformática Lasergen (DNASTAR, Inc., Madison, WI), usando parámetros

por defecto. Este programa representa varios esquemas de alineamiento descritos en las siguientes referencias: Dayhoff, M.O. (1978) "A model of evolutionary change in proteins - Matrices for detecting distant relationships". En Dayhoff, M.O. (ed.) "Atlas of Protein Sequence and Structure", National Biomedical Research Foundation, Washington DC vol. 5, supl. 3, pág 345-358; Hein J. (1990) "Unified Approach to Alignment and Phylogenesis" pág. 5 626-645 "Methods in Enzymology" vol. 183, Academic Press, Inc., San Diego, CA; Higgins, D.G. y Sharp, P.M. (1989) CABIOS 5: 151-153; Myers, E.W. y Muller W. (1988) CABIOS 4: 11-17; Robinson, E.D. (1971) Comb. Theor. 11: 105; Santou, N. Nes, M. (1987) Mol. Biol. Evol. 4: 406-425; Sneath, P.H.A. y Sokal, R.R. (1973) "Numerical Taxonomy - the Principles and Practice of Numerical Taxonomy", Freeman Press, San Francisco, CA; Wilbur, W.J. y Lipman, D.J. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 726-730.

10

[0057] Como alternativa, el alineamiento de secuencias para comparación puede realizarse por el algoritmo de identidad local de Smith y Waterman (1981) Add. APL. Math 2: 482, mediante el algoritmo de identidad de Needleman y Wunsch (1970) J. Mol. Biol. 48:443, mediante los procedimientos de búsqueda de similitud de Pearson y Lipman (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 2444, mediante puestas en práctica informatizadas de estos 15 algoritmos (GAP, BESTFIT, BLAST, FASTA y TFASTA en el paquete de software Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group (GCG), 575 Science Dr., Madison, WI), o mediante inspección.

[0058] Son un ejemplo de algoritmos que son adecuados para determinar la identidad de secuencia y similitud de secuencia porcentuales los algoritmos BLAST y BLAST 2.0, que se describen en Altschul y col. (1977) Nucl. 20 Acids Res. 25: 3389-3402 y Altschul y col. (1990) J. Mol. Biol. 215: 403-410, respectivamente. BLAST y BLAST 2.0 pueden usarse, por ejemplo, con los parámetros descritos en la presente memoria, para determinar la identidad de secuencia porcentual de los polinucleótidos y polipéptidos de la descripción. El software para efectuar los análisis BLAST está disponible públicamente a través del National Center for Biotechnology Information. En un ejemplo 25 ilustrativo, pueden calcularse las puntuaciones acumuladas usando, para secuencias nucleotídicas, los parámetros M (puntuación de recompensa por un par de residuos coincidentes; siempre >0) y N (puntuación de penalización por residuos no coincidentes; siempre <0). Para secuencias aminoacídicas, puede usarse una matriz de puntuación para calcular la puntuación acumulada. La extensión de las coincidencias de palabra en cada dirección se detiene cuando: la puntuación de alineamiento acumulada cae una cantidad X desde su valor máximo conseguido; la puntuación acumulada llega a 0 o menos, debido a la acumulación de uno o más alineamientos de residuos de 30 puntuación negativa o se alcanza el final de cualquier secuencia. Los parámetros del algoritmo BLAST W, T y X determinan la sensibilidad y velocidad del alineamiento. El programa BLASTN (para secuencias nucleotídicas) usa por defecto una longitud de palabra (W) de 11 y una previsión (E) de 10, y los alineamientos de matriz de puntuación BLOSUM62 (véase Henikoff y Henikoff (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 10915) (B) de 50, previsión (E) de 10, M=5, N=-4 y comparación de ambas hebras.

35

[0059] Preferiblemente, el "porcentaje de identidad de secuencia" se determina comparando dos secuencias alineadas óptimamente en una ventana de comparación de al menos 20 posiciones, en el que la porción de la 40 secuencia polinucleotídica o polipeptídica en la ventana de comparación puede comprender adiciones o deleciones (concretamente huecos) de un 20 % o menos, habitualmente de 5 a 15 % o de 10 a 12 %, en comparación con las secuencias de referencia (que no comprenden adiciones ni deleciones) para alineamiento óptimo de las dos secuencias. El porcentaje se calcula determinando el número de posiciones en que aparecen las bases de ácido nucleico o residuos aminoacídicos idénticos en ambas secuencias, proporcionando el número de posiciones coincidentes, dividiendo el número de posiciones coincidentes entre el número total de posiciones en la secuencia de referencia (concretamente, el tamaño de ventana) y multiplicando los resultados por 100, proporcionando el 45 porcentaje de identidad de secuencia.

[0060] Por lo tanto, como se observa anteriormente, la presente descripción engloba secuencias polinucleotídicas y polipeptídicas que tienen una identidad sustancial con las secuencias dadas a conocer en la presente memoria, por ejemplo, aquéllas que comprenden al menos un 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 o 99 % o 50 más identidad de secuencia en comparación con una secuencia polinucleotídica o polipeptídica de esta descripción usando los procedimientos descritos en la presente memoria (por ejemplo, análisis BLAST usando parámetros estándares, como se describe a continuación). Un especialista en esta materia reconocerá que estos valores pueden ajustarse apropiadamente para determinar la correspondiente identidad de las proteínas codificadas por dos 55 secuencias nucleotídicas teniendo en cuenta la degeneración de codones, la similitud de aminoácidos, la disposición del marco de lectura y similares. Además, un especialista en la materia entendería que los polipéptidos de fusión de la presente descripción pueden comprender al menos 2, al menos 3 o al menos 4 o más porciones o fragmentos antigénicos/inmunogénicos de un polipéptido que comprende al menos un 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 o 99 % o 60 más identidad de secuencia con un polipéptido KMP11, SMT, A2 y/o CPB de *Leishmania* que es capaz de proporcionar protección frente a, por ejemplo, en un ensayo *in vivo* como se describe en la presente memoria, o en serodiagnóstico de, especies de *Leishmania* tales como *L. donovani*, *L. major* y/o *L. infantum*.

[0061] En otro aspecto de la descripción, se proporcionan polipéptidos de fusión que comprenden al menos una porción inmunogénica de un polipéptido KMP11, SMT, A2 y/o CPB de *Leishmania* y comprenden 65 adicionalmente un copartícipe de fusión heterólogo, así como polinucleótidos que codifican dichos polipéptidos de fusión. Por ejemplo, en una realización, un polipéptido de fusión comprende una o más porciones o fragmentos inmunogénicos de un polipéptido KMP11, SMT, A2 y/o CPB de *Leishmania* y una o más secuencias inmunogénicas

adicionales de *Leishmania*, que se unen mediante un ligamiento peptídico en una sola cadena aminoacídica. En otra realización, un polipéptido de fusión puede comprender múltiples epítomos antigénicos de *Leishmania*, en el que al menos uno de los epítomos es de un polipéptido KMP11, SMT, A2 y/o CPB de *Leishmania*. Como se usa en la presente memoria, un "epítomo" es una porción de antígeno que reacciona con muestras de sangre de individuos infectados por *Leishmania* (concretamente, un epítomo se une específicamente a uno o más anticuerpos y/o linfocitos T presentes en dichas muestras de sangre).

[0062] En otra realización, un polipéptido de fusión puede comprender múltiples epítomos antigénicos de *Leishmania* en los que al menos uno de los epítomos es de un polipéptido KMP11, SMT, A2 y/o CPB de *Leishmania* y al menos un copartícipe de fusión heterólogo comprende una secuencia que ayuda a proporcionar epítomos de linfocitos T auxiliares (un copartícipe de fusión inmunológico), preferiblemente epítomos de linfocitos T auxiliares reconocidos por seres humanos, o que ayuda a expresar la proteína (un potenciador de la expresión) a rendimientos mayores que la proteína recombinante nativa. Ciertos copartícipes de fusión preferidos incluyen tanto copartícipes de fusión inmunológicos como potenciadores de la expresión. Pueden seleccionarse otros copartícipes de fusión para aumentar la solubilidad de la proteína o para posibilitar que la proteína se oriente a los compartimentos intracelulares deseados. Otros copartícipes de fusión adicionales incluyen marcadores de afinidad tales como V5, 6XHIS, MYC, FLAG y GST, que facilitan la purificación de la proteína. Se entendería por un especialista en la materia que esas secuencias no relacionadas pueden, pero no necesariamente, estar presentes en un polipéptido de fusión usado de acuerdo con la presente descripción. En una realización particular, un copartícipe de fusión inmunológico comprende una secuencia derivada de la proteína D, una proteína de superficie de la bacteria gramnegativa *Haemophilus influenzae* B (documento WO 91/18926). Por ejemplo, un derivado de proteína D comprende aproximadamente el primer tercio de la proteína (por ejemplo, los primeros 100-110 aminoácidos N-terminales), y un derivado de proteína D puede estar lipidado. En ciertas realizaciones, se incluyen los primeros 109 residuos de un copartícipe de fusión de lipoproteína D en el extremo N para proporcionar al polipéptido epítomos de linfocitos T exógenos adicionales y para aumentar el nivel de expresión en *E. coli* (funcionando por tanto como potenciador de la expresión). La cola lipídica asegura una presentación óptima del antígeno ante células presentadoras de antígeno. Otros copartícipes de fusión ilustrativos incluyen la proteína no estructural del virus de la gripe, NS1 (hemaglutinina). Típicamente, se usan los 81 aminoácidos N-terminales, aunque pueden usarse también diferentes fragmentos que incluyen epítomos de linfocitos T auxiliares.

[0063] En otra realización particular, un copartícipe de fusión inmunológico comprende una secuencia aminoacídica derivada de la proteína conocida como LYTA, o una porción de la misma (preferiblemente, una porción C-terminal). LYTA deriva de *Streptococcus pneumoniae*, que sintetiza una *N*-acetil-L-alanina amidasa conocida como amidasa LYTA (codificada por el gen *LytA*; Gene 43: 265-292 (1986)). LYTA es una autolisina que degrada específicamente ciertos enlaces del esqueleto de peptidoglicano. El dominio C-terminal de la proteína LYTA es responsable de la afinidad por colina o algunos análogos de colina tales como DEAE. Esta propiedad se ha explotado para el desarrollo de plásmidos que expresan C-LYTA de *E. coli* útiles para la expresión de proteínas de fusión. Se ha descrito la purificación de proteínas híbridas que contienen el fragmento C-LYTA en el extremo amino (véase Biotechnology 10: 795-798 (1992)). En una realización particular, puede incorporarse una porción repetida de LYTA a una proteína de fusión. Se encuentra una porción repetida en la región C-terminal partiendo del residuo 178. Una porción repetida más particular incorpora los residuos 188-305.

[0064] Las secuencias de fusión pueden unirse directamente (concretamente sin aminoácidos intermedios) o pueden unirse mediante una secuencia de ligamiento (por ejemplo, Gly-Cys-Gly) que no reduce significativamente las propiedades inmunogénicas de los polipéptidos componentes. Los polipéptidos que forman la proteína de fusión están ligados típicamente de extremo C a extremo N, aunque pueden estar también ligados de extremo C a extremo C, de extremo N a extremo N o de extremo N a extremo C. Los polipéptidos de la proteína de fusión pueden estar en cualquier orden. Los polipéptidos de fusión o proteínas de fusión pueden incluir también variantes modificadas conservativamente, variantes polimórficas, alelos, mutantes, subsecuencias, homólogos interespecie y fragmentos inmunogénicos de antígenos que constituyen la proteína de fusión.

[0065] Los polipéptidos de fusión pueden prepararse en general usando técnicas estándares, incluyendo tecnología recombinante, conjugación química y similares. Por ejemplo, las secuencias de ADN que codifican los componentes polipeptídicos de una fusión pueden ensamblarse separadamente y ligarse en un vector de expresión apropiado. El extremo 3' de la secuencia de ADN que codifica un componente polipeptídico está ligado, con o sin ligamiento peptídico, al extremo 5' de una secuencia de ADN que codifica el segundo componente polipeptídico, de modo que los marcos de lectura de las secuencias estén en fase. Esto permite la traducción en un solo polipéptido de fusión que retiene, o en algunos casos supera, la actividad biológica de los polipéptidos componentes.

[0066] Puede emplearse una secuencia de ligamiento peptídica para separar los componentes de fusión una distancia suficiente para asegurar que cada polipéptido se pliega en sus estructuras secundaria y/o terciaria deseadas. Dicha secuencia de ligamiento peptídico puede incorporarse al polipéptido de fusión usando técnicas estándares bien conocidas en la materia. Las secuencias de ligamiento peptídico adecuadas pueden elegirse, por ejemplo, basándose en uno o más de los siguientes factores: (1) su capacidad de adoptar una conformación extendida flexible; (2) su incapacidad de adoptar una estructura secundaria que podría interactuar con epítomos funcionales en el primer y segundo polipéptidos y (3) la falta de residuos hidrófobos o cargados que podrían

reaccionar con los epítomos funcionales polipeptídicos. Ciertas secuencias de ligamiento peptídico preferidas contienen residuos de Gly, Asn y Ser. Pueden usarse también en la secuencia de ligamiento otros aminoácidos casi neutros, tales como Thr y Ala. Las secuencias aminoácidas que pueden emplearse útilmente como ligamientos incluyen aquellas dadas a conocer en Maratea y col., Gene 40: 39-46, 1985; Murphy y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 8258-8262, 1986; patente de EE. UU. n° 4.935.233 y patente de EE. UU. n° 4.751.180. La secuencia de ligamiento puede ser generalmente de 1 a aproximadamente 50 aminoácidos de longitud. Las secuencias de ligamiento no son necesarias cuando el primer y segundo polipéptidos tienen regiones aminoácidas N-terminales no esenciales que pueden usarse para separar los dominios funcionales y evitar la interferencia estérica.

10 **[0067]** Las secuencias de ADN ligadas están ligadas operativamente a elementos reguladores transcripcionales o traduccionales adecuados. Los elementos reguladores responsables de la expresión de ADN están localizados solo en 5' de la secuencia de ADN que codifica los primeros polipéptidos. De forma similar, los codones de terminación necesarios para terminar la traducción y las señales de terminación de la transcripción están solo presentes en 3' de la secuencia de ADN que codifica el segundo polipéptido.

15 **[0068]** Además de la expresión del polipéptido de fusión recombinante, pueden generarse polipéptidos KMP11, SMT, A2 y/o CPB de *Leishmania*, porciones y variantes inmunogénicas de los mismos por medios sintéticos o recombinantes. Pueden generarse polipéptidos sintéticos que tienen menos de aproximadamente 100 aminoácidos, y generalmente menos de aproximadamente 50 aminoácidos, usando técnicas bien conocidas por los especialistas en la materia. Por ejemplo, dichos polipéptidos pueden sintetizarse usando cualquiera de las técnicas en fase sólida comercialmente disponibles, tales como el procedimiento de síntesis en fase sólida de Merrifield, en que se añaden secuencialmente aminoácidos a una cadena aminoácida creciente (Merrifield, J. Am. Chem. Soc. 85: 2149-2146, 1963). Los equipos para la síntesis automatizada de polipéptidos están comercialmente disponibles de suministradores tales como Perkin Elmer/Applied BioSystems Division, Foster City, CA, y pueden manipularse según las instrucciones del fabricante. Por tanto, por ejemplo, pueden sintetizarse antígenos KMP11, SMT, A2 y/o CPB de *Leishmania*, o porciones de los mismos, mediante este procedimiento.

[0069] Los polipéptidos recombinantes que contienen porciones y/o variantes de un polipéptido KMP11, SMT, A2 y/o CPB nativo pueden prepararse fácilmente a partir de una secuencia de ADN que codifica el antígeno, usando técnicas bien conocidas y establecidas. En realizaciones particulares, puede prepararse fácilmente un polipéptido de fusión que comprende al menos 2 porciones o fragmentos inmunogénicos/antigénicos de antígenos KMP11, SMT, A2 y/o CPB de *Leishmania* a partir de una secuencia de ADN que codifica los antígenos fusionados clonados. Por ejemplo, los sobrenadantes de sistemas de hospedador/vector adecuados que secretan proteína recombinante a los medios de cultivo pueden concentrarse en primer lugar usando un filtro comercialmente disponible. Después de la concentración, puede aplicarse el concentrado a una matriz de purificación adecuada tal como una matriz de afinidad, una matriz de cromatografía de exclusión por tamaño o una resina de intercambio iónico.

[0070] Como alternativa, puede emplearse cualquiera de una variedad de vectores de expresión conocidos por los especialistas en la materia para expresar los polipéptidos recombinantes de la descripción. La expresión puede conseguirse en cualquier célula hospedadora apropiada que se haya transformado o transfectado con un vector de expresión que contiene un polinucleótido que codifica un polipéptido recombinante. Preferiblemente, las células hospedadoras son *E. coli*, levadura, una línea celular de insecto (tal como *Spodoptera* o *Trichoplusia*) o una línea celular de mamífero incluyendo (pero sin limitación) CHO, COS, HEK-293T y NS-1. Las secuencias de ADN expresadas de esta manera pueden codificar proteínas de origen natural y proteínas de fusión que comprenden antígenos de *Leishmania* tales como KMP11, SMT, A2 y/o CPB, porciones de las mismas y repeticiones u otras variantes de dichas proteínas. Los polipéptidos de fusión expresados de esta descripción se aíslan generalmente en forma sustancialmente pura. Preferiblemente, los polipéptidos de fusión se aíslan hasta una pureza de al menos un 80 % en peso, más preferiblemente hasta una pureza de al menos un 95 % en peso y lo más preferiblemente hasta una pureza de al menos un 99 % en peso. En general, dicha purificación puede conseguirse usando, por ejemplo, las técnicas estándares de fraccionamiento con sulfato de amonio, electroforesis en PAGE-SDS y cromatografía de afinidad.

[0071] Los polipéptidos KMP11, SMT, A2 y/o CPB de *Leishmania* y polinucleótidos de la descripción pueden prepararse o aislarse usando cualquiera de una variedad de procedimientos y usando cualquiera de una variedad de especies de *Leishmania* incluyendo, pero sin limitación, *L. donovani*, *L. chagasi*, *L. infantum*, *L. major*, *L. amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. panamensis*, *L. mexicana*, *L. tropica* y *L. guyanensis*. Dichas especies están disponibles, por ejemplo, en la American Type Culture Collection (ATCC), Rockville, MD.

[0072] Independientemente del procedimiento de fabricación, los polipéptidos KMP11, SMT, A2 y/o CPB o polipéptidos de fusión producidos como se describe anteriormente son preferiblemente inmunogénicos. En otras palabras, los polipéptidos (y porciones inmunogénicas de los mismos) son capaces de desencadenar una respuesta inmunitaria en cultivos de células de nódulo linfático y/o células mononucleares de sangre periférica (PBMC) aisladas de individuos infectados actual o anteriormente por *Leishmania*. Más específicamente, los antígenos, y porciones inmunogénicas de los mismos, tienen la capacidad de inducir la proliferación de linfocitos T y/o de desencadenar una respuesta de citocina predominantemente de tipo Th1 (por ejemplo, producción de IL-2, IFN- γ y/o TNF- α por linfocitos T y/o linfocitos NK y/o la producción de IL-12 por monocitos, macrófagos y/o linfocitos B) en

células aisladas de individuos infectados actual o anteriormente por *Leishmania*. Un individuo infectado por *Leishmania* puede estar aquejado por una forma de leishmaniosis (tal como subclínica, cutánea, mucosa o visceral activa) o puede ser asintomático. Dichos individuos pueden identificarse usando procedimientos conocidos por los especialistas en la materia. Los individuos con leishmaniosis pueden identificarse basándose en signos clínicos asociados, por ejemplo, a al menos uno de los siguientes: aislamiento del parásito de lesiones, prueba cutánea positiva con lisado de *Leishmania* o prueba serodiagnóstica positiva. Los individuos asintomáticos son individuos infectados que no tienen signos ni síntomas de la enfermedad. Dichos individuos pueden identificarse, por ejemplo, basándose en una prueba serológica positiva y/o prueba cutánea con lisado de *Leishmania*.

10 **[0073]** El término "PBMC," que hace referencia a una preparación de células nucleadas consistente principalmente en linfocitos y monocitos que están presentes en sangre periférica, engloba tanto mezclas de células como preparaciones de uno o más tipos de célula purificados. Las PBMC pueden aislarse mediante procedimientos conocidos por los especialistas en la materia. Por ejemplo, las PBMC pueden aislarse mediante centrifugación de densidad, por ejemplo, mediante Ficoll™ (Winthrop Laboratories, Nueva York). Los cultivos de nódulo linfático pueden prepararse generalmente inmunizando ratones BALB/c (por ejemplo, en la almohadilla plantar trasera) con promastigotes de *Leishmania* emulsionados en coadyuvante completo de Freund. Los nódulos linfáticos de drenaje pueden extraerse después de la inmunización y purificarse los linfocitos T en una columna de Ig anti-ratón para retirar los linfocitos B, seguido de paso a través de una columna Sephadex G10 para retirar los macrófagos. De forma similar, pueden aislarse las células de nódulo linfático de un ser humano después de biopsia o extirpación quirúrgica de un nódulo linfático.

[0074] Puede evaluarse la capacidad de un polipéptido de fusión de la invención de inducir una respuesta en PBMC o cultivos de células de nódulo linfático, por ejemplo, poniendo en contacto las células con el polipéptido y midiendo la respuesta adecuada. En general, la cantidad de polipéptido que es suficiente para la evaluación de aproximadamente 2×10^5 células oscila de aproximadamente 10 ng a aproximadamente 100 µg o de 100 ng a aproximadamente 50 µg, y es preferiblemente de aproximadamente 1 µg a 10 µg. La incubación del polipéptido (por ejemplo, un polipéptido de fusión) con células se efectúa típicamente a 37 °C durante aproximadamente 1-3 días. Después de la incubación con polipéptido, se ensaya en las células la respuesta apropiada. Si la respuesta es una respuesta proliferativa, puede emplearse cualquiera de una variedad de técnicas bien conocidas por los especialistas en la materia. Por ejemplo, las células pueden exponerse a un pulso de timidina radiactiva y medirse la incorporación del marcador al ADN celular. En general, un polipéptido que da como resultado un aumento de al menos tres veces de la proliferación por encima del fondo (concretamente, la proliferación observada para células cultivadas sin polipéptido) se considera que es capaz de inducir la proliferación.

35 **[0075]** Como alternativa, la respuesta para medir puede ser la secreción de una o más citocinas (tales como interferón γ (IFN- γ), interleucina 4 (IL-4), interleucina 12 (p70 y/o p40), interleucina 2 (IL-2) y/o factor de necrosis tumoral α (TNF- α) o el cambio en el nivel de ARNm que codifica una o más citocinas específicas. Por ejemplo, la secreción de interferón γ , interleucina 2, factor de necrosis tumoral α y/o interleucina 12 es indicativa de una respuesta Th1, que contribuye al efecto protector frente a *Leishmania*. Los ensayos de cualquiera de las citocinas anteriores pueden efectuarse generalmente usando procedimientos conocidos por los especialistas en la materia, tales como un ensayo de inmunosorción ligado a enzima (ELISA). Los anticuerpos adecuados para uso en dichos ensayos pueden obtenerse a partir de una variedad de fuentes tales como Chemicon, Temucula, CA y PharMingen, San Diego, CA, y pueden usarse generalmente según las instrucciones del fabricante. El nivel de ARNm que codifica una o más citocinas específicas puede evaluarse, 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- γ , TNF- α o p40 de IL-12, o de 10 pg/ml de p70 de IL-12 p70, se considera capaz de estimular la producción de una citocina.

COMPOSICIONES POLINUCLEOTÍDICAS

50 **[0076]** La presente descripción proporciona también polinucleótidos aislados, particularmente aquellos que codifican los polipéptidos de fusión de la invención, así como composiciones que comprenden dichos polinucleótidos. Como se usan en la presente memoria, los términos "ADN" y "polinucleótido" y "ácido nucleico" hacen referencia a una molécula de ADN que se ha aislado exenta de ADN genómico total a partir de una especie particular. Por lo tanto, un segmento de ADN que codifica un polipéptido hace referencia a un segmento de ADN que contiene una o más secuencias de codificación pero está sustancialmente aislado, o purificado, del ADN genómico total de la especie de la que se obtiene el segmento de ADN. Se incluye en los términos "segmento de ADN" y "polinucleótido" los segmentos de ADN y fragmentos menores de dichos segmentos, y también vectores recombinantes incluyendo, por ejemplo, plásmidos, cósmidos, fagémidos, fagos, virus y similares.

60 **[0077]** Como se entenderá por los especialistas en la materia, las secuencias polinucleotídicas de esta invención pueden incluir secuencias genómicas, secuencias extragenómicas y codificadas por plásmido y segmentos génicos modificados por ingeniería genética menores que expresan, o pueden adaptarse para expresar, proteínas, polipéptidos de fusión, péptidos y similares. Dichos segmentos pueden ser aislados naturalmente, 65 recombinantes o modificados sintéticamente por la mano del hombre.

- 5 **[0078]** Como se reconocerá por el especialista en la materia, los polinucleótidos pueden ser monocatenarios (codificantes o anticodificantes) o bicatenarios, y pueden ser moléculas de ADN (genómico, ADNc o sintético) o ARN. Cualquier polinucleótido puede modificarse adicionalmente para aumentar la estabilidad *in vivo*. Las posibles modificaciones incluyen, pero sin limitación, la adición de secuencias flanqueantes en los extremos 5' y/o 3', el uso de fosforotioato o 2'O-metilo en lugar de ligamientos fosfodiesterasa en el esqueleto y/o la inclusión de bases no tradicionales tales como inosina, queosina y wibutosina, así como formas modificadas con acetilo, metilo, tio y otros de adenina, citidina, guanina, timina y uridina. Pueden estar presentes secuencias codificantes o no codificantes adicionales, pero no necesariamente, en un polinucleótido de la presente invención y el polinucleótido puede, pero no necesariamente, estar ligado a otras moléculas y/o materiales de soporte.
- 10 **[0079]** Los polinucleótidos pueden comprender una secuencia nativa (concretamente, una secuencia endógena que codifica un antígeno de *Leishmania* o una porción del mismo) o pueden comprender una variante o equivalente funcional biológico o antigénico de dicha secuencia. En realizaciones particulares, los polinucleótidos pueden codificar dos o más porciones, fragmentos o variantes antigénicos/inmunogénicos derivados de los
- 15 antígenos KMP11, SMT, A2 y/o CPB de *Leishmania*. En ciertas realizaciones, los polinucleótidos que codifican polipéptidos de fusión de la presente descripción comprenden dos o más secuencias de antígeno de *Leishmania* como se indica en las SEQ ID NO: 11-20 y 29-32 o un fragmento de las mismas que codifica una porción inmunogénica. En un aspecto relacionado, se proporcionan polinucleótidos como se exhiben en las SEQ ID NO: 22 o 24 que codifican polipéptidos de fusión particulares de la presente invención.
- 20 **[0080]** Las variantes polinucleotídicas pueden contener una o más sustituciones, adiciones, deleciones y/o inserciones, como se describe adicionalmente a continuación, preferiblemente de tal modo que la inmunogenicidad del polipéptido modificado no se reduzca respecto a la proteína nativa. El efecto sobre la inmunogenicidad del polipéptido codificado puede valorarse en general como se describe en la presente memoria.
- 25 **[0081]** Por ejemplo, en ciertas realizaciones, las variantes de la descripción incluyen polinucleótidos de cisteína modificada en que los codones que codifican cisteína se reemplazan por codones que codifican otros aminoácidos incapaces de formar enlaces disulfuro intracatenarios o intercatenarios. En realizaciones más específicas, algunos o todos los codones de reemplazo codifican serina debido a la similitud espacial de la cadena
- 30 lateral de serina con la cadena lateral de cisteína en el polipéptido resultante. En otra realización específica, algunos o todos los codones de reemplazo codifican alanina. Son bien conocidos procedimientos ilustrativos de reemplazo de cisteína y otros codones en un polinucleótido (por ejemplo, patente de EE. UU. nº 4.816.566 y Proc. Natl. Acad. Sci. 97 (15): 8530, 2000).
- 35 **[0082]** El término "variantes" engloba también genes homólogos de origen xenogénico.
- [0083]** En realizaciones adicionales, los polinucleótidos aislados de la presente descripción comprenden diversas longitudes de tramos contiguos de secuencia idénticos o complementarios de dos o más KMP11, SMT, A2 y/o CPB, tales como aquellas secuencias dadas a conocer en la presente memoria. Por ejemplo, se proporcionan
- 40 polinucleótidos por esta descripción que comprenden al menos aproximadamente 15, 20, 30, 40, 50, 75, 100, 150, 200, 300, 400, 500 o 1000 o más nucleótidos contiguos de dos o más de las secuencias dadas a conocer en la presente memoria, así como todas las longitudes intermedias entre medias. Se entenderá fácilmente que "longitudes intermedias", en este contexto, significa cualquier longitud entre los valores citados, tal como 16, 17, 18, 19, etc.; 21, 22, 23, etc.; 30, 31, 32, etc.; 50, 51, 52, 53, etc.; 100, 101, 102, 103, etc.; 150, 151, 152, 153, etc.; incluyendo todos
- 45 los enteros de 200-500; 500-1.000 y similares.
- [0084]** Los polinucleótidos de la presente invención, o fragmentos de los mismos, independientemente de la longitud de la secuencia codificante misma, pueden combinarse con otras secuencias de ADN, tales como promotores, señales de poliadenilación, sitios de enzima de restricción adicionales, sitios de clonación múltiple, otros
- 50 segmentos de codificación y similares, de tal modo que su longitud global puede variar considerablemente. Por lo tanto, se contempla que puede emplearse un fragmento polinucleotídico de casi cualquier longitud, estando preferiblemente limitada la longitud total por la facilidad de preparación y uso en el protocolo de ADN recombinante pretendido.
- 55 **[0085]** Además, se apreciará por los especialistas en la materia que, como resultado de la degeneración del código genético, existen muchas secuencias nucleotídicas que codifican un polipéptido como se describe en la presente memoria. Algunos de estos polinucleótidos portan una homología mínima con la secuencia nucleotídica de cualquier gen nativo. No obstante, se contemplan específicamente por la presente invención polinucleótidos que varían debido a diferencias en el uso de codón, por ejemplo, polinucleótidos que están optimizados para selección
- 60 de codón humana y/o de primate. Adicionalmente, los alelos de los genes que comprenden las secuencias polinucleotídicas proporcionadas en la presente memoria están dentro del alcance de la presente descripción. Los alelos son genes endógenos que se alteran como resultado de una o más mutaciones, tales como deleciones, adiciones y/o sustituciones de nucleótidos. El ARNm y proteína resultantes pueden, pero no necesariamente, tener una estructura o función alterada. Los alelos pueden identificarse usando técnicas estándares (tales como
- 65 hibridación, amplificación y/o comparación de secuencia de base de datos).

[0086] Pueden prepararse, manipularse y/o expresarse polinucleótidos de *Leishmania* y fusiones de los mismos usando cualquiera de una variedad de técnicas bien establecidas conocidas y disponibles en la materia. En realizaciones particulares, las fusiones comprenden dos o más secuencias polinucleotídicas que codifican antígenos KMP11, SMT, A2 y/o CPB de *Leishmania*.

5

[0087] Por ejemplo, pueden usarse secuencias polinucleotídicas o fragmentos de las mismas que codifican polipéptidos de la descripción, o proteínas de fusión o equivalentes funcionales de los mismos, en moléculas de ADN recombinante para dirigir la expresión de un polipéptido en células hospedadoras apropiadas. Debido a la degeneración inherente del código genético, pueden producirse otras secuencias de ADN que codifican

10 sustancialmente la misma secuencia aminoacídica o una funcionalmente equivalente y estas secuencias pueden usarse para clonar y expresar un polipéptido dado de la presente descripción.

[0088] Como se entenderá por los especialistas en la materia, puede ser ventajoso en algunos casos producir secuencias nucleotídicas que codifican un polipéptido de fusión que posee codones de origen no natural. Por ejemplo, pueden seleccionarse los codones preferidos por un hospedador procariótico o eucariótico particular para aumentar el índice de expresión de proteína o producir un transcrito de ARN recombinante que tiene propiedades deseables, tales como una semivida que es mayor que la de un transcrito generado a partir de la secuencia de origen natural.

15

[0089] Además, las secuencias polinucleotídicas de la presente invención pueden modificarse por ingeniería genética usando procedimientos generalmente conocidos en la materia para alterar las secuencias que codifican un polipéptido de fusión por una variedad de razones, incluyendo pero sin limitación, alteraciones que modifican la clonación, procesamiento, expresión y/o inmunogenicidad del producto génico.

20

[0090] Para expresar un polipéptido de fusión deseado que comprende dos o más fragmentos o porciones antigénicas/inmunogénicas de polipéptidos KMP11, SMT, A2 y/o CPB, puede insertarse una secuencia nucleotídica que codifica el polipéptido de fusión, o un equivalente funcional, en un vector de expresión adecuado, concretamente un vector que contiene los elementos necesarios para la transcripción y traducción de la secuencia codificante insertada. Pueden usarse procedimientos que son bien conocidos por los especialistas en la materia para construir

30 vectores de expresión que contienen secuencias que codifican un polipéptido de interés y elementos de control transcripcional y traduccional apropiados. Estos procedimientos incluyen técnicas de ADN recombinante *in vitro*, técnicas sintéticas y recombinación genética *in vivo*. Dichas técnicas se describen en Sambrook y col., "Molecular Cloning, A Laboratory Manual" (2001) y Ausubel y col., "Current Protocols in Molecular Biology" (enero de 2008, edición actualizada).

25

30

35

[0091] Son conocidos una variedad de sistemas de vector de expresión/hospedador y pueden utilizarse para contener y expresar secuencias polinucleotídicas. Estos incluyen, pero sin limitación, microorganismos tales como bacterias transformadas con vectores de expresión de ADN de bacteriófago recombinante, plásmido o cósmido; levadura (tal como *Saccharomyces* o *Pichia*) transformada con vectores de expresión de levadura; sistemas de células de insectos infectados con vectores de expresión víricos (por ejemplo, baculovirus); sistemas de células vegetales transformadas con vectores de expresión víricos (por ejemplo, virus de mosaico de la coliflor, CaMV; virus del mosaico de tabaco, TMV) o con vectores de expresión bacterianos (por ejemplo, plásmidos Ti o pBR322) o sistemas de células animales.

40

[0092] Los "elementos de control" o "secuencias reguladoras" presentes en un vector de expresión son aquellas regiones no traducidas del vector: potenciadores, promotores, las regiones no traducidas 5' y 3', que interaccionan con las proteínas celulares del hospedador para llevar a cabo la transcripción y traducción. Dichos elementos pueden variar en su potencia y especificidad. Dependiendo del sistema de vector y hospedador utilizado, puede usarse cualquier número de elementos de transcripción y traducción adecuados, incluyendo promotores constitutivos e inducibles. Por ejemplo, cuando se clona en sistemas bacterianos, pueden usarse promotores inducibles tales como el promotor lacZ híbrido del fagémido PBLUESCRIPT (Stratagene, La Jolla, Calif.) o el plásmido PSPORT1 (Gibco BRL, Gaithersburg, Md.) y similares. En sistemas de células de mamíferos, se prefieren generalmente promotores de genes de mamíferos o de virus de mamíferos. Si es necesario generar una línea celular que contenga múltiples copias de la secuencia que codifica un polipéptido, pueden usarse ventajosamente vectores

50 basados en SV40 o EBV con un marcador seleccionable apropiado.

50

55

[0093] En sistemas bacterianos, puede seleccionarse una serie de vectores de expresión dependiendo del uso pretendido para el polipéptido expresado. Por ejemplo, cuando se requieren grandes cantidades, pueden usarse vectores que dirigen un alto nivel de expresión de las proteínas de fusión, que se purifican fácilmente. Dichos

60 vectores incluyen, pero sin limitación, los vectores de clonación y expresión multifuncional de *E. coli* tales como PBLUESCRIPT (Stratagene), en que la secuencia que codifica el polipéptido de interés puede ligarse en el vector en fase con secuencias de la Met aminoterminal y los 7 residuos posteriores de β -galactosidasa, de modo que se produce una proteína híbrida; vectores pIN (Van Heeke y Schuster, *J. Biol. Chem.* 264: 5503 5509 (1989)) y similares. Los vectores pGEX (Promega, Madison, Wis.) pueden usarse también para expresar polipéptidos extraños

65 como proteínas de fusión con glutatión S-transferasa (GST). En general, dichas proteínas de fusión son solubles y pueden purificarse fácilmente a partir de células lisadas mediante adsorción en perlas de glutatión-agarosa seguida

de elución en presencia de glutatión libre. Las proteínas preparadas en dichos sistemas pueden diseñarse para incluir heparina, trombina o sitios de escisión de proteasa factor XA, de modo que el polipéptido de interés clonado pueda liberarse del resto de GST a voluntad.

- 5 **[0094]** En la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, pueden usarse una serie de vectores que contienen promotores constitutivos o inducibles tales como factor α , alcohol oxidasa y PGH. Para revisiones, véanse Ausubel y col. (supra) y Grant y col., Methods Enzymol. 153: 516-544 (1987).
- 10 **[0095]** En los casos en que se usan vectores de expresión vegetales, la expresión de las secuencias que codifican polipéptidos puede activarse por cualquiera de una serie de promotores. Por ejemplo, pueden usarse promotores víricos tales como los promotores 35S y 19S de CaMV solos o en combinación con la secuencia líder ω de TMV (Takamatsu, EMBO J. 6: 307-311 (1987)). Como alternativa, pueden usarse promotores vegetales tales como la subunidad pequeña de RUBISCO o promotores de choque térmico (Coruzzi y col., EMBO J. 3: 1671-1680 (1984); Broglie y col., Science 224: 838-843 (1984) y Winter y col., Results Probl. Cell Differ. 17: 85-105 (1991)).
- 15 Estos constructos pueden introducirse en células vegetales mediante transformación de ADN directa o transfección mediada por patógeno. Dichas técnicas se describen en una serie de revisiones generalmente disponibles (véase, por ejemplo, Hobbs en McGraw Hill, "Yearbook of Science and Technology", pág. 191-196 (1992)).
- 20 **[0096]** Puede usarse también un sistema de insecto para expresar un polipéptido de interés. Por ejemplo, en uno de dichos sistemas, se usa el virus de la polihedrosis nuclear de *Autographa californica* (AcNPV) como vector para expresar genes extraños en células de *Spodoptera frugiperda* o en larvas de *Trichoplusia*. Las secuencias que codifican el polipéptido pueden clonarse en una región no esencial del virus, tal como el gen de polihedrina, y disponerse bajo el control del promotor de polihedrina. La inserción exitosa de la secuencia que codifica el polipéptido inactivará el gen de polihedrina y producirá virus recombinante que carece de proteína de cubierta. Los
- 25 virus recombinantes pueden usarse entonces para infectar, por ejemplo, células de *S. frugiperda* o larvas de *Trichoplusia* en que puede expresarse el polipéptido de interés (Engelhard y col., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 91: 3224-3227 (1994)).
- 30 **[0097]** En células hospedadoras de mamífero, están generalmente disponibles una serie de sistemas de expresión basados en virus. Por ejemplo, en casos en que se usa un adenovirus como vector de expresión, las secuencias que codifican un polipéptido de la presente descripción pueden ligarse con un complejo de transcripción/traducción de adenovirus consistente en el promotor tardío y la secuencia líder tripartita. La inserción en una región E1 o E3 no esencial del genoma vírico puede usarse para obtener un virus viable que es capaz de expresar el polipéptido en células hospedadoras infectadas (Logan y Shenk, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81: 3655-
- 35 3659 (1984)). Además, pueden usarse potenciadores de la transcripción, tales como potenciador del virus del sarcoma de Rous (RSV), para aumentar la expresión en células hospedadoras de mamífero.
- 40 **[0098]** Pueden usarse también señales de inicio específicas para conseguir una traducción más eficaz de las secuencias que codifican un polipéptido de fusión de interés. Dichas señales incluyen el codón de inicio ATG y secuencias adyacentes. En casos en que se insertan las secuencias que codifican el polipéptido, su codón de inicio y secuencias en dirección 5' en el vector de expresión apropiado, pueden no requerirse señales de control transcripcional o traduccional adicionales. Sin embargo, en casos en que se inserta solo la secuencia de codificación, o una porción de la misma, deberían proporcionarse señales de control traduccional exógenas, incluyendo el codón de inicio ATG. Además, el codón de inicio debería estar en el marco de lectura correcto para
- 45 asegurar la traducción del inserto completo. Los elementos traduccionales exógenos y codones de inicio pueden ser de diversos orígenes, tanto naturales como sintéticos. La eficacia de la expresión puede potenciarse mediante la inclusión de potenciadores que sean apropiados para el sistema celular particular que se usa, tales como los descritos en la bibliografía (Scharf y col., Results Probl. Cell Differ. 20:125-162 (1994)).
- 50 **[0099]** Además, puede elegirse una cepa de célula hospedadora por su capacidad de modular la expresión de las secuencias insertadas o de procesar la proteína de fusión expresada de la forma deseada. Dichas modificaciones del polipéptido incluyen, pero sin limitación, acetilación, carboxilación, glucosilación, fosforilación, lipidación y acilación. Puede usarse también el procesamiento postraduccional que escinde una forma "prepro" de la proteína para facilitar una inserción, plegamiento y/o función correctos. Pueden elegirse células hospedadoras
- 55 diferentes tales como CHO, HeLa, MDCK, HEK293 y W138, que tienen una maquinaria celular específica y mecanismos característicos para dichas actividades postraduccionales, para asegurar la correcta modificación y procesamiento de la proteína extraña.
- 60 **[0100]** Para la producción de alto rendimiento a largo plazo de proteínas recombinantes, se prefiere generalmente una expresión estable. Por ejemplo, las líneas celulares que expresan establemente un polinucleótido de fusión de la presente descripción pueden transformarse usando vectores de expresión que pueden contener orígenes de replicación víricos y/o elementos de expresión endógenos y un gen marcador seleccionable en el mismo o un vector separado. Después de la introducción del vector, las células pueden dejarse crecer durante 1-2 días en un medio enriquecido antes de cambiar a medio selectivo. El fin del marcador seleccionable es conferir resistencia
- 65 para selección, y su presencia permite el crecimiento y recuperación de células que expresan exitosamente las secuencias introducidas. Los clones resistentes de células transformadas establemente pueden hacerse proliferar

usando técnicas de cultivo de tejido apropiadas para el tipo celular.

[0101] Puede usarse cualquier serie de sistemas de selección para recuperar líneas celulares transformadas. Estos incluyen, pero sin limitación, los genes de timidina cinasa (Wigler y col., Cell 11: 223-232 (1977)) y adenina fosforilribosiltransferasa (Lowy y col., Cell 22: 817-823 (1990)) de herpesvirus simplex, que pueden emplearse en células *tk-* o *aprt-*, respectivamente. También pueden usarse antimetabolitos, antibióticos o resistencia a herbicida como base para la selección; por ejemplo, dhfr que confiere resistencia a metotrexato (Wigler y col., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 77: 3567-70 (1980)); *npt*, que confiere resistencia a aminoglucósidos, neomicina y G-418 (Colbere-Garapin y col., J. Mol. Biol. 150: 1-14 (1981)); y *als* o *pat*, que confieren resistencia a clorosulfurón y fosfotricina acetiltransferasa, respectivamente (Murry, supra). Se han descrito genes seleccionables adicionales, por ejemplo *trpB*, que permite a las células utilizar indol en lugar de triptófano, o *hisD*, que permite a las células utilizar histinol en lugar de histidina (Hartman y Mulligan, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85: 8047-51 (1988)). El uso de marcadores visibles ha aumentado su popularidad con marcadores tales como antocianinas, β -glucuronidasa y su sustrato GUS y luciferasa y su sustrato luciferina, siendo ampliamente usados no solo para identificar transformantes, sino también para cuantificar la cantidad de expresión de proteína transitoria o estable atribuible a un sistema de vector específico (Rhodes y col., Methods Mol. Biol. 5: 121-131 (1995)).

[0102] Son conocidos en la materia una variedad de protocolos para detectar y medir la expresión de productos codificados por polinucleótidos, usando anticuerpos policlonales o monoclonales específicos del producto. Los ejemplos incluyen ensayo de inmunosorción ligado a enzima (ELISA), radioinmunoensayo (RIA) y clasificación celular activada por fluorescencia (FACS). Se describen estos y otros ensayos, entre otros lugares, en Hampton y col., "Serological Methods, a Laboratory Manual" (1990) y Maddox y col., J. Exp. Med. 158: 1211-1216 (1983).

[0103] Son conocidos una amplia variedad de marcadores y técnicas de conjugación por los especialistas en la materia y pueden usarse en diversos ensayos de ácidos nucleicos y aminoácidos. Los medios para producir hibridación marcada o sondas de PCR para detectar secuencias relacionadas con polinucleótidos incluyen oligomarcaje, traslado de mella, marcate terminal o amplificación por PCR usando un nucleótido marcado. Como alternativa, las secuencias, o cualquier porción de las mismas, pueden clonarse en un vector para la producción de una sonda de ARNm. Dichos vectores son conocidos en la materia, están comercialmente disponibles y pueden usarse para sintetizar sondas de ARN *in vitro* mediante la adición de una ARN polimerasa apropiada tal como T7, T3, o SP6 y nucleótidos marcados. Estos procedimientos pueden realizarse usando una variedad de kits comercialmente disponibles. Las moléculas indicadoras o marcadores adecuados que pueden usarse incluyen radionucleidos, enzimas, agentes fluorescentes, quimioluminiscentes o cromogénicos, así como sustratos, cofactores, inhibidores, partículas magnéticas y similares.

[0104] Las células hospedadoras transformadas con una secuencia polinucleotídica de interés pueden cultivarse en condiciones adecuadas para la expresión y recuperación de la proteína a partir del cultivo celular. La proteína producida por una célula recombinante puede secretarse o contenerse intracelularmente dependiendo de la secuencia y/o vector usado. Como se entenderá por los especialistas en la materia, los vectores de expresión que contienen polinucleótidos de la invención pueden diseñarse para contener secuencias señal que dirigen la secreción del polipéptido codificado a través de una membrana celular procarionótica o eucariótica. Pueden usarse otras construcciones recombinantes para unir secuencias que codifican un polipéptido de interés con una secuencia nucleotídica que codifica un dominio polipeptídico que facilitará la purificación de proteínas solubles. Además de procedimientos de producción recombinante, los polipéptidos de fusión de la invención, y fragmentos de los mismos, pueden producirse mediante síntesis peptídica directa usando técnicas en fase sólida (Merrifield, J. Am. Chem. Soc. 85: 2149-2154 (1963)). La síntesis de proteína puede efectuarse usando técnicas manuales o por automatización. La síntesis automatizada puede conseguirse, por ejemplo, el sintetizador peptídico 431A de Applied Biosystems (Perkin Elmer). Como alternativa, pueden sintetizarse químicamente diversos fragmentos, por ejemplo, dos o más fragmentos antigénicos/inmunogénicos de antígenos KMP11, SMT, A2 y/o CBP de *Leishmania* separadamente y combinarse usando procedimientos químicos, produciendo la molécula completa.

COMPOSICIONES FARMACÉUTICAS Y VACUNA

[0105] En ciertos aspectos, los polipéptidos, polinucleótidos, porciones, variantes, polipéptidos de fusión, etc., como se describen en la presente memoria, se incorporan a composiciones farmacéutica o vacunas. Las composiciones farmacéuticas comprenden generalmente uno o más polipéptidos, polinucleótidos, porciones, variantes, polipéptidos de fusión, etc., como se describen en la presente memoria, en combinación con un portador fisiológicamente aceptable. Las vacunas, a las que se hace referencia también como composiciones inmunogénicas, comprenden generalmente uno o más de los polipéptidos, polinucleótidos, porciones, variantes, proteínas de fusión, etc., como se describen en la presente memoria, en combinación con un inmunoestimulante tal como un coadyuvante. En realizaciones particulares, las composiciones farmacéuticas comprenden polipéptidos de fusión que contienen adicionalmente al menos 2, al menos 3 o al menos 4 o más antígenos polipeptídicos KMP11, SMT, A2 y/o CPB de *Leishmania* que son capaces de proporcionar protección, por ejemplo en un ensayo *in vivo* como se describe en la presente memoria, frente a especies de *Leishmania* tales como *L. donovani*, *L. major* y/o *L. infantum*.

[0106] Un inmunoestimulante puede ser cualquier sustancia que potencie o fomente una respuesta

inmunitaria (mediada por anticuerpo y/o célula) ante un antígeno exógeno. Los ejemplos de inmunoestimulantes incluyen coadyuvantes, microesferas biodegradables (por ejemplo, ácido poli(láctico-glicólico) y liposomas en los que se incorpora el compuesto (véase, por ejemplo, Fullerton, patente de EE. UU. nº 4.235.877). La preparación de vacuna se describe en general, por ejemplo, en Powell & Newman, eds., "Vaccine Design (the subunit and adjuvant approach)" (1995).

[0107] Puede emplearse cualquiera de una variedad de inmunoestimulantes en las vacunas de esta descripción. Por ejemplo, puede incluirse un coadyuvante. Muchos coadyuvantes contienen una sustancia diseñada para proteger al antígeno del catabolismo rápido, tal como hidróxido de aluminio o aceite mineral, y un estimulante de las respuestas inmunitarias tal como lípido A (natural o sintético), especies de *Bordetella pertussis* o *Mycobacterium* o proteínas derivadas de *Mycobacterium*. Están comercialmente disponibles coadyuvantes adecuados como, por ejemplo, coadyuvante incompleto y coadyuvante completo de Freund (Difco Laboratories, Detroit, Mich.); coadyuvante 65 de Merck (Merck and Company, Inc., Rahway, N.J.); AS-2 y derivados del mismo (GlaxoSmithKline Beecham, Filadelfia, Pa.); CWS, TDM, LeIF, sales de aluminio tales como gel de hidróxido de aluminio (alúmina) o fosfato de aluminio; sales de calcio, hierro o cinc; una suspensión insoluble de tirosina acilada; azúcares acilados; polisacáridos derivatizados catiónica o aniónicamente; polifosfacenos; microesferas biodegradables; monofosforil lípido A y Quil A. Pueden usarse también como coadyuvantes citocinas tales como GM-CSF o interleucina 2, 7 o 12.

[0108] Ciertas realizaciones de la presente descripción contemplan vacunas y composiciones farmacéuticas que incluyen uno o más agonistas de receptor de tipo Toll (agonista de TLR). En realizaciones más específicas, por ejemplo, las composiciones de la invención incluyen agonistas de receptor de tipo Toll tales como agonistas de TLR7 y agonistas de TLR7/8. En ciertas realizaciones, el agonista de TLR es capaz de suministrar una señal biológica al interactuar con al menos un TLR que se selecciona de TLR-2, TLR-3, TLR-4, TLR-5, TLR-6, TLR-7, TLR-8 y TLR-9.

[0109] Los receptores de tipo Toll (TLR) incluyen receptores transmembrana de superficie celular del sistema inmunitario innato que confieren la capacidad de reconocimiento en fase temprana a células hospedadoras para una variedad de estructuras moleculares microbianas conservadas tales como pueden estar presentes en o sobre un gran número de patógenos infecciosos (por ejemplo, Armant y col., 2002 Genome Biol. 3(8): revisiones 3011.1-3011.6; Fearon y col., 1996 Science 272: 50; Medzhitov y col., 1997 Curr. Opin. Immunol. 9:4; Luster 2002 Curr. Opin. Immunol. 14: 129; Lien y col. 2003 Nat. Immunol.: 1162; Medzhitov, 2001 Nat. Rev. Immunol. 1: 135; Takeda y col., 2003 Ann. Rev. Immunol. 21: 335; Takeda y col. 2005 Int. Immunol. 17: 1; Kaisho y col., 2004 Microbes Infect. 6: 1388; Datta y col., 2003 J. Immunol. 170: 4102).

[0110] La inducción de la transducción de señal mediada por LTR para fomentar el inicio de respuestas inmunitarias a través del sistema inmunitario innato puede efectuarse mediante agonistas de TLR, que interactúan con TLR de superficie celular o TLR citoplasmático. Por ejemplo, el lipopolisacárido (LPS) puede ser un agonista de TLR a través de TLR2 o TLR4 (Tsan y col., 2004 J. Leuk. Biol. 76: 514; Tsan y col., 2004 Am. J. Physiol. Cell Physiol. 286: C739; Lin y col., 2005 Shock 24: 206); la poli(inosina-citidina) (poliI:C) puede ser agonista de TLR a través de TLR3 (Salem y col., 2006 Vaccine 24:5119); las secuencias de CpG (oligodesoxinucleótidos que contienen motivos dinucleotídicos de citosina-guanosina no metilados "CpG", por ejemplo, CpG 7909, Cooper y col., 2005 AIDS 19: 1473; CpG 10101 Bayes y col. Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol. 27: 193; Vollmer y col. Expert Opinion on Biological Therapy 5: 673; Vollmer y col., 2004 Antimicrob. Agents Chemother. 48: 2314; Deng y col., 2004 J. Immunol. 173: 5148) pueden ser agonistas de TLR a través de TLR9 (Andaloussi y col., 2006 Glia 54: 526; Chen y col., 2006 J. Immunol. 177: 2373); los peptidoglucanos pueden ser agonistas de TLR2 y/o TLR6 (Soboll y col., 2006 Biol. Reprod. 75: 131; Nakao y col., 2005 J. Immunol. 174: 1566); el 3M003 (hidrato de 4-amino-2-(etoximetil)- α , α -dimetil-6,7,8,9-tetrahidro-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-1-etanol, PM 318 Da de 3M Pharmaceuticals, St. Paul, MN, que es también una fuente de los compuestos relacionados 3M001 y 3M002; Gorden y col., 2005 J. Immunol. 174: 1259) puede ser un agonista de TLR7 (Johansen 2005 Clin. Allergy 35: 1591) y/o un agonista de TLR8 (Johansen 2005); la flagelina puede ser un agonista de TLR5 (Feuillet y col., 2006 Proc. Nat. Acad. Sci. USA 103: 12487) y los antígenos de hepatitis C pueden actuar como agonistas de TLR a través de TLR7 y/o TLR9 (Lee y col., 2006 Proc. Nat. Acad. Sci. USA 103: 1828; Horsmans y col., 2005 Hepatology 42: 724). Son conocidos otros agonistas de TLR (por ejemplo, Schirmbeck y col., 2003 J. Immunol. 171: 5198) y pueden usarse según ciertas de las realizaciones descritas actualmente.

[0111] Por ejemplo, y a modo de antecedente (véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. nº 6.544.518), los oligonucleótidos inmunoestimulantes que contienen dinucleótidos de CpG no metilados ("CpG") son conocidos por ser coadyuvantes cuando se administran tanto por vía sistémica como mucosa (documentos WO 96/02555, EP 468520, Davis y col., J. Immunol., 1998. 160(2): 870-876; McCluskie y Davis, J. Immunol., 1998, 161(9): 4463-6). CpG es una abreviatura de motivos de dinucleótido de citosina-guanosina presentes en el ADN. El papel fundamental del motivo CG en inmunoestimulación se dilucidó por Krieg, Nature 374, p546 1995. El análisis detallado ha mostrado que el motivo CG tiene que estar en cierto contexto de secuencia, y que dichas secuencias son comunes en ADN bacteriano, pero raras en ADN de vertebrado. La secuencia inmunoestimulante es a menudo purina, purina, C, G, pirimidina, pirimidina; en la que el motivo dinucleótido CG no está metilado, pero son conocidas otras secuencias de CpG no metiladas que son inmunoestimulantes y pueden usarse en ciertas realizaciones de la

presente invención. Cuando CpG se formula en vacunas, puede administrarse en solución libre junto con antígeno libre (documento WO 96/02555; McCluskie y Davis, *supra*) o conjugado covalentemente con un antígeno (publicación PCT nº WO 98/16247), o formulado con un portador tal como hidróxido de aluminio (por ejemplo, Davis y col. *supra*, Brazolot-Millan y col., Proc.Natl.Acad.Sci., USA, 1998, 95(26), 15553-8).

5

[0112] Otros oligonucleótidos ilustrativos para uso en composiciones de la presente invención contendrán a menudo dos o más motivos de dinucleótido CpG separados por al menos 3, más preferiblemente al menos 6 o más nucleótidos. Los oligonucleótidos de la presente invención son típicamente desoxinucleótidos. En una realización, el internucleótido en el oligonucleótido es fosforoditioato, o más preferiblemente, un enlace fosforotioato, aunque fosfodiéter y otros enlaces internucleotídicos están dentro del alcance de la invención, incluyendo oligonucleótidos con ligamientos internucleotídicos mixtos. Se describen procedimientos para producir oligonucleótidos de fosforotioato o fosforoditioato en las patentes de EE. UU. nº 5.666.153, 5.278.302 y WO95/26204.

10

[0113] Otros ejemplos de oligonucleótidos tienen secuencias que se dan a conocer en las siguientes publicaciones; para ciertas realizaciones dadas a conocer en la presente memoria, las secuencias contienen preferiblemente los ligamientos internucleotídicos de fosforotioato modificado:

15

CPG 7909: Cooper y col., "CPG 7909 adjuvant improves hepatitis B virus vaccine seroprotection in antiretroviral treated HIV-infected adults." AIDS, 23 de sep. de 2005; 19(14): 1473-9.

20

CpG 10101: Bayes y col., "Gateways to clinical trials." Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol. abril de 2005; 27(3): 193-219. Vollmer J., "Progress in drug development of immunostimulatory CpG oligodeoxynucleotide ligands for TLR9" Expert Opinion on Biological Therapy. Mayo de 2005; 5(5): 673-682

25

[0114] Los oligonucleótidos CpG alternativos pueden comprender variantes de las secuencias preferidas descritas en las publicaciones anteriormente citadas que difieren en que tienen sustituciones, inserciones, deleciones y/o adiciones de secuencia nucleotídica sin consecuencias en las mismas. Los oligonucleótidos CpG utilizados en ciertas realizaciones de la presente invención pueden sintetizarse mediante cualquier procedimiento conocido en la materia (por ejemplo, documento EP 468520). De forma conveniente, dichos oligonucleótidos pueden sintetizarse utilizando un sintetizador automático. Los oligonucleótidos son típicamente desoxinucleótidos. En una realización preferida, el enlace internucleotídico en el oligonucleótido es un enlace fosforoditioato, o más preferiblemente fosforotioato, aunque los fosfodiésteres están también dentro del alcance de las realizaciones actualmente contempladas. Se contemplan también oligonucleótidos que comprenden diferentes ligamientos internucleotídicos, por ejemplo, fosforotioatos-fosfodiésteres mixtos. Pueden usarse también otros enlaces internucleotídicos que estabilizan el oligonucleótido.

30

35

[0115] En ciertas realizaciones más específicas, el agonista de TLR se selecciona de lipopolisacárido, peptidoglicano, polil:C, CpG, 3M003, flagelina, homólogo de *Leishmania* de factor de alargamiento e iniciación ribosómico 4a eucariótico (LelF) y al menos un antígeno de hepatitis C.

40

[0116] Aún otros coadyuvantes ilustrativos incluyen imiquimod, gardiquimod y resiquimod (todos disponibles en Invivogen) y compuestos relacionados, que son conocidos por actuar como agonistas de TLR7/8. Se proporciona un compendio de los coadyuvantes que pueden ser útiles en vacunas por Vogel y col., Pharm Biotechnol. 6: 141 (1995)).

45

[0117] Las composiciones de la invención pueden emplear también sistemas coadyuvantes diseñados para inducir una respuesta inmunitaria predominantemente de tipo Th1. Los altos niveles de citocinas de tipo Th1 (por ejemplo, IFN- γ , TNF- α , IL-2 e IL-12) tienden a favorecer la inducción de respuestas inmunitarias mediadas por célula ante un antígeno administrado. En contraposición, los altos niveles de citocinas de tipo Th2 (por ejemplo, IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10) tienden a favorecer la inducción de respuestas inmunitarias humorales. Después de la aplicación de una vacuna que comprende un polipéptido de fusión que comprende adicionalmente al menos 2, al menos 3 o al menos 4 o más antígenos polipeptídicos KMP11, SMT, A2 y/o CPB de *Leishmania*, como se proporcionan en la presente memoria, un paciente soportará una respuesta inmunitaria que incluye respuestas de tipo Th1 y Th2. En una realización preferida, en que la respuesta es predominantemente de tipo Th1, el nivel de citocinas de tipo Th1 aumentará en mayor medida que el nivel de citocinas de tipo Th2. Los niveles de estas citocinas pueden valorarse fácilmente usando ensayos estándares. Para una revisión de las familias de citocinas, véase Mossman y Coffman, Ann. Rev. Immunol. 7: 145-173 (1989).

55

[0118] Ciertos coadyuvantes para uso en el desencadenamiento de una respuesta de tipo predominantemente Th1 incluyen, por ejemplo, una combinación de monofosforil-lípido A, preferiblemente monofosforil-lípido A 3-des-O-acilado (3D-MPLTM), junto con una sal de aluminio (patentes de EE. UU. nº 4.436.727, 4.877.611, 4.866.034 y 4.912.094). Los oligonucleótidos que contienen CpG (en que el dinucleótido CpG no está metilado) inducen también una respuesta predominantemente Th1. Dichos oligonucleótidos son bien conocidos y se describen, por ejemplo, en los documentos WO 96/02555, WO 99/33488 y las patentes de EE. UU. nº 6.008.200 y 5.856.462. Se describen también secuencias de ADN inmunoestimulantes, por ejemplo, por Sato y col., Science 273: 352 (1996). Otro coadyuvante ilustrativo comprende una saponina, tal como Quil A, o derivados de la misma

65

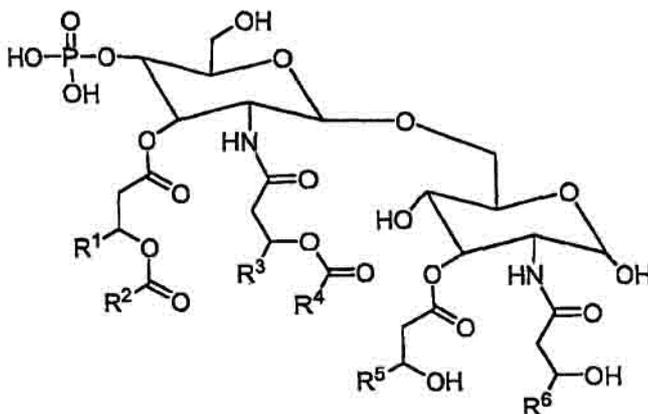
incluyendo QS21 y QS7 (Aquila Biopharmaceuticals Inc., Framingham, Mass.); escina; digitonina o saponinas de *Gypsophila* o *Chenopodium quinoa*. Otras formulaciones ilustrativas incluyen más de una saponina en las combinaciones coadyuvantes de la presente descripción, por ejemplo, combinaciones de al menos dos del siguiente grupo que comprende QS21, QS7, Quil A, β -escina o digitonina.

5

[0119] En una realización particular, el sistema coadyuvante incluye la combinación de un monofosforil-lípido A y un derivado de saponina, tal como la combinación de QS21 y coadyuvante 3D-MPL™, como se describe en el documento WO 94/00153, o una composición menos reactogénica en que el QS21 se apaga con colesterol, como se describe en el documento WO 96/33739. Otras formulaciones comprenden una emulsión de aceite en agua y tocoferol. Se describe otra formulación coadyuvante que emplea QS21, coadyuvante 3D-MPL™ y tocoferol en una emulsión de aceite en agua en el documento WO 95/17210.

[0120] En ciertas realizaciones preferidas, el coadyuvante usado en la presente descripción es un coadyuvante glucopiranosil-lípido A (GLA), como se describe en la publicación de solicitud de patente de EE. UU. n° 20080131466.

[0121] Por ejemplo, en una realización, el coadyuvante GLA usado en el contexto de la presente descripción tiene la siguiente estructura:



20

en la que: R¹, R³, R⁵ y R⁶ son alquilo C₁₁-C₂₀ y R² y R⁴ son alquilo C₁₂-C₂₀.

[0122] En una realización más específica, el GLA tiene la fórmula exhibida anteriormente, en la que R¹, R³, R⁵ y R⁶ son alquilo C₁₁₋₁₄ y R² y R⁴ son alquilo C₁₂₋₁₅.

[0123] En una realización más específica, el GLA tiene la fórmula exhibida anteriormente, en la que R¹, R³, R⁵ y R⁶ son alquilo C₁₁ y R² y R⁴ son alquilo C₁₃.

[0124] Otro sistema coadyuvante potenciado implica la combinación de un oligonucleótido que contiene CpG y un derivado de saponina como se da a conocer en el documento WO 00/09159.

[0125] Otros coadyuvantes ilustrativos incluyen Montanide ISA 720 (Seppic, Francia), SAF (Chiron, Calif., Estados Unidos), ISCOMS (CSL), MF-59 (Chiron), la serie de coadyuvantes SBAS (por ejemplo, SBAS-2, AS2', AS2, SBAS-4 o SBAS6, disponibles en SmithKline Beecham, Rixensart, Bélgica), Detox, RC-529 (Corixa, Hamilton, Mont.) y otros 4-fosfatos de aminoalquilglucosaminida (AGP), tales como aquellos descritos en las solicitudes de patente de EE. UU. pendientes de n° de serie 08/853.826 y 09/074.720, y coadyuvantes de polioxietiléneter tales como aquellos descritos en el documento WO 99/52549A1.

[0126] La vacuna y composiciones farmacéuticas de la descripción pueden formularse usando cualquiera de una variedad de procedimientos conocidos. En ciertas realizaciones, la vacuna o composiciones farmacéuticas se preparan como emulsiones estables (por ejemplo, emulsiones de aceite en agua) o como disoluciones acuosas.

[0127] Las composiciones de la invención pueden comprender también, o como alternativa, linfocitos T específicos del polipéptido de fusión que comprende al menos 2 porciones o fragmentos inmunogénicos/antigénicos de antígenos KMP11, SMT, A2 y/o CPB de *Leishmania* o variantes de los mismos, descritos en la presente memoria. Dichas células pueden prepararse generalmente *in vitro* o *ex vivo*, usando procedimientos estándares. Por ejemplo, los linfocitos T pueden aislarse de médula ósea, sangre periférica o una fracción de médula ósea o sangre periférica de un paciente. Como alternativa, los linfocitos T pueden derivarse de líneas o cultivos celulares humanos, de mamíferos no humanos, relacionados o no relacionados.

50

[0128] Los linfocitos T pueden estimularse con un polipéptido de fusión que comprende al menos 2 porciones o fragmentos inmunogénicos/antigénicos de antígenos KMP11, SMT, A2 y/o CPB de *Leishmania* o variantes de los mismos, un polinucleótido que codifica dicho polipéptido de fusión y/o una célula presentadora de antígeno (APC) que expresa dicho polipéptido de fusión. Dicha estimulación se efectúa en condiciones y durante un tiempo suficiente para permitir la generación de linfocitos T que son específicos del polipéptido. En ciertas realizaciones, el polipéptido o polinucleótido está presente en un vehículo de suministro tal como una microesfera, para facilitar la generación de linfocitos T específicos.

[0129] Los linfocitos T se consideran específicos de un polipéptido de fusión que comprende al menos 2 porciones o fragmentos inmunogénicos/antigénicos de antígenos KMP11, SMT, A2 y/o CPB de *Leishmania* si los linfocitos T proliferan específicamente, secretan citocinas o matan células diana recubiertas con el polipéptido de fusión o que expresan un gen que codifica el polipéptido de fusión. La especificidad de linfocitos T puede evaluarse usando cualquiera de una variedad de técnicas estándares. Por ejemplo, en un ensayo de liberación de cromo o ensayo de proliferación, un índice de estimulación de un aumento de más de 2 veces de la lisis y/o proliferación, en comparación con controles negativos, indica especificidad de linfocitos T. Dichos ensayos pueden efectuarse, por ejemplo, como se describe en Chen y col., *Cancer Res.* 54: 1065-1070 (1994)). Como alternativa, la detección de la proliferación de linfocitos T puede lograrse mediante una variedad de técnicas conocidas. Por ejemplo, la proliferación de linfocitos T puede detectarse midiendo el índice aumentado de síntesis de ADN (por ejemplo, mediante marcaje por pulsos de cultivos de linfocitos T con timidina tritiada y midiendo la cantidad de timidina tritiada incorporada al ADN). El contacto con un polipéptido de la descripción (100 ng/ml-100 µg/ml, preferiblemente 200 ng/ml-25 µg/ml) durante 3-7 días debería dar como resultado un aumento de al menos 2 veces de la proliferación de linfocitos T. El contacto como se describe anteriormente durante 2-3 horas debería dar como resultado la activación de los linfocitos T, medida usando ensayos de citocina estándares en que un aumento de 2 veces del nivel de liberación de citocina (por ejemplo, TNF o IFN-γ) es indicativo de la activación de linfocitos T (véase Coligan y col., "Current Protocols in Immunology", vol. 1 (1998)). Los linfocitos T que se han activado en respuesta a un polipéptido, polinucleótido o APC que expresa polipéptido pueden ser CD4+ y/o CD8+. Los linfocitos T específicos de proteína pueden propagarse usando técnicas estándares. En las realizaciones preferidas, los linfocitos T derivan de un paciente, un donante relacionado o un donante no relacionado y se administran al paciente después de estimulación y propagación.

[0130] En las composiciones de la invención, la formulación de excipientes y soluciones portadoras farmacéuticamente aceptables es bien conocida por los especialistas en la materia, así como el desarrollo de regímenes de dosificación y tratamiento adecuados para usar las composiciones particulares descritas en la presente memoria en una variedad de regímenes de tratamiento incluyendo, por ejemplo, administración y formulación oral, parenteral, intravenosa, intranasal, intradérmica, subcutánea e intramuscular.

[0131] En ciertas aplicaciones, las composiciones dadas a conocer en la presente memoria pueden suministrarse mediante administración oral a un sujeto. Como tales, estas composiciones pueden formularse con un diluyente inerte o con un portador comestible asimilable, o pueden encerrarse en cápsulas de gelatina de cubierta dura o blanda, o pueden comprimirse en comprimidos o pueden incorporarse directamente al alimento de la dieta.

[0132] En ciertas circunstancias, será deseable suministrar las composiciones dadas a conocer en la presente memoria por vía parenteral, intravenosa, intramuscular o incluso intraperitoneal, como se describe por ejemplo en la patente de EE. UU. n° 5.543.158, la patente de EE. UU. n° 5.641.515 y la patente de EE. UU. n° 5.399.363.

[0133] Las disoluciones de compuestos activos como base libre o sales farmacológicamente aceptables pueden prepararse en agua adecuadamente mezclados con un tensioactivo, tal como hidroxipropilcelulosa. Las dispersiones pueden prepararse también en glicerol, polietilenglicoles líquidos y mezclas de los mismos y en aceites. En condiciones ordinarias de almacenamiento y uso, estas preparaciones contienen un conservante para evitar el crecimiento de microorganismos.

[0134] Las formas farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen disoluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de disoluciones o dispersiones inyectables estériles (patente de EE. UU. n° 5.466.468).

[0135] En todos los casos, la forma debe ser estéril y debe ser fluida en la medida en que exista una fácil inyectabilidad. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y debe conservarse frente a la acción contaminante de microorganismos tales como bacterias y hongos. El portador puede ser un disolvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido y similares), mezclas adecuadas de los mismos y/o aceites vegetales. La fluidez apropiada puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula necesario en el caso de dispersión y mediante el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de los microorganismos puede facilitarse mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo azúcares o cloruro de sodio. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede producirse mediante el uso en las composiciones de agentes que retardan la absorción, por

ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

[0136] Para administración parenteral en disolución acuosa, por ejemplo, la disolución debería tamponarse adecuadamente si es necesario y volverse isotónico en primer lugar el diluyente líquido con suficiente disolución salina o glucosa. Estas disoluciones acuosas particulares son especialmente adecuadas para administración intravenosa, intramuscular, subcutánea e intraperitoneal. A este respecto, será conocido un medio acuoso estéril que puede emplearse por los especialistas en la materia a la vista de la presente divulgación. Por ejemplo, puede disolverse una dosificación en 1 ml de disolución isotónica de NaCl y añadirse a 1.000 ml de fluido de hipodermoclasia o inyectarse en el sitio de infusión propuesto (véase, por ejemplo, "Remington's Pharmaceutical Sciences", 15ª edición, pág. 1035-1038 y 1570-1580). Aparecerá cierta variación en la dosificación necesariamente dependiendo de la condición del sujeto que se esté tratando. La persona responsable de la administración determinará, en cualquier caso, la dosis apropiada para el sujeto individual. Además, para administración humana, las preparaciones deberían satisfacer los estándares de esterilidad, pirogenicidad y seguridad general y pureza requeridos por la FDA Office of Biologics standards.

[0137] Las disoluciones inyectables estériles se preparan incorporando los compuestos activos a la cantidad requerida en el disolvente apropiado con los diversos otros ingredientes enumerados anteriormente, según sea necesario, seguido de esterilización por filtración. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando los diversos ingredientes activos esterilizados a un vehículo estéril que contiene el medio de dispersión básico y los demás ingredientes necesarios de aquellos enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de disoluciones inyectables estériles, los procedimientos preferidos de preparación son técnicas de secado a vacío y liofilización que proporcionan un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente adicional deseado a partir de una disolución esterilizada por filtración anteriormente.

[0138] Las composiciones dadas a conocer en la presente memoria pueden formularse en forma neutra o de sal. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las sales de adición de ácido (formadas con los grupos amino libres de la proteína) y que se forman con ácidos inorgánicos tales como, por ejemplo, ácido clorhídrico o fosfórico, o ácidos orgánicos tales como acético, oxálico, tartárico, mandélico y similares. Las sales formadas con los grupos carboxilo libres pueden derivar también de bases inorgánicas tales como, por ejemplo, hidróxidos de sodio, potasio, amonio, calcio o férrico, y bases orgánicas tales como isopropilamina, trimetilamina, histidina, procaína y similares. Tras la formulación, las disoluciones se administrarán de manera compatible con la formulación de dosificación y en una cantidad tal que sea terapéuticamente eficaz para el tratamiento de leishmaniosis. Las formulaciones se administran fácilmente en una variedad de formas de dosificación tales como disoluciones inyectables, cápsulas de liberación de fármaco y similares.

[0139] Como se usa en la presente memoria, "portador" incluye todos y cada uno de disolventes, medios de dispersión, vehículos, recubrimientos, diluyentes, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de la absorción, tampones, disoluciones portadoras, suspensiones, coloides y similares. El uso de dichos medios y agentes para sustancias farmacéuticas activas es bien conocido por un especialista en la materia. Excepto en la medida en que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con el ingrediente activo, se contempla su uso en las composiciones terapéuticas. Pueden incorporarse también ingredientes activos suplementarios a las composiciones.

[0140] La frase "farmacéuticamente aceptable" hace referencia a entidades moleculares y composiciones que no producen una reacción alérgica o similar indeseada cuando se administran a un ser humano. La preparación de una composición acuosa que contiene una proteína como ingrediente activo es bien conocida por el especialista en la materia. Típicamente, dichas composiciones se preparan como inyectables, tanto como disoluciones o suspensiones líquidas; también pueden prepararse formas sólidas adecuadas para disolución o suspensión en líquido antes de la inyección. La preparación puede emulsionarse también.

[0141] En ciertas realizaciones, las composiciones de la presente descripción que comprenden un polipéptido de fusión con al menos 2 porciones o fragmentos inmunogénicos/antigénicos de antígenos KMP11, SMT, A2 y/o CPB de *Leishmania* o variantes de los mismos pueden suministrarse mediante pulverizadores intranasales, inhalación y/u otros vehículos de suministro en aerosol. Se han descrito procedimientos para suministrar genes, polinucleótidos y composiciones peptídicas directamente en los pulmones mediante pulverizadores nasales en aerosol, por ejemplo, en la patente de EE. UU. nº 5.756.353 y la patente de EE. UU. nº 5.804.212.

[0142] Igualmente, el suministro de fármacos usando resinas de micropartículas intranasales (Takenaga y col., 1998) y compuestos de lisofosfatidilglicerol (patente de EE. UU. nº 5.725.871) es también bien conocido en la tecnología farmacéutica. Igualmente, se describe el suministro de fármaco transmucosa en forma de matriz de soporte de politetrafluoroetileno en la patente de EE. UU. nº 5.780.045.

[0143] En ciertas realizaciones, el suministro puede ocurrir mediante el uso liposomas, nanocápsulas, micropartículas, microesferas, partículas lipídicas, vesículas y similares, para la introducción de composiciones que comprenden un polipéptido de fusión como se describe en la presente memoria en células hospedadoras adecuadas. En particular, las composiciones de la presente invención pueden formularse para suministro

encapsuladas en una partícula lipídica, un liposoma, una vesícula, una nanoesfera, una nanopartícula o similar. La formulación y uso de dichos vehículos de suministro pueden llevarse a cabo usando técnicas conocidas y convencionales.

5 **[0144]** Una composición farmacéutica o inmunogénica puede contener, como alternativa, un inmunoestimulante y una molécula de ADN que codifica uno o más de los polipéptidos o polipéptidos de fusión que comprenden dos o más polipéptidos KMP11, SMT, A2 y/o CPB de *Leishmania* o porciones o variantes inmunogénicas de los mismos como se describen anteriormente, de tal modo que se genere el polipéptido deseado *in situ*. En dichas composiciones, el ADN que codifica la proteína de fusión puede estar presente en cualquiera de
 10 una variedad de sistemas de suministro conocidos por los especialistas en la materia, incluyendo sistemas de expresión de ácido nucleico, sistemas de expresión bacterianos y víricos. Los sistemas de expresión de ácido nucleico apropiados contienen las secuencias de ADN necesarias para expresión en el paciente (tales como un promotor y una señal de terminación adecuados). Los sistemas de suministro bacterianos implican la administración de una bacteria (tal como bacilo de *Calmette-Guerin*) que expresa una porción inmunogénica del polipéptido sobre
 15 su superficie celular. En una realización particular, el ADN puede introducirse usando un sistema de expresión vírica (por ejemplo, *Vaccinia* u otro poxvirus, retrovirus o adenovirus), lo que puede implicar el uso de un virus competente de replicación no patológico (defectivo). Las técnicas para incorporar ADN a dichos sistemas de expresión son bien conocidas por los especialistas en la materia. El ADN puede estar también "desnudo", como se describe por ejemplo en Ulmer y col., *Science* 259: 1745-1749 (1993) y se revisa por Cohen, *Science* 259: 1691-1692 (1993). La
 20 captación de ADN desnudo puede aumentarse recubriendo con el ADN perlas biodegradables, que se transportan eficazmente a las células.

[0145] Las composiciones farmacéuticas y vacunas de la descripción que comprenden dos o más polipéptidos KMP11, SMT, A2 y/o CPB de *Leishmania* o porciones, fragmentos o variantes inmunogénicos/antigénicos de los
 25 mismos, o polinucleótidos que codifican dichos polipéptidos, porciones, fragmentos o variantes, pueden usarse, por ejemplo, para inducir inmunidad protectora frente a especies de *Leishmania* tales como *L. donovani*, *L. major* y/o *L. infantum* en un paciente tal como un ser humano o un perro, para prevenir la leishmaniosis o reducir su gravedad. Las composiciones y vacunas pueden usarse también para estimular una respuesta inmunitaria, que puede ser celular y/o humoral, en un paciente, para tratar un individuo ya infectado. En una realización, para pacientes
 30 infectados por *Leishmania*, las repuestas inmunitarias generadas incluyen una respuesta inmunitaria Th1 preferencial (concretamente, una respuesta caracterizada por la producción de las citocinas interleucina 1, interleucina 2, interleucina 12 y/o interferón γ , así como factor de necrosis tumoral α). En otra realización, para pacientes no infectados, la respuesta inmunitaria implica la producción de interleucina 12 y/o interleucina 2, o la estimulación de linfocitos T $\gamma\delta$. En cualquier categoría de paciente, la respuesta estimulada puede incluir la
 35 producción de IL-12. Dichas respuestas pueden desencadenarse también en muestras biológicas de PBMC o componentes de las mismas derivados de individuos infectados por *Leishmania* o no infectados. Como se observa anteriormente, los ensayos para cualquiera de las citocinas anteriores, así como otras citocinas conocidas, pueden efectuarse generalmente usando procedimientos conocidos por los especialistas en la materia, tales como ensayo de inmunosorción ligado a enzima (ELISA).

40 **[0146]** Las dosis y procedimientos de administración de polipéptido de fusión apropiados con estos fines pueden determinarse fácilmente por un especialista en la materia usando el conocimiento disponible en la materia y/o técnicas rutinarias. Las vías y frecuencia de administración, así como la dosificación, para los aspectos anteriores de la presente invención pueden variar de individuo a individuo y pueden ser semejantes a aquellas que
 45 se usan actualmente en inmunización contra otras infecciones, incluyendo infecciones protozoarias, víricas y bacterianas. Por ejemplo, en una realización, se administran entre 1 y 12 dosis de composición que tiene un polipéptido de fusión que comprende dos o más polipéptidos KMP11, SMT, A2 y/o CPB de *Leishmania* o porciones, fragmentos o variantes inmunogénicos/antigénicos de los mismos, durante un periodo de 1 año. Pueden darse vacunaciones de recuerdo periódicamente después de ello según se necesite o desee. Por supuesto, pueden ser
 50 apropiados protocolos alternativos para pacientes individuales. En una realización particular, es una dosis adecuada una cantidad de polipéptido de fusión o ADN que codifica dicho péptido tal que, cuando se administra como se describe anteriormente, es capaz de desencadenar una respuesta inmunitaria en un paciente inmunizado suficiente para proteger al paciente de la leishmaniosis causada por especies de *Leishmania* tales como *L. donovani*, *L. major* y/o *L. infantum* durante al menos 1-2 años. En general, la cantidad de polipéptido de fusión presente en una dosis (o
 55 producida *in situ* por el ADN en una dosis) oscila de aproximadamente 100 ng a aproximadamente 1 mg por kg de hospedador, típicamente de aproximadamente 10 μ g a aproximadamente 100 μ g. Los tamaños de dosis adecuados variarán con el tamaño del paciente, pero oscilarán típicamente de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 5 ml.

PROCEDIMIENTOS Y KITS DE DIAGNÓSTICO

60 **[0147]** En otro aspecto, esta descripción proporciona compuestos y procedimientos para detectar leishmaniosis en individuos y suministros de sangre. En realizaciones particulares, el individuo es un mamífero. En realizaciones más particulares, el mamífero es un ser humano o canino.

65 **[0148]** Los polipéptidos de fusión y polinucleótidos de la presente invención son también útiles como reactivos de diagnóstico para detectar y/o monitorizar infección por *Leishmania* en un paciente. Por ejemplo, las

composiciones, polipéptidos de fusión y polinucleótidos de la invención pueden usarse en ensayos *in vitro* e *in vivo* para detectar anticuerpos humorales o inmunidad mediada por célula contra *Leishmania* para el diagnóstico de infección, la monitorización de la progresión de la enfermedad o la evaluación del ensayo de curación. En realizaciones particulares, los polipéptidos de fusión y polinucleótidos son diagnósticos útiles para serodiagnóstico y
 5 ensayo de sangre completa en pacientes que tienen leishmaniosis causada por especies de *Leishmania* tales como *L. donovani*, *L. major* y/o *L. infantum*.

[0149] En un aspecto, los procedimientos y kits de diagnóstico emplean preferiblemente un polipéptido de fusión que comprende múltiples copias de fragmentos polipeptídicos, repeticiones de fragmentos polipeptídicos o
 10 fragmentos polipeptídicos multiméricos, incluyendo fragmentos antigénicos/inmunogénicos tales como los polipéptidos KMP11, SMT, A2 y/o CPB de *Leishmania*, que comprenden al menos aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más fragmentos contiguos en cualquier orden, e incluyendo todas las longitudes de una composición polipeptídica exhibida en la presente memoria, o aquellos codificados por una secuencia polinucleotídica exhibida en la presente memoria. En otro aspecto, los polipéptidos de fusión de la presente descripción pueden comprender dos
 15 o más fragmentos de antígeno de *Leishmania* como se indican en las SEQ ID NO: 1-10 y 25-28. En una realización más particular, el polipéptido de fusión comprende la secuencia aminoacídica exhibida en las SEQ ID NO: 21 o 23.

[0150] En otra realización, los procedimientos y kits de diagnóstico emplean preferiblemente un polipéptido de fusión que comprende al menos 1, al menos 2, al menos 3 o al menos 4 porciones o fragmentos
 20 inmunogénicos/antigénicos de antígenos KMP11, SMT, A2 y/o CPB de *Leishmania*, variantes o similares, opcionalmente en combinación con uno o más de otros antígenos de *Leishmania* como se describen en la presente memoria, u obtenibles en la materia. En ciertas realizaciones, se preferirá usar múltiples antígenos de *Leishmania* como se describen en la presente memoria, por ejemplo, 3 o más, 4 o más, 5 o más, 6 o más, 7 o más, 8 o más, 9 o más, 10 o más, etc., en un procedimiento de diagnóstico de la descripción. Los antígenos pueden usarse
 25 esencialmente en cualquier formato de ensayo deseado, por ejemplo, como antígenos individuales ensayados separadamente, como antígenos múltiples ensayados simultáneamente (por ejemplo, un polipéptido de fusión tal como KSA o KSAC), como antígenos inmovilizados sobre un soporte sólido tal como una matriz, o similar.

[0151] En una realización, se proporcionan kits de diagnóstico para detectar infección por *Leishmania* en una
 30 muestra biológica que comprenden (a) un polipéptido de fusión que comprende al menos 2 porciones o fragmentos inmunogénicos/antigénicos de polipéptido KMP11, SMT, A2 y/o CPB de *Leishmania* o variante del mismo descritos en la presente memoria y (b) un reactivo de detección.

[0152] En otra realización, se proporcionan kits de diagnóstico para detectar infección por *Leishmania* en una
 35 muestra biológica que comprenden (a) al menos 2 anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que son específicos de un polipéptido de fusión que comprende al menos 2 porciones o fragmentos inmunogénicos/antigénicos de polipéptido KMP11, SMT, A2 y/o CPB de *Leishmania* o variante de los mismos descritos en la presente memoria y (b) un reactivo de detección.

[0153] En otra realización, se proporcionan procedimientos para detectar la presencia de infección por
 40 *Leishmania* en una muestra biológica que comprenden (a) poner en contacto una muestra biológica con un polipéptido de fusión que comprende al menos 2 porciones o fragmentos inmunogénicos/antigénicos de polipéptido KMP11, SMT, A2 y/o CPB de *Leishmania* o variante de los mismos descritos en la presente memoria y (b) detectar en la muestra biológica la presencia de anticuerpos que se unen al polipéptido de fusión.
 45

[0154] En otra realización, se proporcionan procedimientos para detectar la presencia de infección por
 50 *Leishmania* en una muestra biológica que comprenden (a) poner en contacto una muestra biológica con al menos 2 anticuerpos monoclonales que se unen a un polipéptido de fusión que comprende al menos 2 porciones o fragmentos inmunogénicos/antigénicos de polipéptido KMP11, SMT, A2 y/o CPB de *Leishmania* o variante de los mismos descritos en la presente memoria y (b) detectar en la muestra biológica la presencia de proteínas de *Leishmania* que se unen al anticuerpo monoclonal.

[0155] Un especialista en la materia reconocería que los procedimientos y kits descritos en la presente
 55 memoria pueden usarse para detectar todos los tipos de leishmaniosis, dependiendo de la combinación particular de porciones inmunogénicas de antígenos de *Leishmania* presente en el polipéptido de fusión.

[0156] Existen una variedad de formatos de ensayo conocidos por los especialistas en la materia para usar un
 60 polipéptido de fusión para detectar anticuerpos en una muestra. Véase, por ejemplo, Harlow y Lane, "Antibodies. A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988. En una realización preferida, el ensay implica el uso de un polipéptido de fusión inmovilizado sobre un soporte sólido para unirse a y retirar el anticuerpo de la muestra. El anticuerpo unido puede detectarse entonces usando un reactivo de detección que se une al complejo de anticuerpo/péptido y contiene un grupo indicador detectable. Los reactivos de detección adecuados incluyen, por ejemplo, anticuerpos que se unen al complejo de anticuerpo/polipéptido y polipéptido libre marcado con un grupo
 65 indicador (por ejemplo, en ensayo semicompetitivo). Los grupos indicadores adecuados incluyen, por ejemplo, marcadores fluorescentes, marcadores enzimáticos, radioisótopos, marcadores quimioluminiscentes, marcadores electroquimioluminiscentes, marcadores bioluminiscentes, polímeros, partículas poliméricas, partículas metálicas,

haptenos y tintes. Como alternativa, puede utilizarse un ensayo competitivo en que un anticuerpo se une a un polipéptido de fusión de la presente invención marcado con un grupo indicador y se deja unir al polipéptido de fusión inmovilizado después de la incubación del polipéptido de fusión con la muestra. La extensión en que los componentes de la muestra inhiben la unión del anticuerpo marcado al polipéptido de fusión es indicativa de la reactividad de la muestra con el polipéptido de fusión inmovilizado.

[0157] El soporte sólido puede ser cualquier material conocido por los especialistas en la materia con el que pueda enlazarse el polipéptido de fusión. Por ejemplo, el soporte puede ser un pocillo de ensayo en una placa de microvaloración o membrana de nitrocelulosa u otra adecuada. Como alternativa, el soporte puede ser una perla o disco, tal como vidrio, fibra de vidrio, látex o un material plástico tal como poliestireno o poli(cloruro de vinilo). El soporte puede ser también una partícula magnética o un sensor de fibra óptica, tal como aquellos dados a conocer, por ejemplo, en la patente de EE. UU. n.º 5.359.681.

[0158] El polipéptido de fusión puede unirse al soporte sólido usando una variedad de técnicas conocidas por los especialistas en la materia, que se describen ampliamente en la bibliografía de patentes y científica. En el contexto de la presente invención, el término "unido" hace referencia tanto a asociación no covalente, tal como adsorción, como a una enlace covalente (que puede ser un ligamiento directo entre el antígeno y los grupos funcionales sobre el soporte o puede ser un ligamiento mediante un agente de reticulación). Se prefiere la unión por adsorción a un pocillo en una placa de microvaloración o una membrana. En dichos casos, la adsorción puede conseguirse poniendo en contacto el polipéptido, en un tampón adecuado, con el soporte sólido durante una cantidad de tiempo adecuada. El tiempo de contacto varía con la temperatura, pero es típicamente entre aproximadamente 1 hora y 1 día. En general, poner en contacto un pocillo de una placa de microvaloración de plástico (tal como poliestireno o poli(cloruro de vinilo)) con una cantidad de polipéptido de fusión que oscila de aproximadamente 10 ng a aproximadamente 1 µg, y preferiblemente aproximadamente 100 ng, es suficiente para unir una cantidad adecuada de antígeno. La nitrocelulosa unirá aproximadamente 100 µg de proteína por cm³.

[0159] El enlace covalente del polipéptido de fusión con un soporte sólido puede conseguirse generalmente haciendo reaccionar en primer lugar el soporte con un reactivo bifuncional que reaccionará tanto con el soporte como con el grupo funcional, tal como un grupo hidroxilo o amino, sobre el polipéptido de fusión. Por ejemplo, el polipéptido de fusión puede unirse a un soporte que tiene un recubrimiento polimérico apropiado usando benzoquinona o mediante condensación de un grupo aldehído sobre el soporte con una amina y un hidrógeno activo en el polipéptido (véase, por ejemplo, "Pierce Immunotechnology Catalog and Handbook" (1991) en A12-A13).

[0160] En ciertas realizaciones, el ensayo es un ensayo de inmunosorción ligado a enzima (ELISA). Este ensayo puede efectuarse poniendo en contacto en primer lugar un polipéptido de fusión de la presente invención que se ha inmovilizado sobre un soporte sólido, comúnmente el pocillo de una placa de microvaloración, con la muestra, de tal modo que los anticuerpos contra los antígenos de *Leishmania* del polipéptido de fusión en la muestra se dejan unir al polipéptido de fusión inmovilizado. Se retira entonces la muestra no unida del polipéptido de fusión inmovilizado y se añade un reactivo de detección capaz de unirse al complejo anticuerpo-polipéptido inmovilizado. Se determina entonces la cantidad de reactivo de detección que permanece unida al soporte sólido usando un procedimiento apropiado para el reactivo de detección específico.

[0161] Una vez se inmoviliza el polipéptido de fusión sobre el soporte, típicamente se bloquean el resto de sitios de unión de proteína sobre el soporte. Puede emplearse cualquier agente de bloqueo adecuado conocido por los especialistas en la materia, tal como seroalbúmina bovina (BSA) o Tween 20™ (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.). El polipéptido inmovilizado se incuba entonces con la muestra y se deja unir el anticuerpo (si está presente en la muestra) al antígeno. La muestra puede diluirse con un diluyente adecuado, tal como disolución salina tamponada con fosfato (PBS), antes de la incubación. En general, es un tiempo de contacto apropiado (concretamente tiempo de incubación) aquel periodo de tiempo que es suficiente para permitir la detección de la presencia de anticuerpo en una muestra infectada por *Leishmania*. Preferiblemente, el tiempo de contacto es suficiente para conseguir un nivel de unión que es al menos un 95 % del conseguido en el equilibrio entre anticuerpo unido y no unido. Los especialistas en la materia reconocerán que el tiempo necesario para alcanzar el equilibrio puede determinarse fácilmente ensayando el nivel de unión que aparece durante un periodo de tiempo. A temperatura ambiente, es generalmente suficiente un tiempo de incubación de aproximadamente 30 minutos.

[0162] La muestra no unida puede retirarse entonces por lavado del soporte sólido con un tampón apropiado, tal como PBS que contiene un 0,1 % de Tween 20™. Puede añadirse entonces reactivo de detección al soporte sólido. Es un reactivo de detección apropiado cualquier compuesto que se una al complejo de anticuerpo-polipéptido inmovilizado y que pueda detectarse mediante cualquiera de una variedad de medios conocidos por los especialistas en la materia. Preferiblemente, el reactivo de detección contiene un agente de unión (tal como, por ejemplo, proteína A, proteína G, inmunoglobulina, lectina o antígeno libre) conjugado con un grupo indicador. Los grupos indicadores preferidos incluyen enzimas (tales como peroxidasa de rábano picante), sustratos, cofactores, inhibidores, tintes, radionucleidos, grupos luminiscentes, grupos fluorescentes, oro coloidal y biotina. La conjugación del agente de unión con el grupo indicador puede conseguirse usando procedimientos estándares conocidos por los especialistas en la materia. Los agentes de unión comunes pueden adquirirse también conjugados con una variedad de grupos indicadores de muchas fuentes (por ejemplo, Zymed Laboratories, San Francisco, Calif. y Pierce, Rockford, Ill.).

[0163] Se incuba entonces el reactivo de detección con el complejo de anticuerpo-polipéptido inmovilizado durante una cantidad de tiempo suficiente para detectar el anticuerpo unido. Puede determinarse generalmente la cantidad de tiempo apropiada a partir de las instrucciones del fabricante o ensayando el nivel de unión que aparece durante un periodo de tiempo. Se retira entonces el reactivo de detección no unido y se detecta el reactivo de detección unido usando el grupo indicador. El procedimiento empleado para detectar el grupo indicador depende de la naturaleza del grupo indicador. Para grupos radiactivos, son generalmente apropiados el recuento por centelleo o procedimientos autorradiográficos. Pueden usarse procedimientos espectroscópicos para detectar tintes, grupos luminiscentes y grupos fluorescentes. La biotina puede detectarse usando avidina acoplada a un grupo indicador diferente (comúnmente un grupo radiactivo o fluorescente o una enzima). Los grupos indicadores enzimáticos pueden detectarse generalmente mediante la adición de sustrato (generalmente durante un periodo de tiempo específico), seguido de análisis espectroscópico u otro de los productos de reacción.

[0164] Para determinar la presencia o ausencia de anticuerpos anti-*Leishmania* en la muestra, se compara generalmente la señal detectada del grupo indicador que permanece unido al soporte sólido con una señal que corresponde a un valor de corte predeterminado. En una realización, el valor de corte es preferiblemente la señal media promedio obtenida cuando se incuba el polipéptido inmovilizado con muestras de un paciente no infectado. En general, una muestra que genere una señal que está tres desviaciones estándar por encima del valor de corte predeterminado se considera positiva (concretamente, reactiva con el polipéptido). En una realización alternativa, se determina el valor de corte usando una curva operativa de receptor, según el procedimiento de Sackett y col., "Clinical Epidemiology: A Basic Science for Clinical Medicine", pág. 106-7 (Little Brown and Co., 1985). Brevemente, en esta realización, puede determinarse el valor de corte a partir de una gráfica de pares de índices de verdaderos positivos (concretamente sensibilidad) e índices de falsos positivos (100 % de especificidad) que corresponden a cada valor de corte posible para el resultado del ensayo de diagnóstico. El valor de corte en la gráfica que está más cercano a la esquina superior izquierda (concretamente, el valor que encierra el mayor área) es el valor de corte más exacto, y una muestra que genere una señal que es mayor que el valor de corte determinado mediante este procedimiento puede considerarse positiva. Como alternativa, el valor de corte puede desplazarse a la izquierda a lo largo de la gráfica para minimizar el índice de falsos positivos, o a la derecha para minimizar el índice de falsos negativos.

[0165] En una realización relacionada, el ensayo se efectúa en un formato de prueba de flujo continuo o de tira, en el que el antígeno se inmoviliza sobre una membrana tal como nitrocelulosa. En la prueba de flujo continuo, los anticuerpos en la muestra se unen al polipéptido inmovilizado a medida que la muestra pasa a través de la membrana. Se une entonces un reactivo de detección (por ejemplo, proteína A-oro coloidal) al complejo de anticuerpo-polipéptido a medida que la disolución que contiene el reactivo de detección fluye a través de la membrana. La detección del reactivo de detección unido puede efectuarse entonces como se describe anteriormente. En el formato de prueba de tira, se sumerge un extremo de la membrana a la que está unida el polipéptido en una disolución que contiene la muestra. La muestra migra a lo largo de la membrana a través de una región que contiene reactivo de detección y a la zona de polipéptido de fusión inmovilizado. La concentración del reactivo de detección en el polipéptido de fusión indica la presencia de anticuerpos de *Leishmania* en la muestra. Típicamente, la concentración de reactivo de detección en ese sitio genera un patrón, tal como una línea, que puede leerse visualmente. La ausencia de dicho patrón indica un resultado negativo. En general, se selecciona la cantidad de polipéptido de fusión inmovilizado sobre la membrana para generar un patrón visualmente discernible cuando la muestra biológica contiene un nivel de anticuerpos que sería suficiente para generar una señal positiva en un ELISA, como se discute anteriormente. Preferiblemente, la cantidad de polipéptido de fusión inmovilizado sobre la membrana oscila de aproximadamente 25 ng a aproximadamente 1 µg, y más preferiblemente de aproximadamente 50 ng a aproximadamente 500 ng. Dichas pruebas pueden efectuarse típicamente con una cantidad muy pequeña (por ejemplo, una gota) de suero o sangre del paciente.

[0166] Por supuesto, existen numerosos otros protocolos de ensayo que son adecuados para uso con los polipéptidos de fusión de la presente invención. Las descripciones anteriores pretenden ser solo ejemplares.

[0167] En un aspecto de la descripción, los ensayos discutidos anteriormente pueden usarse para detectar específicamente leishmaniosis visceral. En este aspecto, los anticuerpos en la muestra pueden detectarse usando un polipéptido de fusión de la presente descripción, por ejemplo, que comprende una secuencia aminoacídica de dos o más fragmentos o epítomos antigénicos/inmunogénicos del antígeno KMP11, SMT, A2 y/o CPB de *Leishmania*. En una realización más particular, los anticuerpos en la muestra pueden detectarse usando un polipéptido de fusión que comprende la secuencia aminoacídica de dos o más fragmentos inmunogénicos o epítomos como se exhiben en cualquiera de las SEQ ID NO: 1-10 y 25-28. En otro aspecto, los anticuerpos en la muestra pueden detectarse usando un polipéptido de fusión que comprende la secuencia aminoacídica exhibida en las SEQ ID NO: 21 y 23. Preferiblemente, los antígenos de *Leishmania* se inmovilizan por adsorción en un soporte sólido tal como un pocillo de una placa de microvaloración o una membrana como se describe anteriormente, en cantidades aproximadamente similares de tal modo que la cantidad total de polipéptido de fusión en contacto con el soporte oscile de aproximadamente 10 ng a aproximadamente 100 µg. El resto de las etapas del ensayo pueden efectuarse generalmente como se describe anteriormente. Resultará fácilmente evidente para los especialistas en la materia, combinando polipéptidos descritos en la presente memoria con otros polipéptidos que pueden detectar leishmaniosis

cutánea y mucosa, que los polipéptidos dados a conocer en la presente memoria pueden usarse en procedimientos que detectan todos los tipos de leishmaniosis.

[0168] En otro aspecto de esta descripción, los polipéptidos de fusión inmovilizados pueden usarse para purificar anticuerpos que se unen a los mismos. Dichos anticuerpos pueden prepararse mediante cualquiera de una variedad de técnicas conocidas por los especialistas en la materia. Véase, por ejemplo, Harlow y Land, "Antibodies. A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988. En una de dichas técnicas, se inyecta inicialmente un inmunógeno que comprende un polipéptido de fusión de la presente invención en cualquiera de una amplia variedad de mamíferos (por ejemplo, ratones, ratas, conejos, ovejas y cabras). En esta etapa, el polipéptido puede servir como inmunógeno sin modificación. Como alternativa, particularmente para polipéptidos relativamente cortos, puede desencadenarse una respuesta inmunitaria superior si el polipéptido se une a una proteína portadora, tal como seroalbúmina bovina o hemocianina de lapa bocallave. El inmunógeno se inyecta en el hospedador animal preferiblemente según un programa predeterminado que incorpora una o más inmunizaciones de recuerdo, y se extrae sangre periódicamente a los animales. Los anticuerpos policlonales específicos de los polipéptidos pueden purificarse entonces a partir de dichos antisueros, por ejemplo, mediante cromatografía de afinidad usando el polipéptido acoplado con un soporte sólido adecuado.

[0169] Los anticuerpos monoclonales específicos del polipéptido de fusión antigénico de interés pueden prepararse, por ejemplo, usando la técnica de Kohler y Milstein, *Eur. J. Immunol.* 6: 511-519, 1976, y mejoras de la misma. Brevemente, estos procedimientos implican la preparación de líneas celulares inmortales capaces de producir anticuerpos que tienen la especificidad deseada (concretamente, reactividad con el polipéptido de interés). Dichas líneas celulares pueden producirse, por ejemplo, a partir de células de bazo obtenidas a partir de un animal inmunizado como se describe anteriormente. Las células de bazo se immortalizan entonces, por ejemplo, mediante fusión con un copartícipe de fusión de célula de mieloma, preferiblemente uno que sea singénico con el animal inmunizado. Pueden emplearse una variedad de técnicas de fusión. Por ejemplo, las células de bazo y células de mieloma pueden combinarse con un detergente no iónico durante unos pocos minutos y sembrarse entonces a baja densidad sobre un medio selectivo que soporta el crecimiento de células híbridas, pero no de células de mieloma. Una técnica de selección preferida usa la selección con HAT (hipoxantina, aminopterina, timidina). Después de un tiempo suficiente, habitualmente de aproximadamente 1 a 2 semanas, se observan colonias de híbridos. Se seleccionan colonias individuales y se ensaya la actividad de unión frente al polipéptido. Se prefieren los hibridomas que tienen alta reactividad y especificidad.

[0170] Pueden aislarse anticuerpos monoclonales a partir de los sobrenadantes de colonias de hibridoma en crecimiento. En este proceso, pueden emplearse diversas técnicas para potenciar el rendimiento, tales como inyección de la línea celular de hibridoma en la cavidad peritoneal de un hospedador vertebrado adecuado, tal como un ratón. Los anticuerpos monoclonales pueden recogerse entonces del fluido ascítico o la sangre. Pueden retirarse los contaminantes de los anticuerpos mediante técnicas convencionales, tales como cromatografía, filtración en gel, precipitación y extracción. Pueden usarse uno o más polipéptidos en el proceso de purificación, por ejemplo, en una etapa de cromatografía de afinidad.

[0171] Pueden usarse anticuerpos monoespecíficos que se unen a un polipéptido de fusión que comprende dos o más porciones inmunogénicas de antígenos K26, K39 y/o K9 de *Leishmania*, por ejemplo, para detectar infección por *Leishmania* en una muestra biológica usando uno de una variedad de inmunoensayos, que puede ser directo o competitivo. Brevemente, en un formato de ensayo directo, puede inmovilizarse un anticuerpo monoespecífico sobre un soporte sólido (como se describe anteriormente) y ponerse en contacto con la muestra para ensayar. Después de retirar la muestra no unida, puede añadirse un segundo anticuerpo monoespecífico, que se ha marcado con un grupo indicador, y usarse para detectar el antígeno unido. En un ensayo competitivo ejemplar, la muestra puede combinarse con el anticuerpo monoclonal o policlonal, que se ha marcado con un grupo indicador adecuado. Puede combinarse entonces la mezcla de muestra y anticuerpo con antígeno polipeptídico inmovilizado sobre un soporte sólido adecuado. Se deja unirse el anticuerpo que no se ha unido a antígeno en la muestra con antígeno inmovilizado y se retira el resto de la muestra y anticuerpo. El nivel de anticuerpo unido al soporte sólido está inversamente relacionado con el nivel de antígeno en la muestra. Por tanto, un menor nivel de anticuerpo unido al soporte sólido indica la presencia de *Leishmania* en la muestra. Resultarán evidentes otros formatos para usar anticuerpos monoespecíficos para detectar *Leishmania* en una muestra para los especialistas en la materia, y los formatos anteriores se proporcionan únicamente con fines ejemplares.

[0172] Las diversas realizaciones descritas anteriormente pueden combinarse, proporcionando realizaciones adicionales.

[0173] Pueden modificarse aspectos de las realizaciones, si es necesario emplear conceptos de diversas patentes, solicitudes y publicaciones para proporcionar aún más realizaciones.

EJEMPLOS

65 EJEMPLO 1

LOS RATONES INMUNIZADOS CON KSA O KSAC ESTÁN PROTEGIDOS FRENTE A INFECCIÓN POR *L. INFANTUM*

[0174] Se mantuvieron ratones C57BL/6 (Charles River Laboratories, Wilmington, MA) en condiciones exentas de patógeno específico. Los ratones eran de 8 a 12 semanas de edad al comienzo de los experimentos. Se cultivaron promastigotes de *L. infantum* (MHOM/BR/82/BA-2) a 25 °C en MEM (Invitrogen, Carlsbad, CA) suplementado con 0,5X disolución de aminoácidos esenciales MEM (Invitrogen), aminoácidos no esenciales MEM 0,1 mM (Invitrogen), piruvato de sodio 1 mM, HEPES 25 mM, glucosa 8,3 mM, bicarbonato de sodio 26 mM, ácido para-aminobenzoico 1 µg/ml, gentamicina 50 µg/ml, suero fetal bovino termoinactivado al 10 % y hemina 6 µg/ml. Se usaron promastigotes en fase logarítmica tardía o estacionaria para infecciones o preparaciones de Ag.

[0175] Se inmunizaron grupos de 5 ratones. Se inmunizó el primer grupo con disolución salina como control negativo. Se inmunizó el segundo grupo con 10 µg de SMT (por ejemplo, SEQ ID NO:4) más 20 µg de MPL®-SE (GlaxoSmithKline Biologicals, Rixensant, Bélgica) en un volumen de 0,1 ml. Se inmunizó el tercer grupo con 10 µg del polipéptido de fusión KSA (por ejemplo, SEQ ID NO:21) que contiene KMP11, SMT y A2 más 20 µg de MPL-SE® en un volumen de 0,1 ml. Se inmunizó el cuarto grupo con 10 µg del polipéptido de fusión KSAC (por ejemplo, SEQ ID NO:23) que contiene KMP11, SMT, A2 y CBP más 20 µg de MPL-SE® en un volumen de 0,1 ml.

[0176] Se procuraron tres inyecciones subcutáneas (s.c.) en la base de la cola a intervalos de 3 semanas. Se infectaron los ratones 3 semanas después de la terminación del protocolo de inmunización. Como exposición, se suspendieron 5×10^6 promastigotes de *L. infantum* en 100 µl de disolución salina tamponada con fosfato y se inyectaron por vía intravenosa en la vena de cola del ratón.

[0177] A las 4 semanas después de la exposición, se sacrificaron los ratones para recoger los hígados para determinar el número de parásitos en estos tejidos mediante ensayo de dilución limitante. Se homogeneizaron los tejidos con trituradores de vidrio y se diluyeron en serie dos veces las suspensiones con HOMEM completo en microplacas de 96 pocillos con agar con sangre NNN. Se examinó en cada pocillo la presencia de parásitos 10 días después de sembrar, y se calcularon los números de parásitos en los tejidos originales basándose en el factor de dilución del último pocillo positivo (Figura 1).

[0178] Los resultados de este experimento demostraron que los ratones inmunizados con polipéptidos de fusión KSA o KSAC estaban significativamente protegidos frente a infección por *L. infantum*.

EJEMPLO 2

LOS RATONES INMUNIZADOS CON KSA O KSAC ESTÁN PROTEGIDOS FRENTE A INFECCIÓN POR *L. DONOVANI*

[0179] Se mantuvieron ratones BALB/c (Charles River Laboratories) en condiciones exentas de patógeno específico. Los ratones eran de 8 a 12 semanas de edad al comienzo de los experimentos. Se cultivaron promastigotes de *L. donovani* a 25 °C en medio 199 suplementado con suero fetal bovino termoinactivado al 20 %, 100 U de penicilina por ml, 100 µg de estreptomocina por ml, L-glutamina 2 mM, adenina 0,1 mM, HEPES 40 mM, 0,25 mg de hemina por ml y 0,31 mg de 6-biotina por ml. Se usaron promastigotes en fase logarítmica tardía o estacionaria para infecciones o preparaciones de Ag.

[0180] Se inmunizaron grupos de 5 ratones. Se inmunizó el primer grupo con disolución salina como control negativo. Se inmunizó el segundo grupo con 10 µg del polipéptido de fusión KSA (por ejemplo, SEQ ID NO: 21) que contiene KMP11, SMT y A2 más 20 µg de MPL-SE® en un volumen de 0,1 ml. Se inmunizó el tercer grupo con 10 µg del polipéptido de fusión KSAC (por ejemplo, SEQ ID NO: 23) que contiene KMP11, SMT, A2 y CBP más 20 µg de MPL-SE® en un volumen de 0,1 ml.

[0181] Se procuraron tres inyecciones subcutáneas (s.c.) en la base de la cola a intervalos de 3 semanas. Se infectaron los ratones 3 semanas después de la terminación del protocolo de inmunización. Como exposición, se suspendieron 1×10^7 promastigotes de *L. donovani* en 100 ml de disolución salina tamponada con fosfato y se inyectaron por vía intravenosa a la vena de cola del ratón.

[0182] A las 4 semanas después de la exposición, se sacrificaron los ratones para recoger los hígados para determinar el número de parásitos en estos tejidos mediante ensayo de dilución limitante. Se homogeneizaron los tejidos con trituradores de vidrio y se diluyeron en serie las suspensiones dos veces con medio 199 completo en microplacas de 96 pocillos con agar con sangre NNN. Se examinó en cada pocillo la presencia de parásitos 10 días después de sembrar, y se calcularon los números de parásitos en los tejidos originales basándose en el factor de dilución del último pocillo positivo (Figura 2).

[0183] Los resultados de este experimento demostraron que los ratones inmunizados con polipéptidos de fusión KSA o KSAC estaban significativamente protegidos frente a infección con *L. donovani*.

EJEMPLO 3LOS RATONES INMUNIZADOS CON KSAC ESTÁN PROTEGIDOS FRENTE A INFECCIÓN POR *L. MAJOR*

5 **[0184]** Se mantuvieron ratones BALB/c (Charles River Laboratories) en condiciones exentas de patógeno específico. Los ratones eran de 8 a 12 semanas de edad al comienzo de los experimentos. Se cultivaron promastigotes de *L. major* (MHOM/IL/80/Friedlin) a 25 °C en medio 199 suplementado con suero bovino fetal termoinactivado al 20 %, 100 U de penicilina por ml, 100 µg de estreptomicina por ml, L-glutamina 2 mM, adenina 0,1 mM, HEPES 40 mM, 0,25 mg de hemina por ml y 0,31 mg de 6-biotina por ml. Se usaron promastigotes en fase
10 logarítmica tardía o estacionaria para infecciones o preparaciones de Ag.

[0185] Se inmunizaron grupos de 5 ratones. Se inmunizó el primer grupo con disolución salina como control negativo. Se inmunizó el segundo grupo con 10 µg del polipéptido de fusión KSAC (por ejemplo, SEQ ID NO: 23) que contiene KMP11, SMT, A2 y CBP más 20 µg de MPL-SE® en un volumen de 0,1 ml.

15 **[0186]** Como exposición, se suspendieron 2.000 promastigotes de *L. major* en 10 µl de disolución salina tamponada con fosfato y se inyectaron por vía intradérmica a ambas orejas izquierda y derecha. Se infectaron los ratones 3 semanas después de la terminación del protocolo de inmunización.

20 **[0187]** Se monitorizó la progresión de la infección cada semana durante 8 semanas midiendo el diámetro de la induración de la lesión de oreja con un calibre métrico (Figura 3A).

[0188] A las 8 semanas después de la exposición, se recogió tejido de oreja para determinar el número de parásitos mediante ensayo de dilución limitante. Se homogeneizó el tejido con trituradores y se diluyeron en serie las
25 suspensiones dos veces con medio 199 completo en microplacas de 96 pocillos con agar con sangre NNN. Se examinó en cada pocillo la presencia de parásitos 10 días después de sembrar, y se calcularon los números de parásitos en los tejidos originales basándose en el factor de dilución del último pocillo positivo (Figura 3B).

[0189] Los resultados de este experimento demostraron que los ratones inmunizados con polipéptidos de
30 fusión KSAC estaban significativamente protegidos frente a infección con *L. major*.

EJEMPLO 4

INMUNIZACIÓN CON KSAC DE CANINOS

35 **[0190]** Se vacunan perros con leishmaniosis visceral por vía subcutánea con KSAC (SEQ ID NO: 21) + coadyuvante semanalmente durante 6 semanas. Se administra KSAC a una dosis de 25 µg y se administra el coadyuvante MPL-SE (un agonista de TLR-4) a una dosis de 25 µg. En algunos estudios, se administra el agonista de TLR-9 CgG 2395 (500 µg) en lugar, o además, de MPL-SE. Después de una pausa de dos meses, se administran
40 por vía subcutánea 3 vacunas adicionales a intervalos semanales. Los perros inscritos en el estudio tienen puntuaciones clínicas de 4 a 7 de 16 posibles, siendo un número alto indicativo de una enfermedad más grave. Se monitoriza la carga parasitaria en médula ósea, bazo, nódulos linfáticos y piel. Se monitorizan las respuestas inmunitarias a la vacuna en sangre.

45 LISTADO DE SECUENCIAS

[0191]

<110> Infectious Disease Research Institute Goto, Yasuyuki Reed, Steven G.

50 <120> VACUNAS DE POLIPROTEÍNA RECOMBINANTE PARA EL TRATAMIENTO Y DIAGNÓSTICO DE LEISHMANIOSIS

<130> 480239.407PC

55

<140> PCT

<141> 15-05-2009

<160> 38

60

<170> FastSEQ for Windows versión 4.0

<210> 1

<211> 92

65 <212> PRT

<213> *Leishmania infantum*

ES 2 528 928 T3

<400> 1

```

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

5

<210> 2
 <211> 92
 <212> PRT
 <213> *Leishmania donovani*

10

<400> 2

```

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

15

<210> 3
 <211> 92
 <212> PRT
 <213> *Leishmania major*

20 <400> 3

```

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

<210> 4

25 <211> 353

<212> PRT
 <213> *Leishmania infantum*

<400> 4

30

ES 2 528 928 T3

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

Arg Ser Thr Pro Ile Gly Arg Ile Leu Thr Asn Val Met Cys Arg Val
 290 295 300
 Leu Glu Phe Val Arg Leu Ala Pro Lys Gly Thr Tyr Lys Ala Thr Glu
 305 310 315 320
 Ile Leu Glu Glu Ala Ala Glu Ser Leu Val Val Gly Gly Gln Leu Gly
 325 330 335
 Ile Phe Thr Pro Ser Phe Tyr Ile Arg Ala Arg Lys Pro Ser Lys Gln
 340 345 350
 Ala

<210> 5

<211> 353

5 <212> PRT

<213> *Leishmania donovani*

<400> 5

ES 2 528 928 T3

Met Ser Ala Gly Gly Arg Glu Thr Ala Pro Thr Asn Leu Ile Arg Arg
 1 5 10 15
 Arg Asn Lys Asp Glu Thr Asn Gly Asp Val Ser Ala Ala Ala Asp Arg
 20 25 30
 Phe Arg Asp Arg Phe Glu Lys Ala Thr Leu Glu Glu Arg Lys Ala Ala
 35 40 45
 Thr Thr Thr Met Val Asn Glu Tyr Tyr Asp Leu Val Thr Asp Phe Tyr
 50 55 60
 Glu Tyr Gly Trp Gly Gln Asn Phe His Phe Ala Pro Arg Tyr Ala Gly
 65 70 75 80
 Glu Thr Phe Phe Glu Ser Leu Ala Arg His Glu Tyr Phe Leu Ala Ala
 85 90 95
 Arg Gly Gly Phe Met Glu Gly Asp His Ile Val Asp Val Gly Cys Gly
 100 105 110
 Val Gly Gly Pro Ala Arg Asn Met Val Arg Leu Thr Arg Cys Asn Val
 115 120 125
 Ile Gly Val Asn Asn Asn Asp Tyr Gln Ile Ser Arg Ala Arg Arg His
 130 135 140
 Asp Ala Leu Ala Gly Met Ser Ser Lys Ile Asp Tyr Val Lys Thr Asp
 145 150 155 160
 Phe Cys Asn Met Ser Leu Ala Asp Asn Thr Phe Asp Gly Ala Tyr Ala
 165 170 175
 Ile Glu Ala Thr Cys His Ala Lys Asp Lys Val Lys Cys Tyr Ser Glu
 180 185 190
 Val Phe Arg Val Ile Lys Pro Gly Thr Cys Phe Val Leu Tyr Glu Trp
 195 200 205
 Cys Met Thr Asp Lys Tyr Asn Pro Asn Asp Glu Tyr His Arg Thr Ile
 210 215 220
 Lys His Arg Ile Glu Leu Gly Asp Gly Leu Pro Glu Met Glu Thr Cys
 225 230 235 240
 Lys Gln Val Ile Glu Tyr Met Lys Gln Ala Gly Phe Val Val Glu Glu
 245 250 255
 Ala Ile Asp Val Ile Ser Gln Phe Glu Ser Ser Pro Ile Lys Ser Ile
 260 265 270
 Pro Trp Tyr Gln Pro Leu Val Gly Asp Tyr Ser Ser Leu Gln Gly Leu
 275 280 285
 Arg Ser Thr Pro Ile Gly Arg Ile Leu Thr Asn Val Met Cys Arg Val
 290 295 300
 Leu Glu Phe Val Arg Leu Ala Pro Lys Gly Thr Tyr Lys Ala Thr Glu
 305 310 315 320
 Val Leu Glu Glu Ala Ala Glu Ser Leu Val Val Gly Gly Gln Leu Gly
 325 330 335
 Ile Phe Thr Pro Ser Phe Tyr Ile Arg Ala Arg Lys Pro Ser Lys Gln

Ala 340 345 350

<210> 6
 <211> 353
 5 <212> PRT
 <213> *Leishmania major*

<400> 6

ES 2 528 928 T3

Met Ser Ala Gly Gly Arg Glu Thr Ala Pro Met Asn Leu Leu Arg Arg
 1 5 10 15
 Arg Asn Lys Asp Glu Ile Asn Gly Asp Val Asn Ala Ala Ala Asp Arg
 20 25 30
 Phe Arg Asn Arg Phe Glu Lys Ala Thr Leu Glu Glu Arg Lys Ala Ala
 35 40 45
 Thr Thr Thr Met Val Asn Glu Tyr Tyr Asp Leu Val Thr Asp Phe Tyr
 50 55 60
 Glu Tyr Gly Trp Gly Gln Asn Phe His Phe Ala Pro Arg Tyr Ala Gly
 65 70 75 80
 Glu Thr Phe Phe Glu Ser Leu Ala Arg His Glu Tyr Phe Leu Ala Ala
 85 90 95
 Arg Gly Gly Phe Met Glu Gly Asp His Ile Val Asp Val Gly Cys Gly
 100 105 110
 Val Gly Gly Pro Ala Arg Asn Ile Val Arg Leu Thr Arg Cys Asn Val
 115 120 125
 Thr Gly Val Asn Asn Asn Asp Tyr Gln Ile Ser Arg Ala Arg Arg His
 130 135 140
 Asp Ala Leu Ala Gly Met Ser Cys Lys Ile Asp Tyr Val Lys Thr Asp
 145 150 155 160
 Phe Cys Asn Met Ser Leu Ala Asp Asn Thr Phe Asp Gly Ala Tyr Ala
 165 170 175
 Ile Glu Ala Thr Cys His Ala Lys Asp Lys Val Lys Cys Tyr Ser Glu
 180 185 190
 Val Phe Arg Val Ile Lys Pro Gly Thr Cys Phe Val Leu Tyr Glu Trp
 195 200 205
 Cys Met Thr Asp Lys Tyr Asn Pro Asn Asp Glu Tyr His Arg Thr Ile
 210 215 220
 Lys His Arg Ile Glu Leu Gly Asp Gly Leu Pro Glu Met Glu Thr Cys
 225 230 235 240
 Lys Gln Val Ile Glu Tyr Met Lys Glu Ala Gly Phe Val Val Glu Glu
 245 250 255
 Ala Ile Asp Val Ile Ser Gln Phe Glu Ser Ser Pro Ile Lys Ser Ile
 260 265 270
 Pro Trp Tyr Gln Pro Leu Val Gly Asp Tyr Ser Ser Leu Gln Gly Leu
 275 280 285
 Arg Ser Thr Pro Ile Gly Arg Ile Leu Thr Asn Ile Met Cys Arg Val
 290 295 300
 Leu Glu Phe Val His Leu Ala Pro Lys Gly Thr Tyr Lys Ala Thr Glu
 305 310 315 320
 Val Leu Glu Glu Ala Ala Glu Ser Leu Val Val Gly Gly Gln Leu Gly
 325 330 335
 Ile Phe Thr Pro Ser Phe Tyr Ile Arg Ala Arg Lys Pro Ser Lys Gln
 340 345 350
 Ala

<210> 7

<211> 236

5 <212> PRT

<213> *Leishmania infantum*

<400> 7

ES 2 528 928 T3

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

<210> 8

<211> 443

5 <212> PRT

<213> *Leishmania infantum*

<400> 8

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

10

ES 2 528 928 T3

Ala Val Asp Trp Arg Glu Lys Gly Ala Val Thr Pro Val Lys Asn Gln
 130 135 140
 Gly Ala Cys Gly Ser Cys Trp Ala Phe Ser Ala Val Gly Asn Ile Glu
 145 150 155 160
 Ser Gln Trp Ala Arg Val Gly His Gly Leu Val Ser Leu Ser Glu Gln
 165 170 175
 Gln Leu Val Ser Cys Asp Asp Lys Asp Asn Gly Cys Asn Gly Gly Leu
 180 185 190
 Met Leu Gln Ala Phe Glu Trp Leu Arg His Met Tyr Gly Ile Val
 195 200 205
 Phe Thr Glu Lys Ser Tyr Pro Tyr Thr Ser Gly Asn Gly Asp Val Ala
 210 215 220
 Glu Cys Leu Asn Ser Ser Lys Leu Val Pro Gly Ala Gln Ile Asp Gly
 225 230 235 240
 Tyr Val Met Ile Pro Ser Asn Glu Thr Val Met Ala Ala Trp Leu Ala
 245 250 255
 Glu Asn Gly Pro Ile Ala Ile Ala Val Asp Ala Ser Ser Phe Met Ser
 260 265 270
 Tyr Gln Ser Gly Val Leu Thr Ser Cys Ala Gly Asp Ala Leu Asn His
 275 280 285
 Gly Val Leu Leu Val Gly Tyr Asn Lys Thr Gly Gly Val Pro Tyr Trp
 290 295 300
 Val Ile Lys Asn Ser Trp Gly Glu Asp Trp Gly Glu Lys Gly Tyr Val
 305 310 315 320
 Arg Val Ala Met Gly Lys Asn Ala Cys Leu Leu Ser Glu Tyr Pro Val
 325 330 335
 Ser Ala His Val Pro Arg Ser Leu Thr Pro Gly Pro Gly Thr Glu Ser
 340 345 350
 Glu Glu Arg Ala Pro Lys Arg Val Thr Val Glu Gln Val Met Cys Thr
 355 360 365
 Asp Met Tyr Cys Arg Glu Gly Cys Lys Lys Ser Leu Leu Thr Ala Asn
 370 375 380
 Val Cys Tyr Lys Asn Gly Gly Gly Ser Ser Met Thr Lys Cys Gly
 385 390 395 400
 Pro Lys Lys Val Leu Met Cys Ser Tyr Ser Asn Pro His Cys Phe Gly
 405 410 415
 Pro Gly Leu Cys Leu Glu Thr Pro Asp Gly Lys Cys Ala Pro Tyr Phe
 420 425 430
 Leu Gly Ser Ile Met Asn Thr Cys Gln Tyr Thr
 435 440

<210> 10

<211> 443

5 <212> PRT

<213> *Leishmania major*

<400> 10

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

10

ES 2 528 928 T3

				100						105					110				
Gly	Gln	His	Tyr	Arg	Lys	Ala	Arg	Ala	Asp	Leu	Ser	Ala	Val	Pro	Asp				
		115						120					125						
Ala	Val	Asp	Trp	Arg	Glu	Lys	Gly	Ala	Val	Thr	Pro	Val	Lys	Asn	Gln				
		130						135					140						
Gly	Ala	Cys	Gly	Ser	Cys	Trp	Ala	Phe	Ser	Ala	Val	Gly	Asn	Ile	Glu				
		145						150					155		160				
Ser	Gln	Trp	Ala	Val	Ala	Gly	His	Lys	Leu	Val	Arg	Leu	Ser	Glu	Gln				
								165							175				
Gln	Leu	Val	Ser	Cys	Asp	His	Val	Asp	Asn	Gly	Cys	Gly	Gly	Gly	Leu				
								180							190				
Met	Leu	Gln	Ala	Phe	Glu	Trp	Val	Leu	Arg	Asn	Met	Asn	Gly	Thr	Val				
								195						205					
Phe	Thr	Glu	Lys	Ser	Tyr	Pro	Tyr	Val	Ser	Gly	Asn	Gly	Asp	Val	Pro				
								210						220					
Glu	Cys	Ser	Asn	Ser	Ser	Glu	Leu	Ala	Pro	Gly	Ala	Arg	Ile	Asp	Gly				
								225						235					
Tyr	Val	Ser	Met	Glu	Ser	Ser	Glu	Arg	Val	Met	Ala	Ala	Trp	Leu	Ala				
								245						255					
Lys	Asn	Gly	Pro	Ile	Ser	Ile	Ala	Val	Asp	Ala	Ser	Ser	Phe	Met	Ser				
								260						270					
Tyr	His	Ser	Gly	Val	Leu	Thr	Ser	Cys	Ile	Gly	Glu	Gln	Leu	Asn	His				
								275						285					
Gly	Val	Leu	Leu	Val	Gly	Tyr	Asn	Met	Thr	Gly	Glu	Val	Pro	Tyr	Trp				
								290						300					
Val	Ile	Lys	Asn	Ser	Trp	Gly	Glu	Asp	Trp	Gly	Glu	Lys	Gly	Tyr	Val				
								305						315					
Arg	Val	Thr	Met	Gly	Val	Asn	Ala	Cys	Leu	Leu	Thr	Gly	Tyr	Pro	Val				
								325						335					
Ser	Val	His	Val	Ser	Gln	Ser	Pro	Thr	Pro	Gly	Pro	Asn	Thr	Thr	Thr				
								340						350					
Thr	Thr	His	Ala	Pro	Lys	Arg	Val	Thr	Val	Lys	Gln	Ile	Thr	Cys	Thr				
								355						365					
Asp	Tyr	Phe	Cys	Arg	Lys	Gly	Cys	Lys	Thr	Thr	Val	Ile	Pro	Thr	Lys				
								370						380					
Glu	Cys	Leu	Pro	Asn	Gly	Ala	Gly	Gly	Ser	Phe	Gln	Met	Glu	Cys	Gly				
								385						395					
Asp	His	Gln	Val	Leu	Lys	Leu	Thr	Tyr	Thr	Ser	Met	Asn	Cys	Thr	Gly				
								405						415					
Glu	Ala	Lys	Tyr	Thr	Val	Thr	Arg	Glu	Gly	Lys	Cys	Gly	Ile	Ser	Trp				
								420						430					
Ser	Gly	Ser	Ser	Lys	Ser	Ile	Cys	Gln	Tyr	Val									
								435						440					

<210> 11
 <211> 279
 5 <212> ADN
 <213> *Leishmania infantum*

<400> 11

```

atggccacca cgtacgagga gttttcggcg aagctggacc gcctggatga ggagttcaac 60
aggaagatgc aggagcagaa cgccaagttc tttgcgagca agccggatga gtcgacgctg 120
tcgcccgaga tgaaggagca ctacgagaag ttcgagcgca tgatcaagga acacacagag 180
aagttcaaca agaagatgca cgagcactcg gagcacttca agcagaagtt cgccgagctg 240
ctcgcagcgc agaaggctgc gcagtaccgg tccaagtaa 279
  
```

10

<210> 12
 <211> 279
 <212> ADN
 15 <213> *Leishmania donovani*

<400> 12

ES 2 528 928 T3

```

atggccacca cgtacgagga gttttcggcg aagctggacc gcctggatca ggagttcaac 60
aggaagatgc aggagcagaa cgccaagttc tttgcggaca agccggatga gtcgacgctg 120
tcgcccgaga tgagagagca ctacgagaag ttcgagcgca tgatcaagga acacacagag 180
aagttcaaca agaagatgca cgagcactcg gagcacttca agcagaagtt cgccgagctg 240
ctcgagcagc agaaggctgc gcagtaccgg tccaagtaa 279

```

<210> 13

<211> 279

5 <212>ADN

<213> *Leishmania major*

<400> 13

```

atggccacca cgtacgagga gttctcggcg aagctggacc gcctggatga ggagttcaac 60
aggaagatgc aggaacagaa cgccaagttc tttgcggaca agccggatga gtcgacgctg 120
tcgcccgaga tgaaggagca ctacgagaag ttcgagcgca tgatcaagga gcacacagag 180
aagttcaaca agaagatgca cgagcactcg gagcacttca agcagaagtt cgccgagctg 240
ctcgagcagc agaaggctgc gcagtaccgg tccaagtaa 279

```

10

<210> 14

<211> 1062

<212>ADN

15 <213> *Leishmania infantum*

<400> 14

```

atgtccgccg gtggccgtga gaccgcgccg acgaacctga ttcgtcgccg caacaaggac 60
gagacaaacg gggatgtcag cgccgcgccg gaccgcttcc gcgaccgctt cgagaaggca 120
accctcgagg agcgcaaggc cgccaccacg acgatggtca acgagtacta cgacctggtg 180
acggacttct acgagtacgg ctggggccag aacttccatt tcgcgccgcg ctacgcccggc 240
gagaccttct tcgagtcctt cgcgcgccac gactacttcc tggcgcgtcg cggcggcttc 300
atggagggcg accacatcgt cgagctgggc tgcggcgctcg gcggtccggc gcgcaacatg 360
gttcgcctca cgcgctgcaa cgctcatcggc gtcaacaaca acgattacca gatcagccgc 420
gctcgccgtc atgacgcgct cgccgggatg agctccaaga tcgactacgt caagaccgac 480
ttctgcaaca tgagcttagc cgacaacacc ttcgacggcg cctacgccat cgaggccacc 540
tgccacgcaa aggacaaggc caagtgcgat agcgaggctt tccgtgtcat caagcccggc 600
acctgctttg tcctgtacga gtggtgcatg accgacaagt acaaccccaa tgacgagtac 660
caccgcacaa tcaagcaccg catcgagctg ggcgacggcc tgccggagat ggagacgtgc 720
aaacaggtga tcgagtacat gaagcaggcc ggcttcgtgg tggaggaggc catagacgtc 780
atcagtcagt tcgagtcag ccccatcaag agtatcccgt ggtaccagcc gctggtcggc 840
gactattcgt ccctgcaggg cctgcgctct accccgattg gccgcatcct cacgaacgtc 900
atgtgtcgcg tgctggagtt cgtgcgccca gctccgaagg gcacgtacaa ggcgacggag 960
atthtggagg aggtgcgga aagcctggtg gtggggcggtc agctcggcat cttcacgccg 1020
tccttctaca tccgcgctcg caagccgctc aagcaggctt ag 1062

```

20

<210> 15

<211> 1062

<212>ADN

<213> *Leishmania donovani*

25

<400> 15

ES 2 528 928 T3

```

atgtccgccg gtggccgtga gaccgcgccg acgaacctga ttcgtcgccg caacaaggac 60
gagacaaacg gggatgtcag cgccgcgccg gaccgcttcc gcgaccgctt cgagaaggca 120
accctcgagg agcgcaaggc cgccaccacg acgatgggtca acgagtacta cgacctggtg 180
acggacttct acgagtacgg ctggggccag aactttcatt tcgcgcccgcg ctacgccggc 240
gagaccttct tcgagtccct cgcgcgccac gagtacttcc tggccgctcg cggcggtctc 300
atggagggcg accacatcgt cgacgtgggc tgcggcgctcg gcggtccggc gcgcaacatg 360
gttcgcctca cgcgctgcaa cgtcatcggc gtcaacaaca acgattacca gatcagccgc 420
gctcgccgtc atgacgcgct cgccgggatg agctccaaga tcgactacgt caagaccgac 480
ttctgcaaca tgagcttagc cgacaacacc ttcgacggcg cctacgcat cgaggccacc 540
tgccacgcaa aggacaaggt caagtgtat agcgaggtct tccgtgtcat caagcccggc 600

```

```

acctgctttg tcctgtacga gtggtgcatg accgacaagt acaaccccaa tgacgagtac 660
caccgcacaa tcaagcaccg catcgagctg ggcgacggcc tgccggagat ggagacgtgc 720
aaacaggtga tcgagtacat gaagcaggcc ggcttcgtgg tggaggaggc catagacgtc 780
atcagtcagt tcgaatccag ccccatcaag agtatcccgt ggtaccagcc gctggtcggc 840
gactattcgt ccctgcaggg cctgcgctct accccgattg gccgcatcct cacgaacgtc 900
atgtgtcgcg tgctggagtt cgtgcacctc gctccgaagg gcacgtacaa ggcgacggag 960
gttttgaggg aggctgcgga aagcctggtg gtgggcggtc agctcggcat cttcacgccg 1020
tccttctaca tccgcgctcg caagccgtcc aagcaggctt ag 1062

```

<210> 16
<211> 1062

5 <212> ADN
<213> *Leishmania major*

<400> 16

```

atgtctgccg gtggccgtga gaccgcgccg atgaacctgc ttcgtcgccg caacaaggat 60
gagataaacg gggatgtcaa cgccgcgccg gaccgcttcc gcaaccgctt cgagaaggca 120
accctcgagg agcgcaaggc cgccaccacg acgatgggtca acgagtacta cgacctggtg 180
acggacttct acgagtacgg ctggggccag aactttcatt tcgcgcccgcg ctacgccggc 240
gagaccttct tcgagtccct cgcgcgccac gagtacttcc tggccgccccg cggcggtctc 300
atggagggcg accatatcgt cgacgtgggc tgcggcgctcg gcggtccggc gcgcaacata 360
gttcgcctca cgcgctgtaa cgtcaccggc gtcaacaaca acgattacca aatcagccgc 420
gctcgccgtc atgacgcaat cgccgggatg agctgcaaaa tcgactacgt caagaccgac 480
ttctgcaaca tgagcttagc cgacaacacc ttcgacggcg cctacgcat cgaggccaca 540
tgccacgcaa aggacaaggt caagtgtat agcgaggtct tccgtgtcat caagcccggc 600
acctgcttcg tcctgtacga gtggtgcatg accgacaagt acaaccccaa tgacgagtac 660
catcgacgca tcaagcaccg cattgagctg ggcgacggcc tgccggagat ggagacgtgc 720
aagcaggtga tcgagtacat gaaggaggcc ggtttcgtgg tggagggaagc catagatgtc 780
atcagtcagt tcgagtccag ccccatcaag agcatcccgt ggtaccagcc gctggttggc 840
gactactcgt ccctgcaggg cctgcgctct accccgattg gccgcatcct caccaacatc 900
atgtgtcgcg tgctggagtt cgtgcacctc gctccgaagg gcacgtacaa ggcgacggag 960
gttttgaggg aggctgcgga aagcctggtg gtgggcggtc agctcggcat cttcacgccg 1020
tccttctaca tccgcgctcg caagccgtcc aagcaggcct ag 1062

```

10

<210> 17
<211> 711
<212> ADN

15 <213> *Leishmania infantum*

<400> 17

ES 2 528 928 T3

```

atgaagatcc gcagcgtgcg tccgcttgtg gtgttgctgg tgtgcgtcgc ggcggtgctc 60
gcactcagcg cctccgctga gccgcacaag gcggccgttg acgtcggccc gctctccgtt 120
ggcccgcagt ccgtcggccc gctctctggt ggcccgcagg ctgttggtccc gctctccgtt 180
ggcccgcagt ccgtcggccc gctctctggt ggcccgcagg ctgttggtccc gctctctggt 240
ggcccgcagt ccgttggtccc gctctccggt ggcccgcctc ccgttggtccc gcagtctggt 300
ggcccgcctc ccgttggtcc gcagtcctgc ggcccgcctc ctgttggtcc gcagtcctgc 360
ggcccgcctc ccgttggtccc gcaggtctgt ggcccgcctc ccgttggtccc gcagtcctgc 420
ggcccgcctc ctgttggtccc gcaggtctgt ggcccgcctc ctgttggtccc gcagtcctgc 480
ggcccgcctc ccgttggtccc gcagtcctgt ggcccgcctc ccgttggtccc gcagtcctgc 540
ggcccgcctc ctgttggtcc gcagtcctgc ggcccgcctc ccgttggtccc gcagtcctgc 600
ggcccgcctc ccgttggtccc gcagtcctgc ggcccgcctc ccgttggtccc gcagtcctgc 660
ggcccgcctc ccgttggtccc gcagtcctgt gacgtttctc ccgtgtctta a 711

```

<210> 18
<211> 1332

5 <212>ADN
<213>*Leishmania infantum*

<400> 18

```

atggcgacgt cgagggccgc tctctgcgct gttgcggtcg tgtgcgtggt gcttgccggt 60
gcctgcgcgc ctgcgcgcgc gatatacgtg ggcacgccgg ctgctgcgct gttcagaggag 120

```

```

ttcaagcggc cgtaccggcg cgcgtacggg acgctggccg aggagcagca gcggtggcg 180
aacttcgagc gcaacctgga gctgatgcgc gagcatcagg cgaggaaccc acacgcgagg 240
ttcgggatca cgaagtctct cgacctgtcg gaggcggagt tcgccgcgcg ctacctgaac 300
ggcgccgcgt acttcgcagc ggogaagcag cacgccggcc agcactaccg caaggcgcgc 360
gcgacactgt cggcgggtgc tgatgcggtg gactggcgcg agaagggcgc cgtgacgccg 420
gtgaagaatc aaggcgcgtg cgggtcgtgc tgggcgttct cggcgggtcgg caacatcgag 480
tcgcagtggg cccgtgcccg ccacggcttg gtgagcctgt cggagcagca gctggtgagc 540
tgcatgaca aagacaatgg ctgcaacggc gggctgatgc tgcaggcgtt cgagtggctg 600
ctgcgacaca tgtacgggat cgtgttcacg gagaagagct acccctacac gtccggcaac 660
ggtgatgtgg ccgagtgtt gaacagcagt aaactcgttc ccggcgcgca aatcgacggc 720
tacgtgatga tcccagcaa cgaaacggtt atggctgcgt ggcttgcgga gaatggcccc 780
atcgcgattg cggtcgacgc cagctccttc atgtcttacc agagcggcgt gctgaccagc 840
tgcgctggcg atgcaactga ccacggcgtg ctgctcgtcg ggtacaacia gaccggtggg 900
gttccgtact ggggtatcaa gaactcgtgg ggtgaggact ggggcgagaa gggctacgtg 960
cgcgtggtca tggggctgaa cgcgtgcctg ctacgtgaat acccctgtgc cgcgatgtg 1020
ccgcggagtc tcaccctgg cccgggcacg gagagcaggg agcgcgcccc taaacgggtg 1080
acgggtggagc agatgatgtg caccgatatg tactgcaggg aggggtgcaa gaagatcctt 1140
ctcaccgcga acgtgtgcta caagaacggg ggaggcggct cctctatgac gaagtgcggg 1200
ccgcagaagg tgctgatgtg ctcgactcgc aaccctcatt gctttggtcc tggcgtgtgc 1260
ctcgagactc ctgatggcaa gtgcgcgcgg tacttcttgg gctcgatcat gaacacctgc 1320
cagtacacgt ag 1332

```

10

<210> 19
<211> 1332
<212> ADN

15 <213> *Leishmania donovani*

<400> 19

ES 2 528 928 T3

```

atggcgacgt cgagggccgc tctctgcgct gttgcggtcg tgtgcgtggt gcttgcggct 60
gcctgcgcgc ctgcgcgcgc gatatacgtg ggcacgccgg ctgctgcgct gttcgaggag 120
ttcaagcgga cgtaccggcg cgcgtacggg acgctggccg aggagcagca gcggtggcg 180
aacttcgagc gcaacctgga gctgatgcgc gagcatcagg cgaggaaccc acacgcgagg 240
ttcgggatca cgaagtctt cgacctgtcg gaggcggagt tcgccgcgcg ctacctgaac 300
ggcgccgcgt acttcgcagc ggccaagcag cacgccggcc agcactaccg caaggcgcgc 360
gcggaacctg cggcgggtgc tgatgcggtg gactggcgcg agaagggcgc cgtgacgccg 420
gtgaagaatc aaggcgcgtg cgggtcgtgc tgggcgttct cggcggtcgg caacatcgag 480
tcgcagtggg cccgtgtcgg ccacggcttg gtgagcctgt cggagcagca gctggtgagc 540
tgcatgaca aagacaatgg ctgcaacggc gggctgatgc tgcaggcgtt cgagtggctg 600
ctgcgacaca tgtacgggat cgtgttcacg gagaagaget acccctacac gtcggcaac 660
ggtgatgtgg ccgagtgtt gaacagcagt aaactcgttc ccggcgcgca aatcgacggc 720
tacgtgatga tcccagagca cgaaacagtt atggctgcgt ggcttgcgga gaatggcccc 780
atcgcgattg cggtcgacgc cagctccttc atgtcttacc agagcggcgt gctgaccagc 840
tgcgctggcg atgactgaa ccacggcgtg ctgctcgtcg ggtacaacia gaccgggtggg 900
gttccgtact gggatgataa gaactcgtg ggtgaggact ggggcgagaa gggctacgtg 960
cgcgtggcca tggggaagaa cgcgtgcctg ctacgtgaat acccctgttc cgcgatgtg 1020
ccgcggagtc taccctctgg gccgggacg gagagcgagg agcgcgctcc taaacgggtg 1080
acggtgagc aggtgatgtg caccgatatg tactgcaggg aggggtgcaa gaagagtctt 1140
ctcaccgca acgtgtgcta caagaacggg ggaggcggct cctctatgac gaagtgcggg 1200
ccgaagaagg tgctgatgtg ctcgactcgc aacctcatt gctttgttcc tgggctgtgc 1260
ctcgagactc ctgatggcaa gtgcgcgcgg tacttcttgg gctcgatcat gaacacctgc 1320
cagtacacgt ag 1332

```

<210> 20
<211> 1332

5 <212>ADN
<213> *Leishmania major*

<400> 20

```

atggcgacgt cgagggccgc tctctgcgct gttgcggttg tgtgcgtggt gcttgcggct 60
gcctgcgcgc ccgcgcgcgc gatatacgtg ggcacgccgg ctgctgcgct gttcgaggag 120
ttcaagcgga cgtaccagcg cgcgtacggg acgctgaccg aggagcagca gcggtggcg 180

```

```

aacttcgagc gcaacctgga gctgatgcgc gagcatcagg cgaggaaccc acacgcgagg 240
ttcgggatca cgaagtctt tgacctgtcg gaggcggagt tcgccgcgcg ctacctgaac 300
ggcgccgcgt acttcgcagc ggccaagcag cacgccggcc agcactaccg caaggcgcgc 360
gcggaacctg cggcgggtgc tgatgcggtg gactggcgcg agaagggcgc cgtgacgccg 420
gtgaagaatc aaggcgcgtg cgggtcgtgc tgggcgttct cggcggtcgg caacatcgag 480
tcgcagtggg ccgttgccgg ccacaagctg gtgaggctgt cggagcagca gctggtgagc 540
tgcatcacg tggacaatgg ttgcggcggc gggctgatgc tgcaggcatt cgagtgggtg 600
ctgcgaaaca tgaacgggac cgtgttcacg gagaagaget acccctacgt ctccggcaac 660
ggtgatgtgc ccgagtgtc gaacagcagt gaactcgtc ccggtgcgcg aatcgacggg 720
tacgtgtcga tggaaagcag cgaagagtt atggctgcgt ggcttgcgaa gaatggcccc 780
atctcgattg cggtcgacgc cagctcctt atgtcttacc atagcggcgt cctgaccagc 840
tgcatggtg agcagctgaa ccacggcgtg ctgctcgttg ggtacaacat gactggtgag 900
gttccgtact gggatgataa gaactcgtg ggtgaggact ggggcgagaa gggctacgtg 960
cgcgtgacca tgggggtgaa cgcgtgcctg ctactgggt acccctgttc cgtgatgtg 1020
tcgcagagcc ccaccctgg cccaacacg accaccacga cgcacgctcc taaacgggtg 1080
acggtgaagc agatcacctg cacggattat ttctgccgaa aggggtgcaa gacgacgggtg 1140
atccccacga aagagtgcct gccgaacggg gcaggcggct cttttcagat ggagtgcggg 1200
gaccatcagg tgttgaagct cacctacacc tccatgaatt gcaactggtg ggccaagtat 1260
acggtgacaa gggagggtaa gtgcgggata tcgtggtccg gctcgagcaa gagcatttgc 1320
cagtacgtgt ag 1332

```

10

<210> 21
<211> 660
<212> PRT

15 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia aminoacídica de un polipéptido de fusión KSA

ES 2 528 928 T3

<400> 21

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

ES 2 528 928 T3

				245					250					255			
Met	Ser	Leu	Ala	Asp	Asn	Thr	Phe	Asp	Gly	Ala	Tyr	Ala	Ile	Glu	Ala		
			260					265					270				
Thr	Cys	His	Ala	Lys	Asp	Lys	Val	Lys	Cys	Tyr	Ser	Glu	Val	Phe	Arg		
		275					280					285					
Val	Ile	Lys	Pro	Gly	Thr	Cys	Phe	Val	Leu	Tyr	Glu	Trp	Cys	Met	Thr		
	290					295					300						
Asp	Lys	Tyr	Asn	Pro	Asn	Asp	Glu	Tyr	His	Arg	Thr	Ile	Lys	His	Arg		
305					310					315					320		
Ile	Glu	Leu	Gly	Asp	Gly	Leu	Pro	Glu	Met	Glu	Thr	Cys	Lys	Gln	Val		
			325						330					335			
Ile	Glu	Tyr	Met	Lys	Gln	Ala	Gly	Phe	Val	Val	Glu	Glu	Ala	Ile	Asp		
		340						345					350				
Val	Ile	Ser	Gln	Phe	Glu	Ser	Ser	Pro	Ile	Lys	Ser	Ile	Pro	Trp	Tyr		
		355					360					365					
Gln	Pro	Leu	Val	Gly	Asp	Tyr	Ser	Ser	Leu	Gln	Gly	Leu	Arg	Ser	Thr		
	370					375					380						
Pro	Ile	Gly	Arg	Ile	Leu	Thr	Asn	Val	Met	Cys	Arg	Val	Leu	Glu	Phe		
385					390					395					400		
Val	Arg	Leu	Ala	Pro	Lys	Gly	Thr	Tyr	Lys	Ala	Thr	Glu	Ile	Leu	Glu		
			405						410					415			
Glu	Ala	Ala	Glu	Ser	Leu	Val	Val	Gly	Gly	Gln	Leu	Gly	Ile	Phe	Thr		
			420					425					430				
Pro	Ser	Phe	Tyr	Ile	Arg	Ala	Arg	Lys	Pro	Ser	Lys	Gln	Ala	Gly	Ser		
		435					440					445					
Glu	Pro	His	Lys	Ala	Ala	Val	Asp	Val	Gly	Pro	Leu	Ser	Val	Gly	Pro		
	450					455					460						
Gln	Ser	Val	Gly	Pro	Leu	Ser	Val	Gly	Pro	Gln	Ala	Val	Gly	Pro	Leu		
465					470					475					480		
Ser	Val	Gly	Pro	Gln	Ser	Val	Gly	Pro	Leu	Ser	Val	Gly	Pro	Gln	Ala		
			485						490					495			
Val	Gly	Pro	Leu	Ser	Val	Gly	Pro	Gln	Ser	Val	Gly	Pro	Leu	Ser	Val		
			500					505					510				
Gly	Pro	Leu	Ser	Val	Gly	Pro	Gln	Ser	Val	Gly	Pro	Leu	Ser	Val	Gly		
		515					520					525					
Ser	Gln	Ser	Val	Gly	Pro	Leu	Ser	Val	Gly	Pro	Gln	Ser	Val	Gly	Pro		
	530					535					540						
Leu	Ser	Val	Gly	Pro	Gln	Ala	Val	Gly	Pro	Leu	Ser	Val	Gly	Pro	Gln		
545					550					555					560		
Ser	Val	Gly	Pro	Leu	Ser	Val	Gly	Pro	Gln	Ala	Val	Gly	Pro	Leu	Ser		
			565						570					575			
Val	Gly	Pro	Gln	Ser	Val	Gly	Pro	Leu	Ser	Val	Gly	Pro	Gln	Ser	Val		
			580					585					590				
Gly	Pro	Leu	Ser	Val	Gly	Ser	Gln	Ser	Val	Gly	Pro	Leu	Ser	Val	Gly		
		595					600					605					
Pro	Gln	Ser	Val	Gly	Pro	Leu	Ser	Val	Gly	Pro	Gln	Ser	Val	Gly	Pro		
	610					615					620						
Leu	Ser	Val	Gly	Pro	Gln	Ser	Val	Gly	Pro	Leu	Ser	Val	Gly	Pro	Gln		
625					630					635					640		
Ser	Val	Gly	Pro	Leu	Ser	Val	Gly	Pro	Gln	Ser	Val	Asp	Val	Ser	Pro		
			645						650					655			
Val	Ser	Gly	Ser														
			660														

<210> 22
 <211> 1989
 5 <212>ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia de ácido nucleico que codifica el polipéptido de fusión KSA

10 <400> 22

ES 2 528 928 T3

```

atggccacca cgtacgagga gttttcggcg aagctggacc gcctggatga ggagttcaac 60
aggaagatgc aggagcagaa cgccaagttc tttgcgga agccggatga gtcgacgctg 120
tcgcccgaga tgaaggagca ctacgagaag ttcgagcgca tgatcaagga acacacagag 180
aagttaaca agaagatgca cgagcactcg gagcacttca agcagaagtt cgccgagctg 240
ctcgagcagc agaaggctgc gcagtaccg tccaagacta gttccgccgg tggccgtgag 300
accgcccga cgaacctgat tcgtcgccgc aacaaggacg agacaaacgg ggatgtcagc 360
gcccccggcg accgcttccg cgaccgcttc gagaaggcaa ccctcgagga gcgcaaggcc 420
gccaccacga cgatggtaaa cgagtactac gacctgggta cggacttcta cgagtacggc 480
tggggccaga acttccattt cgcgcccgcg tacgcccggc agaccttctt cgagtcctc 540
gcgcccacg agtacttctt ggccgctcgc ggccgcttca tggagggcga ccacatcgtc 600
gacgtgggct gcggcgtcgg cgggtccggc cgcaacatgg ttgcctcac gcgctgcaac 660
gtcatcgcg tcaacaacaa cgattaccag atcagccgct ctcgcccgtc tgacgcgctc 720
gccggtatga gtcacaagat cgactacgct aagaccgact tctgcaacat gagcttagcc 780
gacaacacct tcgacggcgc ctacgccatc gaggccacct gccacgcaa ggacaaggtc 840
aagtgtata gcgaggtctt ccgtgtcatc aagcccggca cctgcttctt cctgtacgag 900
tgggtcatga ccgacaagta caaccacaat gagagatacc accgcacaat caagcaccgc 960
atcgagctgg gcgacggcct gccggagatg gagacgtgca aacaggtgat cgagtacatg 1020
aagcaggccg gcttcgtggt ggaggaggcc atagacgtca tcagtcagtt cgagtccagc 1080
cccataaga gtatcccgtg gtaccagccg ctgggtcggc actattcgtc cctgcagggc 1140
ctgcgctcta ccccgattgg ccgcatctc acgaacgtca tgtgtcgcgt gctggagttc 1200
gtgcgcttag ctccgaaggg cacgtacaag gcgacggaga ttttgagga ggctgcggaa 1260
agcctgggtg tgggcccgtc gctcggcatc ttcacgccgt ccttctacat ccgctcgc 1320
aagccgtcca agcaggctgg atccgagccg cacaaggcgg ccgttgacgt cggcccgtc 1380
tccgttggcc cgcagtcctg cggcccgtc tctgttggcc cgcaggctgt tggcccgtc 1440
tccgttggcc cgcagtcctg tggcccgtc tccgttggcc cgcagtcctg tggcccgtc 1500
tctgttggcc cgcagtcctg tggcccgtc tccgttggcc cgcagtcctg tggcccgtc 1560
tctgttggcc cgcagtcctg tggcccgtc tccgttggcc cgcagtcctg tggcccgtc 1620
tccgtcggcc cgcagtcctg tggcccgtc gctgttggcc cgcagtcctg tggcccgtc 1680
tccgtcggcc cgcagtcctg tggcccgtc gctgttggcc cgcagtcctg tggcccgtc 1740
tccgttggcc cgcagtcctg tggcccgtc tctgttggcc cgcagtcctg tggcccgtc 1800
tccgtcggcc cgcagtcctg tggcccgtc tccgtcggcc cgcagtcctg tggcccgtc 1860
tctgtcggcc cgcagtcctg tggcccgtc tccgtcggcc cgcagtcctg tggcccgtc 1920
tccgttggcc cgcagtcctg tggcccgtc tccgttggcc tttctccggt gtctggatcc 1980
gaattctaa
    
```

<210> 23

<211> 978

5 <212>PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia aminoacídica de un polipéptido de fusión KSAC

10

<400> 23

```

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


ES 2 528 928 T3

Gly Pro Leu Ser Val Gly Ser Gln Ser Val Gly Pro Leu Ser Val Gly
 595 600 605
 Pro Gln Ser Val Gly Pro Leu Ser Val Gly Pro Gln Ser Val Gly Pro
 610 615 620
 Leu Ser Val Gly Pro Gln Ser Val Gly Pro Leu Ser Val Gly Pro Gln
 625 630 635 640
 Ser Val Gly Pro Leu Ser Val Gly Pro Gln Ser Val Asp Val Ser Pro
 645 650 655
 Val Ser Gly Ser Glu Phe Asp Ala Val Asp Trp Arg Glu Lys Gly Ala
 660 665 670
 Val Thr Pro Val Lys Asn Gln Gly Ala Cys Gly Ser Cys Trp Ala Phe
 675 680 685
 Ser Ala Val Gly Asn Ile Glu Ser Gln Trp Ala Arg Ala Gly His Gly
 690 695 700
 Leu Val Ser Leu Ser Glu Gln Gln Leu Val Ser Cys Asp Asp Lys Asp
 705 710 715 720
 Asn Gly Cys Asn Gly Gly Leu Met Leu Gln Ala Phe Glu Trp Leu Leu
 725 730 735
 Arg His Met Tyr Gly Ile Val Phe Thr Glu Lys Ser Tyr Pro Tyr Thr
 740 745 750
 Ser Gly Asn Gly Asp Val Ala Glu Cys Leu Asn Ser Ser Lys Leu Val
 755 760 765
 Pro Gly Ala Gln Ile Asp Gly Tyr Val Met Ile Pro Ser Asn Glu Thr
 770 775 780
 Val Met Ala Ala Trp Leu Ala Glu Asn Gly Pro Ile Ala Ile Ala Val
 785 790 795 800
 Asp Ala Ser Ser Phe Met Ser Tyr Gln Ser Gly Val Leu Thr Ser Cys
 805 810 815
 Ala Gly Asp Ala Leu Asn His Gly Val Leu Leu Val Gly Tyr Asn Lys
 820 825 830
 Thr Gly Gly Val Pro Tyr Trp Val Ile Lys Asn Ser Trp Gly Glu Asp
 835 840 845
 Trp Gly Glu Lys Gly Tyr Val Arg Val Val Met Gly Leu Asn Ala Cys
 850 855 860
 Leu Leu Ser Glu Tyr Pro Val Ser Ala His Val Pro Arg Ser Leu Thr
 865 870 875 880
 Pro Gly Pro Gly Thr Glu Ser Glu Glu Arg Ala Pro Lys Arg Val Thr
 885 890 895
 Val Glu Gln Met Met Cys Thr Asp Met Tyr Cys Arg Glu Gly Cys Lys
 900 905 910
 Lys Ser Leu Leu Thr Ala Asn Val Cys Tyr Lys Asn Gly Gly Gly Gly
 915 920 925
 Ser Ser Met Thr Lys Cys Gly Pro Gln Lys Val Leu Met Cys Ser Tyr
 930 935 940
 Ser Asn Pro His Cys Phe Gly Pro Gly Leu Cys Leu Glu Thr Pro Asp
 945 950 955 960
 Gly Lys Cys Ala Pro Tyr Phe Leu Gly Ser Ile Met Asn Thr Cys Gln
 965 970 975
 Tyr Thr

<210> 24

<211> 2937

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de ácido nucleico que codifica el polipéptido de fusión KSAC

10

<400> 24

ES 2 528 928 T3

```

atggccacca cgtacgagga gttttcggcg aagctggacc gcctggatga ggagttcaac 60
aggaagatgc aggagcagaa cgccaagttc tttgcgga agccggatga gtcgacgctg 120
tcgcccgaga tgaaggagca ctacgagaag ttcgagcgca tgatcaagga acacacagag 180
aagttcaaca agaagatgca cgagcactcg gagcacttca agcagaagtt cgccgagctg 240
ctcgagcagc agaaggctgc gcagtacccg tccaagacta gttccgccgg tggccgtgag 300
accgcgccga cgaacctgat tcgtcgccgc aacaaggacg agacaaacgg ggatgtcagc 360
gccaccacga cgatgggtcaa cgagtactac gacctgggtga cggacttcta cgagtacggc 420
tggtggcaga acttccattt cgcgccgcgc tacgccggcg agaccttctt cgagtccttc 540
gcgcgccacg agtacttccct ggccgctcgc ggccggttca tggaggcgca ccacatcgtc 600
gacgtgggct gcggcgctcg cggtccggcg cgcaacatgg ttcgcctcac gcgctgcaac 660
gtcatcgcg tcaacaacaa cgattaccag atcagccgcg ctccgctca tgacgcctc 720
gccggtatga gtcccaagat cgactacgtc aagaccgact tctgcaacat gagcttagcc 780
gacaacacct tcgacggcgc ctacgccatc gaggccacct gccacgcaaa ggacaaggtc 840
aagtgtata gggaggtctt ccgtgtcatc aagcccggca cctgctttgt cctgtacgag 900
tggtggcaga cgcacaagta caaccacaat gagcagtagc accgcacaat cgagtccttc 960
atcgagctgg gcgacggcct gccggagatg gagacgtgca aacaggatga cgagtacatg 1020
aagcaggccg gcttcgtggt ggaggaggcc atagacgtca tcagtcagtt cgagtccagc 1080
cccatacaaga gtatcccgtg gtaccagccg ctggctggcg actattcgtc cctgcagggc 1140
ctgcgctcta ccccgattgg ccgcatcctc acgaacgtca tgtgtcgcgt gctggagttc 1200
gtgcgcctag ctccgaaggg cacgtacaag gcgacggaga ttttggagga ggctgcggaa 1260
agcctggtgg tgggcggtca gctcggcatc ttcacgccgt ccttctacat ccgcgctcgc 1320
aagccgtcca agcaggctgg atccgagccg cacaaggcgg ccgttgacgt cggcccgtc 1380
tccgttgccc cgcagtcctg cggcccgtc tctgttgccc cgcaggctgt tggcccgtc 1440
tccgttgccc cgcagtcctg cggcccgtc tctgttgccc cgcaggctgt tggcccgtc 1500
tctgttgccc cgcagtcctg tggcccgtc tccgttgccc cgcagtcctg tggcccgtc 1560
tctgttgccc cgcagtcctg tggcccgtc tccgttgccc cgcagtcctg tggcccgtc 1620
tccgtcggcc cgcagtcctg tggcccgtc gctgttgccc cgcagtcctg tggcccgtc 1680
tccgtcggcc cgcagtcctg tggcccgtc gctgttgccc cgcagtcctg tggcccgtc 1740
tccgttgccc cgcagtcctg tggcccgtc tctgttgccc cgcagtcctg tggcccgtc 1800
tccgtcggcc cgcagtcctg tggcccgtc cccgtcggcc cgcagtcctg tggcccgtc 1860
tctgtcggcc cgcagtcctg tggcccgtc tccgtcggcc cgcagtcctg tggcccgtc 1920
tccgttgccc cgcagtcctg tggcccgtc tccgttgacc tttctcgggt gctgtgatcc 1980
gaattcgatg cgggtggactg gcgcgagaag ggcccggtga cgccgggtga gaatcaaggc 2040
gcgtgcgggt cgtgctgggc gttctcggcg gtcggcaaca tcgagtcgca gtgggcccgt 2100
gccggccaag gcttggtgag cctgtcggag cagcagctgg tgagctgca tgacaaagac 2160
aatggctgca acggcgggct gatgctgcag gcgttcgagt ggctgctgcg acacatgtac 2220
gggatcgtgt tcacggagaa gagctacccc tacacgtccg gcaacgggtga tgtggccag 2280
tgctgaaca gcagtaaac cgttcccgcg gcgcaaatcg acggctacgt gatgatccc 2340
agcaacgaaa cggttatggc tgcgtggctt cgggagaatg gccccatcgc gatgctggtc 2400
gacgccagct ccttcatgtc ttaccagagc ggctgtctga ccagctgcgc tggcgatgca 2460
ctgaaccacg gcgtgctgct cgtcgggtac aacaagaccg gtggggttcc gtactgggtg 2520
atcaagaact cgtggggtga ggactgggac gagaagggtc acgtgcgcgt ggtcatgggg 2580
ctgaacgcgt gcctgctcag tgaatacccc gtgtccgcgc atgtgcccgc gactctcacc 2640
cctggcccgg gcacggagag cgaggagcgc gccctaaac gggtgacggg ggagcagatg 2700
atgtgcaccg atatgtactg cagggagggg tgcaagaaga gtcttctcac cgcgaacgtg 2760
tgctacaaga acgggggagg cggctcctct atgacgaagt gcggtccgca gaaggtgctg 2820
atgtgctcgt actcgaacct tcattgcttt ggtcctggc tgtgctcga gactcctgat 2880
ggcaagtgcg cgccgtactt cttgggctcg atcatgaaca cctgccagta cacgtaa 2937

```

<210> 25

<211> 92

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia aminoacídica de una porción inmunogénica de un polipéptido KMP11

10

<400> 25

ES 2 528 928 T3

```

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

```

<210> 26

<211> 352

5 <212>PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223>Secuencia aminoacídica de una porción inmunogénica de un polipéptido SMP

10

<400> 26

```

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

```

ES 2 528 928 T3

		290					295					300							
	Glu	Phe	Val	Arg	Leu	Ala	Pro	Lys	Gly	Thr	Tyr	Lys	Ala	Thr	Glu	Ile			
	305					310					315					320			
	Leu	Glu	Glu	Ala	Ala	Glu	Ser	Leu	Val	Val	Gly	Gly	Gln	Leu	Gly	Ile			
					325					330					335				
	Phe	Thr	Pro	Ser	Phe	Tyr	Ile	Arg	Ala	Arg	Lys	Pro	Ser	Lys	Gln	Ala			
				340					345					350					

- <210> 27
- <211> 210
- 5 <212> PRT
- <213> Secuencia artificial

- <220>
- <223> Secuencia aminoacídica de una porción inmunogénica de un polipéptido A2
- 10 <400> 27

	Glu	Pro	His	Lys	Ala	Ala	Val	Asp	Val	Gly	Pro	Leu	Ser	Val	Gly	Pro			
	1				5					10					15				
	Gln	Ser	Val	Gly	Pro	Leu	Ser	Val	Gly	Pro	Gln	Ala	Val	Gly	Pro	Leu			
				20					25					30					
	Ser	Val	Gly	Pro	Gln	Ser	Val	Gly	Pro	Leu	Ser	Val	Gly	Pro	Gln	Ala			
			35					40					45						
	Val	Gly	Pro	Leu	Ser	Val	Gly	Pro	Gln	Ser	Val	Gly	Pro	Leu	Ser	Val			
			50				55					60							
	Gly	Pro	Leu	Ser	Val	Gly	Pro	Gln	Ser	Val	Gly	Pro	Leu	Ser	Val	Gly			
	65				70					75					80				
	Ser	Gln	Ser	Val	Gly	Pro	Leu	Ser	Val	Gly	Pro	Gln	Ser	Val	Gly	Pro			
				85						90					95				
	Leu	Ser	Val	Gly	Pro	Gln	Ala	Val	Gly	Pro	Leu	Ser	Val	Gly	Pro	Gln			
				100					105					110					
	Ser	Val	Gly	Pro	Leu	Ser	Val	Gly	Pro	Gln	Ala	Val	Gly	Pro	Leu	Ser			
			115					120					125						
	Val	Gly	Pro	Gln	Ser	Val	Gly	Pro	Leu	Ser	Val	Gly	Pro	Gln	Ser	Val			
			130				135					140							
	Gly	Pro	Leu	Ser	Val	Gly	Ser	Gln	Ser	Val	Gly	Pro	Leu	Ser	Val	Gly			
	145				150						155				160				
	Pro	Gln	Ser	Val	Gly	Pro	Leu	Ser	Val	Gly	Pro	Gln	Ser	Val	Gly	Pro			
				165						170					175				
	Leu	Ser	Val	Gly	Pro	Gln	Ser	Val	Gly	Pro	Leu	Ser	Val	Gly	Pro	Gln			
				180						185					190				
	Ser	Val	Gly	Pro	Leu	Ser	Val	Gly	Pro	Gln	Ser	Val	Asp	Val	Ser	Pro			
			195					200						205					
	Val	Ser																	
		210																	

- 15 <210> 28
- <211> 316
- <212>PRT
- <213> Secuencia artificial

- 20 <220>
- <223> Secuencia aminoacídica de una porción inmunogénica de un polipéptido CBP
- <400> 28

	Asp	Ala	Val	Asp	Trp	Arg	Glu	Lys	Gly	Ala	Val	Thr	Pro	Val	Lys	Asn			
25	1				5					10					15				

ES 2 528 928 T3

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

<210> 29

<211> 276

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de ácido nucleico que codifica el polipéptido KMP11

10

<400> 29

```
atggccacca cgtacgagga gttttcggcg aagctggacc gcctggatga ggagttcaac 60
aggaagatgc aggagcagaa cgccaagttc ttgcgggaca agccggatga gtcgacgctg 120
tcgcccgaga tgaaggagca ctacgagaag ttcgagcgca tgatcaagga acacacagag 180
aagttcaaca agaagatgca cgagcactcg gagcacttca agcagaagtt cgccgagctg 240
ctcgagcagc agaaggctgc gcagtaccg tccaag 276
```

15 <210> 30

<211> 1056

<212>ADN

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> Secuencia de ácido nucleico que codifica el polipéptido SMP

<400> 30

ES 2 528 928 T3

```

tccgccggtg gccgtgagac cgcgccgacg aacctgattc gtcgccgcaa caaggacgag 60
acaaacgggg atgtcagcgc cgcgccgacg cgcttccgcg accgcttcca gaaggcaacc 120
ctcgaggagc gcaaggccgc caccacgacg atgggtcaac agtactacga cctgggtgacg 180
gactttctacg agtacggctg gggccagaac ttccatttcc cgccgcgcta cgccggcgag 240
accttcttcg agtccctcgc gcgccacgag tacttccctgg ccgctcgcgg cggcttccatg 300
gagggcgacc acatcgtcga cgtgggctgc ggcgtcggcg gtccggcgcg caacatgggt 360
cgctcagcgc gctgcaacgt catcggcgtc aacaacaacg attaccagat cagccgcgct 420
cgccgtcagc acgcgctcgc cggtatgagc tccaagatcg actacgtcaa gaccgacttc 480
tgcaacatga gcttagccga caacaccttc gacggcgctc acgccatcga ggccacctgc 540
cacgcaaagg acaagggtcaa gtgctatagc gaggtcttcc gtgtcatcaa gcccggcacc 600
tgctttgtcc tgtacgagtg gtgcatgacc gacaagtaca accccaatga cgagtaccac 660
cgcacatca agcaccgcat cgagctgggc gacggcctgc cggagatgga gacgtgcaaa 720
caggtgatcg agtacatgaa gcaggccggc ttctgtgtgg aggaggccat agacgtoatc 780
agtcagttcg agtccagccc catcaagagt atcccgtggt accagccgct ggtcggcgac 840
tattcgtccc tgcaggccct gcgctctacc ccgattggcc gcacctcac gaacgtcatg 900
tgtcgcgtgc tggagttcgt gcgcctagct ccgaaggcca cgtacaaggc cagggagatt 960
ttggaggagc ctgcggaaag cctgggtgtg ggcggtcagc tcggcatctt cacgccgtcc 1020
ttctacatcc gcgctcgcga gccgtccaag caggct 1056

```

<210> 31

<211> 629

5 <212>ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de ácido nucleico que codifica el polipéptido A2

10

<400> 31

```

gagccgcaca aggcggccgt tgacgtcggc ccgctctcgg ttggcccga gtcgctcggc 60
ccgctctctg ttggcccga ggctgttggc ccgctctcgg ttggcccga gtcgctcggc 120
ccgctctctg ttggcccga ggctgttggc ccgctctctg ttggcccga gtcgcttggc 180
ccgctctcgg ttggcccgt ctccgttggc ccgcagtcg ttggcccgt ctccgttggc 240
tcgcagtcgg tcggcccgt ctctgttggg ccgcagtcgg tcggcccgt ctccgttggc 300
ccgcaggctg ttggcccgt ctccgttggc ccgcagtcgg tcggcccgt ctctgttggc 360
ccgcaggctg ttggcccgt ctctgttggc ccgcagtcgg ttggcccgt ctccgttggc 420
ccgcagtcg ttggcccgt ctccgttggc tcgcagtcgg tcggcccgt ctctgttggg 480
ccgcagtcgg tcggcccgt ctccgttggc ccgcagtcgg tcggcccgt ctccgttggc 540
ccgcagtcgg tcggcccgt ctccgttggg ccgcagtcgg ttggcccgt ctccgttggc 600
ccgcagtcgg ttgacgttcc tccggtgtc 629

```

15 <210> 32

<211> 948

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> Secuencia de ácido nucleico que codifica el polipéptido CBP

<400> 32

```

gatgcggtgg actggcgcga gaaggcgcc gtgacgcgg tgaagaatca aggcgcgtgc 60
gggtcgtgct gggcgttctc ggcggtcggc aacatcgagt cgcagtgggc ccgtgcccgc 120
cacggcttgg tgagcctgtc ggagcagcag ctggtgagct gcgatgaaa agacaatggc 180
tgcaacggcg ggctgatgct gcaggcgttc gctggctgct tcgcacacat gtacgggatc 240
gtgttcacgg agaagagcta cccctacacg tccggcaacg gtgatgtggc cgagtgtctg 300
aacagcagta aactcgttcc cggcgcgcaa atcgacggct acgtgatgat cccgagcaac 360

```

25

ES 2 528 928 T3

```

gaaacggtta tggctgctg gcttgcgag aatggcccca tcgcgattgc ggtcgacgcc 420
agctccttca tgtcttacca gagcggcgtg ctgaccagct gcgctggcga tgcactgaac 480
cacggcgtgc tgctcgtcgg gtacaacaag accggtgggg ttccgtactg ggtgatcaag 540
aactcgtggg gtgaggactg gggcgagaag ggctacgtgc gcgtggtoat ggggctgaac 600
gcgtgcctgc tcagtgaata ccccggtgcc gcgcatgtgc cgcggagtct caccctggc 660
ccgggcacgg agagcgagga gcgcgcccct aaacgggtga cggtggagca gatgatgtgc 720
accgatatgt actgcagggg ggggtgcaag aagagtcttc tcaccgcgaa cgtgtgctac 780
aagaacgggg gagcgggctc ctctatgacg aagtgcggtc cgcagaaggt gctgatgtgc 840
tcgtactcga accctcattg ctttggtcct gggctgtgcc tcgagactcc tgatggcaag 900
tgcgcgccgt acttcttggg ctcgatcatg aacacctgcc agtacacg 948
    
```

<210> 33
 <211> 1003

5 <212>PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia aminoacídica del polipéptido de fusión KSAC

10 <400> 33

```

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

ES 2 528 928 T3

Ile Glu Leu Gly Asp Gly Leu Pro Glu Met Glu Thr Cys Lys Gln Val
 325 330 335
 Ile Glu Tyr Met Lys Gln Ala Gly Phe Val Val Glu Glu Ala Ile Asp
 340 345 350
 Val Ile Ser Gln Phe Glu Ser Ser Pro Ile Lys Ser Ile Pro Trp Tyr
 355 360 365
 Gln Pro Leu Val Gly Asp Tyr Ser Ser Leu Gln Gly Leu Arg Ser Thr
 370 375 380
 Pro Ile Gly Arg Ile Leu Thr Asn Val Met Cys Arg Val Leu Glu Phe
 385 390 395 400
 Val Arg Leu Ala Pro Lys Gly Thr Tyr Lys Ala Thr Glu Ile Leu Glu
 405 410 415
 Glu Ala Ala Glu Ser Leu Val Val Gly Gly Gln Leu Gly Ile Phe Thr
 420 425 430
 Pro Ser Phe Tyr Ile Arg Ala Arg Lys Pro Ser Lys Gln Ala Gly Ser
 435 440 445
 Lys Ile Arg Ser Val Arg Pro Leu Val Val Leu Leu Val Cys Val Ala
 450 455 460
 Ala Val Leu Ala Leu Ser Ala Ser Ala Glu Pro His Lys Ala Ala Val
 465 470 475 480
 Asp Val Gly Pro Leu Ser Val Gly Pro Gln Ser Val Gly Pro Leu Ser
 485 490 495
 Val Gly Pro Gln Ala Val Gly Pro Leu Ser Val Gly Pro Gln Ser Val
 500 505 510
 Gly Pro Leu Ser Val Gly Pro Gln Ala Val Gly Pro Leu Ser Val Gly
 515 520 525
 Pro Gln Ser Val Gly Pro Leu Ser Val Gly Pro Leu Ser Val Gly Pro
 530 535 540
 Gln Ser Val Gly Pro Leu Ser Val Gly Ser Gln Ser Val Gly Pro Leu
 545 550 555 560
 Ser Val Gly Pro Gln Ser Val Gly Pro Leu Ser Val Gly Pro Gln Ala
 565 570 575
 Val Gly Pro Leu Ser Val Gly Pro Gln Ser Val Gly Pro Leu Ser Val
 580 585 590
 Gly Pro Gln Ala Val Gly Pro Leu Ser Val Gly Pro Gln Ser Val Gly
 595 600 605
 Pro Leu Ser Val Gly Pro Gln Ser Val Gly Pro Leu Ser Val Gly Ser
 610 615 620
 Gln Ser Val Gly Pro Leu Ser Val Gly Pro Gln Ser Val Gly Pro Leu
 625 630 635 640
 Ser Val Gly Pro Gln Ser Val Gly Pro Leu Ser Val Gly Pro Gln Ser
 645 650 655
 Val Gly Pro Leu Ser Val Gly Pro Gln Ser Val Gly Pro Leu Ser Val
 660 665 670
 Gly Pro Gln Ser Val Asp Val Ser Pro Val Ser Gly Ser Glu Phe Asp
 675 680 685
 Ala Val Asp Trp Arg Glu Lys Gly Ala Val Thr Pro Val Lys Asn Gln
 690 695 700
 Gly Ala Cys Gly Ser Cys Trp Ala Phe Ser Ala Val Gly Asn Ile Glu
 705 710 715 720
 Ser Gln Trp Ala Arg Ala Gly His Gly Leu Val Ser Leu Ser Glu Gln
 725 730 735
 Gln Leu Val Ser Cys Asp Asp Lys Asp Asn Gly Cys Asn Gly Gly Leu
 740 745 750
 Met Leu Gln Ala Phe Glu Trp Leu Leu Arg His Met Tyr Gly Ile Val
 755 760 765
 Phe Thr Glu Lys Ser Tyr Pro Tyr Thr Ser Gly Asn Gly Asp Val Ala
 770 775 780
 Glu Cys Leu Asn Ser Ser Lys Leu Val Pro Gly Ala Gln Ile Asp Gly
 785 790 795 800
 Tyr Val Met Ile Pro Ser Asn Glu Thr Val Met Ala Ala Trp Leu Ala

ES 2 528 928 T3

				805					810					815			
Glu	Asn	Gly	Pro	Ile	Ala	Ile	Ala	Val	Asp	Ala	Ser	Ser	Phe	Met	Ser		
			820					825					830				
Tyr	Gln	Ser	Gly	Val	Leu	Thr	Ser	Cys	Ala	Gly	Asp	Ala	Leu	Asn	His		
		835					840					845					
Gly	Val	Leu	Leu	Val	Gly	Tyr	Asn	Lys	Thr	Gly	Gly	Val	Pro	Tyr	Trp		
	850					855					860						
Val	Ile	Lys	Asn	Ser	Trp	Gly	Glu	Asp	Trp	Gly	Glu	Lys	Gly	Tyr	Val		
865					870					875					880		
Arg	Val	Val	Met	Gly	Leu	Asn	Ala	Cys	Leu	Leu	Ser	Glu	Tyr	Pro	Val		
				885					890					895			
Ser	Ala	His	Val	Pro	Arg	Ser	Leu	Thr	Pro	Gly	Pro	Gly	Thr	Glu	Ser		
			900					905					910				
Glu	Glu	Arg	Ala	Pro	Lys	Arg	Val	Thr	Val	Glu	Gln	Met	Met	Cys	Thr		
		915					920					925					
Asp	Met	Tyr	Cys	Arg	Glu	Gly	Cys	Lys	Lys	Ser	Leu	Leu	Thr	Ala	Asn		
	930					935					940						
Val	Cys	Tyr	Lys	Asn	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Ser	Met	Thr	Lys	Cys	Gly		
945					950					955					960		
Pro	Gln	Lys	Val	Leu	Met	Cys	Ser	Tyr	Ser	Asn	Pro	His	Cys	Phe	Gly		
				965					970					975			
Pro	Gly	Leu	Cys	Leu	Glu	Thr	Pro	Asp	Gly	Lys	Cys	Ala	Pro	Tyr	Phe		
			980					985					990				
Leu	Gly	Ser	Ile	Met	Asn	Thr	Cys	Gln	Tyr	Thr							
	995						1000										

<210> 34
 <211> 3021
 5 <212>ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia de ácido nucleico que codifica el polipéptido de fusión KSAC

10
 <400> 34

```

catatggcca ccacgtacga ggagttttcgc gcgaagctgg accgcctgga tgaggagttc 60
aacaggaaga tgcaggagca gaacgccaaag ttctttgcgg acaagccgga tgagtcgacg 120
ctgtcgcccg agatgaagga gcaactacgag aagttcgagc gcatgatcaa ggaacacaca 180
gagaagttca acaagaagat gcacgagcac tcggagcact tcaagcagaa gttcgccgag 240
ctgctcgagc agcagaaggc tgcgcagtac ccgtccaaga ctagttccgc cgggtggccgt 300
gagaccgcgc cgacgaacct gattcgtcgc cgcaacaagg acgagacaaa cggggatgtc 360
agcgcccgcc cgcaccgctt ccgcgaccgc ttcgagaagg caaccctcga ggagcgcaag 420
gcccaccaca cgacgatggt caacgagtac tacgacctgg tgacggactt ctacgagtac 480
ggctggggcc agaacttcca tttcgcgccc cgctacgccg gcgagacctt cttcgagtcc 540
ctcgcgcgcc acgagtactt cctggccgct cgcggcggct tcatggaggg cgaccacatc 600
gtcgacgtgg gctgcggcgt cggcggctcc gcgcgcaaca tggttcgcct cacgcgctgc 660
aacgtcatcg gcgtcaacaa caacgattac cagatcagcc gcgctcgcgg tcatgacggc 720
ctcgccggtg tgagctcaa gatcgactac gtcaagaccg acttctgcaa catgagctta 780
gccgacaaca ctttcgacgg cgcctacgcc atcgaggcca cctgccacgc aaaggacaag 840
gtcaagtgtc atagcgaggt cttccgtgtc atcaagcccg gcacctgctt tgtcctgtac 900
gagtggtgca tgaccgacaa gtacaacccc aatgacgagt accaccgcac aatcaagcac 960
cgcatcgagc tgggcgacgg cctgcccggag atggagacgt gcaaacaggt gatcgagtac 1020
atgaagcagc cggccttctg ggtggaggag gccatagacg tcatcagtcg gttcagatcc 1080
agccccatca agagtatccc gtggtaccag ccgctggctc gcgactattc gtcctgcagc 1140
ggcctgcgct ctaccccgat tggccgcac ctcacgaacg tcatgtgtcg cgtgctggag 1200
ttcgtgcgcc tagctccgaa gggcacgtac aaggcgacgg agattttgga ggaggctgcg 1260
gaaagcctgg tgggtggcgg tcagctcggc atcttcacgc cgtccttcta catccgcgct 1320
cgcaagccgt ccaagcaggc tggatccaag atccgcagcg tgcgtccgct tgtggtggtg 1380
ctggtgtgcg tcgcggcggc gctcgcactc agcgcctccg ctgagccgca caaggcggcc 1440
    
```

ES 2 528 928 T3

```

gttgacgtcg gcccgctgag cgttggcccc cagagcgtcg gcccgctgag cgttggcccc 1500
caggcgggtg gcccgctgag cgttggcccc cagagcgtcg gcccgctgag cgttggcccc 1560
caggcgggtg gcccgctgag cgttggcccc cagagcgttg gcccgctgag cgttggcccc 1620
ctgagcgttg gcccgagag cgttggcccc ctgagcgttg gcagccagag cgtcggcccc 1680
ctgagcgttg gtccgcagag cgtcggcccc ctgagcgttg gcccgagagc ggttggcccc 1740
ctgagcgttg gcccgagag cgtcggcccc ctgagcgttg gcccgagagc ggttggcccc 1800
ctgagcgttg gcccgagag cgttggcccc ctgagcgttg gcccgagag cgttggcccc 1860
ctgagcgttg gcagccagag cgtcggcccc ctgagcgttg gtccgcagag cgtcggcccc 1920
ctgagcgttg gcccgagag cgtcggcccc ctgagcgttg gcccgagag cgtcggcccc 1980
ctgagcgttg gtccgcagag cgttggcccc ctgagcgttg gcccgagag cgttgacgtt 2040
agcccgggga gcggatccga attcgatgag gtggactggc gcgagaaggg cgccgtgacg 2100
ccggtgaaga atcaaggcgc gtgcgggctg tgctgggctg tctcggcggc cggcaacatc 2160
gagtcgcagt gggcccctgc cggccacggc ttggtgagcc tgctcggagca gcagctgggtg 2220
agctgcgatg acaaagacaa tggctgcaac ggccgggtga tgctgcagggc gttcagatgg 2280
atgctgcgac acatgtacgg gatcgtgttc acggagaaga gctaccacct cactccggc 2340
aacggtgatg tggccgagtg cttgaacagc agtaaactcg tcccggcgc gcaaatcgac 2400
ggctacgtga tgatcccag caacgaaacg gttatggctg cgtggcttg gcgagaatggc 2460
cccacgcga ttgcggctga cggcagctcc ttcattgtct accagagcgg cgtgctgacc 2520
agctgcgctg gcgatgcaat gaaccacggc gtgctgctcg tcgggtacaa caagaccggt 2580
ggggttccgt actgggtgat caagaactcg tggggtgagg actggggcga gaagggtac 2640
gtgcgcgctg tcatgggct gaacgcgtgc ctgctcagtg aataccccgt gtccgcgcat 2700
gtgccgcgga gtctcaccct tggcccggc acggagagcg aggagcgcgc ccctaaacgg 2760
gtgagcgttg agcagatgat gtgcaccgat atgtactgca gggaggggtg caagaagagt 2820
cttctcaccg cgaacgtgtg ctacaagaac gggggagcgc gctcctctat gacgaagtgc 2880
ggtcgcgaga aggtgctgat gtgctcgtac tcgaaccctc attgctttgg tctcgggctg 2940
tgctcagaga ctctgatgg caagtgcgcg ccgtacttct tgggctcgtat catgaacacc 3000
tgccagtaca cgtaaaagct t 3021

```

<210> 35

<211> 660

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia aminoacídica de un polipéptido de fusión KSA (sin Cys)

10

<400> 35

```

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

```

ES 2 528 928 T3

				180						185					190
Phe	Met	Glu	Gly	Asp	His	Ile	Val	Asp	Val	Gly	Ser	Gly	Val	Gly	Gly
		195					200					205			
Pro	Ala	Arg	Asn	Met	Val	Arg	Leu	Thr	Arg	Ser	Asn	Val	Ile	Gly	Val
	210					215					220				
Asn	Asn	Asn	Asp	Tyr	Gln	Ile	Ser	Arg	Ala	Arg	Arg	His	Asp	Ala	Leu
225					230					235					240
Ala	Gly	Met	Ser	Ser	Lys	Ile	Asp	Tyr	Val	Lys	Thr	Asp	Phe	Ser	Asn
				245					250					255	
Met	Ser	Leu	Ala	Asp	Asn	Thr	Phe	Asp	Gly	Ala	Tyr	Ala	Ile	Glu	Ala
			260					265					270		
Thr	Ser	His	Ala	Lys	Asp	Lys	Val	Lys	Ser	Tyr	Ser	Glu	Val	Phe	Arg
		275					280						285		
Val	Ile	Lys	Pro	Gly	Thr	Ser	Phe	Val	Leu	Tyr	Glu	Trp	Ser	Met	Thr
	290					295					300				
Asp	Lys	Tyr	Asn	Pro	Asn	Asp	Glu	Tyr	His	Arg	Thr	Ile	Lys	His	Arg
305					310					315					320
Ile	Glu	Leu	Gly	Asp	Gly	Leu	Pro	Glu	Met	Glu	Thr	Ser	Lys	Gln	Val
				325					330					335	
Ile	Glu	Tyr	Met	Lys	Gln	Ala	Gly	Phe	Val	Val	Glu	Glu	Ala	Ile	Asp
			340					345					350		
Val	Ile	Ser	Gln	Phe	Glu	Ser	Ser	Pro	Ile	Lys	Ser	Ile	Pro	Trp	Tyr
		355					360						365		
Gln	Pro	Leu	Val	Gly	Asp	Tyr	Ser	Ser	Leu	Gln	Gly	Leu	Arg	Ser	Thr
	370					375					380				
Pro	Ile	Gly	Arg	Ile	Leu	Thr	Asn	Val	Met	Ser	Arg	Val	Leu	Glu	Phe
385					390					395					400
Val	Arg	Leu	Ala	Pro	Lys	Gly	Thr	Tyr	Lys	Ala	Thr	Glu	Ile	Leu	Glu
			405						410					415	
Glu	Ala	Ala	Glu	Ser	Leu	Val	Val	Gly	Gly	Gln	Leu	Gly	Ile	Phe	Thr
			420					425					430		
Pro	Ser	Phe	Tyr	Ile	Arg	Ala	Arg	Lys	Pro	Ser	Lys	Gln	Ala	Gly	Ser
		435					440					445			
Glu	Pro	His	Lys	Ala	Ala	Val	Asp	Val	Gly	Pro	Leu	Ser	Val	Gly	Pro
	450					455					460				
Gln	Ser	Val	Gly	Pro	Leu	Ser	Val	Gly	Pro	Gln	Ala	Val	Gly	Pro	Leu
465					470					475					480
Ser	Val	Gly	Pro	Gln	Ser	Val	Gly	Pro	Leu	Ser	Val	Gly	Pro	Gln	Ala
				485					490					495	
Val	Gly	Pro	Leu	Ser	Val	Gly	Pro	Gln	Ser	Val	Gly	Pro	Leu	Ser	Val
			500					505					510		
Gly	Pro	Leu	Ser	Val	Gly	Pro	Gln	Ser	Val	Gly	Pro	Leu	Ser	Val	Gly
		515					520						525		
Ser	Gln	Ser	Val	Gly	Pro	Leu	Ser	Val	Gly	Pro	Gln	Ser	Val	Gly	Pro
	530					535					540				
Leu	Ser	Val	Gly	Pro	Gln	Ala	Val	Gly	Pro	Leu	Ser	Val	Gly	Pro	Gln
545					550					555					560
Ser	Val	Gly	Pro	Leu	Ser	Val	Gly	Pro	Gln	Ala	Val	Gly	Pro	Leu	Ser
				565					570					575	
Val	Gly	Pro	Gln	Ser	Val	Gly	Pro	Leu	Ser	Val	Gly	Pro	Gln	Ser	Val
			580					585					590		
Gly	Pro	Leu	Ser	Val	Gly	Ser	Gln	Ser	Val	Gly	Pro	Leu	Ser	Val	Gly
		595					600						605		
Pro	Gln	Ser	Val	Gly	Pro	Leu	Ser	Val	Gly	Pro	Gln	Ser	Val	Gly	Pro
	610					615							620		
Leu	Ser	Val	Gly	Pro	Gln	Ser	Val	Gly	Pro	Leu	Ser	Val	Gly	Pro	Gln
625					630					635					640
Ser	Val	Gly	Pro	Leu	Ser	Val	Gly	Pro	Gln	Ser	Val	Asp	Val	Ser	Pro
				645					650					655	
Val	Ser	Gly	Ser												
			660												

<210> 36
 <211> 1990
 5 <212>ADN
 <213> Secuencia artificial

ES 2 528 928 T3

<220>

<223> Secuencia nucleotídica de KSA (sin Cys) clonada en NdeI/EcoRI en pET29

<400> 36

5

```

catatggcca ccacgtacga ggagtttagc gogaagctgg accgcctgga tgaggagttc 60
aaccgcaaga tgcaggagca gaacgccaaag ttctttgcgg acaagccgga tgagagcacg 120
ctgagcccgg agatgaagga gcactacgag aagttcgagc gcatgatcaa ggaacacacc 180
gagaagttca acaagaagat gcacgagcac agcgagcact tcaagcagaa gttcgccgag 240
ctgctggagc agcagaagc ggcgcagtac ccgagcaaga ctagtagcgc cggtgccgt 300
gagaccgcgc cgacgaacct gattcgtcgc cgcaacaagg acgagaccaa cggcgatgtc 360
agcgcccgcc cgcaccgctt ccgcgaccgc ttcgagaagg caaccctgga ggagcgcaag 420
gccgccacca cgacgatggt caacgagtac tacgacctgg tgacggactt ctaccgagtac 480
ggctggggcc agaactcca tttcgcgcgg cgctacgccg gcgagacctt cttcgagagc 540
gtggcgcgac acgagtactt cctggccgcg cgcggcggct tcatggaggg cgaccacatc 600
gtcgacgtgg gcagcggcgt cggcggctcg ggcgcaaca tggttcgctt gacgcgcgagc 660
aacgtcatcg gcgtcaacaa caacgattac cagatcagcc gcgcgcgccc tcatgacgcg 720
ctggccggtg tgagcagcaa gatcgactac gtcaagaccg acttcagcaa catgagcctg 780
gccgacaaca ctttcgacgg cgcctacgcc atcgaggcca ccagccacgc aaaggacaag 840
gtcaagagct atagcaggt cttccgtgtc atcaagccgg gcaccagctt tgtcctgtac 900
gagtgagca tgaccgaaa gtacaaccgg aatgacgagt accaccgcac catcaagcac 960
cgcacgcagc tgggcgacgg cctgccggag atggagacga gcaaacaggt gatcgagtac 1020
atgaagcagg ccggcttcgt ggtggaggag gccattgacg tcatcagcca gttcgagagc 1080
agcccgatca agagcatccc gtggtaccag ccgctggtcg gcgactatag cagcctgcag 1140
ggcctgcgca gcaccccgat tggccgcatc ctgacgaacg tcatgagccg cgtgctggag 1200
ttcgtgcgcc tggcgcgcaa gggcacgtac aaggcgacgg agattctgga ggaggcggcg 1260
gaaagcctgg tggtgggcgg tcagctgggc atcttcacgc cgagcttcta catccgcgcg 1320
cgcaagccga gcaagcaggc gggatccgag ccgcacaagg cggccggtga cgtcggcccc 1380
ctgagcgttg gcccgagag cgtcggcccc ctgagcgttg gcccgagggc ggttggcccc 1440
ctgagcgttg gcccgagag cgtcggcccc ctgagcgttg gcccgagggc ggttggcccc 1500
ctgagcgttg gcccgagag cgttggcccc ctgagcgttg gcccgctgag cgttggcccc 1560
cagagcgttg gcccgctgag cgttggcagc cagagcgtcg gcccgctgag cgttggcccc 1620
cagagcgtcg gcccgctgag cgttggcccc caggcgggtg gcccgctgag cgttggcccc 1680
cagagcgtcg gcccgctgag cgttggcccc caggcgggtg gcccgctgag cgttggcccc 1740
cagagcgttg gcccgctgag cgttggcccc cagagcgttg gcccgctgag cgttggcccc 1800
cagagcgtcg gcccgctgag cgttggcccc cagagcgtcg gcccgctgag cgttggcccc 1860
cagagcgtcg gcccgctgag cgttggcccc cagagcgtcg gcccgctgag cgttggcccc 1920
cagagcgttg gcccgctgag cgttggcccc cagagcgttg acgttagccc ggtgagcgga 1980
tcctgaattc
    
```

<210> 37

<211> 978

10 <212>PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia aminoacídica de la poliproteína de fusión KSAC original (sin Cys)

15

<400> 37

```

Met Ala Thr Thr Tyr Glu Glu Phe Ser Ala Lys Leu Asp Arg Leu Asp
 1           5           10           15
Glu Glu Phe Asn Arg Lys Met Gln Glu Gln Asn Ala Lys Phe Phe Ala
          20           25           30
    
```

ES 2 528 928 T3

Asp Lys Pro Asp Glu Ser Thr Leu Ser Pro Glu Met Lys Glu His Tyr
 35 40 45
 Glu Lys Phe Glu Arg Met Ile Lys Glu His Thr Glu Lys Phe Asn Lys
 50 55 60
 Lys Met His Glu His Ser Glu His Phe Lys Gln Lys Phe Ala Glu Leu
 65 70 75 80
 Leu Glu Gln Gln Lys Ala Ala Gln Tyr Pro Ser Lys Thr Ser Ser Ala
 85 90 95
 Gly Gly Arg Glu Thr Ala Pro Thr Asn Leu Ile Arg Arg Arg Asn Lys
 100 105 110
 Asp Glu Thr Asn Gly Asp Val Ser Ala Ala Ala Asp Arg Phe Arg Asp
 115 120 125
 Arg Phe Glu Lys Ala Thr Leu Glu Glu Arg Lys Ala Ala Thr Thr Thr
 130 135 140
 Met Val Asn Glu Tyr Tyr Asp Leu Val Thr Asp Phe Tyr Glu Tyr Gly
 145 150 155 160
 Trp Gly Gln Asn Phe His Phe Ala Pro Arg Tyr Ala Gly Glu Thr Phe
 165 170 175
 Phe Glu Ser Leu Ala Arg His Glu Tyr Phe Leu Ala Ala Arg Gly Gly
 180 185 190
 Phe Met Glu Gly Asp His Ile Val Asp Val Gly Ser Gly Val Gly Gly
 195 200 205
 Pro Ala Arg Asn Met Val Arg Leu Thr Arg Ser Asn Val Ile Gly Val
 210 215 220
 Asn Asn Asn Asp Tyr Gln Ile Ser Arg Ala Arg Arg His Asp Ala Leu
 225 230 235 240
 Ala Gly Met Ser Ser Lys Ile Asp Tyr Val Lys Thr Asp Phe Ser Asn
 245 250 255
 Met Ser Leu Ala Asp Asn Thr Phe Asp Gly Ala Tyr Ala Ile Glu Ala
 260 265 270
 Thr Ser His Ala Lys Asp Lys Val Lys Ser Tyr Ser Glu Val Phe Arg
 275 280 285
 Val Ile Lys Pro Gly Thr Ser Phe Val Leu Tyr Glu Trp Ser Met Thr
 290 295 300
 Asp Lys Tyr Asn Pro Asn Asp Glu Tyr His Arg Thr Ile Lys His Arg
 305 310 315 320
 Ile Glu Leu Gly Asp Gly Leu Pro Glu Met Glu Thr Ser Lys Gln Val
 325 330 335
 Ile Glu Tyr Met Lys Gln Ala Gly Phe Val Val Glu Glu Ala Ile Asp
 340 345 350
 Val Ile Ser Gln Phe Glu Ser Ser Pro Ile Lys Ser Ile Pro Trp Tyr
 355 360 365
 Gln Pro Leu Val Gly Asp Tyr Ser Ser Leu Gln Gly Leu Arg Ser Thr
 370 375 380
 Pro Ile Gly Arg Ile Leu Thr Asn Val Met Ser Arg Val Leu Glu Phe
 385 390 395 400
 Val Arg Leu Ala Pro Lys Gly Thr Tyr Lys Ala Thr Glu Ile Leu Glu
 405 410 415
 Glu Ala Ala Glu Ser Leu Val Val Gly Gly Gln Leu Gly Ile Phe Thr
 420 425 430
 Pro Ser Phe Tyr Ile Arg Ala Arg Lys Pro Ser Lys Gln Ala Gly Ser
 435 440 445
 Glu Pro His Lys Ala Ala Val Asp Val Gly Pro Leu Ser Val Gly Pro
 450 455 460
 Gln Ser Val Gly Pro Leu Ser Val Gly Pro Gln Ala Val Gly Pro Leu
 465 470 475 480
 Ser Val Gly Pro Gln Ser Val Gly Pro Leu Ser Val Gly Pro Gln Ala
 485 490 495
 Val Gly Pro Leu Ser Val Gly Pro Gln Ser Val Gly Pro Leu Ser Val
 500 505 510
 Gly Pro Leu Ser Val Gly Pro Gln Ser Val Gly Pro Leu Ser Val Gly

ES 2 528 928 T3

<223> Secuencia nucleotídica de KSAC original (sin Cys) clonado en NdeI/HindIII en pET29

<400> 38

```

catatggcca ccacgtacga ggagtttagc gccaagctgg accgcctgga tgaggagttc 60
aaccgcaaga tgcaggagca gaacgccaag ttctttgcgg acaagccgga tgagagcacg 120
ctgagcccgg agatgaagga gcaactacgag aagttcagac gcatgatcaa ggaacacacc 180
gagaagtcca acaagaagat gcacgagcac agcagagcact tcaagcagaa gttcgcgag 240
ctgctggagc agcagaaggc ggcgagctac ccgagcaaga ctagttagcgc cggtagccgt 300
gagaccgagc cgacgaacct gattcgtcgc cgcaacaagg acgagaccaa cggcgatgtc 360
agcgcgcccg ccgaccgctt ccgagaccgc ttogagaagg caaccctgga ggagcgcaag 420
gccgccacca cgacgatggt caacgagtac tacgacctgg tgacggactt ctacgagtac 480
ggctggggcc agaacttcca tttcgcgccc cgctacgccc gcgagacctt cttcgagagc 540
ctggcgcgcc acgagtactt cctggcgcgc cgcgccggct tcatggaggg cgaccacatc 600
gtcagcgtgg gcacggcgt cgggcgtccg gcgcgcaaca tggttcgcct gacgcgcagc 660
aacgtcatcg gcgtcaacaa caacgattac cagatcagcc gcgcgcgccg tcatgagcgt 720
ctggccggtg tgagcagcaa gatcgactac gtcaagaccg acttcagcaa catgagcctg 780
gccgacaaca ccttcgacgg cgactacgcc atcgaggcca ccagccacgc aaaggacaag 840
gtcaagagct atagcgaggt cttccgtgtc atcaagccgg gcaccagctt tgtcctgtac 900
gagtgagca tgaccgacaa gtacaaccgg aatgacgagt accaccgcac catcaagcac 960
cgcacgagc tgggagcagc cctgccggag atggagacga gcaaacaggt gatcgagtac 1020
atgaagcagg ccggcttcgt ggtggaggag gccattgacg tcatcagcca gttcgagagc 1080
agcccgatca agagcatccc gtggtaccag ccgctggtcg gcgactatag cagcctgcag 1140
ggcctgcgca gcaccccgat tggccgcatc ctgacgaacg tcatgagccg cgtgctggag 1200
ttcgtgcgcc tggcgccgaa gggcacgtac aaggcgagcg agattctgga ggagcgggcg 1260
gaaagcctgg tgggtggcgg tcagctgggc atcttcacgc cgagcttcta catccgcgcg 1320
cgcaagccga gcaagcaggc gggatccgag ccgcacaagg cggccgttga cgtcggcccg 1380
ctgagcgttg gcccgagag cgtcggcccg ctgagcgttg gcccgagggc ggttggcccg 1440
ctgagcgttg gcccgagag cgtcggcccg ctgagcgttg gcccgagggc ggttggcccg 1500
ctgagcgttg gcccgagag cgttggcccg ctgagcgttg gcccgctgag cgttggcccg 1560
cagagcgttg gcccgctgag cgttggcagc cagagcgtcg gcccgctgag cgttggctcg 1620
cagagcgtcg gcccgctgag cgttggcccg caggcggttg gcccgctgag cgttggcccg 1680
cagagcgtcg gcccgctgag cgttggcccg cagagcgttg gcccgctgag cgttggcagc 1740
cagagcgtcg gcccgctgag cgttggcccg cagagcgttg gcccgctgag cgttggcagc 1800
cagagcgtcg gcccgctgag cgttggctcg cagagcgtcg gcccgctgag cgttggcccg 1860
cagagcgtcg gcccgctgag cgttggcccg cagagcgtcg gcccgctgag cgttggctcg 1920
cagagcgttg gcccgctgag cgttggcccg cagagcgttg acgttagccc ggtgagcggg 1980
tccgaattcg atgcggtgga ctggcgagc aaggcgcccg tgacgcccgt gaagaatcaa 2040
ggcgcgagcg gcagcagctg ggcgttcagc gcggtcggca acatcgagag ccagtgggcc 2100
cgtgccggcc acggcctggt gagcctgagc gagcagcagc tggtagagcag cgatgacaaa 2160
gacaatggca gcaacggcgg cctgatgctg caggcgttcg agtggctgct gcgccacatg 2220
tacggcatcg tgttcacgga gaagagctac ccgtacacga gcggcaacgg tgatgtggcc 2280
gagagcctga acagcagcaa actggttcgg ggcgcgcaaa tcgacggcta cgtgatgatc 2340
ccgagcaacg aaacggttat ggcgcgctgg ctggcggaga atggcccgat cgcgattgag 2400
gtcgacgcca gcagcttcat gagctaccag agcggcgtgc tgaccagcag cgcgggagat 2460
gcaactgaacc acggcgtgct gctggtcggc tacaacaaga ccggtggcgt tccgtactgg 2520
gtgatcaaga acagctgggg tgaggactgg ggcgagaagg gctacgtgag cgtggtcatg 2580
ggcctgaacg cgagcctgct gagcgaatac ccggtgagcg cgcagcctg cgcagcctg 2640
accccgggcc cgggcacgga gagcgaggag cgcgccccga aacgcgtgac ggtggagcag 2700
atgatgagca ccgatatgta cagccgcgag ggcagcaaga agagcctgct gaccgcgaac 2760
gtgagctaca agaacggcgg cggcggcagc agcatgacga agagcggctc gcagaaggtg 2820
ctgatgagca gctacagcaa cccgatagc tttggtccgg gcctgagcct ggagaccccg 2880
gatggcaaga gcgcgcccgt cttcctgggc agcatcatga acaccagcca gtacacgtaa 2940
aagctt 2946

```

5

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido de fusión que comprende una porción inmunogénica de al menos cuatro antígenos de *Leishmania*, en el que los antígenos de *Leishmania* son KMP11, SMT, A2 y CPB, en el que el polipéptido de fusión
5 comprende una secuencia aminoacídica exhibida en una cualquiera de las SEQ ID NO: 23, 33 o 37, o una secuencia que tiene al menos un 97 % de identidad con la misma; y en el que el polipéptido de fusión es capaz de inducir una respuesta inmunitaria protectora para prevenir la leishmaniosis o reducir la gravedad de la leishmaniosis en un mamífero.
- 10 2. El polipéptido de fusión de la reivindicación 1, en el que el polipéptido de fusión comprende una secuencia aminoacídica exhibida en la SEQ ID NO: 37, o una secuencia que tiene al menos un 97 % de identidad con la misma.
3. El polipéptido de fusión de la reivindicación 1, en el que el polipéptido de fusión comprende una
15 secuencia aminoacídica exhibida en la SEQ ID NO: 33, o una secuencia que tiene al menos un 97 % de identidad con la misma.
4. El polipéptido de fusión de la reivindicación 1, en el que el polipéptido de fusión comprende una
20 secuencia aminoacídica exhibida en la SEQ ID NO: 23, o una secuencia que tiene al menos un 97 % de identidad con la misma.
5. El polipéptido de fusión de la reivindicación 1, en el que el polipéptido de fusión comprende una secuencia aminoacídica exhibida en la SEQ ID NO: 23.
- 25 6. El polipéptido de fusión según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la leishmaniosis está causada por infección por *L. major*, *L. infantum* y/o *L. donovani*.
7. Un polinucleótido aislado que codifica un polipéptido de fusión de la reivindicación 1.
- 30 8. Una composición que comprende al menos un componente seleccionado del grupo consistente en un polipéptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 y un polinucleótido según la reivindicación 7, en combinación con al menos un inmunoestimulante.
9. La composición según la reivindicación 8, en la que el inmunoestimulante se selecciona del grupo
35 consistente en un oligonucleótido que contiene CpG, lípido A sintético, MPL™, 30-MPL™, saponinas, miméticos de saponina, AGP, agonistas de receptores de tipo Toll o una combinación de los mismos.
10. La composición según la reivindicación 8, en la que el inmunoestimulante se selecciona del grupo
40 consistente en un agonista de TLR4, un agonista de TLR7/8 y un agonista de TLR9.
11. La composición según la reivindicación 8, en la que el inmunoestimulante se selecciona del grupo
consistente en GLA, oligonucleótido que contiene CpG, imiquimod, gardiquimod y resiquimod.
12. La composición según la reivindicación 8 para uso en la estimulación de una respuesta inmunitaria
45 frente a leishmaniosis en un mamífero.
13. La composición según la reivindicación 8 para uso en la inducción de inmunidad protectora frente a leishmaniosis en un mamífero.
- 50 14. La composición según la reivindicación 8 para uso en la inducción de inmunidad protectora frente a leishmaniosis en un canino, en la que el inmunoestimulante es GLA y en la que la composición se formula como una emulsión de aceite en agua estable.
15. La composición para uso según la reivindicación 14, en la que la composición comprende
55 adicionalmente al menos un componente seleccionado de un agonista de TLR7/8 y un agonista de TLR9.
16. La composición para uso según la reivindicación 15, en la que el agonista de TLR7/8 se selecciona del grupo consistente en imiquimod, gardiquimod y resiquimod, y el agonista de TLR9 es un oligonucleótido que
60 contiene CpG.
17. La composición para uso según la reivindicación 14, en la que la composición comprende un polipéptido de fusión KSAC que tiene una secuencia aminoacídica exhibida en una cualquiera de las SEQ ID NO: 23, 33 o 37.

18. La composición para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 17, en la que la leishmaniosis está causada por infección por *L. major*, *L. infantum* y/o *L. donovani*.

19. Un procedimiento para detectar infección por *Leishmania* en una muestra biológica, que comprende:

5

a) poner en contacto una muestra biológica con un polipéptido de fusión de la reivindicación 1; y

b) detectar en la muestra biológica la presencia de anticuerpos que se unen al polipéptido de fusión, detectando así infección por *Leishmania* en una muestra biológica.

10

20. El procedimiento de la reivindicación 19, en el que la muestra biológica se selecciona del grupo consistente en sueros, sangre y saliva.

21. El procedimiento de la reivindicación 19, en el que el polipéptido de fusión comprende una secuencia aminoacídica exhibida en una cualquiera de las SEQ ID NO: 23, 33 o 37.

15

22. El procedimiento de la reivindicación 19, en el que el polipéptido de fusión está unido a un soporte sólido.

20

23. Un kit de diagnóstico para detectar infección por *Leishmania* en una muestra biológica, que comprende:

a) un polipéptido de fusión de la reivindicación 1; y

25

b) un reactivo de detección.

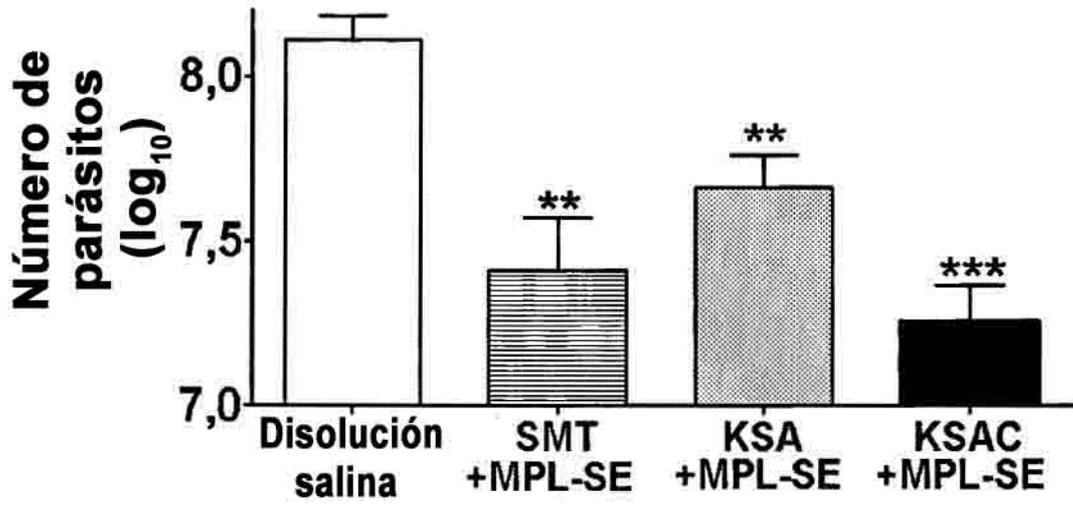


Fig. 1

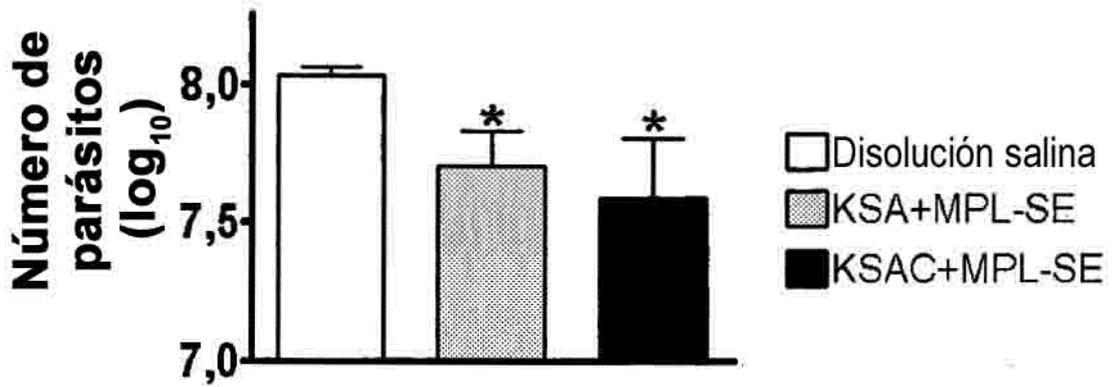


Fig. 2

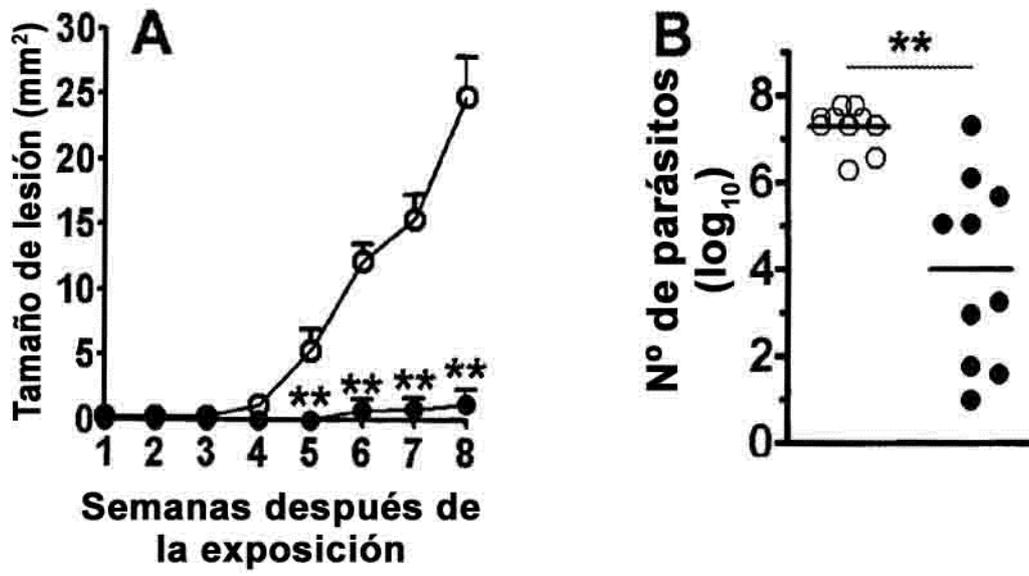


Fig. 3

ATGGCCACCACGTACGAGGAGTTTTCGGCGAAGCTGGACCGCCTGGATG
 AGGAGTTCAACAGGAAGATGCAGGAGCAGAACGCCAAGTTCTTTGCGGA
 CAAGCCGGATGAGTCGACGCTGTCGCCCGAGATGAAGGAGCACTACGAG
 AAGTTCGAGCGCATGATCAAGGAACACACAGAGAAGTTCAACAAGAAGAT
 GCACGAGCACTCGGAGCACTTCAAGCAGAAGTTCGCCGAGCTGCTCGAG
 CAGCAGAAGGCTGCGCAGTACCCGTCCAAG(ACTAGT)TCCGCCGGTGGC
CGTGAGACCGCGCCGACGAACCTGATTCGTCGCCGCAACAAGGACGAGA
CAAACGGGGATGTCAGCGCCGCCGCCGACCGCTTCCGCGACCGCTTCG
AGAAGGCAACCCTCGAGGAGCGCAAGGCCGCCACCACGACGATGGTCAA
CGAGTACTACGACCTGGTGACGGACTTCTACGAGTACGGCTGGGGCCAG
AACTTCCATTTCCGCGCCGCGCTACGCCGGCGAGACCTTCTTCGAGTCCCT
CGCGCGCCACGAGTACTTCTGGCCGCTCGCGGGCGGCTTCATGGAGGG
CGACCACATCGTCGACGTGGGCTGCGGGCTCGGGCGTCCGGCGCGCAA
CATGGTTCGCCTCACGCGCTGCAACGTCATCGGCGTCAACAACAACGATT
ACCAGATCAGCCGCGCTCGCCGTCATGACGCGCTCGCCGGTATGAGCTC
CAAGATCGACTACGTCAAGACCGACTTCTGCAACATGAGCTTAGCCGACA
ACACCTTCGACGGCGCCTACGCCATCGAGGCCACCTGCCACGCAAAGGA
CAAGGTCAAGTGCTATAGCGAGGTCTTCCGTGTCATCAAGCCCGGCACCT
GCTTTGTCCTGTACGAGTGGTGCATGACCGACAAGTACAACCCCAATGAC
GAGTACCACCGCACAAATCAAGCACCGCATCGAGCTGGGCGACGGCCTGC
CGGAGATGGAGACGTGCAAACAGGTGATCGAGTACATGAAGCAGGCCGG
CTTCGTGGTGGAGGAGGCCATAGACGTCATCAGTCAGTTCGAGTCCAGC
CCCATCAAGAGTATCCCGTGGTACCAGCCGCTGGTCCGGCGACTATTCGT
CCCTGCAGGGCCTGCGCTCTACCCCGATTGGCCGCATCCTCACGAACGT
CATGTGTCGCGTGCTGGAGTTCGTGCGCCTAGCTCCGAAGGGCACGTAC
AAGGCGACGGAGATTTTGGAGGAGGCTGCGGAAAGCCTGGTGGTGGGC
GGTCAGCTCGGCATCTTACGCCGTCTTCTACATCCGCGCTCGCAAGC
CGTCCAAGCAGGCT(GGATCC)GAGCCGCACAAGGCGGCCGTTGACGTC
GGCCCGCTCTCCGTTGGCCCGCAGTCCGTCCGCCCGCTCTCTGTTGGCC
CGCAGGCTGTTGGCCCGCTCTCCGTTGGCCCGCAGTCCGTCCGCCCGC
TCTCTGTTGGCCCGCAGGCTGTTGGCCCGCTCTCTGTTGGCCCGCAGTC
CGTTGGCCCGCTCTCCGTTGGCCCGCTCTCCGTTGGCCCGCAGTCTGTT
GGCCCGCTCTCCGTTGGCTCGCAGTCCGTCCGCCCGCTCTCTGTTGGTC
CGCAGTCCGTCCGCCCGCTCTCCGTTGGCCCGCAGGCTGTTGGCCCGC
TCTCCGTTGGCCCGCAGTCCGTCCGCCCGCTCTCTGTTGGCCCGCAGGC
TGTTGGCCCGCTCTCTGTTGGCCCGCAGTCCGTTGGCCCGCTCTCCGTT
GGCCCGCAGTCTGTTGGCCCGCTCTCCGTTGGCTCGCAGTCCGTCCGCC
CGCTCTCTGTTGGTCCGCAGTCCGTCCGCCCGCTCTCCGTTGGCCCGCA
GTCTGTCGGCCCGCTCTCCGTTGGCCCGCAGTCCGTCCGCCCGCTCTCC
GTTGGTCCGCAGTCCGTTGGCCCGCTCTCCGTTGGCCCGCAGTCCGTTG
ACGTTTCTCCGGTGTCT(GGATCCGAATTC)TAA

Fig. 4

ATGGCCACCACGTACGAGGAGTTTTCGGCCGAAGCTGGACCGCCTGGAT
GAGGAGTTCAACAGGAAGATGCAGGAGCAGAACGCCAAGTTCTTTGCG
GACAAGCCGGATGAGTCGACGCTGTGCCCGAGATGAAGGAGCACTA
CGAGAAGTTCGAGCGCATGATCAAGGAACACACAGAGAAGTTCAACAA
GAAGATGCACGAGCACTCGGAGCACTTCAAGCAGAAGTTCGCCGAGCT
GCTCGAGCAGCAGAAGGCTGCGCAGTACCCGTCCAAG(ACTAGT)TCC
GCCGGTGGCCGTGAGACCCGCGCCGACGAACCTGATTTCGTGCGCCGCAA
CAAGGACGAGACAAACGGGGATGTCAGCGCCGCCGCCGACCGCTTCC
GCGACCGCTTCGAGAAGGCAACCCTCGAGGAGCGCAAGGCCGCCACC
ACGACGATGGTCAACGAGTACTACGACCTGGTGACGGACTTCTACGAG
TACGGCTGGGGCCAGAACTTCCATTTTCGCGCCGCGCTACGCCGGCGA
GACCTTCTTCGAGTCCCTCGCGCGCCACGAGTACTTCTGGCCGCTCG
CGGCGGCTTCATGGAGGGCGACCACATCGTCGACGTGGGCTGCGGGC
TCGGCGGTCCGGCGCGCAACATGGTTCGCCTCACGCGCTGCAACGTC
ATCGGCGTCAACAACAACGATTACCAGATCAGCCGCGCTCGCCGTCAT
GACGCGCTCGCCGGTATGAGCTCCAAGATCGACTACGTCAAGACCGAC
TTCTGCAACATGAGCTTAGCCGACAACACCTTCGACGGCGCCTACGCC
ATCGAGGCCACCTGCCACGCAAAGGACAAGGTCAAGTGCTATAGCGAG
GTCTTCCGTGTCATCAAGCCCGGCACCTGCTTTGTCTGTACGAGTGG
TGCATGACCGACAAGTACAACCCCAATGACGAGTACCACCGCACAAATC
AAGCACCGCATCGAGCTGGGCGACGGCCTGCCGGAGATGGAGACGTG
CAAACAGGTGATCGAGTACATGAAGCAGGCCGGCTTCGTGGTGGAGG
AGGCCATAGACGTATCAGTCAGTTCGAGTCCAGCCCCATCAAGAGTA
TCCCGTGGTACCAGCCGCTGGTTCGGCGACTATTCGTCCCTGCAGGGC
CTGCGCTTACCCCGATTGGCCGCATCCTCACGAACGTATGTGTCCG
GTGCTGGAGTTCGTGCGCCTAGCTCCGAAGGGCACGTACAAGGCGAC
GGAGATTTTGGAGGAGGCTGCGGAAAGCCTGGTGGTGGGCGGTGAGC
TCGGCATCTTCACGCCGTCTTCTACATCCGCGCTCGCAAGCCGTCCA
AGCAGGCT(GGATCC)GAGCCGCACAAGGCCGGCCGTTGACGTGCGCC
CGCTCTCCGTTGGCCCGCAGTCCGTGCGCCCGCTCTCTGTTGGCCCG
CAGGCTGTTGGCCCGCTCTCCGTTGGCCCGCAGTCCGTGCGCCCGCT
CTCTGTTGGCCCGCAGGCTGTTGGCCCGCTCTCTGTTGGCCCGCAGT
CCGTTGGCCCGCTCTCCGTTGGCCCGCTCTCCGTTGGCCCGCAGTCT
GTTGGCCCGCTCTCCGTTGGCTCGCAGTCCGTGCGCCCGCTCTCTGTT
GGTCCGAGTCCGTGCGCCCGCTCTCCGTTGGCCCGCAGGCTGTTGG
CCCGCTCTCCGTTGGCCCGCAGTCCGTGCGCCCGCTCTCTGTTGGCC
CGCAGGCTGTTGGCCCGCTCTCTGTTGGCCCGCAGTCCGTTGGCCCG
CTCTCCGTTGGCCCGCAGTCTGTTGGCCCGCTCTCCGTTGGCTCGCA
GTCCGTGCGCCCGCTCTCTGTTGGTCCGAGTCCGTGCGCCCGCTCT
CCGTTGGCCCGCAGTCTGTGCGCCCGCTCTCCGTTGGCCCGCAGTCC
GTCGGCCCGCTCTCCGTTGGTCCGAGTCCGTTGGCCCGCTCTCCGT
TGGCCCGCAGTCCGTTGACGTTTCTCCGGTGTCT(GGATCCGAATTC)G
ATGCGGTGGACTGGCGCGAGAAGGGCGCCGTGACGCCGGTGAAGAAT
CAAGGCGCGTGCGGGTCGTGCTGGGCGTTCTCGGCGG

Fig. 5A

TCGGCAACATCGAGTCGCAGTGGGCCCGTGCCGGCCACGGCTTGGTG
AGCCTGTCGGAGCAGCAGCTGGTGAGCTGCGATGACAAAGACAATGG
CTGCAACGGCGGGCTGATGCTGCAGGCGTTCGAGTGGCTGCTGCGAC
ACATGTACGGGATCGTGTTACGGAGAAGAGCTACCCCTACACGTCCG
GCAACGGTGATGTGGCCGAGTGCTTGAACAGCAGTAAACTCGTTCCCG
GCGCGCAAATCGACGGCTACGTGATGATCCCGAGCAACGAAACGGTTA
TGGCTGCGTGGCTTGCGGAGAATGGCCCCATCGCGATTGCGGTGAC
GCCAGCTCCTTCATGTCTTACCAGAGCGGCGTGCTGACCAGCTGCGCT
GGCGATGCACTGAACCACGGCGTGCTGCTCGTCGGGTACAACAAGAC
CGGTGGGGTTCCGTACTIONGGTGATCAAGAACTCGTGGGGTGAGGACT
GGGGCGAGAAGGGCTACGTGCGCGTGGTCATGGGGCTGAACGCGTGC
CTGCTCAGTGAATACCCCGTGTCCGCGCATGTGCCGCGGAGTCTCACC
CCTGGCCCGGGCACGGAGAGCGAGGAGCGCGCCCCCTAACGGGTGA
CGGTGGAGCAGATGATGTGCACCGATATGTACTIONCAGGGAGGGGTGC
AAGAAGAGTCTTCTCACCGCGAACGTGTGCTACAAGAACGGGGGAGGC
GGCTCCTCTATGACGAAGTGCGGTCCGCAGAAGGTGCTGATGTGCTCG
TACTCGAACCCCTCATTGCTTTGGTCCCTGGGCTGTGCCTCGAGACTCCT
GATGGCAAGTGCGCGCCGTACTIONCTTGGGCTCGATCATGAACACCTGC
CAGTACACGTAA

Fig. 5B

MATTYEEFSAKLDRLDEEFNRKMQEQNAKFFADKPDESTLSPEMKEHYEK
FERMIKEHTEKFNKKMHEHSEHFQKQFAELLEQQKAAQYPSK(TS)SAGGR
ETAPTNLIRRRNKDETNGDVSAADRFRDRFEKATLEERKAATTTMVNEY
DLVTDIFYEYGWGQNFHFAPRYAGETFFESLARHEYFLAARGGFMEGDHIV
DVGCGVGGPARNMVRLTRCNVIGVNNNDYQISRARRHDALAGMSSKIDYV
KTDFCNMSLADNTFDGAYAIEATCHAKDKVKCYSEVFRVIKPGTCFVLYEW
CMTDKYNPNDEYHRTIKHRIELGDGLPEMETCKQVIEYMKQAGFVVEEAID
VISQFESSPIKSIPWYQPLVGDYSSLQGLRSTPIGRILTVMCRVLEFVRLAP
KGTYKATEILEEAAESLVVGGQLGIFTPSFYIRARKPSKQA(GS)EPHKAAVD
VGPLSVGPQSVGPLSVGPQAVGPLSVGPQSVGPLSVGPQAVGPLSVGPQ
SVGPLSVGPLSVGPQSVGPLSVGSQSVGPLSVGPQSVGPLSVGPQAVGP
LSVGPPQSVGPLSVGPQAVGPLSVGPQSVGPLSVGPQSVGPLSVGSQSVG
PLSVGPQSVGPLSVGPQSVGPLSVGPQSVGPLSVGPQSVGPLSVGPQSV
DVSPVS(GSEF)

Fig. 6

MATTYEEFSAKLDRLDEEFNRKMQEQNAKFFADKPDESTLSPEMKEHYEKFE
RMKEHTEKFNKKMHEHSEHFQKQFAELLEQQKAAQYPSK(TS)SAGGRETAPT
NLIRRRNKDETNGDVSAADRFRDRFEKATLEERKAATTTMVNEYDDLVTDFY
EYGWGQNFHFAPRYAGETFFESLARHEYFLAARGGFMEGDHIVDVGCGVGG
PARNMVRLTRCNVIGVNNNDYQISRARRHDALAGMSSKIDYVKTDFCNMSLAD
NTFDGAYAIEATCHAKDKVKCYSEVFRVIKPGTCFVLYEWCMTDKYNPNDEYH
RTIKHRIELGDGLPEMETCKQVIEYMKQAGFVVEEAIDVISQFESSPIKSIPWYQ
PLVGDYSSLQGLRSTPIGRILTVMCRVLEFVRLAPKGTYKATEILEEAAESLVV
GGQLGIFTPSFYIRARKPSKQA(GS)EPHKAAVDVGPLSVGPQSVGPLSVGPQ
AVGPLSVGPQSVGPLSVGPQAVGPLSVGPQSVGPLSVGPLSVGPQSVGPLS
VGSQSVGPLSVGPQSVGPLSVGPQAVGPLSVGPQSVGPLSVGPQAVGPLSV
GPQSVGPLSVGPQSVGPLSVGSQSVGPLSVGPQSVGPLSVGPQSVGPLSVG
PQSVGPLSVGPQSVGPLSVGPQSVDVSPVS(GSEF)DAVDWREKGAVTPVKN
QGACGSCWAFSAVGNIESQWARAGHGLVSLSEQQLVSCDDKDNCGNGLML
QAFEWLLRHMYGIVFTEKSYPYTSNGDVAECLNSSKLVPGAQIDGYVMIPSN
ETVMAAWLAENGPAAIIVDASSFMSYQSGVLTSCAGDALNHGVLLVGYNKTGG
VPYWVIKNSWGEDWGEKGYVRVVMGLNACLLSEYPVSAHVPRSLTPGPGTE
SEERAPKRVTVEQMMCTDMYCREGCKKSLLTANVCYKNGGGGSSMTKCGPQ
KVLMCSYSNPHCFGPGLCLETPDGKCAPYFLGSIMNTCQYT

Fig. 7