(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 628 743**

(51) Int. CI.:

C07K 14/44 (2006.01)
C07K 16/20 (2006.01)
A61K 39/008 (2006.01)
A61P 33/02 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.07.2009 PCT/US2009/049559**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **07.01.2010 WO10003085**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.07.2009 E 09774534 (3)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.03.2017 EP 2291394**

(54) Título: **Proteínas de fusión y su uso en el diagnóstico y tratamiento de la leishmaniasis**

(30) Prioridad:

03.07.2008 US 78255 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
03.08.2017

(73) Titular/es:

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

(72) Inventor/es:

BHATIA, AJAY y
REED, STEVEN, G.

(74) Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

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

Proteínas de fusión y su uso en el diagnóstico y tratamiento de la leishmaniasis

Antecedentes de la invención

1. Campo técnico

La presente invención se refiere en general a proteínas de fusión hechas de una construcción génica quimérica sintética que comprende secuencias de K26, K39 y K9 y su uso en el diagnóstico y tratamiento de la leishmaniasis.

2. Descripción de la técnica relacionada

Los organismos de Leishmania son parásitos protozoarios intracelulares de macrófagos que causan una amplia gama de enfermedades clínicas en los seres humanos y en los animales domésticos, principalmente en los perros. En algunas infecciones, el parásito puede permanecer inactivo durante muchos años. En otros casos, el huésped puede desarrollar una de una variedad de formas de leishmaniasis. Por ejemplo, la enfermedad puede ser asintomática o puede manifestarse como leishmaniasis visceral subclínica, que se caracteriza por síntomas leves de malestar, diarrea y hepatomegalia intermitente. Los pacientes con enfermedad subclínica o asintomática usualmente tienen bajos títulos de anticuerpos, lo que hace que la enfermedad sea difícil de detectar con técnicas estándar. Alternativamente, la leishmaniasis puede manifestarse como una enfermedad cutánea, el cual es un problema médico grave, aunque generalmente autolimitado, o como una enfermedad mucosal altamente destructiva, que no es autolimitada. Finalmente, y lo más grave, la enfermedad puede manifestarse como una infección visceral aguda que implica el bazo, el hígado y los ganglios linfáticos, que, si no se trata, es generalmente una enfermedad mortal. Los síntomas de la leishmaniasis visceral aguda incluyen hepatoesplenomegalia, fiebre, leucopenia, anemia e hipergamma-globulinemia.

Se conocen tres variantes clínicas principales de esta enfermedad: cutánea, mucocutánea y visceral. La leishmaniasis cutánea puede manifestarse como una ulceración cutánea en el sitio de la picadura del mosquito simúlido que aparece poco después de la infección o meses después como lesiones diseminadas. El síndrome mucocutáneo se desarrolla como una forma cutánea, pero progresa meses o años después a lesiones de la boca, nariz o faringe. Los principales efectos a largo plazo de la enfermedad cutánea y mucocutánea son las cicatrices. La leishmaniasis visceral tiene un período de incubación de 3-6 meses e implica el sistema reticuloendotelial.

Las manifestaciones clínicas de la leishmaniasis visceral incluyen el agrandamiento del hígado y del bazo, fiebre, anemia y pérdida de peso. En ausencia de tratamiento, la enfermedad visceral sintomática a menudo termina en la muerte. En los últimos años, la coexistencia de especies de HIV y Leishmania causantes de enfermedad visceral ha resultado en varios cientos de casos de individuos infectados dualmente (Berman, J.D., (1997) Clin. Infect. Dis. 24: 684). La Organización Mundial de la Salud estimó recientemente en 2000 que la leishmaniasis afectaba a personas en 88 países, con 350 millones de personas en riesgo de contraer la enfermedad y alrededor de dos millones de nuevos casos cada año. El impacto devastador de esta enfermedad es ejemplificado por la reciente epidemia de leishmaniasis visceral en el Sudán, que se cobró unas 100.000 vidas (Seaman, J., et al. 1996) Int. J. Epidemiol. 25: 862). Esta enfermedad es frecuentemente una amenaza en las operaciones militares, como lo demuestra el brote de leishmaniasis viscerotrópica durante la Guerra del Golfo (Magill, J., et al. 1993) N Engl J Med 328: 1383).

La leishmaniasis es un serio problema en gran parte del mundo, incluyendo Brasil, China, África Oriental, India y áreas del Medio Oriente. La enfermedad también es endémica en la región mediterránea, incluyendo el sur de Francia, Italia, Grecia, España, Portugal y el norte de África. El número de casos de leishmaniasis ha aumentado dramáticamente en los últimos 20 años, y ahora existen en todo el mundo millones de casos de esta enfermedad. Alrededor de 2 millones de nuevos casos se diagnostican cada año, el 25% de los cuales son leishmaniasis visceral. Sin embargo, actualmente no existen vacunas ni tratamientos eficaces.

La leishmaniasis está causada por varias especies de Leishmania. Estos organismos unicelulares del orden Kinetoplastida están relacionados con los tripanosomas, los organismos causantes de la Enfermedad del Sueño en África y la enfermedad de Chagas en América del Sur. Los parásitos de Leishmania comúnmente existen en dos formas distintas, el promastigote móvil del vector insecto y el amastigote sésil presente en el huésped mamífero. Los promastigotes se transmiten a los seres humanos por la picadura de flebótomos infectados, que se encuentran en todas las regiones intertropicales y templadas del mundo. Tras la administración en el huésped mamífero, los promastigotes infectan los macrófagos del sistema reticuloendotelial y se transforman en amastigotes.

El diagnóstico preciso de la leishmaniasis es frecuentemente difícil de lograr. Hay 20 especies de Leishmania que infectan a los seres humanos, incluyendo L. donovani, L. chagasi, L. infantum, L. mayor, L. amazonensis, L. braziliensis, L. panamensis, L. mexicana, L. tropica y L. guyanensis, y no hay signos distintivos o síntomas que inequívocamente indiquen la presencia de la infección por Leishmania. Se han utilizado métodos de detección de

parásitos, pero tales métodos no son ni sensibles ni clínicamente prácticos. Las pruebas cutáneas actuales usan típicamente parásitos enteros o lisados. Tales pruebas son generalmente insensibles, irreproducibles y propensas a la reacción inespecífica con una variedad de otras enfermedades. Además, las preparaciones empleadas en tales ensayos son a menudo inestables.

Boarino A, et al, Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology, Vol. 12, No. 5 (5-2005), págs. 647-653, describen una proteína de fusión que comprende antígenos de Leishmania K9-K39-K26, mediante los cuales se derivan antígenos de Leishmania chagasi. El documento da además resultados de ensayos ELISA para sueros de leishmania negativos y positivos en seres humanos y caninos.

Por lo tanto, existe una necesidad de métodos mejorados para la detección de la infección por Leishmania. Por ejemplo, existe una necesidad en la técnica de métodos más sensibles y específicos para detectar la infección por Leishmania y para identificar aquellas infecciones asintomáticas de Leishmania que puedan progresar probablemente a infecciones viscerales agudas. La presente invención satisface estas necesidades y proporciona además otras ventajas relacionadas.

Breve resumen

La presente invención se define por el alcance y la formulación de las reivindicaciones y se refiere en general a composiciones que comprenden al menos dos antígenos heterólogos de Leishmania, polipéptidos de fusión que comprenden los antígenos y polinucleótidos que codifican los antígenos y fusiones, en el que los antígenos de Leishmania se seleccionan de K39, K26 y/o K9. La presente invención también se refiere a métodos de utilización de los polipéptidos y polinucleótidos de la invención en el diagnóstico, tratamiento y prevención de la leishmaniasis. Los antígenos de la invención, cuando se emplean en combinación y/o como polipéptidos o polinucleótidos de fusión como se describen en la presente memoria, ofrecen ventajas mejoradas e inesperadas, y son particularmente útiles en el contexto del diagnóstico de leishmaniasis y el desarrollo de vacunas.

Por lo tanto, de acuerdo con una realización, la presente invención proporciona un polipéptido de fusión aislado que comprende dos o más antígenos de Leishmania seleccionados del grupo que consiste en K26, K39, y K9, en el que cada antígeno se define como se describe en las reivindicaciones. En una realización relacionada, un polipéptido de fusión aislado comprende al menos los tres de los antígenos de Leishmania anteriores, en donde al menos uno de los antígenos se aísla de Leishmania donovani.

En realizaciones particulares, los polipéptidos de fusión de la invención comprenden una primera porción inmunogénica que comprende al menos los residuos 142-267 de K26 (SEQ ID NO: 5); una segunda porción inmunogénica que comprende al menos los residuos 2110 - 2343 de K39 (SEQ ID NO: 6); y una tercera porción inmunogénica que comprende al menos los residuos 1-399 de K9 (SEQ ID NO: 7). En realizaciones más particulares, un polipéptido de fusión de la presente invención comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en los residuos de aminoácidos 10 - 262 de la SEQ ID NO: 8. En ciertas realizaciones, el polipéptido de fusión comprende una secuencia de aminoácidos N-terminal de MHHHHHHTS (SEQ ID NO: 21). En ciertas otras realizaciones, el polipéptido de fusión comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 8.

En diversas realizaciones, la presente invención proporciona polinucleótidos aislados que codifican un polipéptido de fusión de la presente invención.

La presente descripción también proporciona un anticuerpo aislado, o fragmento de unión al antígeno que se une específicamente a un polipéptido de fusión tal como se describe en todo este documento.

En otra realización, la invención contempla una composición farmacéutica que comprende un polipéptido de fusión de la presente invención, o un polinucleótido que codifica un polipéptido de fusión de la presente invención en combinación con un vehículo fisiológicamente aceptable.

En una realización relacionada, la presente invención contempla composiciones de vacuna que comprenden un polipéptido de fusión de la presente invención, o un polinucleótido que codifica un polipéptido de fusión de la presente invención en combinación con un potenciador de la respuesta inmune no específica.

En realizaciones particulares, la presente invención proporciona métodos para detectar infecciones asintomáticas o subclínicas de Leishmania en una muestra biológica seleccionada del grupo que consiste en sueros, sangre y saliva, que comprende: poner en contacto una muestra biológica con un polipéptido de fusión que comprende dos o más antígenos de Leishmania seleccionados del grupo que consiste en K26, K39, y K9, como se define anteriormente; y detectar en la muestra biológica la presencia de anticuerpos que se unen al polipéptido de fusión, detectando de este modo una infección subclínica asintomática o activa de Leishmania en la muestra biológica. En realizaciones más particulares, un método para detectar una infección asintomática o subclínica de Leishmania en una muestra

biológica emplea un polipéptido de fusión que comprende: una primera porción inmunogénica que comprende al menos los residuos 142-267 de K26 (SEQ ID NO: 5); una segunda porción inmunogénica que comprende al menos los residuos 2110 - 2343 de K39 (SEQ ID NO: 6); y una tercera porción inmunogénica que comprende al menos los residuos 1-399 de K9 (SEQ ID NO: 7). En realizaciones aún más particulares, el polipéptido de fusión comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en los residuos 10 - 262 de la SEQ ID NO: 8. En realizaciones relacionadas aún más particulares, el polipéptido de fusión comprende además una secuencia de aminoácidos N-terminal de MHHHHHHTS (SEQ ID NO: 21).

En realizaciones relacionadas, los métodos para detectar una infección asintomática o subclínica de Leishmania en una muestra biológica utilizan un polipéptido de fusión unido a un soporte sólido, en el que el soporte sólido puede comprender, por ejemplo, nitrocelulosa, látex o un material plástico. En ciertas realizaciones, los métodos comprenden además i) eliminar la muestra no unida de un soporte sólido; ii) añadir un reactivo de detección al soporte sólido; y iii) determinar el nivel de reactivo de detección unido al soporte sólido, con relación a un valor de corte predeterminado, detectando de este modo la infección de Leishmania asintomática o subclínica en la muestra biológica.

En diversas realizaciones, la presente invención proporciona métodos para identificar un paciente afligido con leishmaniasis visceral asintomática o subclínica que es probable que desarrolle leishmaniasis visceral aguda, que comprende: poner en contacto una muestra biológica obtenida de un paciente afligido con leishmaniasis visceral asintomática o subclínica con un primer polipéptido que es un polipéptido de fusión que comprende dos o más antígenos seleccionados de Leishmania del grupo que consiste en K26, K39, y como se define anteriormente, seleccionándose la muestra biológica del grupo que consiste en sueros, sangre y saliva; e independientemente poner en contacto la muestra biológica con un segundo polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en las SEQ ID NO: 6, 10 o 11; y detectar en la muestra la presencia de anticuerpos que se unen a al menos uno de los polipéptidos primero y segundo, identificando así a un paciente afligido con leishmaniasis visceral asintomática o subclínica que es probable que desarrolle leishmaniasis visceral aguda.

En realizaciones particulares, los métodos para identificar a un paciente afectado con leishmaniasis visceral asintomática o subclínica que es probable que desarrolle leishmaniasis visceral aguda emplean un polipéptido de fusión que comprende una primera porción inmunogénica que comprende al menos los residuos 142-267 de K26 (SEQ ID NO: 5); una segunda porción inmunogénica que comprende al menos los residuos 2110 - 2343 de K39 (SEQ ID NO: 6); y una tercera porción inmunogénica que comprende al menos los residuos 1-399 de K9 (SEQ ID NO: 7). En realizaciones aún más particulares, el polipéptido de fusión comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en los residuos de aminoácidos 10 - 262 de la SEQ ID NO: 8. En realizaciones relacionadas aún más particulares, el polipéptido de fusión comprende además una secuencia de aminoácidos N-terminal de MHHHHHHTS (SEQ ID NO: 21).

En realizaciones relacionadas, los métodos de identificación de un paciente afligido con leishmaniasis visceral asintomática o subclínica que es probable que desarrolle leishmaniasis visceral aguda emplean un polipéptido de fusión unido a un soporte sólido, en el que el soporte sólido puede comprender, por ejemplo, nitrocelulosa, látex o un material plástico. En ciertas realizaciones relacionadas, los métodos comprenden además i) eliminar la muestra no unida de cada soporte sólido; ii) añadir un reactivo de detección a cada soporte sólido; e iii) comparar el nivel de reactivo de detección unido a cada soporte sólido, con relación a un valor de corte predeterminado, a partir de lo cual se identifica a un paciente afectado con leishmaniasis asintomática o subclínica que es probable que desarrolle leishmaniasis visceral aguda.

En realizaciones particulares, el reactivo de detección comprende un grupo indicador conjugado con un agente aglutinante. En realizaciones relacionadas, el agente aglutinante se selecciona del grupo que consiste en anti-inmunoglobulina, Proteína G, Proteína A y lectinas. En otras realizaciones relacionadas, el grupo indicador se selecciona del grupo que consiste en radioisótopos, grupos fluorescentes, grupos luminiscentes, enzimas, oro coloidal, biotina y partículas de colorante.

En diversas otras realizaciones, la presente invención proporciona kits de diagnóstico para detectar leishmaniasis visceral asintomática o subclínica en una muestra biológica. En realizaciones particulares, los kits para detectar la leishmaniasis visceral asintomática o subclínica en una muestra biológica, en donde la muestra se selecciona del grupo que consiste en sueros, sangre y saliva, comprenden un polipéptido de fusión que comprende dos o más antígenos de Leishmania seleccionados del grupo consistente en K26, K39 y K9, como se define anteriormente; y un reactivo de detección.

En ciertas realizaciones, un kit de diagnóstico para identificar a un paciente afligido con leishmaniasis visceral asintomática o subclínica que es probable que desarrolle leishmaniasis visceral aguda, contiene un primer polipéptido que es un polipéptido de fusión que comprende dos o más antígenos de Leishmania seleccionados del grupo que consiste en K26, K39, y K9, como se define anteriormente; y un segundo polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en las SEQ ID NO: 10 o 11; y un reactivo de detección.

Los kits de la presente invención pueden comprender además, un reactivo de detección que comprende un grupo indicador conjugado con un agente aglutinante y/o un agente aglutinante se selecciona del grupo que consiste en anti-inmunoglobulina, Proteína G, Proteína A y lectinas y/o el grupo indicador se selecciona del grupo que consiste en radioisótopos, grupos fluorescentes, grupos luminiscentes, enzimas, oro coloidal, biotina y partículas de colorante.

Breve descripción de las diversas vistas de los dibujos

La Figura 1 muestra un diagrama esquemático de la construcción del gen de fusión K28, que comprende un motivo de 9 aminoácidos N-terminal que comprende un marcador 6X HIS (es decir, 6 restos histidina), polinucleótidos 142-267 de una secuencia génica LdK26 (SEQ ID NO: 1), los polinucleótidos 2110-2343 de una secuencia de gen LdK39 (SEQ ID NO: 2) y los polinucleótidos 1-399 de una secuencia génica de LdK9 (SEQ ID NO: 3).

La figura 2 muestra una comparación de la capacidad de los antígenos K28, K39 y K9 para detectar LV en el suero de pacientes humanos de Venezuela.

La figura 3 muestra una comparación de la capacidad de los antígenos K9, K26, K28 y K39 para detectar LV en el suero de caninos de Venezuela.

Breve descripción de los identificadores de la secuencia

La SEQ ID NO: 1 representa los polinucleótidos 142-267 de una secuencia del gen K26 de L. donovani, que codifica una porción inmunogénica del antígeno K26.

La SEQ ID NO: 2 representa los polinucleótidos 2110-2343 de una secuencia del gen K39 de L. donovani, que codifica una porción inmunogénica del antígeno K39.

La SEQ ID NO: 3 representa los polinucleótidos 1-399 de una secuencia del gen K9 de L. donovani, que codifica una porción inmunogénica y el antígeno K9 de longitud completa.

La SEQ ID NO: 4 representa la secuencia polinucleotídica de un gen sintético K28 que comprende un motivo de 9 aminoácidos N-terminal que comprende un marcador 6X HIS, la secuencia polinucleotídica de SEQ ID NO: 1 fusionada a la secuencia polinucleotídica de SEQ ID NO: 2, que se fusiona con la secuencia polinucleotídica de SEQ ID NO3. La ORF comienza en el nucleótido 4.

La SEQ ID NO: 5 representa la secuencia de aminoácidos de un polipéptido inmunogénico codificado por los polinucleótidos 142-267 de un antígeno de L. donovani K26.

La SEQ ID NO: 6 representa la secuencia de aminoácidos de un polipéptido inmunogénico codificado por los polinucleótidos 2110-2343 de un antígeno K39 de L. donovani.

La SEQ ID NO: 7 representa la secuencia de aminoácidos del polipéptido inmunogénico de longitud completa codificado por los polinucleótidos 1-399 de un antígeno K9 de L. donovani.

La SEQ ID NO: 8 representa la secuencia de aminoácidos del polipéptido K28 codificado por SEQ ID NO: 4.

La SEQ ID NO: 9 representa la secuencia de aminoácidos de una única unidad repetida de un antígeno K26 de L. donovani.

La SEQ ID NO: 10 representa la secuencia de aminoácidos de una única unidad repetida de un antígeno K39 de L. donovani.

La SEQ ID NO: 11 representa la secuencia de aminoácidos de una única unidad repetida de un antígeno K39 de L. donovani.

La SEQ ID NO: 12 representa una secuencia polinucleotídica que codifica una única unidad repetida de un antígeno K26 de L. donovani de acuerdo con SEQ ID NO: 9.

La SEQ ID NO: 13 representa una secuencia polinucleotídica que codifica una única unidad repetida de un antígeno K26 de L. donovani según SEQ ID NO: 9.

La SEQ ID NO: 14 representa una secuencia polinucleotídica que codifica la unidad única de repetición de un antígeno K39 de L. donovani según SEQ ID NO: 10.

La SEQ ID NO: 15 representa una secuencia polinucleotídica que codifica la unidad única de repetición de un antígeno K39 de L. donovani según SEQ ID NO: 11.

La SEQ ID NO: 16 representa la secuencia polinucleotídica de longitud completa de un gen K26 de L. donovani.

La SEQ ID NO: 17 representa la secuencia polinucleotídica de longitud completa de un gen K39 de L. donovani.

La SEQ ID NO: 18 representa la secuencia polinucleotídica de longitud completa de un gen K9 de L. donovani.

La SEQ ID NO: 19 representa la secuencia de aminoácidos codificada por SEQ ID NO: 16.

La SEQ ID NO: 20 representa la secuencia de aminoácidos codificada por SEQ ID NO: 17.

La SEQ ID NO: 21 representa un marcador de histidina N - terminal ilustrativo usado en la producción recombinante de los polipéptidos de la presente invención.

Descripción detallada

Antígenos de Leishmania y sus fusiones

La presente invención se refiere en general a composiciones y métodos de utilización de antígenos de Leishmania. Las composiciones de la presente invención generalmente comprenden al menos dos antígenos heterólogos o su porción inmunogénica de una especie de Leishmania. Las secuencias de antígenos de Leishmania se pueden obtener, por ejemplo, en la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI) para una variedad de especies de Leishmania, incluyendo L. donovani, L. chagasi, L. infantum, L. major, L. amazonensis, L. venezuelensis, L. braziliensis, L. panamensis, L. mexicana, L. tropica y L. guyanensis.

En un aspecto, la presente invención proporciona polipéptidos de Leishmania aislados, como se describe en el presente documento, que incluyen polipéptidos de fusión, y composiciones que contienen a los mismos. Generalmente, un polipéptido de la presente invención será un polipéptido aislado, múltiples fragmentos polipeptídicos (por ejemplo, un polipéptido de fusión) o un polipéptido de longitud completa de una secuencia de aminoácidos de dos o más de los genes de Leishmania, incluyendo, pero sin limitarse a, K26, K39 y/o K9. Cualquier experto en la técnica apreciaría que los fragmentos de polipéptidos antigénicos también podrían obtenerse de los ya disponibles en la técnica. Los polipéptidos de la invención pueden prepararse usando técnicas convencionales recombinantes y/o sintéticas.

En ciertas realizaciones, los polipéptidos de la presente invención son polipéptidos de fusión. En realizaciones particulares, los polipéptidos de fusión comprenden los antígenos K26, K39 y/o K9 o partes inmunógenas de los mismos, que son antigénicas/inmunogénicas, es decir, reaccionan detectablemente dentro de un inmunoensayo (tal como un ensayo con ELISA o de estimulación de células T) con antisueros y/o células T de un sujeto infectado. El cribado de la actividad inmunogénica puede realizarse utilizando técnicas bien conocidas por los expertos en la técnica. Por ejemplo, estos cribados pueden realizarse usando métodos tales como los descritos en Harlow y Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988. En un ejemplo ilustrativo, un polipéptido de la presente invención (por ejemplo, un polipéptido de fusión) puede inmovilizarse sobre un soporte sólido y ponerse en contacto con sueros de pacientes para permitir la unión de anticuerpos dentro de los sueros al polipéptido inmovilizado. Los sueros no unidos pueden ser entonces eliminados y los anticuerpos unidos detectados usando, por ejemplo, proteína A marcada con ^{125}I.

Como sería reconocido por cualquier experto en la técnica, los polipéptidos de fusión de la presente descripción pueden comprender porciones o fragmentos antigénicos o inmunogénicos de los polipéptidos de Leishmania K26, K39 y/o K9 descritos en la presente memoria. Una "parte inmunogénica", tal como se utiliza en la presente memoria, es un fragmento de un polipéptido inmunogénico de la invención que es por sí mismo inmunológicamente reactivo (es decir, se une específicamente) con los receptores de antígeno de superficie de células B y/o T que reconocen el polipéptido. Las porciones inmunogénicas pueden identificarse generalmente usando técnicas bien conocidas, tales como las resumidas en Paul, Fundamental Immunology, 5ª ed., Lippincott Williams & Wilkins, 2003 y las referencias citadas en la misma. Tales técnicas incluyen la selección de polipéptidos por su capacidad de reaccionar con anticuerpos específicos de antígeno, antisueros y/o líneas o clones de células T. Como se usan en este documento, los antisueros y anticuerpos son "específicos del antígeno" si se unen específicamente a un antígeno (es decir, reaccionan con la proteína en un inmunoensayo y no reaccionan detectablemente con proteínas no relacionadas). Tales antisueros y anticuerpos pueden prepararse como se describe en la presente memoria y usando técnicas bien conocidas.

En una realización particular, una parte o fragmento polipeptídico antigénico/inmunogénico de un polipéptido de fusión de la presente descripción es una porción que reacciona con antisueros y/o células T a un nivel que no es

sustancialmente menor que la reactividad del polipéptido de fusión de longitud completa (por ejemplo, en un ensayo ELISA y/o de reactividad con células T). Preferiblemente, el nivel de actividad inmunogénica de la porción antigénica/inmunogénica dentro de un polipéptido de fusión es al menos aproximadamente 50%, preferiblemente al menos aproximadamente 70% y más preferiblemente mayor que aproximadamente 90% de la inmunogenicidad para el polipéptido de fusión de longitud completa. En algunos casos, se identificarán porciones inmunogénicas preferidas que tienen un nivel de actividad inmunogénica mayor que el del polipéptido de fusión de longitud completa correspondiente, por ejemplo, que tiene una actividad inmunogénica superior a aproximadamente 100% o 150% o más. En realizaciones particulares, la inmunogenicidad del polipéptido de fusión de longitud completa tendrá una inmunogenicidad aditiva aportada por cada una de las porciones antigénicas/inmunogénicas contenidas en el mismo.

Un polipéptido de fusión de la descripción puede comprender también uno o más polipéptidos que son inmunológicamente reactivos con células T y/o anticuerpos generados contra un polipéptido de la invención, particularmente un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos descrita en la presente memoria o un fragmento o variante inmunogénico del mismo. En realizaciones particulares, el polipéptido es un polipéptido de fusión como se describe en el presente documento.

En otra realización de la invención, se proporcionan polipéptidos de fusión que comprenden dos o más polipéptidos que son capaces de provocar células 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 de polinucleótidos contiguas contenidas en las secuencias polinucleotídicas descritas en la presente, o fragmentos inmunogénicos o variantes de las mismas, o a dos o más secuencias polinucleotídicas que se hibridan con dos o más de estas secuencias bajo condiciones de moderada a alta rigurosidad.

La presente descripción también proporciona polipéptidos de fusión que comprenden fragmentos de los polipéptidos K26, K39 y/o K9, incluyendo fragmentos antigénicos/inmunogénicos que comprenden al menos aproximadamente 5, 10, 15, 20, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 250, 300 o 350 aminoácidos contiguos, o más, incluyendo todas las longitudes intermedias, de un antígeno de Leishmania K26, K39, y/o K9, tales como los expuestos en este documento, o los codificados por una secuencia polinucleotídica en este documento expuesta.

En otro aspecto, los polipéptidos de fusión de la presente descripción contienen copias múltiples de fragmentos de polipéptidos, repeticiones de fragmentos de polipéptidos o fragmentos de polipéptidos multiméricos, incluyendo fragmentos antigénicos/inmunogénicos tales como polipéptidos de Leishmania K26, K39 y/o K9, 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 establecida en la presente memoria, o las codificadas por una secuencia polinucleotídica descrita en la presente memoria. En otro aspecto, los polipéptidos de fusión de la presente invención pueden comprender dos o más fragmentos de antígeno de Leishmania, tal como se describen en las SEQ ID NO: 5-7 y 9-11. En un aspecto relacionado, el polipéptido de fusión comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 8 o los aminoácidos 10 - 262 de SEQ ID NO: 8.

En otro aspecto más, la presente invención proporciona polipéptidos de fusión que comprenden dos o más variantes de los polipéptidos de Leishmania K26, K39 y/o K9 descritos en el presente documento. Las variantes de polipéptidos generalmente abarcadas por la presente invención exhibirán típicamente al menos aproximadamente 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% 98% o 99% o más de identidad (determinada como se describe a continuación), a lo largo de su longitud, a una secuencia polipeptídica descrita en la presente memoria. Preferiblemente, dichas variantes tendrán la misma actividad inmunológica, similar o mejorada con respecto a una secuencia nativa K26, K39 y/o K9.

Un polipéptido "variante", tal como se utiliza en este documento, es un polipéptido que típicamente difiere de un polipéptido específicamente descrito en la presente memoria (por ejemplo, polipéptidos de Leishmania K26, K39, y/o K9) en una o más sustituciones, deleciones, adiciones y/o inserciones. Dichas variantes pueden producirse naturalmente o pueden generarse sintéticamente, por ejemplo, modificando una o más de las secuencias polipeptídicas anteriores de la invención y evaluando su actividad inmunogénica como se describe en la presente memoria utilizando cualquiera de una serie de técnicas bien conocidas en la técnica.

En muchos casos, una variante contendrá sustituciones conservadoras. Una "sustitución conservadora" es aquella en la que un aminoácido se sustituye por otro aminoácido que tiene propiedades similares, de modo que un experto en la técnica de la química de péptidos esperaría que la estructura secundaria y la naturaleza hidropática del polipéptido permanezcan sustancialmente sin cambios. Como se ha descrito anteriormente, se pueden hacer modificaciones en la estructura de los polinucleótidos y polipéptidos de la presente invención y todavía obtener una molécula funcional que codifique un polipéptido variante o derivado con características deseables, por ejemplo, con características inmunogénicas. Cuando se desea alterar la secuencia de aminoácidos de un polipéptido para crear una variante o porción inmunogénica equivalente o incluso mejorada de un polipéptido de la invención, un experto en la técnica típicamente cambiará uno o más de los codones de la secuencia de ADN codificante de acuerdo con la Tabla 1.

Por ejemplo, ciertos aminoácidos pueden sustituirse por otros aminoácidos en una estructura de proteína sin pérdida apreciable de capacidad de unión interactiva con estructuras tales como, por ejemplo, regiones de unión a antígenos de anticuerpos o sitios de unión en moléculas de sustrato. Dado que es la capacidad interactiva y la naturaleza de una proteína la que define la actividad funcional biológica de dicha proteína, ciertas sustituciones de secuencia de aminoácidos pueden hacerse en una secuencia de proteínas y, por supuesto, su secuencia codificante de ADN subyacente, y sin embargo obtener una proteína con propiedades similares. Se contempla así que se pueden hacer diversos cambios en las secuencias peptídicas de las composiciones descritas, o secuencias de ADN correspondientes 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

Al hacer tales cambios, se puede considerar el índice hidropático de los aminoácidos. La importancia del índice de aminoácidos hidropático en conferir función biológica interactiva a una proteína se entiende generalmente en la técnica (Kyte y Doolittle, 1982, incorporada en este documento como referencia). 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. A cada aminoácido se le ha asignado un índice hidropático en base a sus características de hidrofobicidad 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).

Se sabe en la técnica que ciertos aminoácidos pueden estar sustituidos por otros aminoácidos que tienen un índice o puntaje hidropático similar y que todavía producen una proteína con actividad biológica similar, es decir, aún obtener una proteína biológicamente funcional equivalente. Al realizar tales cambios, se prefiere la sustitución de aminoácidos cuyos índices hidropáticos están dentro de ± 2, los que están dentro de ± 1 son particularmente preferidos y los que están dentro de ± 0,5 son aún más particularmente preferidos. También se entiende en la técnica que la sustitución de aminoácidos similares puede hacerse eficazmente sobre la base de la hidrofilicidad.

Como se detalla en la Patente de EE.UU. 4.554.101, se han asignado los siguientes valores de hidrofilicidad a los residuos de aminoácidos: arginina (+3,0); Lisina (+3,0); Aspartato (+3,0 ± 1); Glutamato (+3,0 ± 1); Serina (+0,3); Asparagina (+0,2); Glutamina (+0,2); Glicina (0); Treonina (-0,4); Prolina (-0,5 ± 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 ser sustituido por otro que tiene un valor de hidrofilicidad similar y todavía obtener una proteína biológicamente equivalente, y en particular, una proteína inmunológicamente equivalente. En tales cambios, se prefiere la sustitución de aminoácidos cuyos valores de hidrofilicidad están dentro de ± 2, los que están dentro de ± 1 son particularmente preferidos y los que están dentro de ± 0,5 son aún más particularmente preferidos.

Como se ha indicado anteriormente, las sustituciones de aminoácidos se basan generalmente en la similitud relativa de los sustituyentes de las cadenas laterales de aminoácidos, por ejemplo, su hidrofobicidad, hidrofilicidad, carga, tamaño y similares. Las sustituciones ejemplares que toman en consideración varias de las características anteriores son bien conocidas por los expertos en la técnica e incluyen: arginina y lisina; Glutamato y aspartato; Serina y treonina; Glutamina y asparagina; y valina, leucina e isoleucina.

Además, cualquier polinucleótido puede modificarse adicionalmente para aumentar la estabilidad in vivo. Las posibles modificaciones incluyen, pero no se limitan a, la adición de secuencias flanqueantes en los extremos 5' y/o 3'; el uso de enlaces fosforotioato o 2' O-metilo en lugar de fosfodiesterasa en el esqueleto; y/o la inclusión de bases no tradicionales tales como inosina, queosina y wybutosina, así como acetilmetil-, tio- y otras formas modificadas de adenina, citidina, guanina, timina y uridina.

Las sustituciones de aminoácidos pueden realizarse adicionalmente sobre la base de similitudes en polaridad, carga, solubilidad, hidrofobicidad, hidrofilicidad 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 polar sin carga que tienen valores de hidrofilicidad 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 conservadores 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 también puede, o alternativamente, contener cambios no conservadores. En una realización preferida, los polipéptidos variantes difieren de una secuencia nativa por sustitución, supresión o adición de cinco aminoácidos o menos. Las variantes también pueden (o alternativamente) ser modificadas por, por ejemplo, la deleción o adición de aminoácidos que tienen mínima influencia sobre la inmunogenicidad, la estructura secundaria y la naturaleza hidropática del polipéptido.

Como se ha indicado anteriormente, los polipéptidos pueden comprender una secuencia señal (o líder) en el extremo N-terminal de la proteína, que dirige co-traslacional o post-traduccionalmente la transferencia de la proteína. El polipéptido puede conjugarse también con un enlazador u otra secuencia para facilitar la síntesis, purificación o identificación del polipéptido (por ejemplo, marcador de poli-histidina (6 × His), GST, MBP, TAP/TAG, epítopo FLAG, epítopo MYC, epítopo V5, epítopo VSV-G, etc.), o para aumentar la unión del polipéptido a un soporte sólido. Por ejemplo, un polipéptido puede conjugarse con una región Fc de inmunoglobulina.

Cuando se comparan secuencias de polipéptidos, se dice que dos secuencias son "idénticas" si la secuencia de aminoácidos en las dos secuencias es la misma cuando están alineadas para correspondencia máxima, como se describe a continuación. Las comparaciones entre dos secuencias se realizan típicamente comparando las secuencias sobre 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, se refiere a un segmento de al menos aproximadamente 20 posiciones contiguas, usualmente de 30 a aproximadamente 75, 40 a aproximadamente 50, en el que una secuencia puede compararse con una secuencia de referencia del mismo número de posiciones contiguas Después de que las dos secuencias estén alineadas óptimamente.

La alineación óptima de las secuencias para la comparación se puede llevar a cabo utilizando el programa Megalign en el paquete de Lasergene del software de bioinformática (DNASTAR, Inc., Madison, Wiss.), utilizando parámetros por defecto. Este programa incorpora varios esquemas de alineación 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, pp. 345-358; Hein J. (1990) Unified Approach to Alignment and Phylogenes pp. 626-645 Methods in Enzymology vol. 183, Academic Press, Inc., San Diego, CA; Higgins, D. G. and Sharp, P.M. (1989) CABIOS 5:151-153; Myers, E.W. and 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. and Sokal, R.R. (1973) Numerical Taxonomy - the Principles and Practice of Numerical Taxonomy, Freeman Press, San Francisco, CA; Wilbur, W.J. and Lipman, D.J. (1983) Proc. Nat'l Acad., Sci. USA 80:726-730.

Alternativamente, la alineación óptima de secuencias para comparación puede realizarse mediante el algoritmo de identidad local de Smith y Waterman (1981) Add. APL. Math 2: 482, por el algoritmo de alineación de identidad de Needleman y Wunsch (1970) J. Mol. Biol. 48: 443, mediante la búsqueda de métodos de similitud de Pearson y Lipman (1988) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 85: 2444, mediante implementaciones computarizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, BLAST, FASTA y TFASTA en el Paquete de Software de Genética de Wisconsin, Genetics Computer Group (GCG), 575 Science Dr., Madison, Wiss, o por inspección.

Un ejemplo preferido de algoritmos que son adecuados para determinar el porcentaje de identidad de secuencia y similitud de secuencia son los algoritmos BLAST y BLAST 2.0, que se describen en Altschul et al. (1977) Nucl. 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 este documento, para determinar el porcentaje de identidad de secuencia para los polinucleótidos y polipéptidos de la invención. El software para realizar análisis BLAST está disponible públicamente a través del National Center for Biotechnology Information. Para secuencias de aminoácidos, se puede usar una matriz de puntuación para calcular la puntuación acumulada. La extensión de los golpes de palabra en cada dirección se detiene cuando: la puntuación de alineación acumulada disminuye por la cantidad X de su valor máximo alcanzado; La puntuación acumulada va a cero o por debajo, debido a la acumulación de una o más alineaciones de residuo de puntuación negativa; o se alcanza el final de cada secuencia. Los parámetros del algoritmo BLAST W, T y X determinan la sensibilidad y la velocidad de la alineación.

En un enfoque preferido, el "porcentaje de identidad de secuencia" se determina comparando dos secuencias alineadas óptimamente sobre una ventana de comparación de al menos 20 posiciones, en donde la porción de la secuencia polipeptídica en la ventana de comparación puede comprender adiciones o supresiones (es decir, huecos) del 20 por ciento o menos, normalmente del 5 al 15 por ciento, o del 10 al 12 por ciento, en comparación con las secuencias de referencia (que no comprende adiciones o supresiones) para la alineación óptima de las dos secuencias. El porcentaje se calcula determinando el número de posiciones en las que se produce el residuo de aminoácido idéntico en ambas secuencias para producir el número de posiciones coincidentes, dividiendo el número de posiciones coincidentes por el número total de posiciones en la secuencia de referencia (es decir, el tamaño de la ventana) y multiplicando los resultados por 100 para obtener el porcentaje de identidad de secuencia.

En ciertas realizaciones preferidas de la descripción, se proporcionan polipéptidos de fusión de Leishmania, y polinucleótidos que codifican polipéptidos de fusión, donde los polipéptidos de fusión comprenden dos o más secuencias de polipéptidos K26, K39 y/o K9 o porciones inmunogénicas de los mismos. El polipéptido de fusión y las proteínas de fusión se refieren a un polipéptido que tiene al menos dos polipéptidos heterólogos de Leishmania sp., tales como polipéptidos de Leishmania donovani, unidos covalentemente, ya sea directamente o a través de un enlazador de aminoácidos. Las secuencias antigénicas K26, K39 y/o K9 pueden, pero no necesitan, derivarse de la misma especie de Leishmania. Los polipéptidos que forman la proteína de fusión están típicamente unidos del extremo C al extremo N, aunque también pueden estar enlazados del extremo C al extremo C, del extremo N al extremo N o del extremo N al extremo C. Los polipéptidos de la proteína de fusión pueden estar en cualquier orden y pueden contener múltiples copias, repeticiones o multímeros de cada uno o cualquiera de los polipéptidos que comprenden la proteína de fusión. Los polipéptidos de fusión o las proteínas de fusión también pueden incluir variantes conservativamente modificadas, variantes polimórficas, alelos, mutantes, subsecuencias, homólogos interespecies y fragmentos inmunogénicos de los antígenos que constituyen la proteína de fusión. En realizaciones particulares, los polipéptidos de fusión de la presente invención pueden comprender uno o más fragmentos de antígeno de Leishmania como se describen en las SEQ ID NO: 5-7 y 9-11. En una realización relacionada, el polipéptido de fusión comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 8 o los aminoácidos 10 - 262 de SEQ ID NO: 8.

También se pueden usar antígenos de otras especies de Leishmania que corresponden a antígenos de Leishmania donovani, y pueden ser identificados, por ejemplo, utilizando algoritmos de comparación de secuencias, como se describen en la presente memoria, u otros métodos conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo, ensayos de hibridación y ensayos de unión a anticuerpos.

Los polipéptidos de fusión de la descripción generalmente comprenden por lo menos dos porciones o fragmentos antigénicos/inmunogénicos de los polipéptidos K26, K39 y/o K9 como se describen en la presente memoria, y pueden comprender además otras secuencias no relacionadas, tales como una secuencia que ayuda a proporcionar epítopes T colaboradores (una pareja de fusión inmunológica), preferiblemente epítopos T colaboradores

reconocidos por los seres humanos, o que ayudan a expresar la proteína (un potenciador de la expresión) con mayores rendimientos que la proteína recombinante nativa. Ciertas parejas de fusión preferidas son tanto parejas de fusión inmunológicas como mejoradores de la expresión. Otras parejas de fusión pueden seleccionarse de manera que aumenten la solubilidad de la proteína o permitan que la proteína se dirija a los compartimentos intracelulares deseados. Otras parejas de fusión adicionales pueden incluir marcadores de afinidad tales como V5, 6xHIS, MYC, FLAG y GST, que facilitan la purificación de la proteína. Se entenderá por alguien con experiencia en la técnica que las secuencias no relacionadas pueden estar presentes, pero no necesariamente, en un polipéptido de fusión usado de acuerdo con la presente invención.

Las proteínas de fusión pueden prepararse generalmente usando técnicas estándar. Preferiblemente, una proteína de fusión se expresa como una proteína recombinante. Por ejemplo, las secuencias de ADN que codifican los componentes polipeptídicos de una fusión deseada pueden ser ensambladas por separado, y ligadas en un vector de expresión apropiado. El extremo 3' de la secuencia de ADN que codifica un componente polipeptídico se liga, con o sin un enlazador peptídico, al extremo 5' de una secuencia de ADN que codifica el segundo componente polipéptido de modo que los marcos de lectura de las secuencias estén en fase. Esto permite la traducción en una única proteína de fusión que retiene la actividad biológica de ambos polipéptidos componentes.

Se puede emplear una secuencia enlazadora peptídica para separar los componentes polipeptídicos primero y segundo por una distancia suficiente para asegurar que cada polipéptido se pliegue en sus estructuras secundarias y terciarias, si se desea. Dicha secuencia enlazadora peptídica se incorpora en la proteína de fusión usando técnicas estándar bien conocidas en la técnica. Ciertas secuencias enlazadoras peptídicas pueden elegirse basándose en los siguientes factores: (1) su capacidad para adoptar una conformación extendida flexible; (2) su incapacidad para adoptar una estructura secundaria que pudiera interactuar con epítopos funcionales sobre el primer y el segundo polipéptidos; Y (3) la falta de residuos hidrofóbicos o cargados que podrían reaccionar con los epítopes polipéptidos funcionales. Las secuencias enlazadoras peptídicas preferidas contienen residuos Gly, Asn y Ser. Otros aminoácidos casi neutrales, tales como Thr y Ala también pueden usarse en la secuencia enlazadora. Las secuencias de aminoácidos que se pueden emplear útilmente como ligadores incluyen las descritas en Maratea et al., Gene 40:39 46 (1985); Murphy et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 8258-8262 (1986); Pat. Nº 4.935.233 y la Patente de EE.UU. 4.751.180. La secuencia enlazadora puede tener generalmente de 1 a aproximadamente 50 aminoácidos de longitud. Las secuencias de enlace no son necesarias cuando el primer y el segundo polipéptidos tienen regiones de aminoácidos N-terminales no esenciales que pueden usarse para separar los dominios funcionales y prevenir la interferencia estérica.

Las secuencias de ADN ligadas están unidas operativamente a elementos reguladores transcripcionales o traduccionales adecuados. Los elementos reguladores responsables de la expresión de ADN están situados sólo a 5' de la secuencia de ADN que codifica los primeros polipéptidos. De forma similar, los codones de parada requeridos para terminar la traducción y las señales de terminación de la transcripción sólo están presentes 3' con respecto a la secuencia de ADN que codifica el segundo polipéptido.

Dentro de las realizaciones preferidas, una pareja de fusión inmunológica para uso en un polipéptido de fusión de la descripción se deriva de la proteína D, una proteína de superficie de la bacteria gramnegativa Haemophilus influenza B (documento WO 91/18926). Preferiblemente, un derivado de proteína D comprende aproximadamente el primer tercio de la proteína (por ejemplo, el primer N-terminal de 100 110 aminoácidos), y un derivado de proteína D puede ser lipidado. Dentro de ciertas realizaciones preferidas, los primeros 109 residuos de una pareja de fusión de lipoproteína D se incluyen en el extremo N para proporcionar el polipéptido de fusión con epítopos de células T exógenos adicionales y para aumentar el nivel de expresión en E. coli (funcionando así como un potenciador de expresión). La cola lipídica garantiza una presentación óptima del antígeno a las células presentadoras de antígeno. Otras parejas de fusión incluyen la proteína no estructural del virus influenzae, NS1 (hemaglutinina). Típicamente, se usan los 81 aminoácidos N-terminales, aunque pueden usarse diferentes fragmentos que incluyen epítopos T auxiliares. En otra realización, una pareja de fusión inmunológica comprende una secuencia de aminoácidos derivada de la proteína conocida como LYTA, o una parte de la misma (preferiblemente una porción C-terminal). LYTA se 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 en el esqueleto del peptidoglicano. El dominio C-terminal de la proteína LYTA es responsable de la afinidad con la colina o con algunos análogos de colina tales como DEAE. Esta propiedad ha sido explotada para el desarrollo de plásmidos que expresan C-LYTA de E. coli útiles para la expresión de proteínas de fusión. La purificación de proteínas híbridas que contienen el fragmento C-LYTA en el extremo amino se ha descrito (véase Biotechnology 10: 795-798 (1992)). Dentro de una realización preferida, una porción de repetición de LYTA puede incorporarse en polipéptidos de fusión de la presente invención, como se describe en la presente memoria. Una porción de repetición se encuentra en la región C-terminal comenzando en el residuo 178. Una porción de repetición particularmente preferida incorpora los restos 188 - 305.

En general, se aíslan polipéptidos y polipéptidos de fusión (así como sus polinucleótidos que codifican). Un polipéptido o polinucleótido "aislado" es uno que se elimina de su entorno original. Por ejemplo, una proteína natural se aísla si está separada de algunos o todos los materiales coexistentes en el sistema natural. Preferiblemente,

dichos polipéptidos son al menos aproximadamente 90% puros, más preferiblemente al menos aproximadamente 95% puros y lo más preferiblemente al menos aproximadamente 99% puros. Se considera que un polinucleótido está aislado si, por ejemplo, se clona en un vector que no forma parte del medio natural.

En ciertas realizaciones, los polipéptidos de fusión de la invención comprenderán al menos un epítopo de cada uno de K26, K39 y K9. Los epítopos pueden determinarse generalmente generando polipéptidos que contienen porciones o fragmentos de la secuencia y evaluando la reactividad de los polipéptidos con sueros de individuos infectados con Leishmania usando, por ejemplo, un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA). Los ensayos adecuados para evaluar la reactividad de un polipéptido con sueros infectados con Leishmania se describen con más detalle a continuación. Dentro de tales ensayos representativos, se considera que las porciones de la secuencia que generan una señal que diferencia entre sueros positivos y negativos de una manera sustancialmente similar a la de toda la longitud contienen un epítopo. En otras palabras, una porción del antígeno que contiene un epítopo generará una señal que indica la infección de Leishmania en sustancialmente todas (es decir, al menos aproximadamente 80%, y preferiblemente al menos aproximadamente 90%) de las muestras biológicas para las cuales tal infección sería indicado usando el antígeno de longitud completa y generará una señal que indica la ausencia de infección de Leishmania en sustancialmente todas las muestras que serían negativas con el polipéptido de longitud completa.

En un aspecto relacionado, se describen polipéptidos de fusión que comprenden epítopos de múltiples polipéptidos de Leishmania. En ciertas realizaciones particulares, los epítopos de diferentes polipéptidos, repeticiones o variantes de Leishmania, se unen a través de un enlace peptídico a una única cadena de aminoácidos. Los epítopos pueden unirse directamente (es decir, sin aminoácidos intermedios) o pueden unirse por medio de una secuencia enlazadora (por ejemplo, Gly - Cys - Gly) que no altera significativamente las propiedades antigénicas de los epítopos. En realizaciones particulares, el polipéptido de fusión se deriva de dos o más porciones o fragmentos antigénicos/inmunogénicos. En otro aspecto, los polipéptidos de fusión de la presente invención pueden comprender dos o más fragmentos de antígeno de Leishmania como se describen en las SEQ ID NO: 5-7 y 9-11. En un aspecto relacionado, el polipéptido de fusión comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 8 o los residuos de aminoácidos 10-262 de SEQ ID NO: 8.

Los polipéptidos de fusión de esta invención se pueden generar usando técnicas bien conocidas por los expertos en la técnica. Los polipéptidos de la presente invención que tienen menos de aproximadamente 100 aminoácidos, y generalmente menos de aproximadamente 50 aminoácidos, se pueden sintetizar utilizando, por ejemplo, el método de síntesis en fase sólida Merrifield, en el que se añaden secuencialmente aminoácidos a una cadena de aminoácidos en crecimiento (Merrifield, J. Am. Chem. Soc. 85: 2149 - 2146, 1963). El equipo para la síntesis automatizada de polipéptidos está disponible comercialmente de proveedores tales como Applied Biosystems, Inc., Foster City, Calif. Así, por ejemplo, se pueden sintetizar por este método antígenos de Leishmania K26, K39 y K9, o porciones de los mismos.

Alternativamente, los polipéptidos de esta invención pueden prepararse por expresión de ADN recombinante que codifica el polipéptido en células huésped cultivadas. Preferiblemente, las células huésped son E. coli, levadura, una línea celular de insecto (tal como Spodoptera o Trichoplusia) o una línea celular de mamífero, incluyendo (pero no limitado a) CHO, COS, HEK-293T y NS-1. Las secuencias de ADN expresadas de esta manera pueden codificar proteínas naturales y proteínas de fusión que comprenden antígenos de Leishmania tales como K26, K9 y/o K39, partes de los mismos y repeticiones u otras variantes de tales proteínas. Los polipéptidos de fusión expresados de esta invención se aíslan generalmente en forma sustancialmente pura. Preferiblemente, los polipéptidos de fusión se aíslan hasta una pureza de al menos 80% en peso, más preferiblemente, hasta una pureza de al menos 95% en peso, y lo más preferiblemente hasta una pureza de al menos 99% en peso. En general, tal purificación puede conseguirse utilizando, por ejemplo, las técnicas estándar de fraccionamiento de sulfato de amonio, electroforesis SDS-PAGE y cromatografía de afinidad.

Composiciones polinucleotídicas

La presente invención también proporciona polinucleótidos aislados, particularmente aquellos que codifican los polipéptidos de fusión de la invención, así como composiciones que comprenden dichos polinucleótidos. Tal como se usa en el presente documento, los términos "ADN" y "polinucleótido" y "ácido nucleico" se refieren a una molécula de ADN que ha sido aislada libre de ADN genómico total de una especie particular. Por lo tanto, un segmento de ADN que codifica un polipéptido se refiere a un segmento de ADN que contiene una o más secuencias codificantes pero está sustancialmente aislado de, o purificado libre de, ADN genómico total de la especie a partir de la cual se obtiene el segmento de ADN. Dentro de los términos "segmento de ADN" y "polinucleótido" se incluyen segmentos de ADN y fragmentos más pequeños de dichos segmentos, y también vectores recombinantes, incluyendo, por ejemplo, plásmidos, cósmidos, fagémidos, fagos, virus y similares.

Como comprenderán los expertos en la técnica, las secuencias polinucleotídicas de esta invención pueden incluir secuencias genómicas, secuencias extra genómicas y codificadas en plásmidos y segmentos génicos de ingeniería más pequeños que expresan o pueden adaptarse para expresar proteínas, polipéptidos de fusión, Péptidos y

similares. Tales segmentos pueden estar naturalmente aislados, ser recombinantes o modificados sintéticamente por la mano del hombre.

Como será reconocido por el experto en la técnica, los polinucleótidos pueden ser monocatenarios (codificantes o antisentido) o bicatenarios, y pueden ser moléculas de ADN (genómico, ADNc o sintético) o ARN. Pueden estar presentes, pero no necesariamente, secuencias codificantes o no codificantes adicionales dentro de un polinucleótido de la presente invención, y un polinucleótido puede, aunque no necesariamente, estar enlazado a otras moléculas y/o materiales de soporte.

Los polinucleótidos pueden comprender una secuencia nativa (es decir, una secuencia endógena que codifica un antígeno de Leishmania o una parte de los mismos) o pueden comprender una variante, o un equivalente funcional biológico o antigénico de dicha secuencia. En realizaciones particulares, los polinucleótidos pueden codificar para dos o más porciones, fragmentos o variantes antigénicos/inmunogénicos derivados de los antígenos Leishmania K26, K39 y/o K9. En cierta realización, los polinucleótidos que codifican polipéptidos de fusión de la presente invención pueden codificar dos o más fragmentos de antígeno de Leishmania como se describen en las SEQ ID NO: 5-7 y 9-11. En un aspecto relacionado, el polipéptido de fusión está codificado por polinucleótidos que codifican la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 8 o los aminoácidos 10 - 262 de SEQ ID NO: 8.

Las variantes de polinucleótidos pueden contener una o más sustituciones, adiciones, supresiones y/o inserciones, como se describe adicionalmente más adelante, preferiblemente de manera que la inmunogenicidad del polipéptido codificado no disminuya, con relación a la proteína nativa. El efecto sobre la inmunogenicidad del polipéptido codificado puede evaluarse generalmente como se describe en la presente memoria. El término "variantes" también abarca genes homólogos de origen xenogénico.

En realizaciones adicionales, los polinucleótidos de fusión aislados comprenderán varias longitudes de tramos contiguos de secuencia idénticos o complementarios a dos o más K26, K39, y/o K9, tales como las secuencias descritas en la presente memoria, porciones o variantes de las mismas. Por ejemplo, son proporcionados polinucleótidos por esta invención 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 Descritos en la presente memoria, así como todas las longitudes intermedias entre los mismos. Se entenderá fácilmente que "longitudes intermedias", en este contexto, significa cualquier longitud entre los valores citados, tales 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 los enteros a través de 200-500; 500-1.000, y similares.

Los polinucleótidos de fusión de la presente invención, o sus fragmentos, independientemente de la longitud de la propia secuencia codificante, pueden combinarse con otras secuencias de ADN, tales como promotores, señales de poliadenilación, sitios de enzimas de restricción adicionales, sitios de clonación múltiples, otros segmentos codificantes, Y similares, de manera que su longitud total pueda variar considerablemente. Por lo tanto, se contempla que se puede emplear un fragmento de polinucleótido de casi cualquier longitud; estando preferiblemente limitada la longitud total por la facilidad de preparación y el uso en el protocolo del ADN recombinante deseado.

Además, los expertos en la técnica apreciarán que, como resultado de la degeneración del código genético, hay muchas secuencias de nucleótidos que codifican un polipéptido como se describe en el presente documento. Algunos de estos polinucleótidos tienen una homología mínima con la secuencia de nucleótidos de cualquier gen nativo. Sin embargo, los polinucleótidos que varían debido a las diferencias en el uso de codones están específicamente contemplados por la presente invención, por ejemplo polinucleótidos que están optimizados para la selección de codones humanos y/o primates. Además, los alelos de los genes que comprenden las secuencias polinucleotídicas proporcionadas en el presente documento están dentro del alcance de la presente invención. Los alelos son genes endógenos que se alteran como resultado de una o más mutaciones, tales como supresiones, adiciones y/o sustituciones de nucleótidos. El ARNm y la proteína resultantes pueden, pero no necesitan, tener una estructura o función alterada. Los alelos pueden identificarse usando técnicas estándar (tales como hibridación, amplificación y/o comparación de secuencias de bases de datos).

Los polinucleótidos de Leishmania y sus fusiones pueden prepararse, manipularse y/o expresarse usando cualquiera de una variedad de técnicas bien establecidas conocidas y disponibles en la técnica. Por ejemplo, pueden usarse secuencias polinucleotídicas o fragmentos de las mismas que codifican polipéptidos de la invención, o proteínas de fusión o equivalentes funcionales de las mismas, en moléculas de ADN recombinante para dirigir la expresión de un polipéptido en células huésped apropiadas. Debido a la degeneración inherente del código genético, pueden producirse otras secuencias de ADN que codifican sustancialmente la misma o una secuencia de aminoácidos funcionalmente equivalente y estas secuencias pueden usarse para clonar y expresar un polipéptido dado de la presente invención.

Como comprenderán los expertos en la técnica, puede ser ventajoso en algunos casos producir secuencias de nucleótidos codificantes del polipéptido de fusión que poseen codones no naturales. Por ejemplo, los codones preferidos por un huésped procariótico o eucariótico particular pueden seleccionarse para aumentar la velocidad de

expresión de la proteína o para producir un transcripto de ARN recombinante que tenga propiedades deseables, tal como una semivida que sea más larga que la de un transcrito generado a partir de la secuencia natural.

Por otra parte, las secuencias polinucleotídicas de la presente invención pueden ser modificadas mediante métodos generalmente conocidos en la técnica con el fin de alterar las secuencias codificantes de polipéptidos de fusión por una diversidad de razones, incluyendo pero sin limitarse a alteraciones que modifican la clonación, procesamiento, expresión y/o inmunogenicidad del producto génico.

Con el fin de expresar un polipéptido de fusión deseado que comprenda dos o más fragmentos o porciones antigénicas/inmunogénicas o porciones de polipéptidos K26, K39 y/o K9, se puede insertar una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido de fusión o un equivalente funcional en el vector de expresión apropiado, es decir, un vector que contenga los elementos necesarios para la transcripción y traducción de la secuencia codificante insertada. Pueden usarse métodos que son bien conocidos por los expertos en la técnica para construir vectores de expresión que contienen secuencias que codifican un polipéptido de interés y elementos de control transcripcionales y de traducción apropiados. Estos métodos incluyen técnicas de ADN recombinante in vitro, técnicas sintéticas y recombinación genética in vivo. Tales técnicas se describen en Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual (2001) y Ausubel y col., Current Protocols in Molecular Biology (enero de 2008, edición actualizada).

Se conocen una variedad de sistemas vector/huésped de expresión y pueden utilizarse para contener y expresar secuencias de polinucleótidos. Estos incluyen, pero no se limitan a, microorganismos tales como bacterias transformadas con bacteriófagos recombinantes, plásmidos, o vectores de expresión de ADN cósmido; levadura transformada con vectores de expresión de levadura; sistemas de células de insectos infectados con vectores de expresión de virus (por ejemplo, baculovirus); sistemas de células de planta transformadas con vectores de expresión de virus (por ejemplo, virus del mosaico de la coliflor, CaMV, virus del mosaico del tabaco, TMV) o con vectores de expresión bacterianos (por ejemplo, plásmidos Ti o pBR322); o sistemas celulares animales.

Los "elementos de control" o "secuencias reguladoras" presentes en un vector de expresión son aquellas regiones no traducidas de los potenciadores del vector, promotores, regiones 5' y 3' no traducidas que interaccionan con proteínas celulares del huésped para llevar a cabo la transcripción y la traducción. Tales elementos pueden variar en su resistencia y especificidad. Dependiendo del sistema de vector y huésped utilizado, se puede usar 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, CA) 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, los vectores basados en SV40 o EBV pueden usarse ventajosamente con un marcador seleccionable apropiado.

En sistemas bacterianos, se pueden seleccionar varios vectores de expresión dependiendo del uso destinado al polipéptido expresado. Por ejemplo, cuando se necesitan grandes cantidades, se pueden usar vectores que dirigen la expresión de alto nivel de proteínas de fusión que se purifican fácilmente. Tales vectores incluyen, pero no se limitan a, los vectores de clonación y expresión de E. coli multifuncionales tales como PBLUESCRIPT (Stratagene), en los que la secuencia que codifica el polipéptido de interés puede ligarse al vector en el marco con secuencias para el Met terminal amino y los subsiguientes 7 residuos de β-galactosidasa de manera 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.) También pueden usarse para expresar polipéptidos ajenos 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 por adsorción a perlas de glutatión-agarosa seguido por elución en presencia de glutatión libre. Las proteínas fabricadas en tales sistemas pueden diseñarse para incluir sitios de escisión de heparina, trombina o factor XA proteasa de manera que el polipéptido clonado de interés pueda liberarse del resto GST a voluntad.

En la levadura, Saccharomyces cerevisiae, pueden usarse varios vectores que contienen promotores constitutivos o inducibles tales como el factor alfa, la alcoholoxidasa y la PGH. Para revisiones, véase Ausubel et al. (Supra) y Grant et al., Methods Enzymol. 153: 516 - 544 (1987).

En los casos en que se usan vectores de expresión de plantas, la expresión de secuencias que codifican polipéptidos puede ser impulsada por cualquiera de un número de promotores. Por ejemplo, los promotores virales tales como los promotores 35S y 19S de CaMV pueden usarse solos o en combinación con la secuencia líder omega de TMV (Takamatsu, EMBO J. 6: 307-311 (1987)). Alternativamente, se pueden usar promotores de plantas tales como la subunidad pequeña de RUBISCO o promotores de choque térmico (Coruzzi et al., EMBO J. 3: 1671 - 1680 (1984), Broglie y col., Science 224: 838 - 843 (1984), y Winter et al., Results Probl. Cell Differ. 17: 85 - 105 (1991)). Estas construcciones se pueden introducir en células de planta mediante transformación directa de ADN o

transfección mediada por patógenos. Tales técnicas se describen en una serie de revisiones generalmente disponibles (véase, por ejemplo, Hobbs in McGraw Hill, Yearbook of Science and Technology, pp. 191-196 (1992)).

También se puede usar un sistema de insectos para expresar un polipéptido de interés. Por ejemplo, en un sistema de este tipo, se utiliza el virus de la poliedrosis 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 se ponen bajo control del promotor de poliedrina. La inserción exitosa de la secuencia que codifica el polipéptido hará que el gen de la poliedrina sea inactivo y produzca un virus recombinante que carece de proteína de recubrimiento. Los virus recombinantes pueden utilizarse entonces para infectar, por ejemplo, células de S. frugiperda o larvas de Trichoplusia en las que puede expresarse el polipéptido de interés (Engelhard et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 91: 3224 - 3227 (1994)).

En células huésped de mamífero, están disponibles generalmente varios sistemas de expresión basados en virus. Por ejemplo, en los casos en que se usa un adenovirus como vector de expresión, las secuencias que codifican un polipéptido de la presente invención pueden ligarse a un complejo de transcripción/traducción de adenovirus que consiste en el promotor tardío y la secuencia líder tripartita. La inserción en una región E1 o E3 no esencial del genoma viral puede usarse para obtener un virus viable que sea capaz de expresar el polipéptido en células huésped infectadas (Logan & Shenk, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81: 3655 - 3659 (1984)). Además, se pueden usar potenciadores de la transcripción, tales como el potenciador del virus del sarcoma de Rous (RSV), para aumentar la expresión en células huésped de mamífero.

También se pueden usar señales de iniciación específicas para conseguir una traducción más eficaz de las secuencias que codifican un polipéptido de fusión de interés. Tales señales incluyen el codón de iniciación ATG y secuencias adyacentes. En los casos en que las secuencias que codifican el polipéptido, su codón de iniciación y secuencias aguas arriba se insertan en el vector de expresión apropiado, no se necesitarán señales adicionales de control transcripcional o de traducción. Sin embargo, en los casos en los que sólo se inserta secuencia de codificación, o una porción de la misma, se deben proporcionar señales de control de traducción exógenas que incluyen el codón de iniciación ATG. Además, el codón de iniciación debe estar en el marco de lectura correcto para asegurar la traducción de todo el inserto. Los elementos de traducción exógenos y los codones de iniciación pueden ser de diversos orígenes, tanto naturales como sintéticos. La eficacia de la expresión puede potenciarse mediante la inclusión de potenciadores que son apropiados para el sistema celular particular que se utiliza, tales como los descritos en la bibliografía (Scharf et al., Results Probl. Cell Differ. 20: 125 - 162 (1994)).

Además, se puede elegir una cepa de célula huésped por su capacidad para modular la expresión de las secuencias insertadas o para procesar la proteína de fusión expresada de la manera deseada. Tales modificaciones del polipéptido incluyen, pero no se limitan a, acetilación, carboxilación, glicosilación, fosforilación, lipidación y acilación. El procesamiento postraduccional que escinde una forma "prepro" de la proteína también puede usarse para facilitar la inserción, plegado y/o función correctos. Se pueden elegir diferentes células huésped tales como CHO, HeLa, MDCK, HEK293 y W138, que tienen maquinaria celular específica y mecanismos característicos para tales actividades postraduccionales, para asegurar la correcta modificación y procesamiento de la proteína ajena.

Para la producción a largo plazo y de alto rendimiento de proteínas recombinantes, generalmente se prefiere una expresión estable. Por ejemplo, las líneas celulares que expresan de manera estable un polinucleótido de fusión de la presente invención se pueden transformar utilizando vectores de expresión que pueden contener orígenes virales de replicación y/o elementos de expresión endógenos y un gen marcador seleccionable en el mismo o en un vector separado. Después de la introducción del vector, se puede permitir que las células crezcan durante 1-2 días en un medio enriquecido antes de que se cambien a medios selectivos. El objetivo del marcador seleccionable es conferir resistencia a la selección, y su presencia permite el crecimiento y la recuperación de células que expresan con éxito las secuencias introducidas. Los clones resistentes de células transformadas de forma estable pueden proliferarse usando técnicas de cultivo de tejidos apropiadas para el tipo de células.

Puede usarse cualquier número de sistemas de selección para recuperar líneas celulares transformadas. Estos incluyen, pero no se limitan a, genes de la timidina quinasa del virus del herpes simple (Wigler et al., Cell 11: 223-232 (1977)) y adenina fosforibosiltransferasa (Lowy et al., Cell 22: 817-823 (1990)) que pueden ser empleados en células tk- o aprt-, respectivamente. También, la base para la selección puede ser la resistencia a antimetabolitos, antibióticos o herbicidas; por ejemplo, dhfr que confiere resistencia al metotrexato (Wigler et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 77: 3567 - 70 (1980)); Npt, que confiere resistencia a los aminoglucósidos, neomicina y G - 418 (Colbere - Garapin et al., J. Mol. Biol. 150: 1 - 14 (1981)); y als o pat, que confieren resistencia al clorsulfurón ya la fosfinotricina 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 ganado popularidad con marcadores tales como antocianinas, β-glucuronidasa y su sustrato GUS, y la luciferasa y su sustrato luciferina, siendo ampliamente utilizado no sólo para identificar

transformantes, sino también para cuantificar la cantidad de expresión de proteína transitoria o estable Atribuible a un sistema vector específico (Rhodes et al., Methods Mol. Biol. 55: 121 - 131 (1995)).

Se conocen en la técnica una variedad de protocolos para detectar y medir la expresión de productos codificados por polinucleótidos, usando anticuerpos policlonales o monoclonales específicos para el producto. Los ejemplos incluyen el ensayo inmunoenzimático (ELISA), el radioinmunoensayo (RIA) y la clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS). Estos y otros ensayos se describen, entre otros lugares, en Hampton et al., Serological Methods, a Laboratory Manual (1990) y Maddox et al., J. Exp. Med. 158: 1211 - 1216 (1983).

Una amplia variedad de marcadores y técnicas de conjugación son conocidas por los expertos en la técnica 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, traducción de muescas, marcado final o amplificación por PCR usando un nucleótido marcado. Alternativamente, las secuencias, o cualquiera de sus porciones, se pueden clonar en un vector para la producción de una sonda de ARNm. Tales vectores son conocidos en la técnica, están disponibles comercialmente 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 llevarse a cabo usando una variedad de kits comercialmente disponibles. Las moléculas indicadoras o marcadores adecuados que pueden usarse incluyen radionúclidos, enzimas, agentes fluorescentes, quimioluminiscentes o cromogénicos, así como sustratos, cofactores, inhibidores, partículas magnéticas y similares.

Las células huésped transformadas con una secuencia polinucleotídica de interés pueden cultivarse bajo condiciones adecuadas para la expresión y recuperación de la proteína a partir del cultivo celular. La proteína producida por una célula recombinante puede ser secretada o contenida intracelularmente dependiendo de la secuencia y/o del vector utilizado. Como comprenderán los expertos en la técnica, los vectores de expresión que contienen polinucleótidos de la invención pueden estar diseñados para contener secuencias señal que dirigen la secreción del polipéptido codificado a través de una membrana celular procariótica o eucariótica. Se pueden usar otras construcciones recombinantes para unir secuencias que codifican un polipéptido de interés para la secuencia de nucleótidos que codifica un dominio polipéptido que facilitará la purificación de proteínas solubles.

Además de los métodos de producción recombinante, los polipéptidos de fusión de la invención, y sus fragmentos, pueden producirse mediante síntesis directa de péptidos usando técnicas en fase sólida (Merrifield, J. Am. Chem. Soc. 85: 2149 - 2154 (1963)). La síntesis de proteínas se puede realizar usando técnicas manuales o por automatización. La síntesis automatizada puede conseguirse, por ejemplo, utilizando el sintetizador de péptidos Applied Biosystems 431A (Perkin Elmer). Alternativamente, varios fragmentos, por ejemplo, dos o más fragmentos antigénicos/inmunogénicos de antígenos de Leishmania K26, K39 y/o K9, pueden sintetizarse químicamente por separado y combinarse usando métodos químicos para producir la molécula de longitud completa.

Métodos y kits de diagnóstico

En otro aspecto, esta invención proporciona compuestos y métodos para detectar leishmaniasis en individuos y en suministros de sangre. En una realización particular, el individuo es un mamífero. En una realización más particular el mamífero es humano o canino.

En un aspecto, se proporcionan métodos para detectar leishmaniasis visceral asintomática o subclínica en una muestra biológica, que comprende: (a) poner en contacto una muestra biológica con un polipéptido de fusión tal como se describe en el presente documento, por ejemplo, que comprende al menos dos antígenos heterólogos de Leishmania, en donde los antígenos de Leishmania se seleccionan de K39, K26, como se define anteriormente que difiere solamente en sustituciones y/o modificaciones conservativas; y (b) detectar en la muestra biológica la presencia de anticuerpos que se unen al polipéptido de fusión, detectando de este modo infección visceral asintomática o subclínica de Leishmania en la muestra biológica.

En un aspecto particular, la presente invención proporciona métodos para detectar leishmaniasis visceral asintomática o subclínica en una muestra biológica, que comprende: (a) poner en contacto una muestra biológica con un polipéptido de fusión como se describe en el presente documento, por ejemplo, que comprende al menos dos antígenos heterólogos de Leishmania, en el que los antígenos de Leishmania se seleccionan de secuencias de polipéptidos K39, K26 y/o K9 de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID NO: 5-7 y 9-11, en cualquier combinación, como se define anteriormente; y (b) detectar en la muestra biológica la presencia de anticuerpos que se unen al polipéptido, detectando de este modo infección visceral asintomática o subclínica de Leishmania en la muestra biológica. En realizaciones relacionadas, al menos uno de los antígenos K26, K39 y K9 de Leishmania es de la especie de Leishmania donovani.

En ciertos aspectos, la presente invención proporciona métodos para detectar la infección visceral de Leishmania en una muestra biológica, que comprende: (a) poner en contacto una muestra biológica con un polipéptido de fusión

como se describe en la presente memoria, por ejemplo, que comprende al menos dos antígenos heterólogos de Leishmania, en donde la proteína de fusión comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 8 o los aminoácidos 10-262 de SEQ ID NO: 8, como se define anteriormente; y (b) detectar en la muestra biológica la presencia de anticuerpos que se unen al polipéptido, detectando de este modo la infección visceral de Leishmania en la muestra biológica.

En otro aspecto relacionado, se proporcionan métodos para identificar un paciente afectado con leishmaniasis visceral asintomática o subclínica que es probable que desarrolle leishmaniasis visceral aguda. En una realización, el método comprende: (a) poner en contacto una muestra biológica obtenida de un paciente afligido con leishmaniasis visceral asintomática o subclínica con un polipéptido de fusión como se describe en este documento, por ejemplo, que comprende al menos dos antígenos de Leishmania heterólogos, en donde los antígenos de Leishmania se seleccionan de K39, K26, y/o K9 como se define anteriormente; (b) detectar en la muestra biológica obtenida de un paciente la presencia de anticuerpos que se unen al polipéptido de fusión en la etapa (a), identificando así un paciente afligido con leishmaniasis visceral asintomática o subclínica que es probable que desarrolle leishmaniasis visceral aguda (LV).

Dentro de los aspectos relacionados, se proporcionan kits de diagnóstico para diagnosticar la leishmaniasis. En una realización, por ejemplo, se proporcionan kits para detectar leishmaniasis visceral en una muestra biológica, que comprende: (a) un polipéptido de fusión tal como se describe en este documento, por ejemplo, que comprende al menos dos antígenos de Leishmania heterólogos, en el que los antígenos de Leishmania se seleccionan de K39, K26 y/o K9 como se define anteriormente; y (b) detectar en la muestra biológica la presencia de anticuerpos que se unen al polipéptido, detectando así la leishmaniasis visceral en la muestra biológica.

En otro aspecto relacionado, se proporcionan métodos para identificar un paciente afectado con leishmaniasis visceral asintomática o subclínica que es probable que desarrolle leishmaniasis visceral aguda. En una realización, el método comprende: (a) poner en contacto una muestra biológica obtenida de un paciente afligido con leishmaniasis asintomática o subclínica con un polipéptido de fusión como se describe en este documento, por ejemplo, que comprende al menos dos antígenos heterólogos de Leishmania, en el que los antígenos de Leishmania son seleccionados de secuencias de polipéptidos K39, K26 y/o K9 de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID NO: 5-7 y 9-11, en cualquier combinación, como se define anteriormente; y (b) detectar en la muestra biológica obtenida de un paciente la presencia de anticuerpos que se unen al polipéptido de fusión en la etapa (a), identificando así un paciente afligido con leishmaniasis visceral asintomática o subclínica que es probable que desarrolle leishmaniasis visceral aguda (LV).

Dentro de los aspectos relacionados, se proporcionan kits de diagnóstico para diagnosticar la leishmaniasis. En una realización, se proporcionan kits para detectar leishmaniasis visceral en una muestra biológica, que comprende: (a) un polipéptido de fusión tal como se describe en este documento, por ejemplo, que comprende al menos dos antígenos heterólogos de Leishmania, en el que los antígenos de Leishmania se seleccionan entre secuencias de polipéptidos K39, K26, y/o K9 de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID NO: 5-7 y 9-11, en cualquier combinación, como se define anteriormente; y (b) detectar en la muestra biológica la presencia de anticuerpos que se unen al polipéptido, detectando así la leishmaniasis visceral en la muestra biológica.

En otro aspecto relacionado, se proporcionan métodos para identificar un paciente afectado con leishmaniasis visceral asintomática o subclínica que es probable que desarrolle leishmaniasis visceral aguda. En una realización, el método comprende: (a) poner en contacto una muestra biológica obtenida de un paciente afligido con leishmaniasis asintomática o subclínica con un polipéptido de fusión como se describe en este documento, por ejemplo, que comprende al menos dos antígenos heterólogos de Leishmania, en donde la proteína de fusión comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 8 o los aminoácidos 10-262 de SEQ ID NO: 8, como se define anteriormente; y (b) detectar en la muestra biológica la presencia de anticuerpos que se unen al polipéptido, detectando así la leishmaniasis visceral en la muestra biológica.

Dentro de los aspectos relacionados, se proporcionan kits de diagnóstico para diagnosticar la leishmaniasis. En una realización, se proporcionan kits para detectar leishmaniasis visceral en una muestra biológica, que comprende: (a) un polipéptido de fusión tal como se describe en este documento, por ejemplo, que comprende al menos dos antígenos heterólogos de Leishmania, en donde la proteína de fusión comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 8 o los aminoácidos 10 - 262 de SEQ ID NO: 8, como se define anteriormente; y (b) detectar en la muestra biológica la presencia de anticuerpos que se unen al polipéptido, detectando así la leishmaniasis visceral en la muestra biológica.

En otro aspecto de esta invención, se describen métodos para detectar y monitorizar la infección por Leishmania, así como para distinguir entre tipos de infecciones de Leishmania, en individuos y extracciones de sangre. En general, la infección por Leishmania puede detectarse en cualquier muestra biológica que contenga anticuerpos. Preferiblemente, la muestra es sangre, suero, plasma, saliva, líquido cefalorraquídeo, heces u orina. Más preferiblemente, la muestra es una muestra de sangre o suero obtenida de un paciente o de una extracción de sangre.

En otro aspecto, la infección de Leishmania puede detectarse usando un polipéptido de fusión que comprende dos o más polipéptidos que contienen uno o más de los epítopos discutidos anteriormente, repeticiones o variantes de los mismos. Si se emplean múltiples epítopos, estos epítopos pueden estar presentes en uno o más antígenos de Leishmania. Por ejemplo, en un aspecto, un polipéptido de fusión de la presente invención comprende dos o más polipéptidos antigénicos K26, K29 y/o K9. El polipéptido de fusión se utiliza entonces para determinar la presencia o ausencia de anticuerpos frente a los mismos polipéptidos antigénicos en la muestra, con relación a un valor de corte predeterminado.

Hay una variedad de formatos de ensayo conocidos por los expertos en la técnica para usar un polipéptido de fusión para detectar anticuerpos en una muestra. Véase, por ejemplo, Harlow and Lane, Antibodies. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988. En una realización preferida, el ensayo implica el uso del polipéptido de fusión inmovilizado sobre un soporte sólido para unirse y retirar el anticuerpo de la muestra. El anticuerpo unido puede entonces ser detectado usando un reactivo de detección que se une al complejo de anticuerpo/péptido y contiene un grupo indicador de detección. Los reactivos de detección adecuados incluyen anticuerpos que se unen al complejo anticuerpo/polipéptido y polipéptido libre marcado con un grupo indicador (por ejemplo, en un ensayo semicompetitivo). Los grupos indicadores adecuados incluyen marcadores fluorescentes, marcadores enzimáticos, radioisótopos, marcadores quimioluminiscentes, marcadores electroquimioluminiscentes, marcadores bioluminiscentes, polímeros, partículas de polímero, partículas metálicas, haptenos y colorantes. Alternativamente, se puede utilizar un ensayo competitivo, en el que un anticuerpo, que se une a un polipéptido de fusión de la presente invención marcado con un grupo indicador, se deja unirse al polipéptido de fusión inmovilizado después de la incubación del polipéptido de fusión con la muestra. El grado en que los componentes de la muestra inhiben la unión del anticuerpo marcado al polipéptido de fusión es indicativo de la reactividad de la muestra con el polipéptido de fusión inmovilizado.

El soporte sólido puede ser de cualquier material conocido por los expertos en la técnica al que se puede unir el polipéptido de fusión. Por ejemplo, el soporte puede ser un pocillo de ensayo en una placa de microtitulación o una nitrocelulosa u otra membrana adecuada. Alternativamente, el soporte puede ser una perla o un disco, tal como vidrio, fibra de vidrio, látex o un material plástico tal como poliestireno o cloruro de polivinilo. El soporte puede ser también una partícula magnética o un sensor de fibra óptica, tales como los descritos, por ejemplo, en la Patente de EE.UU. 5.359.681.

El polipéptido de fusión puede unirse al soporte sólido usando una variedad de técnicas conocidas por los expertos en la técnica, las cuales se describen ampliamente en la patente y en la literatura científica. En el contexto de la presente invención, el término "unido" se refiere tanto a la asociación no covalente, como a la adsorción, y la unión covalente (que puede ser un enlace directo entre el antígeno y los grupos funcionales sobre el soporte o puede ser un enlace por Forma de un agente de reticulación). Se prefiere la unión por adsorción a un pocillo en una placa de microvaloración o a una membrana. En tales casos, la adsorción se puede conseguir poniendo en contacto el polipéptido, en un tampón adecuado, con el soporte sólido durante un tiempo adecuado. El tiempo de contacto varía con la temperatura, pero es típicamente entre aproximadamente 1 hora y 1 día. En general, el contacto de un pocillo de una placa de microtitulación de plástico (tal como poliestireno o cloruro de polivinilo) con una cantidad de polipéptido de fusión que varía 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 cm^3.

La fijación covalente del polipéptido de fusión a un soporte sólido puede lograrse generalmente haciendo reaccionar primero el soporte con un reactivo bifuncional que reaccionará con el soporte y un 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 tenga un recubrimiento de polímero apropiado usando benzoquinona o por condensación de un grupo aldehído sobre el soporte con una amina y un hidrógeno activo sobre el polipéptido (véase, por ejemplo, Pierce Immunotechnology Catalog and Handbook (1991) en A12 - A13).

En ciertas realizaciones, el ensayo es un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA). Este ensayo puede realizarse poniendo en contacto primero 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 modo que los anticuerpos contra los antígenos de Leishmania del polipéptido de fusión dentro de la muestra Se les permite unirse al polipéptido de fusión inmovilizado. La muestra no unida se retira entonces del polipéptido de fusión inmovilizado y se añade un reactivo de detección capaz de unirse al complejo de anticuerpo-polipéptido inmovilizado. La cantidad de reactivo de detección que permanece unida al soporte sólido se determina entonces usando un método apropiado para el reactivo de detección específico.

Una vez que el polipéptido de fusión se inmoviliza sobre el soporte, los sitios restantes de unión a la proteína sobre el soporte son típicamente bloqueados. Se puede emplear cualquier agente bloqueante adecuado conocido por los expertos en la técnica, tal como albúmina de suero bovino (BSA) o Tween 20™ (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.). El polipéptido inmovilizado se incuba entonces con la muestra, y se permite que el anticuerpo (si está presente en la muestra) se una al antígeno. La muestra puede diluirse con un diluyente adecuado, tal como solución salina

tamponada con fosfato (PBS) antes de la incubación. En general, un tiempo de contacto apropiado (es decir, el tiempo de incubación) es aquel periodo de tiempo que es suficiente para permitir la detección de la presencia de anticuerpo dentro de una muestra infectada con Leishmania. Preferiblemente, el tiempo de contacto es suficiente para conseguir un nivel de unión que es al menos el 95% del alcanzado en equilibrio entre el anticuerpo unido y no unido. Los expertos en la técnica reconocerán que el tiempo necesario para alcanzar el equilibrio puede determinarse fácilmente analizando el nivel de unión que se produce durante un periodo de tiempo. A temperatura ambiente, generalmente es suficiente un tiempo de incubación de aproximadamente 30 minutos.

La muestra no unida puede entonces eliminarse lavando el soporte sólido con un tampón apropiado, tal como PBS que contiene 0,1% de Tween 20™. El reactivo de detección puede entonces añadirse al soporte sólido. Un reactivo de detección apropiado es cualquier compuesto que se une al complejo de anticuerpo-polipéptido inmovilizado y que puede ser detectado por cualquiera de una variedad de medios conocidos por los expertos en la técnica. Preferiblemente, el reactivo de detección contiene un agente de unión (tal como, por ejemplo, Proteína A, Proteína G, inmunoglobulina, lectina o antígeno libre) conjugado a un grupo indicador. Los grupos indicadores preferidos incluyen enzimas (tales como peroxidasa de rábano picante), sustratos, cofactores, inhibidores, colorantes, radionúclidos, grupos luminiscentes, grupos fluorescentes y biotina. La conjugación del agente de unión con el grupo indicador se puede conseguir usando métodos estándar conocidos por los expertos en la técnica. También se pueden comprar agentes de unión comunes conjugados a una variedad de grupos indicadores de muchas fuentes (por ejemplo, Zymed Laboratories, San Francisco, Calif. y Pierce, Rockford, IL).

El reactivo de detección se incuba luego con el complejo de polipéptido de anticuerpo inmovilizado durante una cantidad de tiempo suficiente para detectar el anticuerpo unido. Generalmente se puede determinar una cantidad de tiempo apropiada a partir de las instrucciones del fabricante o analizando el nivel de unión que se produce durante un período de tiempo. Entonces se retira el reactivo de detección no unido y se detecta el reactivo de detección unido usando el grupo indicador. El método empleado para detectar el grupo indicador depende de la naturaleza del grupo indicador. Para los grupos radiactivos, los métodos de contaje de escintilación o autorradiográficos son generalmente apropiados. Pueden usarse métodos espectroscópicos de detección de colorantes, 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 ser detectados generalmente por la adición de sustrato (generalmente durante un período de tiempo específico), seguido por análisis espectroscópico u otro análisis de los productos de reacción.

Para determinar la presencia o ausencia de anticuerpos anti-Leishmania en la muestra, la señal detectada desde el grupo indicador que permanece unida al soporte sólido se compara generalmente con una señal que corresponde a un valor de corte predeterminado. En una realización preferida, el valor de corte es preferiblemente la media de la señal media obtenida cuando el polipéptido inmovilizado se incuba con muestras de un paciente no infectado. En general, una muestra que genera una señal que es tres desviaciones estándar por encima del valor de corte predeterminado se considera positiva (es decir, reactiva con el polipéptido). En una realización preferida alternativa, el valor de corte se determina usando una Curva de Operador Receptor, de acuerdo con el método de Sackett y col., Clinical Epidemiology: A Basic Science for Clinical Medicine, p. 106-7 (Little Brown y Co., 1985). Brevemente, en esta realización, el valor de corte se puede determinar a partir de un gráfico de pares de tasas positivas verdaderas (es decir, sensibilidad) y tasas de falsos positivos (100% de especificidad) que corresponden a cada valor de corte posible para el resultado diagnóstico de la prueba. El valor de corte en el gráfico que es el más cercano a la esquina superior izquierda (es decir, el valor que encierra el área más grande) es el valor de corte más preciso, y una muestra que genera una señal que es más alta que la del valor de corte determinado por este método puede considerarse positivo. Alternativamente, el valor de corte se puede desplazar a la izquierda a lo largo de la gráfica, para minimizar la tasa de falsos positivos, o hacia la derecha, para minimizar la tasa de falsos negativos.

En una realización relacionada, el ensayo se realiza en un formato de prueba de flujo o de tira, donde el antígeno se inmoviliza sobre una membrana tal como nitrocelulosa. En la prueba de flujo, los anticuerpos dentro de la muestra se unen al polipéptido inmovilizado a medida que la muestra pasa a través de la membrana. Un reactivo de detección (por ejemplo, proteína A-oro coloidal) se une entonces al complejo de anticuerpo-polipéptido cuando la solución que contiene el reactivo de detección fluye a través de la membrana. La detección del reactivo de detección unido se puede realizar entonces como se ha descrito anteriormente. En el formato de prueba de tira, un extremo de la membrana a la que se une el polipéptido se sumerge en una solución que contiene la muestra. La muestra migra a lo largo de la membrana a través de una región que contiene el reactivo de detección y al área del 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 tal patrón indica un resultado negativo. En general, la cantidad de polipéptido de fusión inmovilizado sobre la membrana se selecciona 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 ha discutido anteriormente. Preferiblemente, la cantidad de polipéptido de fusión inmovilizado en la membrana oscila entre aproximadamente 25 ng y aproximadamente 1 µg, y más preferiblemente entre aproximadamente 50 ng y aproximadamente 500 ng. Tales

ensayos se pueden llevar a cabo típicamente con una cantidad muy pequeña (por ejemplo, una gota) de suero o sangre de paciente.

Por supuesto, existen numerosos otros protocolos de ensayo que son adecuados para su uso con los polipéptidos de fusión de la presente invención. Las descripciones anteriores están destinadas a ser únicamente ilustrativas.

En un aspecto de la descripción, los ensayos discutidos anteriormente pueden usarse para detectar específicamente la leishmaniasis visceral. En este aspecto, los anticuerpos en la muestra pueden ser detectados usando un polipéptido de fusión que comprende la secuencia de aminoácidos de dos o más fragmentos o epítopos antigénicos/inmunogénicos de un antígeno de Leishmania K26, K39, y/o K9. En otro aspecto, los anticuerpos en la muestra pueden detectarse utilizando un polipéptido de fusión que comprende la secuencia de aminoácidos de dos o más fragmentos o epítopos inmunogénicos como se establece en cualquiera de las SEQ ID NO: 5-7 y 9-11. En otro aspecto, los anticuerpos en la muestra se pueden detectar usando un polipéptido de fusión que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 8 o los aminoácidos 10 - 262 de la SEQ ID NO: 8. Preferiblemente, los antígenos de Leishmania se inmovilizan por adsorción a un soporte sólido tal como un pocillo de una placa de microvaloración o una membrana, como se ha descrito anteriormente, en cantidades aproximadamente similares, de modo que la cantidad total de polipéptido de fusión en contacto con el soporte oscila entre aproximadamente 10 ng hasta aproximadamente 100 µg. El resto de los pasos en el ensayo puede realizarse generalmente como se ha descrito anteriormente. Será fácilmente evidente para los expertos en la técnica que, al combinar los polipéptidos descritos en la presente memoria con otros polipéptidos que pueden detectar leishmaniasis cutánea y mucosa, los polipéptidos descritos en la presente memoria pueden usarse en métodos que detectan todos los tipos de leishmaniasis.

En otro aspecto de la invención, los pacientes con LV asintomática o subclínica cuya enfermedad es probable que progresen a la leishmaniasis visceral aguda pueden distinguirse de los pacientes infectados cuya enfermedad no es probable que progrese. Tal progresión puede ocurrir dentro de un año (y típicamente dentro de 5-12 meses) para la enfermedad subclínica, o dentro de muchos años en el caso de pacientes asintomáticos. Esta determinación puede realizarse usando cualquiera de varios enfoques. En una realización, el ensayo se realiza utilizando un polipéptido como se describe en la presente memoria, por ejemplo, que comprende al menos una unidad repetida del antígeno K39, como se expone en las SEQ ID NO: 6, 10 o 11, por ejemplo. En una realización relacionada, el polipéptido comprende una unidad repetida del antígeno K39 codificada por la secuencia polinucleotídica recitada en las SEQ ID NO: 2, 14 o 15. Mientras que una unidad repetida del antígeno K39 genera un resultado positivo (en relación con el valor de corte predeterminado) cuando reacciona con sueros de más del 97% de pacientes con leishmaniasis visceral aguda, los pacientes con leishmaniasis asintomática reaccionan muy débilmente, si lo hacen, con este antígeno. Es probable que los sueros que reaccionen débilmente indiquen infecciones que están en proceso de progresión o que probablemente progresen, hasta la leishmaniasis visceral aguda (o infecciones que están en remisión o respuesta al tratamiento, que pueden distinguirse según la historia del paciente).

En otra realización, el ensayo se realiza por separado con un polipéptido de fusión de la invención, por ejemplo, que comprende la secuencia de aminoácidos de dos o más fragmentos o epítopos antigénicos/inmunogénicos de un antígeno Leishmania K26, K39 y/o K9, tal como K28 Por ejemplo, y con un polipéptido que comprende al menos una unidad de repetición del antígeno K39. En esta realización, la densidad óptica (DO) obtenida en el ensayo que usa el polipéptido de fusión K28 se compara con el valor obtenido usando el polipéptido K39. Una DO significativamente mayor en el ensayo usando el polipéptido de fusión K28, cuando se compara con la DO en el ensayo usando el polipéptido K39 indica una detección más robusta y fiable de una infección asintomática o subclínica de LV. Los pacientes asintomáticos o subclínicos para los cuales ambos valores son relativamente altos probablemente estén en el proceso de desarrollar leishmaniasis visceral aguda (o en el proceso de recuperación de la infección). En otro aspecto, el ensayo se realiza por separado con un polipéptido de fusión que comprende la secuencia de aminoácidos de dos o más fragmentos o epítopos inmunogénicos como se establece en cualquiera de las SEQ ID NO: 5-7 y 9-11 y con un polipéptido que comprende al Menos una unidad repetida de un antígeno K39. En otro aspecto, el ensayo se realiza por separado con un polipéptido de fusión que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 8 o los aminoácidos 10-262 de la SEQ ID NO: 8, y con un polipéptido que comprende al menos una unidad repetida de un antígeno K39.

En otra realización, los pacientes asintomáticos o subclínicos que pueden desarrollar leishmaniasis visceral aguda pueden identificarse usando ensayos de polipéptidos de fusión separados (por ejemplo, K28) y K39 (como se describió anteriormente) que se realizan durante un período de tiempo. Por ejemplo, los ensayos se pueden realizar cada 1, 2, 3, 4, 5 o 6 meses durante un período de meses o años. Los pacientes asintomáticos o subclínicos que tienden a permanecer asintomáticos o subclínicos generalmente tienen sueros que muestran una alta reactividad con K28 y una baja reactividad con el K39, como se ha expuesto anteriormente, en cada punto de tiempo. Sin embargo, los pacientes que están progresando hacia la leishmaniasis visceral aguda mostrarán un aumento en la reactividad de ambos polipéptidos K28 y K39 durante el periodo de tiempo de los ensayos. Mediante la monitorización de un paciente individual de esta manera, el desarrollo de la leishmaniasis visceral aguda puede ser identificado antes de que otros síntomas aparezcan. Esta identificación temprana permite el tratamiento selectivo de sólo aquellos pacientes asintomáticos que están predispuestos a desarrollar una forma más grave de la enfermedad.

En otro aspecto de esta descripción, se pueden usar polipéptidos de fusión inmovilizados para purificar anticuerpos que se unan a los mismos. Tales anticuerpos pueden prepararse mediante cualquiera de una variedad de técnicas conocidas por los expertos en la técnica. Véase, por ejemplo, Harlow and Land, Antibodies. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988. En una de tales técnicas, un inmunógeno que comprende un polipéptido de fusión de la presente invención se inyecta inicialmente en cualquiera de una amplia variedad de mamíferos (por ejemplo, ratones, ratas, conejos, ovejas y cabras). En esta etapa, el polipéptido puede servir como el inmunógeno sin modificación. Alternativamente, particularmente para polipéptidos relativamente cortos, puede obtenerse una respuesta inmune superior si el polipéptido se une a una proteína portadora, tal como albúmina de suero bovino o hemocianina de lapa californiana. El inmunógeno se inyecta en el huésped animal, preferiblemente de acuerdo con un programa predeterminado que incorpora una o más inmunizaciones de refuerzo, y a los animales se les extrae sangre periódicamente. Los anticuerpos policlonales específicos para el polipéptido pueden purificarse después de tales antisueros por, por ejemplo, cromatografía de afinidad usando el polipéptido acoplado a un soporte sólido adecuado.

Los anticuerpos monoclonales específicos para el polipéptido antigénico de fusión de interés pueden prepararse, por ejemplo, utilizando la técnica de Kohler y Milstein, Eur. J. Immunol. 6: 511 - 519, 1976, y mejoras al mismo. En resumen, estos métodos implican la preparación de líneas celulares inmortales capaces de producir anticuerpos que tienen la especificidad deseada (es decir, reactividad con el polipéptido de interés). Tales líneas celulares pueden producirse, por ejemplo, a partir de células de bazo obtenidas de un animal inmunizado como se ha descrito anteriormente. Las células del bazo se inmortalizan a continuación, por ejemplo, mediante la fusión con una pareja de fusión de células de mieloma, preferiblemente una que sea singénica con el animal inmunizado. Se pueden emplear una variedad de técnicas de fusión. Por ejemplo, las células de bazo y las células de mieloma se pueden combinar con un detergente no iónico durante unos minutos y después se plaquean a baja densidad en un medio selectivo que soporta el crecimiento de células híbridas, pero no de células de mieloma. Una técnica de selección preferida utiliza la selección de HAT (hipoxantina, aminopterina, timidina). Después de un tiempo suficiente, normalmente de 1 a 2 semanas, se observan colonias de híbridos. Las colonias individuales se seleccionan y se ensayan en cuanto a actividad de unión contra el polipéptido. Se prefieren los hibridomas que tienen alta reactividad y especificidad.

Los anticuerpos monoclonales pueden aislarse de los sobrenadantes de las colonias de hibridoma en crecimiento. En este procedimiento, pueden emplearse diversas técnicas para aumentar el rendimiento, tal como la inyección de la línea celular de hibridoma en la cavidad peritoneal de un huésped vertebrado adecuado, tal como un ratón. Los anticuerpos monoclonales pueden entonces ser recuperados del fluido de ascitis o de la sangre. Los contaminantes pueden eliminarse de los anticuerpos mediante técnicas convencionales, tales como cromatografía, filtración en gel, precipitación y extracción. Uno o más polipéptidos se pueden usar en el proceso de purificación en, por ejemplo, una etapa de cromatografía de afinidad.

Los anticuerpos monoespecíficos que se unen a un polipéptido de fusión que comprende dos o más porciones inmunogénicas de antígenos de Leishmania K26, K39, y/o K9 pueden usarse, por ejemplo, para detectar la infección de Leishmania en una muestra biológica utilizando uno de una variedad de inmunoensayos que pueden ser directos o competitivos. Brevemente, en un formato de ensayo directo, se puede inmovilizar un anticuerpo monoespecífico sobre un soporte sólido (como se ha descrito anteriormente) y ponerse en contacto con la muestra a ensayar. Después de la eliminación de la muestra no unida, se puede añadir un segundo anticuerpo monoespecífico, que ha sido 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. La mezcla de muestra y anticuerpo puede entonces combinarse con antígeno polipeptídico inmovilizado sobre un soporte sólido adecuado. El anticuerpo que no se ha unido a un antígeno en la muestra se deja unirse al antígeno inmovilizado y el resto de la muestra y el anticuerpo se elimina. El nivel de anticuerpo unido al soporte sólido está inversamente relacionado con el nivel de antígeno en la muestra. Por lo tanto, un nivel inferior de anticuerpo unido al soporte sólido indica la presencia de Leishmania en la muestra. Otros formatos para el uso de anticuerpos monoespecíficos para detectar Leishmania en una muestra serán evidentes para los expertos en la técnica, y los formatos anteriores se proporcionan únicamente para propósitos ejemplares.

Composiciones farmacéuticas y vacunales

En otro aspecto, la presente invención se refiere a formulaciones de uno o más polinucleótidos, polipéptidos de fusión u otras composiciones descritas en la presente invención en soluciones farmacéuticamente aceptables o fisiológicamente aceptables para administración a una célula o un animal, ya sea solo o en combinación con uno o más otras modalidades de terapia. Tales composiciones farmacéuticas son particularmente preferidas para su uso como vacunas cuando se formulan con un sistema inmunoestimulante/adyuvante adecuado. Las composiciones son también adecuadas para su uso en un contexto de diagnóstico.

También se entenderá que, si se desea, las composiciones de la invención se pueden administrar en combinación con otros agentes también, tales como, por ejemplo, otras proteínas o polipéptidos o diversos agentes farmacéuticamente activos. Prácticamente no hay límite para otros componentes que también pueden incluirse,

siempre que los agentes adicionales no causen un efecto adverso significativo sobre los objetivos de acuerdo con la invención.

En ciertas realizaciones, las composiciones de la invención se usan como vacunas y se formulan en combinación con uno o más inmunoestimulantes. Un inmunoestimulante puede ser cualquier sustancia que realce o potencia una respuesta inmune (anticuerpo y/o mediada por células) a un antígeno exógeno. Ejemplos de inmunoestimulantes incluyen coadyuvantes, microesferas biodegradables (por ejemplo, galactida poliláctica) y liposomas (en los que se incorpora el compuesto, véase, por ejemplo, Fullerton, Patente de Estados Unidos Nº 4.235.877). La preparación de la vacuna se describe generalmente, por ejemplo, en Powell & Newman, eds., Vaccine Design (the subunit and adjuvant approach) (1995).

Puede utilizarse cualquiera de una variedad de inmunoestimulantes en las vacunas de esta invención. Por ejemplo, se puede incluir un adyuvante. Muchos adyuvantes contienen una sustancia diseñada para proteger el antígeno de un catabolismo rápido, tal como hidróxido de aluminio o aceite mineral, y un estimulador de respuestas inmunitarias, tales como las proteínas derivadas del lípido A (natural o sintético), Bortadella pertussis o Mycobacterium o proteínas derivadas de Mycobacterium. Adyuvantes adecuados están comercialmente disponibles como, por ejemplo, el Adyuvante Incompleto de Freund y el Adyuvante Completo (Difco Laboratories, Detroit, Mich.); Adjuvante 65 de Merck (Merck and Company, Inc., Rahway, N.J.); AS-2 y sus derivados (SmithKline Beecham, Philadelphia, Pa.); CWS, TDM, Leif, sales de aluminio tales como gel de hidróxido de aluminio (alumbre) o fosfato de aluminio; Sales de calcio, hierro o cinc; Una suspensión insoluble de tirosina acilada; Azúcares acilados; Polisacáridos derivatizados catiónicamente o aniónicamente; Polifosfacenos; Microesferas biodegradables; Monofosforil lípido A y quil A. También pueden usarse como adyuvantes citocinas, tales como GM-CSF o interleuquina-2, -7, o -12.

Otros adyuvantes ilustrativos útiles en el contexto de la invención incluyen agonistas del receptor de tipo Toll, tales como agonistas de TLR7, agonistas de TLR7/8, y similares. Todavía otros adyuvantes ilustrativos incluyen imiquimod, gardiquimod, resiquimod, y compuestos relacionados.

Ciertas vacunas emplean sistemas adyuvantes diseñados para inducir una respuesta inmunitaria predominantemente del tipo Th1. Los niveles altos de citoquinas de tipo Th1 (por ejemplo, IFN-γ, TNF-α, IL-2 e IL-12) tienden a favorecer la inducción de respuestas inmunes mediadas por células a un antígeno administrado. Por el contrario, los niveles elevados de citoquinas de tipo Th2 (por ejemplo, IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10) tienden a favorecer la inducción de respuestas inmunes humorales. Después de la aplicación de una vacuna como se proporciona en la presente, un paciente apoyará una respuesta inmune que incluye respuestas de tipo Th1 y Th2. En una realización, en la que una respuesta es predominantemente de tipo Th1, el nivel de citoquinas de tipo Th1 aumentará en mayor medida que el nivel de citoquinas de tipo Th2. Los niveles de estas citoquinas pueden ser fácilmente evaluados usando ensayos estándar. Para una revisión de las familias de citoquinas, véase Mossman y Coffman, Ann. Rev. Immunol. 7: 145 - 173 (1989).

Algunos adyuvantes para usar en la inducción de una respuesta predominantemente de tipo Th1 incluyen, por ejemplo, una combinación de monofosforil lípido A, preferiblemente monofosforil lípido A 3-de-O-acilado (3D-MPL™), junto con una sal de aluminio (patentes de EE.UU. Nos. 4.436.727; 4.877.611; 4.866.034; y 4.912.094). Los oligonucleótidos que contienen CpG (en los que el dinucleótido CpG está desmetilado) también inducen una respuesta predominantemente Th1. Tales oligonucleótidos son bien conocidos y se describen, por ejemplo, en los documentos WO 96/02555, WO 99/33488 y patentes de EE.UU. Nos. 6.008.200 y 5.856.462. Las secuencias de ADN inmunoestimuladoras también se describen, por ejemplo, por Sato et al., Science 273: 352 (1996). Otro adyuvante ilustrativo comprende una saponina, tal como Quil A, o sus derivados, incluyendo QS21 y QS7 (Aquila Biopharmaceuticals Inc., Framingham, Mass.); Escin; Digitonin; o saponinas de Gypsophila o Chenopodium quinoa. Otras formulaciones ilustrativas incluyen más de una saponina en las combinaciones de adyuvantes de la presente invención, por ejemplo combinaciones de al menos dos del siguiente grupo que comprende QS21, QS7, Quil A, escina o digitonina.

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 3D-MPL™, como se describe en el documento WO 94/00153, o una composición menos reactogénica en la que QS21 se inactiva con colesterol, como se describe en el documento WO 96/33739. Otras formulaciones comprenden una emulsión de aceite en agua y tocoferol. En WO 95/17210 se describe otra formulación adyuvante que emplea QS21, adyuvante 3D-MPL™ y tocoferol en una emulsión de aceite en agua.

Otro sistema adyuvante mejorado implica la combinación de un oligonucleótido que contiene CpG y un derivado de saponina como se describe en el documento WO 00/09159.

Otros adyuvantes ilustrativos incluyen Montanide ISA 720 (Seppic, Francia), SAF (Chiron, California, Estados Unidos), ISCOMS (CSL), MF-59 (Chiron), la serie de adyuvantes SBAS (por ejemplo, SBAS-2, AS2', AS2'', SBAS-4 o SBAS6, disponible de SmithKline Beecham, Rixensart, Bélgica), Detox, RC-529 (Corixa, Hamilton, Mont.) y otros glucosaminida 4-fosfatos de aminoalquilo (AGP), tales como los descritos en las patentes de EE.UU. US6113918 y

US6355257 en trámite, y adyuvantes de éter de polioxietileno tales como los descritos en el documento WO 99/52549A1.

Las composiciones de la invención pueden también, o alternativamente, comprender células T específicas para un polipéptido de fusión de Leishmania, tal como se describe en todo este documento. Tales células se pueden preparar generalmente in vitro o ex vivo, usando procedimientos estándar. Por ejemplo, las células T pueden aislarse de médula ósea, sangre periférica, o una fracción de médula ósea o sangre periférica de un paciente. Alternativamente, las células T pueden derivarse de seres humanos relacionados o no relacionados, de mamíferos no humanos, de líneas celulares o de cultivos.

Las células T pueden estimularse con un polipéptido de fusión que comprende dos o más porciones inmunogénicas de antígenos de Leishmania K26, K39 y/o K9, polinucleótido que codifica dicho polipéptido de fusión y/o una célula presentadora de antígeno (APC) que expresa tal polipéptido de fusión. Dicha estimulación se realiza bajo condiciones y durante un tiempo suficiente para permitir la generación de células T que son específicas para el polipéptido de fusión. Preferiblemente, el polipéptido o polinucleótido de fusión está presente dentro de un vehículo de suministro, tal como una microesfera, para facilitar la generación de células T específicas.

Las células T se consideran específicas para un polipéptido de fusión de la invención si las células T proliferan específicamente, segregan citocinas o destruyen células diana recubiertas con el polipéptido o expresan un gen que codifica el polipéptido. La especificidad de las células T puede evaluarse usando cualquiera de una variedad de técnicas estándar. Por ejemplo, dentro de un ensayo de liberación de cromo o ensayo de proliferación, un índice de estimulación de más de dos veces el aumento en lisis y/o proliferación, en comparación con controles negativos, indica la especificidad de células T. Tales ensayos pueden realizarse, por ejemplo, como se describe en Chen et al., Cancer Res. 54: 1065 - 1070 (1994)). Alternativamente, la detección de la proliferación de células T puede realizarse mediante una diversidad de técnicas conocidas. Por ejemplo, la proliferación de células T puede detectarse midiendo una velocidad incrementada de síntesis de ADN (por ejemplo, marcando por pulso cultivos de células T con timidina tritiada y midiendo la cantidad de timidina tritiada incorporada en el ADN). El contacto con un polipéptido de la invención (100 ng/ml-100 µg/ml, preferiblemente 200 ng/ml-25 µg/ml) durante 3-7 días debe resultar en al menos un aumento de dos veces en la proliferación de las células T. El contacto como se ha descrito anteriormente durante 2-3 horas debe resultar en la activación de las células T, medida según los ensayos estándar de citoquinas en las que un aumento de dos veces en el nivel de liberación de citoquinas (por ejemplo, TNFα o IFN-γ) es indicativo de la activación de células T (Véase Coligan y col., Current Protocols in Immunology, vol. 1 (1998)). Las células T que se han activado en respuesta a una APC que expresa un polipéptido de fusión, un polinucleótido o un polipéptido de fusión pueden ser CD4+ y/o CD8+. Las células T específicas de la proteína se pueden expandir usando técnicas estándar. En las realizaciones preferidas, las células T se derivan de un paciente, un donante relacionado o un donante no relacionado, y se administran al paciente después de la estimulación y la expansión.

En las composiciones farmacéuticas de la invención, la formulación de excipientes y soluciones portadoras farmacéuticamente aceptables es bien conocida por los expertos en la técnica, al igual que 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, la administración y formulación oral, parenteral, intravenosa, intranasal e intramuscular.

En ciertas aplicaciones, las composiciones farmacéuticas descritas en la presente invención pueden administrarse por vía oral a un sujeto. Como tales, estas composiciones se pueden formular con un diluyente inerte o con un vehículo comestible asimilable, o pueden encerrarse en cápsulas de gelatina dura o blanda, o pueden comprimirse en tabletas, o pueden incorporarse directamente con el alimento de la dieta.

En ciertas circunstancias, será deseable entregar las composiciones farmacéuticas descritas en la presente memoria parenteral, intravenosa, intramuscular o incluso intraperitonealmente, como se describe, por ejemplo, en la patente de EE.UU. Nº 5.543.158; patente de EE.UU. Nº 5.641.515 y la patente de EE.UU. Nº 5.399.363. Las soluciones de los compuestos activos como base libre o sales farmacológicamente aceptables pueden prepararse en agua adecuadamente mezclada con un tensioactivo, tal como hidroxipropilcelulosa. Las dispersiones también pueden prepararse en glicerol, polietilenglicoles líquidos, y mezclas de los mismos y en aceites. En condiciones normales de almacenamiento y uso, estas preparaciones contienen un conservante para prevenir el crecimiento de microorganismos.

Las formas farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de disoluciones o dispersiones inyectables estériles (Patente de EE.UU. No. 5.466.468). En todos los casos, la forma debe ser estéril y debe ser fluida en la medida en que exista una facilidad de inyección. Debe ser estable bajo las condiciones de fabricación y almacenamiento y debe preservarse contra la acción contaminante de microorganismos, tales como bacterias y hongos. El vehículo 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 adecuada puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento, tal como lecitina, mediante

el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de la dispersión y por el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de microorganismos puede ser facilitada por 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 ser provocada por el uso en las composiciones de agentes retardadores de la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

Para la administración parenteral en una solución acuosa, por ejemplo, la solución debe ser adecuadamente tamponada si es necesario y el diluyente líquido se hace primero isotónico con suficiente solución salina o glucosa. Estas soluciones acuosas particulares son especialmente adecuadas para la administración intravenosa, intramuscular, subcutánea e intraperitoneal. A este respecto, un medio acuoso estéril que se puede emplear será conocido por los expertos en la técnica a la luz de la presente descripción. Por ejemplo, se puede disolver una dosis en 1 ml de solución isotónica de NaCl y se añade a 1000 ml de fluido de hipodermocisis o se inyecta en el sitio de infusión propuesto (véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 15ª edición, págs. 1035-1038 y 1570-1580). Cierta variación en la dosificación necesariamente ocurrirá dependiendo de la condición del sujeto que se esté tratando. En cualquier caso, la persona responsable de la administración determinará la dosis apropiada para cada sujeto. Además, para la administración humana, las preparaciones deben cumplir con la esterilidad, pirogenicidad y los estándares generales de seguridad y pureza según lo requerido por los estándares de la Oficina de Biología de la FDA.

Las soluciones inyectables estériles se preparan incorporando los compuestos activos en la cantidad requerida en el disolvente apropiado con los otros ingredientes enumerados anteriormente, según se requiera, seguido por esterilización por filtración. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando los diversos ingredientes activos esterilizados en un vehículo estéril que contiene el medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos de preparación preferidos son técnicas de secado al vacío y liofilización que proporcionan un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente adicional deseado a partir de una solución filtrada previamente esterilizada del mismo.

Las composiciones descritas en la presente invención pueden formularse en una 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, ácidos clorhídrico o fosfórico, o ácidos orgánicos tales como acético, oxálico, tartárico, mandélico , y similares. Las sales formadas con los grupos carboxilo libres también se pueden derivar 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 soluciones se administrarán de una manera compatible con la formulación de dosificación y en una cantidad tal que sea terapéuticamente eficaz. Las formulaciones se administran fácilmente en una variedad de formas de dosificación tales como soluciones inyectables, cápsulas de liberación de fármaco y similares.

Tal como se usa en la presente memoria, "vehículo" incluye cualquier y todos los disolventes, medios de dispersión, vehículos, revestimientos, diluyentes, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardadores de la absorción, tampones, soluciones portadoras, suspensiones, coloides y similares. El uso de tales medios y agentes para sustancias farmacéuticas activas es bien conocido en la técnica. 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. Los ingredientes activos suplementarios también se pueden incorporar en las composiciones.

La frase "farmacéuticamente aceptable" se refiere a entidades moleculares y composiciones que no producen una reacción alérgica o similar adversa cuando se administran a un ser humano. La preparación de una composición acuosa que contiene una proteína como ingrediente activo se entiende bien en la técnica. Típicamente, tales composiciones se preparan como inyectables, ya sea como soluciones o suspensiones líquidas; También se pueden preparar formas sólidas adecuadas para solución en, o suspensión en un líquido antes de la inyección. La preparación también puede emulsionarse.

En ciertas realizaciones, las composiciones farmacéuticas pueden administrarse por pulverizaciones intranasales, inhalación, y/u otros vehículos de suministro de aerosoles. Los procedimientos para suministrar genes, polinucleótidos y composiciones de péptidos directamente a los pulmones a través de aerosoles nasales se han descrito, por ejemplo, en la Patente de EE.UU. Nº 5.756.353 y la Patente de EE.UU. Nº 5.804.212 (cada una de las cuales se incorpora específicamente en este documento como referencia en su totalidad). Del mismo modo, la administración de fármacos usando resinas de micropartículas intranasales (Takenaga et al., 1998) y compuestos de lisofosfatidil-glicerol (Patente de Estados Unidos Nº 5.725.871, incorporado específicamente en este documento como referencia en su totalidad), también se conocen bien en las técnicas farmacéuticas. Del mismo modo, el suministro de fármaco transmucosal en forma de una matriz de soporte de politetrafluoroetheileno se describe en la Patente de EE.UU. Nº 5.780.045 (incorporado específicamente en este documento como referencia en su totalidad).

En ciertas realizaciones, el suministro puede producirse mediante el uso de liposomas, nanocápsulas, micropartículas, microesferas, partículas lipídicas, vesículas y similares, para la introducción de las composiciones de la presente invención en células huésped adecuadas. En particular, las composiciones de la presente invención pueden formularse para su administración bien encapsuladas en una partícula lipídica, un liposoma, una vesícula, una nanosfera, una nanopartícula o similar. La formulación y el uso de tales vehículos de suministro pueden llevarse a cabo usando técnicas conocidas y convencionales.

En otro aspecto de esta invención, se proporcionan vacunas y composiciones farmacéuticas para la prevención de la infección por Leishmania y sus complicaciones, en un mamífero, preferiblemente un ser humano o un perro. Las composiciones farmacéuticas comprenden generalmente uno o más polipéptidos de fusión como se describe en este documento, y un vehículo fisiológicamente aceptable. Las vacunas comprenden uno o más de los polipéptidos de fusión anteriores y un adyuvante, para potenciar la respuesta inmune.

Las rutas y la frecuencia de las dosis de administración y polipéptido de fusión variarán de individuo a individuo y pueden ser paralelas a las utilizadas actualmente en la inmunización contra otras infecciones por protozoarios. En general, las composiciones farmacéuticas y las vacunas pueden administrarse por inyección (por ejemplo, intramuscular, intravenosa o subcutánea), intranasal (por ejemplo, por aspiración) u oralmente. Entre 1 y 4 dosis pueden administrarse durante un período de 2-6 semanas. Preferiblemente, se administran dos dosis, con la segunda dosis 2-4 semanas más tarde que la primera. Una dosis adecuada es una cantidad de polipéptido de fusión que es eficaz para producir anticuerpos en un mamífero tratado que son suficientes para proteger al mamífero de la infección de Leishmania durante un período de tiempo. En general, la cantidad de polipéptido de fusión presente en una dosis oscila entre aproximadamente 1 pg y aproximadamente 100 mg por kg de huésped, típicamente entre aproximadamente 10 pg y aproximadamente 1 mg y preferiblemente entre aproximadamente 100 pg y aproximadamente 1 µg. Los tamaños de dosis adecuados variarán con el tamaño del animal, pero típicamente oscilarán entre aproximadamente 0,01 ml y aproximadamente 5 ml para 10-60 kg de animal.

Aunque cualquier vehículo adecuado conocido por los expertos en la técnica puede ser empleado en las composiciones farmacéuticas de esta invención, el tipo de vehículo variará dependiendo del modo de administración. Para la administración parenteral, tal como inyección subcutánea, el vehículo preferiblemente comprende agua, solución salina, alcohol, una grasa, una cera o un tampón. Para la administración oral se puede emplear cualquiera de los vehículos anteriores o un vehículo sólido, tal como manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, talco, celulosa, glucosa, sacarosa y carbonato de magnesio. También pueden emplearse microesferas biodegradables (por ejemplo, galactida poliláctica) como vehículos para las composiciones farmacéuticas de esta invención.

Puede utilizarse cualquiera de una variedad de adyuvantes en las vacunas de esta invención para aumentar de forma no específica la respuesta inmune. La mayoría de los adyuvantes contienen una sustancia diseñada para proteger el antígeno del catabolismo rápido, tal como hidróxido de aluminio o aceite mineral, y un estimulador no específico de la respuesta inmune, tal como el lípido A, Bordella pertussis o Mycobacterium tuberculosis. Tales coadyuvantes están comercialmente disponibles como, por ejemplo, el adyuvante incompleto de Freund y el adyuvante completo (Difco Laboratories, Detroit, Michigan) y el adyuvante 65 de Merck (Merck y Company, Inc., Rahway, N.J.).

Ejemplo 1

Clonación y expresión del polipéptido de fusión de leishmania

La presente invención se refiere a una construcción génica sintética, denominada K28, que comprende secuencias derivadas de 3 genes de Leishmania donovani. El gen sintético comprende secuencias de ADN parciales de los genes K26 y K39 y las secuencias de ADN completas del gen K9. Adicionalmente, el gen sintético comprende un motivo N - terminal de nueve aminoácidos, que incluye 6 histidinas (por ejemplo, un marcador de epítopo 6X HIS). La construcción de ADN sintético se clonó en el sitio NdeI/XhoI del plásmido pCRX2.1 con el fin de expresar la proteína de fusión de este gen. El gen sintético contiene tres repeticiones de 14 aminoácidos de K26 codificadas por SEQ ID NO: 1, dos repeticiones de 39 aminoácidos de K39 codificadas por SEQ ID NO: 2 y el marco de lectura abierto completo para el gen K9 codificado por SEQ ID NO: 3. Esta construcción de fusión fue diseñada para mejorar el potencial de diagnóstico de cada una de estas proteínas individuales en una molécula y ofrece una cobertura más amplia, mayor sensibilidad y costos reducidos en términos de la fabricación de una sola proteína en lugar de las tres.

Ejemplo 2

Detección de infecciones viscerales asintomáticas y subclínicas de leishmania en seres humanos utilizando un polipéptido K28

Este Ejemplo ilustra el aumento de la sensibilidad de detección de la infección por Leishmania en seres humanos usando un polipéptido de fusión de la invención, preparado como se describe en el Ejemplo 1, en un formato ELISA.

Los ensayos ELISA se realizaron como sigue. Tres series de placas de 96 pocillos de Polysorp (Nunc, Rochester, NY) se recubrieron cada una con 2 µg/ml de un antígeno recombinante diferente en tampón de bicarbonato durante la noche a 4ºC y se bloquearon durante 2 horas a temperatura ambiente con PBST con 1% (p/v) de BSA en un agitador de placas. Los sueros se diluyeron apropiadamente a 1/200 en PBST con BSA al 0,1%, se añadieron a cada pocillo y las placas se incubaron a temperatura ambiente durante 2 horas con agitación. Las placas se lavaron con PBST con BSA al 0,1% y se añadió a cada pocillo inmunoglobulina IgG conjugada con HRP (Sigma, St. Louis, MO), diluida a 1:10000 en PBST y BSA al 0,1% y se incubaron a temperatura ambiente durante 60 minutos con sacudida. Después del lavado, se desarrollaron las placas con sustrato de color de peroxidasa (KPL, Baltimore Md.) con reacción inactivada por la adición de H_2SO_4 1N después de 10 minutos. La densidad óptica corregida de cada pocillo a 450-570 nm se leyó utilizando un lector de microplacas VERSAmax® (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). El valor de corte se determinó para cada ensayo calculando la media de los controles negativos de Conjugado de Enzima más tres desviaciones estándar (EC).

Se identificaron individuos venezolanos con leishmaniasis visceral (LV) basándose en la serología (por ejemplo, inmunofluorescencia o hemaglutinación IFAT o IHA), síntomas clínicos (p. Ej., malestar, diarrea, esplenomegalia y hepatomegalia) y ELISA de lisado entero. De las 52 muestras de suero de pacientes con LV, 94% dieron positivo en el ensayo anterior. Sin embargo, la prueba del antígeno K28 mostró valores de DO significativamente mayores en el 33% de las muestras débiles o marginalmente detectadas usando el antígeno K39 solo. Además, 3 muestras que se caracterizaron inicialmente como negativas utilizando el ensayo K39 se detectaron de manera fiable utilizando la prueba del antígeno K28.

Estos resultados se representan en la FIG. 2, que muestran la distribución de los valores de absorbancia a 450-570 nm para las 52 muestras de suero de LV ensayadas con K26, K28 y K39. Estos resultados indican que el uso de K28 proporciona una mayor sensibilidad sobre el uso de K39 solo para detectar la leishmaniasis visceral asintomática o subclínica.

Ejemplo 3

Detección de infecciones viscerales asintomáticas y subclínicas de leishmania en caninos utilizando un polipéptido K28

Este Ejemplo ilustra el aumento de la sensibilidad de detección de la infección por Leishmania en caninos usando un polipéptido de fusión de la invención, preparado como se describe en el Ejemplo 1, en un formato ELISA.

Los ensayos ELISA se realizaron como se describe en el Ejemplo 2, excepto que se usaron 4 antígenos recombinantes diferentes. Cuatro series de placas de 96 pocillos de Polysorp se recubrieron cada una con 2 µg/ml de los antígenos recombinantes K9, K26, K28 o K39. Se identificaron caninos venezolanos con leishmaniasis visceral (LV) basándose en la serología (por ejemplo, inmunofluorescencia o hemaglutinación IFAT o IHA), síntomas clínicos (p. ej., malestar, diarrea, esplenomegalia y hepatomegalia) y ELISA de lisado completo.

Los resultados representados en la FIG. 3 muestran que K28 identificó un número significativamente mayor de casos que cualquiera de los otros tres antígenos usados solos. Esto indica que el uso de K28 proporciona una mayor sensibilidad en los caninos para detectar la leishmaniasis asintomática o subclínica, y además, K28 proporciona una sensibilidad aumentada de detección con respecto al uso de antígenos K9, K26 y K39 solamente.

Ejemplo 4

Detección de infecciones viscerales de Leishmania en seres humanos usando un polipéptido K28 o un polipéptido K39 en un formato de prueba rápida de doble vía comparado con el ensayo de aglutinación directa

Este Ejemplo ilustra el aumento de la sensibilidad de detección de la infección por Leishmania en seres humanos usando un polipéptido de fusión de la invención (K28), preparado como se describe en el Ejemplo 1, frente a un único antígeno (K39) en un formato de prueba rápida de doble vía, en comparación con un Ensayo de aglutinación (DAT) utilizando sueros de Sudán.

El ensayo rápido de doble vía se realizó esencialmente como se describe en la patente de EE.UU. Nº 7.189.522, que se incorpora en este documento como referencia en su totalidad. Brevemente, se recubrió K28 o K39 sobre una tira de nitrocelulosa. Se añadió una gota de suero humano adecuadamente diluido al pocillo de muestra en un cartucho de ensayo que contenía la nitrocelulosa impregnada con antígeno. Después se añadieron dos gotas de tampón de muestra al pocillo de muestra y se dejó que la muestra migrara por acción capilar hasta que desaparecieran las líneas en la ventana de detección del cartucho de prueba. A continuación se añadieron dos gotas de tampón al

pocillo de reactivo de detección en el cartucho de ensayo para reconstituir el reactivo de detección inmovilizado (proteína A de Staphylococcus conjugada con oro coloidal).

El reactivo de detección migra por flujo capilar a la ventana de detección. Si la muestra contiene anticuerpos para el antígeno de prueba, se unen al antígeno inmovilizado en la ventana de detección donde se visualizarán como dos líneas rosadas por unión del reactivo de detección. Una sola línea rosa indica que no hay anticuerpo en la muestra y que el reactivo de detección está unido a inmunoglobulina (Ig) de control inmovilizada en la ventana de detección. La ausencia de líneas rosadas es indicativa de una prueba defectuosa.

El ensayo DAT se realizó esencialmente como se describe por Sundar y Rai en Clin Diag Lab Immunol 9: 951 - 958, 2002.

Los resultados de este análisis demostraron que K28 identificó un número significativamente mayor de casos de LV humana que el K39 solo. Más específicamente, K28 proporcionó una mayor sensibilidad en humanos (muestras 66/69, 95,6%) para detectar la leishmaniasis visceral frente a K39 solo (61/69 muestras, 88,4%) cuando se empleó en un formato de prueba rápida de doble vía. Además, 4 muestras de pacientes con títulos DAT muy bajos (<3200) se identificaron correctamente mediante la prueba rápida K28, mientras que sólo 2 de los 4 se identificaron correctamente mediante la prueba rápida K39.

Listado de secuencias

<110> Instituto de investigación de enfermedades infecciosas

Ajay Bhatia

Steven G. Reed

<120> PROTEÍNAS DE FUSIÓN Y SU USO EN EL DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO DE LA LEISHMANIASIS

<130> 480239.406PC

<140> PCT

<141> 2009-07-02

<150> US 61/078,255

<151> 03-07-2008

<160> 21

<170> FastSEQ para Windows Versión 4.0

<210> 1

<211> 126

<212> ADN

<213> L. donovani

<400> 1

```
ccgaaggagg acggccatac acagaaaaat gacggcgatg gccctaagga ggacggccat 60
acacagaaaa atgacggcga tggcccgaag gaggacggcc atacacagaa aaatgacggc 120
gatggc                                                            126
```

<210> 2

<211> 234

<212> ADN

<213> L. donovani

<400> 2

```
cttgagcagc tgcttcgcga atccgaggag cgcgctgcgg agctggcgag tcagctggag 60
tccactactg ctgcgaagat gtcggcggag caggaccgcg agaacacgag ggccacgcta 120
gagcagcagc ttcgtgactc cgaggagcgc gctgcggagc tggcgagcca gctggaggcc 180
actgctgctg cgaagtcgtc ggcggagcag gaccgcgaga acacgagggc cgcg       234
```

<210> 3

<211> 399

<212> ADN

<213> L. donovani

<400> 3

```
atgggaagtt cttgtacaaa ggactccgca aaggagcccc agaagcgtgc tgataacatc 60
cataaaacca ctgaggccaa tcacagaggc gccgccgtgc ccccgaagca cgccggcggt 120
gcgatgaacg actctgcccc gaagaaggat ggccatacac agaaaaatga cggcgatggc 180
cctaaggagg atgaccatac acagaaaaat gacggcgatg gccctaagga ggatgaccat 240
gcgcacaacg acggcggtgg ccctaaggag gatgagaatc tgccgcaaaa cgatggggat 300
gcgcaggaga agaacgaaga tggacacaac gtgggggatg gagctaacga caatgaggat 360
ggtaacgatg atcagccgaa ggagcacgct gccggcaac                        399
```

<210> 4

<211> 804

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de polinucleótido de un gen sintético de K28

<400> 4

```
catatgcatc accatcacca tcacactagt ccgaaggagg acggccatac acagaaaaat 60
gacggcgatg gccctaagga ggacggccat acacagaaaa atgacggcga tggcccgaag 120
gaggacggcc atacacagaa aaatgacggc gatggccttg agcagctgct tcgcgaatcc 180
gaggagcgcg ctgcggagct ggcgagtcag ctggagtcca ctactgctgc gaagatgtcg 240
gcggagcagg accgcgagaa cacgagggcc acgctagagc agcagcttcg tgactccgag 300
gagcgcgctg cggagctggc gagccagctg gaggccactg ctgctgcgaa gtcgtcggcg 360
gagcaggacc gcgagaacac gagggccgcg atgggaagtt cttgtacaaa ggactccgca 420
aaggagcccc agaagcgtgc tgataacatc cataaaacca ctgaggccaa tcacagaggc 480
gccgccgtgc ccccgaagca cgccggcggt gcgatgaacg actctgcccc gaagaaggat 540
ggccatacac agaaaaatga cggcgatggc cctaaggagg atgaccatac acagaaaaat 600
gacggcgatg gccctaagga ggatgaccat gcgcacaacg acggcggtgg ccctaaggag 660
gatgagaatc tgccgcaaaa cgatggggat gcgcaggaga agaacgaaga tggacacaac 720
gtgggggatg gagctaacga caatgaggat ggtaacgatg atcagccgaa ggagcacgct 780
gccggcaacg ctagctgact cgag                                        804
```

<210> 5

<211> 42

<212> PRT

<213> L. donovani

<400> 5

```
Pro Lys Glu Asp Gly His Thr Gln Lys Asn Asp Gly Asp Gly Pro Lys
 1               5                  10                  15
Glu Asp Gly His Thr Gln Lys Asn Asp Gly Asp Gly Pro Lys Glu Asp
            20                  25                  30
Gly His Thr Gln Lys Asn Asp Gly Asp Gly
        35                  40
```

<210> 6

<211> 78

<212> PRT

<213> L. donovani

<400> 6

```
Leu Glu Gln Leu Leu Arg Glu Ser Glu Glu Arg Ala Ala Glu Leu Ala
 1               5                  10                  15
Ser Gln Leu Glu Ser Thr Thr Ala Ala Lys Met Ser Ala Glu Gln Asp
            20                  25                  30
Arg Glu Asn Thr Arg Ala Thr Leu Glu Gln Gln Leu Arg Asp Ser Glu
        35                  40                  45
Glu Arg Ala Ala Glu Leu Ala Ser Gln Leu Glu Ala Thr Ala Ala Ala
    50                  55                  60
Lys Ser Ser Ala Glu Gln Asp Arg Glu Asn Thr Arg Ala Ala
65                  70                  75
```

<210> 7

<211> 133

<212> PRT

<213> L. donovani

<400> 7

```
Met Gly Ser Ser Cys Thr Lys Asp Ser Ala Lys Glu Pro Gln Lys Arg
 1               5                  10                  15
```

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

<210> 8

<211> 264

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos del gen sintético K28

<400> 8

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

<210> 9

<211> 14

<212> PRT

<213> L. donovani

<400> 9

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

<210> 10

<211> 39

<212> PRT

<213> L. donovani

<400> 10

```
Leu Glu Gln Leu Leu Arg Glu Ser Glu Glu Arg Ala Ala Glu Leu Ala
 1               5                  10                  15
Ser Gln Leu Glu Ser Thr Thr Ala Ala Lys Met Ser Ala Glu Gln Asp
            20                  25                  30
Arg Glu Asn Thr Arg Ala Thr
        35
```

<210> 11

<211> 39

<212> PRT

<213> L. donovani

<400> 11

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

<210> 12

<211> 42

<212> ADN

<213> L. donovani

<400> 12

```
ccgaaggagg acggccatac acagaaaaat gacggcgatg gc                    42
```

<210> 13

<211> 42

<212> ADN

<213> L. donovani

<400> 13

```
cctaaggagg acggccatac acagaaaaat gacggcgatg gc                    42
```

<210> 14

<211> 117

<212> ADN

<213> L. donovani

<400> 14

cttgagcagc tgcttcgcga atccgaggag cgcgctgcgg agctggcgag tcagctggag 60
tccactactg ctgcgaagat gtcggcggag caggaccgcg agaacacgag ggccacg 117

<210> 15

<211> 117

<212> ADN

<213> L. donovani

<400> 15

ctagagcagc agcttcgtga ctccgaggag cgcgctgcgg agctggcgag ccagctggag 60
gccactgctg ctgcgaagtc gtcggcggag caggaccgcg agaacacgag ggccgcg 117

<210> 16

<211> 1206

<212> ADN

<213> L. donovani

<400> 16

atgggaactt cttgtacaaa ggactccgca aaggagcccc agaagcgtgc tgataacatc 60
cataaaacca ctgaggccaa tcacggaggc gccactggtg tgcccccgaa gcacaccggc 120
agtgcgatga acgactctgc cccgaaggag gacggccata cacagaaaaa tgacggcgat 180
ggccctaagg aggacggcca tacacagaaa aatgacggcg atggcccgaa ggaggacggc 240
catacacaga aaaatgacgg cgatggccct aaggaggacg gccatacaca gaaaaatgac 300
ggcgatggcc cgaaggagga cggccataca cagaaaaatg acggcgatgg ccctaaggag 360
gacggccata cacagaaaaa tgacggcgat ggcccgaagg aggacggcca tacacagaaa 420
aatgacggcg atggccctaa ggaggacggc catacacaga aaaatgacgg cgatggcccg 480
aaggaggacg gccatacaca gaaaaatgac ggcgatggcc ctaaggagga cggccataca 540
cagaaaaatg acggcgatgg cccgaaggag gacggccata cacagaaaaa tgacggcgat 600
ggcccgaagg aggacggcca tacacagaaa aatgacggcg atggccctaa ggaggacggc 660
catacacaga aaaatgacgg cgatggcccg aaggaggacg gccatacaca gaaaaatgac 720
ggcgatggcc ctaaggagga cggccataca cagaaaaatg acggcgatgg cccgaaggag 780
gacggccata cacagaaaaa tgacggcgat ggccctaagg aggacggcca tacacagaaa 840
aatgacggcg atggcccgaa ggaggacggc catacacaga aaaatgacgg cgatggccct 900
aaggaggacg gccatacaca gaaaaatgac ggcgatggcc cgaaggagga cggccataca 960
cagaaaaatg acggcgatgg ccctaaggag gacggccata cacagaaaaa tgacggcgat 1020
ggcccgaagg aggacggcca tacacagaaa aatgacggcg atggccctaa ggagggtgag 1080
aatctgcagc aaaacgatgg ggatgcgcag gagaagaacg aagatggaca caacgtgggg 1140
gatggagcta acggcaatga ggatggtaac gatgatcagc cgaaggagca cgctgccggc 1200
aactag 1206

<210> 17

<211> 9831

<212> ADN

<213> L. donovani

<400> 17

atgcaccctt ccactgtgcg gcgtgaggcg gagcgggtga aggtgtcggt gcgcgtgcgc 60
cccctaaacg aacgtgaaaa caatgccccg gaagggacga aagtgaccgt tgcggcgaaa 120
caggcggccg ccgtggtgac ggtcaaggtc ctgggaggca gcaacaacag cggcgccgcc 180
gagtcgatgg ggactgcaag gcgggtagcg caggactttc agttcgacca cgtgttctgg 240
tctgtggaga cgccggacgc gtgcggcgcg acccccgcga cgcaggcaga cgtgttccgg 300
acgatcgggt acccgctggt gcagcacgcg ttcgacgggt tcaactcgtg cttgtttgcg 360
tacgggcaga cagggagcgg gaagacgtac acgatgatgg gcgcggacgt gagcgtgctt 420
agtggtgagg gcaacggcgt gacgccgcgg atctgcctgg agatctttgc gcggaaggcg 480
agcgtggagg cgcaggggca ctcgcggtgg atcgtggagc tggggtacgt ggaggtgtac 540
aacgagcgcg tgtcggacct gcttgggaag cggaagaagg gtgtgaaggg cggcggcgag 600
gaggtgtacg tggacgtgcg cgagcacccg agccgcggcg tgttcctgga ggggcagcgg 660
ctggtggagg ttgggagcct ggacgatgtt gtgcggctga tcgagatcgg caacggcgtg 720
cggcacaccg cttcgacgaa gatgaacgac cggagcagcc ggagccacgc gatcatcatg 780
ctgctgctgc gcgaggagcg gacgatgacg acgaagagcg gggagacgat ccgtactgcc 840

ggcaagagca gccgcatgaa ccttgtggac cttgcggggt ctgagcgcgt ggcgcagtcg 900
caggtggagg ggcagcagtt caaggaggcg acgcacatca acctgtcgct gacgacgctc 960
gggcgcgtga tcgacgtgct cgcggacatg gcgacgaagg gtgcgaaggc gcagtacagc 1020
gttgcgccgt tccgcgactc gaagctgacg ttcatcctga aggactcgct tggcgggaac 1080
tcgaagacgt tcatgatcgc gactgtgagc ccgagcgcgc tgaactacga ggagacgctg 1140
agcacgctgc ggtacgcgtc gcgcgcgcgc gacattgtga atgttgcgca ggtgaacgag 1200
gacccgcgcg cacggcggat ccgcgagctg gaggagcaga tggaggacat gcggcaggcg 1260
atggctggcg gcgaccccgc gtacgtgtct gagctgaaga agaagcttgc gctgctggag 1320
tcggaggcgc agaagcgtgc ggcggacctg caggcgctgg agagggagcg ggagcacaac 1380
caggtgcagg agcggctgct gcgcgcgacg gaggcggaga agagcgagct ggagtcgcgt 1440
gcggctgcgc tgcaggagga gatggccgcg actcgacggc aggcggacaa gatgcaggcg 1500
ctgaacctgc ggctgaagga agagcaggcg cgcaaggagc gcgagctgct gaaagagatg 1560
gcgaagaagg acgccgcgct ctcgaaggtt cggcgacgca aagacgccga gatagcaagc 1620
gagcgcgaga agctggagtc gaccgtggcg cagctggagc gtgagcagcg cgagcgcgag 1680
gtggctctgg acgcattgca gacgcaccag agaaagctgc aggaagcgct cgagagctct 1740
gagcggacag ccgcggaaag ggaccagctg cttcagcagc taacagagct tcagtctgag 1800
cgtacgcagc tatcacaggt tgtgaccgac cgcgagcggc ttacacgcga cttgcagcgt 1860
attcagtacg agtacgggga aaccgagctc gcgcgagacg tggcgctgtg cgccgcgcag 1920
gagatggagg cgcgctacca cgctgctgtg tttcacctgc aaacgctcct ggagctcgca 1980
accgagtggg aggacgcact ccgcgagcgt gcgcttgcag agcgtgacga agccgctgca 2040
gccgaacttg atgccgcagc ctctacttcc caaaacgcac gtgaaagcgc ctccgagcgg 2100
ctaaccagcc ttgagcagct gcttcgcgaa tccgaggagc gcgctgcgga gctggcgagt 2160
cagctggagt ccactactgc tgcgaagatg tcggcggagc aggaccgcga gaacacgagg 2220
gccacgctag agcagcagct tcgtgactcc gaggagcgcg ctgcggagct ggcgagccag 2280
ctggaggcca ctgctgctgc gaagtcgtcg gcggagcagg accgcgagaa cacgagggcc 2340
gcgttggagc agcagcttcg tgactccgag gagcgcgctg cggagctggc gagtcagctg 2400
gagtccacta ctgctgcgaa gacgtcggcg gagcaggacc gcgagaacac gagggccacg 2460
ctagagcagc agcttcgtga ctccgaggag cgcgctgcgg agctggcgag tcagctggag 2520
tccactactg ctgcgaagat gtcagcggag caggaccgcg agaacacgag ggccgcgcta 2580
gagcagcagc ttctcgaatc cgaggagcgc gctgcggagc tgaaggccga gctagaggcc 2640
actgctgctg cgaagtcgtc ggcggagcag gaccgcgaga acacgagggc cgcgttggag 2700
cagcagcttc gtgactccga ggagcgcgct gcggagctgg cgagtcagct ggagtccact 2760
actgctgcga agacgtcggc ggagcaggac cgcgagaaca cgagggccac gctagagcag 2820
cagcttcgtg actccgagga gcgcgctgcg gagctggcga gtcagctgga gtccactact 2880
gctgcgaaga tgtcggcgga gcaggaccgc gagaacacga gggccacgct agagcagcag 2940
cttcgtgact ccgaggagcg cgctgcggag ctggcgagtc agctggagtc cactactgct 3000
gcgaagatgt cggcggagca ggaccgcgag aacacgaggg ccacgctaga gcagcagctt 3060
cgtgactccg aggagcgcgc tgcggagctg gcgagtcagc tggagtccac tactgctgcg 3120
aagatgtcag cggagcagga ccgcgagaac acgagggccg cgctagagca gcagcttctc 3180
gaatccgagg agcgcgctgc ggagctgaag gccgagctag aggccactgc tgctgcgaag 3240
tcgtcggcgg agcaggaccg cgagaacacg agggccacgc tagagcagca gcttcgtgac 3300
tccgaggagc gcgctgcgga gctggcgagc cagctggagg ccactgctgc tgcgaagtcg 3360
tcggcggagc aggaccgcga gaacacgagg gccgcgttgg agcagcagct tcgtgactcc 3420
gaggagcgcg ctggggagct ggcgagccag ctggaggcca ctgctgctgc gaagtcgtcg 3480
gcggagcagg accgcgagaa cacgagggcc gcgttggagc agcagcttct cgaatccgag 3540
gcgcgcgctg cggagctggc gagccagctg gaggccactg ctgctgcgaa gtcgtcggcg 3600
gagcaggacc gcgagaacac gagggccgcg ttggagcagc agcttcgcga atccgaggcg 3660
cgcgctgggg agctggcgag ccagctggag gccactgctg ctgcgaagat gtcagcggag 3720
caggaccgcg agaacacgag ggccgcgttg gagcagcagc ttcgcgaatc cgaggagcgc 3780
gctgcggagc tggcgagcca gctggaggcc actgctgctg cgaagtcgtc ggcggagcag 3840
gaccgcgaga acacgagggc cgcgttggag cagcagcttc gcgaatccga ggcgcgcgct 3900
gcggagctgg cgagccagct ggaggccact gctgctgcga agtcgtcggc ggagcaggac 3960
cgcgagaaca cgagggccgc gttggagcag cagcttcgcg aatccgaggc gcgcgctgcg 4020
gagctggcga gccagctgga ggccactgct gctgcgaaga cgtcggcgga gcaggaccgc 4080
gagaacacga gggccgcgtt ggagcagcag cttcgcgaat ccgaggagcg cgctgcggag 4140
ctggcgagcc agctggaggc cactgctgct gcgaagatgt cggcggagca ggaccgcgag 4200
aacacgaggg ccacgctaga gcagcagctt ctcgaatccg aggagcgcgc tgcggagctg 4260
gcgagccagc tggaggccac tgctgctgcg aagatgtcgg cggagcagga ccgcgagaac 4320
acgagggcca cgctagagca gcagcttctc gaatccgagg agcgcgctgc ggagctggcg 4380
agccagctgg aggccactgc tgctgcgaag tcgtcggcgg agcaggaccg cgagaacacg 4440
agggccgcgt tggagcagca gcttcgggaa tccgaggcgc gcgctgcgga gctggcgagc 4500

cagctggagg ccactgctgc tgcgaagacg tcggcggagc aggaccgcga gaacacgagg 4560
gccacgctag agcagcagct tcgcgaatcc gaggcgcgcg ctggggagct ggcgagccag 4620
ctggaggcca ctgctgctgc gaagtcgtcg gcggagcagg accgcgagaa cacgagggcc 4680
gcgttggagc agcagcttcg ggaatccgag gagcgcgctg cggagctgat gcggaagtta 4740
gaggcgactg ctgctgcgaa gtcgtcggta gagcaggacc gtgagagcat gaaggtagcg 4800
cttgaggcgc gcaccgcgga gctggcttct cgattgaagg cgacggctgc tgcgaagacg 4860
tcggccgagc aggagcgaga taggacaagg gctacctttg aggagaggct aagagttgct 4920
gaagtgcgcg ctgtgcagct ggcgagtcag ctggaggcca ctgctgctgc gaagtcgtcg 4980
gtggagcagg accgcgaaaa gacgaggaca gctctggaag cgcgcgttgc ggagctggcg 5040
agcaagctgg aggccactgc tgctgcgaag gctttggtag agcaggaccg cgagaacacg 5100
agggccactt tagaggagcg actccgggtt gctgaggtgc gggctgcgga gctggcagcg 5160
cagctggagg ccactgctgc tgcgaagtcg tcggtggagc aggaccgcga aaagacgagg 5220
acggctctgg aagcgcgcgt tgcggagctg gcgagcaagc tggaggccac tgctgcggcg 5280
aagacttcgg cggagcagga ccgcgagagc acgagggcca ccttgaagga gcggcttcgg 5340
attgcggagg tgcgcgctgc ggagctggca acccagttgg aggcgacttc ggctgcgaag 5400
acgtcggtgg agcaggaccg cgagagaacg agggcggctc tggaggcgcg cgttgcggag 5460
ctggcgagca agctggagtc gacggcggct gcgaaggcct tggttgagca ggaccgcgag 5520
agcacgaggg ccaccttgga ggagcggctt cggattgcgg aggcgcgcgc tgcggaactt 5580
gccattgagt tggatgccac tgctgctgcg aaggcttcga tggaacatga ccgcgagagc 5640
acgagggcca ctttagagga gcggcttcgg attgcggagg tgcgcggagc ggaactggca 5700
agtcagctag aggccactgc tgctgcaaaa gcgttgttgg agcaggaccg ggagagaacg 5760
agggcggctc tggaggctcg agctgcggag ctggcgagca agctggaggc cactgctgct 5820
gcgaagatgt cggcggagca ggaccgcgag agaaccaggg cggccataga ggagcagctt 5880
cggctcgctg aggtgcgcgc tgcggagctg gcgagccagc tggaggccac tgctgctgca 5940
aaagcgttgt tggagcagga ccgcgagaga acgagggcgg ctctggaagg ccgcgctgcg 6000
gagctggcgc gaaagctgga ggccactgct attgccaaga cggcggtgga acaggaccgg 6060
gaaagcacga gggccacctt ggaggagcgc ttgcgcggtg ctgaggtgcg cgttgcggag 6120
ctggcgagtc agctggaggc cactgctgct gcgaagacgt cggcggagca ggagcgtgcg 6180
aacactaggg cggcgttgga ggcccgcgct gcggagctgg cgagcaagct ggaggcgact 6240
gctgctgcga agttcgcggt ggagcaggac cgtgagagga cgagggccac cttggaggag 6300
cgcttgcgcg gtgctgaggt gcgcgctgcg gagctggcgc gcaagctgga ggctactgct 6360
gctgcgaagg cttcgatgga acatgatcgc gagagcacga gggcggcttt ggaagagcgg 6420
ttgcgggggg cggaggttcg tgctgcggag ctggcgagca agcttgaggc aactgcggct 6480
gcgaaggccg cagtggagca ggaccgcgag aggactcggg cgacctttga aaagcagctt 6540
cgtgactccg aggcgcgggt tgcggagctt tcagggcagc tagaggccac tgctgctgcg 6600
aagacgtcgg cggagcagga ccgcgagaac acgaaggctg ctctgcaggc gcgcgctgcg 6660
gagctgaagg cccagttgga gtccactgct gctgcgaaga tgtcagcgga gcaggaccgc 6720
gagaacacga gggccgcgtt ggagcagcgg cttcgtgaat ccgaggagca cgctgcggag 6780
ctgaaggccc agctggagtc cactgctgct gcgaagacgt cggcggacca ggaccgcgag 6840
aggatgaggg tcgcgctgca ggagcggctg cgcgtcgctg agttgcgcgc tgcggagctg 6900
gcgagtcagc tggaggccac tgttgccgcg aagacgtcgg cggagcagga ccgcgagaac 6960
acgagggcca cgctagagca gcagcttcgc gaatccgagg cgcgcgctgc ggagctggcg 7020
agccagctgg aggccactgc tgctgcgaag tcgtcggcgg agcaggaccg cgagaacaca 7080
aaggctgctc tgcaggcgcg cgctgcggag ctggcgagcc agctggagtc cactgctgct 7140
gcgaagatgt cagcggagca ggaccgcgag aacacgaggg ccacgctaga gcagcagctt 7200
cgcgaatccg aggcgcgcgc tgcagagctg gcgagtcagc tggagtccac tgctgctgcg 7260
aagacgtcgg cggagcagga ccgcgagaac acgagggcca cgctagagca gcagcttcgc 7320
gaatccgagg cgcgcgctgc ggagctggcg agccagctgg aggccactgc tgctgcgaag 7380
tcgtcggcgg agcaggaccg cgagaacaca aaggctgctc tgcaggcgcg cgctgcggag 7440
ctggcgagcc agctggagtc cactgctgct gcgaagatgt cagcggagca ggaccgcgag 7500
aacacgaggg ctgcgttgga gcagcggctt cgcgaatccg aggagcacgc tgcggagctg 7560
gcgagccagc tggaggccac tgctgctgcg aagtcgtcgg cggagcagga ccgcgagaac 7620
acgagggcca cgctagagca gcagcttcgc gactccgaga cgcgcgctgc ggagctggcg 7680
agtcagctgg agtccactgc tgctgcgaag acgtcggcgg agcaggaccg cgagaacacg 7740
agggccgcgt tggagcagcg gcttcgcgaa tccgaggcgc gcgctgcgga gctgaaggcc 7800
gagctggagg ccactgctgc cgcgaagacg tcggcggagc aggaccgcga gaacacgagg 7860
gccgcgttgg agcagcggct tcgcgaatcc gaggcgcgcg ctggggagct gaaggccgag 7920
ctggaggcca ctactgctgc gaagacgtcg gcggagcagg accgcgagaa cacgagggcc 7980
acgctagagc agcagcttcg cgactccgag gagcgcgctg cggagctggc gagccagctg 8040
gaggccactg ctgctgcgaa gtcgtcggcg gagcaggacc gcgagaacac gagggccacg 8100
ctagagcagc agcttcgcga atccgaggcg cgcgctgggg agctggcgag ccagctggag 8160

```
gccactgctg ctgcgaagtc gtcggcggag caggaccgcg agaacacgag ggctgctctg 8220
caggcgcgcg ctgcggagct gaaggccgag ctggaggcca ctgctgctgc gaagacgtcg 8280
gcggagcagg accgcgagag gatgagggtc acgttggagg agcggcttcg cgtcgctgag 8340
ttgcgcgctg cggagctgac gggagtgctg gaggccactg ctgctgcgaa gacgtcggcg 8400
gagcaggatc gtgagaggac gaggaccacg ttgcaggagc agcttcgcga atccgaggcg 8460
cgcgctgcgg agctgaaggc cgagctggag gccactgctg ctgcgaagtc gtcggcggag 8520
caggaccgcg agaacacgag ggctgctctg gaggagaagc taaggggcac cgaggcgcgc 8580
gctgcggagc tggaggcccg cctaaaggct atcgctgcga caaaggcatc gatcgagcag 8640
gagagggaga gctcgagggc ttctctggag gaaaggctaa ggggctctga ggcgcgcgct 8700
gcggagctgg ctgctcggct aaaggctgct gctgctgcga agacgtcggc ggagcaggag 8760
cgtgagaaca cgagggtgac gttggagcag cagcttcgcg aatccgagaa gcgcgctgcg 8820
gagctggcga gtcagctgga gtccactgct gctgcgaaga cgtcggcgga gcaggaccgc 8880
gagaacacga gggtcacgtt ggggcagcag cttcgcgaat ccgaggcgcg cgctgcggag 8940
ctgaaggccg agctggaggc cgctgctgct gcgaagtcgt cggcggagca ggaccgcgag 9000
aacacgaggg ctgctctgga ggagaagcta aggggcaccg aggcgcgcgc tgcggagctg 9060
gcggcccgcc taaaggctat tgctgcgatg aaggcgtcaa tggtgcagga gcgggaaagc 9120
gcgagggatg ctctggagga aaagctaagg ggctctgagg cgcgcgctgc ggagctggct 9180
gctcggctaa aggctgctgc tgctgcgaag acgtcggcgg agcaggagcg tgagaacacg 9240
agggtgacgt tggagcagca gcttcgcgaa tccgaggagc gcgctgcgga gctggcgagt 9300
cagctggagg ccgctgctgc tgcgaagtcg tcggcggagc aggaccgcga gaacacgagg 9360
gctgctctgg aggagaagct aagagactcc gaggagcgcg ctgcggagct gggaacccgt 9420
gtaaaggcta gttctgcggc gaaggctttg gcggagcagg agcgggacag gataagggct 9480
gccctggagg agaagttgcg tgattcggag gcgcgcgctg cggagctgac gaccaagctg 9540
gaggccactg ttgctgcgaa gtcgtcggcg gagcaggagc gggaaaatat aaaggtggct 9600
ttagaggaag aattggttga tgcaagggcg aaattggctg gaatggaggc gtcgttgaag 9660
gaatcgaagt tggagtttga aggtcgtgtc ggggagcttg aaggagagtg cgagaagctg 9720
aggaatgata aggtcaggta tgcgaaaaag gttcaatcgc ttgagtatca gatgcgcatc 9780
gatgaggctc gactgaaggc gcgtcgtgat gcggttcatc gaaaggagtg a          9831
```

<210> 18

<211> 402

<212> ADN

<213> L. donovani

<400> 18

```
atgggaagtt cttgtacaaa ggactccgca aaggagcccc agaagcgtgc tgataacatc 60
cataaaacca ctgaggccaa tcacagaggc gccgccgtgc ccccgaagca cgccggcggt 120
gcgatgaacg actctgcccc gaagaaggat ggccatacac agaaaaatga cggcgatggc 180
cctaaggagg atgaccatac acagaaaaat gacggcgatg gccctaagga ggatgaccat 240
gcgcacaacg acggcggtgg ccctaaggag gatgagaatc tgccgcaaaa cgatggggat 300
gcgcaggaga agaacgaaga tggacacaac gtgggggatg gagctaacga caatgaggat 360
ggtaacgatg atcagccgaa ggagcacgct gccggcaact ag                    402
```

<210> 19

<211> 401

<212> PRT

<213> L. donovani

<400> 19

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

Gln Lys Asn Asp Gly Asp Gly Pro Lys Glu Asp Gly His Thr Gln Lys
            100                 105                 110
Asn Asp Gly Asp Gly Pro Lys Glu Asp Gly His Thr Gln Lys Asn Asp
        115                 120                 125
Gly Asp Gly Pro Lys Glu Asp Gly His Thr Gln Lys Asn Asp Gly Asp
    130                 135                 140
Gly Pro Lys Glu Asp Gly His Thr Gln Lys Asn Asp Gly Asp Gly Pro
145                 150                 155                 160
Lys Glu Asp Gly His Thr Gln Lys Asn Asp Gly Asp Gly Pro Lys Glu
                165                 170                 175
Asp Gly His Thr Gln Lys Asn Asp Gly Asp Gly Pro Lys Glu Asp Gly
            180                 185                 190
His Thr Gln Lys Asn Asp Gly Asp Gly Pro Lys Glu Asp Gly His Thr
        195                 200                 205
Gln Lys Asn Asp Gly Asp Gly Pro Lys Glu Asp Gly His Thr Gln Lys
    210                 215                 220
Asn Asp Gly Asp Gly Pro Lys Glu Asp Gly His Thr Gln Lys Asn Asp
225                 230                 235                 240
Gly Asp Gly Pro Lys Glu Asp Gly His Thr Gln Lys Asn Asp Gly Asp
                245                 250                 255
Gly Pro Lys Glu Asp Gly His Thr Gln Lys Asn Asp Gly Asp Gly Pro
            260                 265                 270
Lys Glu Asp Gly His Thr Gln Lys Asn Asp Gly Asp Gly Pro Lys Glu
        275                 280                 285
Asp Gly His Thr Gln Lys Asn Asp Gly Asp Gly Pro Lys Glu Asp Gly
    290                 295                 300
His Thr Gln Lys Asn Asp Gly Asp Gly Pro Lys Glu Asp Gly His Thr
305                 310                 315                 320
Gln Lys Asn Asp Gly Asp Gly Pro Lys Glu Asp Gly His Thr Gln Lys
                325                 330                 335
Asn Asp Gly Asp Gly Pro Lys Glu Asp Gly His Thr Gln Lys Asn Asp
            340                 345                 350
Gly Asp Gly Pro Lys Glu Gly Glu Asn Leu Gln Gln Asn Asp Gly Asp
        355                 360                 365
Ala Gln Glu Lys Asn Glu Asp Gly His Asn Val Gly Asp Gly Ala Asn
    370                 375                 380
Gly Asn Glu Asp Gly Asn Asp Asp Gln Pro Lys Glu His Ala Ala Gly
385                 390                 395                 400
Asn
```

<210> 20

<211> 3276

<212> PRT

<213> L. donovani

<400> 20

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

```
            100                 105                 110
Gly Phe Asn Ser Cys Leu Phe Ala Tyr Gly Gln Thr Gly Ser Gly Lys
        115                 120                 125
Thr Tyr Thr Met Met Gly Ala Asp Val Ser Val Leu Ser Gly Glu Gly
    130                 135                 140
Asn Gly Val Thr Pro Arg Ile Cys Leu Glu Ile Phe Ala Arg Lys Ala
145                 150                 155                 160
Ser Val Glu Ala Gln Gly His Ser Arg Trp Ile Val Glu Leu Gly Tyr
                165                 170                 175
Val Glu Val Tyr Asn Glu Arg Val Ser Asp Leu Leu Gly Lys Arg Lys
            180                 185                 190
Lys Gly Val Lys Gly Gly Gly Glu Glu Val Tyr Val Asp Val Arg Glu
        195                 200                 205
His Pro Ser Arg Gly Val Phe Leu Glu Gly Gln Arg Leu Val Glu Val
    210                 215                 220
Gly Ser Leu Asp Asp Val Val Arg Leu Ile Glu Ile Gly Asn Gly Val
225                 230                 235                 240
Arg His Thr Ala Ser Thr Lys Met Asn Asp Arg Ser Ser Arg Ser His
                245                 250                 255
Ala Ile Ile Met Leu Leu Leu Arg Glu Glu Arg Thr Met Thr Thr Lys
            260                 265                 270
Ser Gly Glu Thr Ile Arg Thr Ala Gly Lys Ser Ser Arg Met Asn Leu
        275                 280                 285
Val Asp Leu Ala Gly Ser Glu Arg Val Ala Gln Ser Gln Val Glu Gly
    290                 295                 300
Gln Gln Phe Lys Glu Ala Thr His Ile Asn Leu Ser Leu Thr Thr Leu
305                 310                 315                 320
Gly Arg Val Ile Asp Val Leu Ala Asp Met Ala Thr Lys Gly Ala Lys
                325                 330                 335
Ala Gln Tyr Ser Val Ala Pro Phe Arg Asp Ser Lys Leu Thr Phe Ile
            340                 345                 350
Leu Lys Asp Ser Leu Gly Gly Asn Ser Lys Thr Phe Met Ile Ala Thr
        355                 360                 365
Val Ser Pro Ser Ala Leu Asn Tyr Glu Glu Thr Leu Ser Thr Leu Arg
    370                 375                 380
Tyr Ala Ser Arg Ala Arg Asp Ile Val Asn Val Ala Gln Val Asn Glu
385                 390                 395                 400
Asp Pro Arg Ala Arg Arg Ile Arg Glu Leu Glu Glu Gln Met Glu Asp
                405                 410                 415
Met Arg Gln Ala Met Ala Gly Gly Asp Pro Ala Tyr Val Ser Glu Leu
            420                 425                 430
Lys Lys Lys Leu Ala Leu Leu Glu Ser Glu Ala Gln Lys Arg Ala Ala
        435                 440                 445
Asp Leu Gln Ala Leu Glu Arg Glu Arg Glu His Asn Gln Val Gln Glu
    450                 455                 460
Arg Leu Leu Arg Ala Thr Glu Ala Glu Lys Ser Glu Leu Glu Ser Arg
465                 470                 475                 480
Ala Ala Ala Leu Gln Glu Glu Met Ala Ala Thr Arg Arg Gln Ala Asp
                485                 490                 495
Lys Met Gln Ala Leu Asn Leu Arg Leu Lys Glu Glu Gln Ala Arg Lys
            500                 505                 510
Glu Arg Glu Leu Leu Lys Glu Met Ala Lys Lys Asp Ala Ala Leu Ser
        515                 520                 525
Lys Val Arg Arg Arg Lys Asp Ala Glu Ile Ala Ser Glu Arg Glu Lys
    530                 535                 540
Leu Glu Ser Thr Val Ala Gln Leu Glu Arg Glu Gln Arg Glu Arg Glu
545                 550                 555                 560
Val Ala Leu Asp Ala Leu Gln Thr His Gln Arg Lys Leu Gln Glu Ala
                565                 570                 575
Leu Glu Ser Ser Glu Arg Thr Ala Ala Glu Arg Asp Gln Leu Leu Gln
            580                 585                 590
```

```
Gln Leu Thr Glu Leu Gln Ser Glu Arg Thr Gln Leu Ser Gln Val Val
        595                 600                 605
Thr Asp Arg Glu Arg Leu Thr Arg Asp Leu Gln Arg Ile Gln Tyr Glu
    610                 615                 620
Tyr Gly Glu Thr Glu Leu Ala Arg Asp Val Ala Leu Cys Ala Ala Gln
625                 630                 635                 640
Glu Met Glu Ala Arg Tyr His Ala Ala Val Phe His Leu Gln Thr Leu
                645                 650                 655
Leu Glu Leu Ala Thr Glu Trp Glu Asp Ala Leu Arg Glu Arg Ala Leu
            660                 665                 670
Ala Glu Arg Asp Glu Ala Ala Ala Ala Glu Leu Asp Ala Ala Ala Ser
        675                 680                 685
Thr Ser Gln Asn Ala Arg Glu Ser Ala Ser Glu Arg Leu Thr Ser Leu
    690                 695                 700
Glu Gln Leu Leu Arg Glu Ser Glu Glu Arg Ala Ala Glu Leu Ala Ser
705                 710                 715                 720
Gln Leu Glu Ser Thr Thr Ala Ala Lys Met Ser Ala Glu Gln Asp Arg
                725                 730                 735
Glu Asn Thr Arg Ala Thr Leu Glu Gln Gln Leu Arg Asp Ser Glu Glu
            740                 745                 750
Arg Ala Ala Glu Leu Ala Ser Gln Leu Glu Ala Thr Ala Ala Ala Lys
        755                 760                 765
Ser Ser Ala Glu Gln Asp Arg Glu Asn Thr Arg Ala Ala Leu Glu Gln
    770                 775                 780
Gln Leu Arg Asp Ser Glu Glu Arg Ala Ala Glu Leu Ala Ser Gln Leu
785                 790                 795                 800
Glu Ser Thr Thr Ala Ala Lys Thr Ser Ala Glu Gln Asp Arg Glu Asn
                805                 810                 815
Thr Arg Ala Thr Leu Glu Gln Gln Leu Arg Asp Ser Glu Glu Arg Ala
            820                 825                 830
Ala Glu Leu Ala Ser Gln Leu Glu Ser Thr Thr Ala Ala Lys Met Ser
        835                 840                 845
Ala Glu Gln Asp Arg Glu Asn Thr Arg Ala Ala Leu Glu Gln Gln Leu
    850                 855                 860
Leu Glu Ser Glu Glu Arg Ala Ala Glu Leu Lys Ala Glu Leu Glu Ala
865                 870                 875                 880
Thr Ala Ala Ala Lys Ser Ser Ala Glu Gln Asp Arg Glu Asn Thr Arg
                885                 890                 895
Ala Ala Leu Glu Gln Gln Leu Arg Asp Ser Glu Glu Arg Ala Ala Glu
            900                 905                 910
Leu Ala Ser Gln Leu Glu Ser Thr Thr Ala Ala Lys Thr Ser Ala Glu
        915                 920                 925
Gln Asp Arg Glu Asn Thr Arg Ala Thr Leu Glu Gln Gln Leu Arg Asp
    930                 935                 940
Ser Glu Glu Arg Ala Ala Glu Leu Ala Ser Gln Leu Glu Ser Thr Thr
945                 950                 955                 960
Ala Ala Lys Met Ser Ala Glu Gln Asp Arg Glu Asn Thr Arg Ala Thr
                965                 970                 975
Leu Glu Gln Gln Leu Arg Asp Ser Glu Glu Arg Ala Ala Glu Leu Ala
            980                 985                 990
Ser Gln Leu Glu Ser Thr Thr Ala Ala Lys Met Ser Ala Glu Gln Asp
        995                 1000                1005
Arg Glu Asn Thr Arg Ala Thr Leu Glu Gln Gln Leu Arg Asp Ser Glu
    1010                1015                1020
Glu Arg Ala Ala Glu Leu Ala Ser Gln Leu Glu Ser Thr Thr Ala Ala
1025                1030                1035                1040
Lys Met Ser Ala Glu Gln Asp Arg Glu Asn Thr Arg Ala Ala Leu Glu
                1045                1050                1055
Gln Gln Leu Leu Glu Ser Glu Glu Arg Ala Ala Glu Leu Lys Ala Glu
            1060                1065                1070
Leu Glu Ala Thr Ala Ala Ala Lys Ser Ser Ala Glu Gln Asp Arg Glu
```

```
        1075                1080                1085
Asn Thr Arg Ala Thr Leu Glu Gln Gln Leu Arg Asp Ser Glu Glu Arg
    1090                1095                1100
Ala Ala Glu Leu Ala Ser Gln Leu Glu Ala Thr Ala Ala Ala Lys Ser
1105                1110                1115                1120
Ser Ala Glu Gln Asp Arg Glu Asn Thr Arg Ala Ala Leu Glu Gln Gln
                1125                1130                1135
Leu Arg Asp Ser Glu Glu Arg Ala Gly Glu Leu Ala Ser Gln Leu Glu
            1140                1145                1150
Ala Thr Ala Ala Ala Lys Ser Ser Ala Glu Gln Asp Arg Glu Asn Thr
        1155                1160                1165
Arg Ala Ala Leu Glu Gln Gln Leu Leu Glu Ser Glu Ala Arg Ala Ala
    1170                1175                1180
Glu Leu Ala Ser Gln Leu Glu Ala Thr Ala Ala Ala Lys Ser Ser Ala
1185                1190                1195                1200
Glu Gln Asp Arg Glu Asn Thr Arg Ala Ala Leu Glu Gln Gln Leu Arg
                1205                1210                1215
Glu Ser Glu Ala Arg Ala Gly Glu Leu Ala Ser Gln Leu Glu Ala Thr
            1220                1225                1230
Ala Ala Ala Lys Met Ser Ala Glu Gln Asp Arg Glu Asn Thr Arg Ala
        1235                1240                1245
Ala Leu Glu Gln Gln Leu Arg Glu Ser Glu Glu Arg Ala Ala Glu Leu
    1250                1255                1260
Ala Ser Gln Leu Glu Ala Thr Ala Ala Ala Lys Ser Ser Ala Glu Gln
1265                1270                1275                1280
Asp Arg Glu Asn Thr Arg Ala Ala Leu Glu Gln Gln Leu Arg Glu Ser
                1285                1290                1295
Glu Ala Arg Ala Ala Glu Leu Ala Ser Gln Leu Glu Ala Thr Ala Ala
            1300                1305                1310
Ala Lys Ser Ser Ala Glu Gln Asp Arg Glu Asn Thr Arg Ala Ala Leu
        1315                1320                1325
Glu Gln Gln Leu Arg Glu Ser Glu Ala Arg Ala Ala Glu Leu Ala Ser
    1330                1335                1340
Gln Leu Glu Ala Thr Ala Ala Ala Lys Thr Ser Ala Glu Gln Asp Arg
1345                1350                1355                1360
Glu Asn Thr Arg Ala Ala Leu Glu Gln Gln Leu Arg Glu Ser Glu Glu
                1365                1370                1375
Arg Ala Ala Glu Leu Ala Ser Gln Leu Glu Ala Thr Ala Ala Ala Lys
            1380                1385                1390
Met Ser Ala Glu Gln Asp Arg Glu Asn Thr Arg Ala Thr Leu Glu Gln
        1395                1400                1405
Gln Leu Leu Glu Ser Glu Glu Arg Ala Ala Glu Leu Ala Ser Gln Leu
    1410                1415                1420
Glu Ala Thr Ala Ala Ala Lys Met Ser Ala Glu Gln Asp Arg Glu Asn
1425                1430                1435                1440
Thr Arg Ala Thr Leu Glu Gln Gln Leu Leu Glu Ser Glu Glu Arg Ala
                1445                1450                1455
Ala Glu Leu Ala Ser Gln Leu Glu Ala Thr Ala Ala Ala Lys Ser Ser
            1460                1465                1470
Ala Glu Gln Asp Arg Glu Asn Thr Arg Ala Ala Leu Glu Gln Gln Leu
        1475                1480                1485
Arg Glu Ser Glu Ala Arg Ala Ala Glu Leu Ala Ser Gln Leu Glu Ala
    1490                1495                1500
Thr Ala Ala Ala Lys Thr Ser Ala Glu Gln Asp Arg Glu Asn Thr Arg
1505                1510                1515                1520
Ala Thr Leu Glu Gln Gln Leu Arg Glu Ser Glu Ala Arg Ala Gly Glu
                1525                1530                1535
Leu Ala Ser Gln Leu Glu Ala Thr Ala Ala Ala Lys Ser Ser Ala Glu
            1540                1545                1550
Gln Asp Arg Glu Asn Thr Arg Ala Ala Leu Glu Gln Gln Leu Arg Glu
        1555                1560                1565
```

```
Ser Glu Glu Arg Ala Ala Glu Leu Met Arg Lys Leu Glu Ala Thr Ala
    1570                1575                1580
Ala Ala Lys Ser Ser Val Glu Gln Asp Arg Glu Ser Met Lys Val Ala
1585                1590                1595                1600
Leu Glu Ala Arg Thr Ala Glu Leu Ala Ser Arg Leu Lys Ala Thr Ala
                1605                1610                1615
Ala Ala Lys Thr Ser Ala Glu Gln Glu Arg Asp Arg Thr Arg Ala Thr
            1620                1625                1630
Phe Glu Glu Arg Leu Arg Val Ala Glu Val Arg Ala Val Gln Leu Ala
        1635                1640                1645
Ser Gln Leu Glu Ala Thr Ala Ala Ala Lys Ser Ser Val Glu Gln Asp
    1650                1655                1660
Arg Glu Lys Thr Arg Thr Ala Leu Glu Ala Arg Val Ala Glu Leu Ala
1665                1670                1675                1680
Ser Lys Leu Glu Ala Thr Ala Ala Ala Lys Ala Leu Val Glu Gln Asp
                1685                1690                1695
Arg Glu Asn Thr Arg Ala Thr Leu Glu Glu Arg Leu Arg Val Ala Glu
            1700                1705                1710
Val Arg Ala Ala Glu Leu Ala Ala Gln Leu Glu Ala Thr Ala Ala Ala
        1715                1720                1725
Lys Ser Ser Val Glu Gln Asp Arg Glu Lys Thr Arg Thr Ala Leu Glu
    1730                1735                1740
Ala Arg Val Ala Glu Leu Ala Ser Lys Leu Glu Ala Thr Ala Ala Ala
1745                1750                1755                1760
Lys Thr Ser Ala Glu Gln Asp Arg Glu Ser Thr Arg Ala Thr Leu Lys
                1765                1770                1775
Glu Arg Leu Arg Ile Ala Glu Val Arg Ala Ala Glu Leu Ala Thr Gln
            1780                1785                1790
Leu Glu Ala Thr Ser Ala Ala Lys Thr Ser Val Glu Gln Asp Arg Glu
        1795                1800                1805
Arg Thr Arg Ala Ala Leu Glu Ala Arg Val Ala Glu Leu Ala Ser Lys
    1810                1815                1820
Leu Glu Ser Thr Ala Ala Ala Lys Ala Leu Val Glu Gln Asp Arg Glu
1825                1830                1835                1840
Ser Thr Arg Ala Thr Leu Glu Glu Arg Leu Arg Ile Ala Glu Ala Arg
                1845                1850                1855
Ala Ala Glu Leu Ala Ile Glu Leu Asp Ala Thr Ala Ala Ala Lys Ala
            1860                1865                1870
Ser Met Glu His Asp Arg Glu Ser Thr Arg Ala Thr Leu Glu Glu Arg
        1875                1880                1885
Leu Arg Ile Ala Glu Val Arg Gly Ala Glu Leu Ala Ser Gln Leu Glu
    1890                1895                1900
Ala Thr Ala Ala Ala Lys Ala Leu Leu Glu Gln Asp Arg Glu Arg Thr
1905                1910                1915                1920
Arg Ala Ala Leu Glu Ala Arg Ala Ala Glu Leu Ala Ser Lys Leu Glu
                1925                1930                1935
Ala Thr Ala Ala Ala Lys Met Ser Ala Glu Gln Asp Arg Glu Arg Thr
            1940                1945                1950
Arg Ala Ala Ile Glu Glu Gln Leu Arg Leu Ala Glu Val Arg Ala Ala
        1955                1960                1965
Glu Leu Ala Ser Gln Leu Glu Ala Thr Ala Ala Ala Lys Ala Leu Leu
    1970                1975                1980
Glu Gln Asp Arg Glu Arg Thr Arg Ala Ala Leu Glu Gly Arg Ala Ala
1985                1990                1995                2000
Glu Leu Ala Arg Lys Leu Glu Ala Thr Ala Ile Ala Lys Thr Ala Val
                2005                2010                2015
Glu Gln Asp Arg Glu Ser Thr Arg Ala Thr Leu Glu Glu Arg Leu Arg
            2020                2025                2030
Gly Ala Glu Val Arg Val Ala Glu Leu Ala Ser Gln Leu Glu Ala Thr
        2035                2040                2045
Ala Ala Ala Lys Thr Ser Ala Glu Gln Glu Arg Ala Asn Thr Arg Ala
```

```
    2050                2055                2060
Ala Leu Glu Ala Arg Ala Ala Glu Leu Ala Ser Lys Leu Glu Ala Thr
2065                2070                2075                2080
Ala Ala Ala Lys Phe Ala Val Glu Gln Asp Arg Glu Arg Thr Arg Ala
                2085                2090                2095
Thr Leu Glu Glu Arg Leu Arg Gly Ala Glu Val Arg Ala Ala Glu Leu
            2100                2105                2110
Ala Arg Lys Leu Glu Ala Thr Ala Ala Ala Lys Ala Ser Met Glu His
        2115                2120                2125
Asp Arg Glu Ser Thr Arg Ala Ala Leu Glu Glu Arg Leu Arg Gly Ala
    2130                2135                2140
Glu Val Arg Ala Ala Glu Leu Ala Ser Lys Leu Glu Ala Thr Ala Ala
2145                2150                2155                2160
Ala Lys Ala Ala Val Glu Gln Asp Arg Glu Arg Thr Arg Ala Thr Phe
                2165                2170                2175
Glu Lys Gln Leu Arg Asp Ser Glu Ala Arg Val Ala Glu Leu Ser Gly
            2180                2185                2190
Gln Leu Glu Ala Thr Ala Ala Ala Lys Thr Ser Ala Glu Gln Asp Arg
        2195                2200                2205
Glu Asn Thr Lys Ala Ala Leu Gln Ala Arg Ala Ala Glu Leu Lys Ala
    2210                2215                2220
Gln Leu Glu Ser Thr Ala Ala Ala Lys Met Ser Ala Glu Gln Asp Arg
2225                2230                2235                2240
Glu Asn Thr Arg Ala Ala Leu Glu Gln Arg Leu Arg Glu Ser Glu Glu
                2245                2250                2255
His Ala Ala Glu Leu Lys Ala Gln Leu Glu Ser Thr Ala Ala Ala Lys
            2260                2265                2270
Thr Ser Ala Asp Gln Asp Arg Glu Arg Met Arg Val Ala Leu Gln Glu
        2275                2280                2285
Arg Leu Arg Val Ala Glu Leu Arg Ala Ala Glu Leu Ala Ser Gln Leu
    2290                2295                2300
Glu Ala Thr Val Ala Ala Lys Thr Ser Ala Glu Gln Asp Arg Glu Asn
2305                2310                2315                2320
Thr Arg Ala Thr Leu Glu Gln Gln Leu Arg Glu Ser Glu Ala Arg Ala
                2325                2330                2335
Ala Glu Leu Ala Ser Gln Leu Glu Ala Thr Ala Ala Ala Lys Ser Ser
            2340                2345                2350
Ala Glu Gln Asp Arg Glu Asn Thr Lys Ala Ala Leu Gln Ala Arg Ala
        2355                2360                2365
Ala Glu Leu Ala Ser Gln Leu Glu Ser Thr Ala Ala Ala Lys Met Ser
    2370                2375                2380
Ala Glu Gln Asp Arg Glu Asn Thr Arg Ala Thr Leu Glu Gln Gln Leu
2385                2390                2395                2400
Arg Glu Ser Glu Ala Arg Ala Ala Glu Leu Ala Ser Gln Leu Glu Ser
                2405                2410                2415
Thr Ala Ala Ala Lys Thr Ser Ala Glu Gln Asp Arg Glu Asn Thr Arg
            2420                2425                2430
Ala Thr Leu Glu Gln Gln Leu Arg Glu Ser Glu Ala Arg Ala Ala Glu
        2435                2440                2445
Leu Ala Ser Gln Leu Glu Ala Thr Ala Ala Ala Lys Ser Ser Ala Glu
    2450                2455                2460
Gln Asp Arg Glu Asn Thr Lys Ala Ala Leu Gln Ala Arg Ala Ala Glu
2465                2470                2475                2480
Leu Ala Ser Gln Leu Glu Ser Thr Ala Ala Ala Lys Met Ser Ala Glu
                2485                2490                2495
Gln Asp Arg Glu Asn Thr Arg Ala Ala Leu Glu Gln Arg Leu Arg Glu
            2500                2505                2510
Ser Glu Glu His Ala Ala Glu Leu Ala Ser Gln Leu Glu Ala Thr Ala
        2515                2520                2525
Ala Ala Lys Ser Ser Ala Glu Gln Asp Arg Glu Asn Thr Arg Ala Thr
    2530                2535                2540
```

```
Leu Glu Gln Gln Leu Arg Asp Ser Glu Thr Arg Ala Ala Glu Leu Ala
2545                2550                2555                2560
Ser Gln Leu Glu Ser Thr Ala Ala Ala Lys Thr Ser Ala Glu Gln Asp
                2565                2570                2575
Arg Glu Asn Thr Arg Ala Ala Leu Glu Gln Arg Leu Arg Glu Ser Glu
            2580                2585                2590
Ala Arg Ala Ala Glu Leu Lys Ala Glu Leu Glu Ala Thr Ala Ala Ala
        2595                2600                2605
Lys Thr Ser Ala Glu Gln Asp Arg Glu Asn Thr Arg Ala Ala Leu Glu
    2610                2615                2620
Gln Arg Leu Arg Glu Ser Glu Ala Arg Ala Gly Glu Leu Lys Ala Glu
2625                2630                2635                2640
Leu Glu Ala Thr Thr Ala Ala Lys Thr Ser Ala Glu Gln Asp Arg Glu
                2645                2650                2655
Asn Thr Arg Ala Thr Leu Glu Gln Gln Leu Arg Asp Ser Glu Glu Arg
            2660                2665                2670
Ala Ala Glu Leu Ala Ser Gln Leu Glu Ala Thr Ala Ala Ala Lys Ser
        2675                2680                2685
Ser Ala Glu Gln Asp Arg Glu Asn Thr Arg Ala Thr Leu Glu Gln Gln
    2690                2695                2700
Leu Arg Glu Ser Glu Ala Arg Ala Gly Glu Leu Ala Ser Gln Leu Glu
2705                2710                2715                2720
Ala Thr Ala Ala Ala Lys Ser Ser Ala Glu Gln Asp Arg Glu Asn Thr
                2725                2730                2735
Arg Ala Ala Leu Gln Ala Arg Ala Ala Glu Leu Lys Ala Glu Leu Glu
            2740                2745                2750
Ala Thr Ala Ala Ala Lys Thr Ser Ala Glu Gln Asp Arg Glu Arg Met
        2755                2760                2765
Arg Val Thr Leu Glu Glu Arg Leu Arg Val Ala Glu Leu Arg Ala Ala
    2770                2775                2780
Glu Leu Thr Gly Val Leu Glu Ala Thr Ala Ala Ala Lys Thr Ser Ala
2785                2790                2795                2800
Glu Gln Asp Arg Glu Arg Thr Arg Thr Thr Leu Gln Glu Gln Leu Arg
                2805                2810                2815
Glu Ser Glu Ala Arg Ala Ala Glu Leu Lys Ala Glu Leu Glu Ala Thr
            2820                2825                2830
Ala Ala Ala Lys Ser Ser Ala Glu Gln Asp Arg Glu Asn Thr Arg Ala
        2835                2840                2845
Ala Leu Glu Glu Lys Leu Arg Gly Thr Glu Ala Arg Ala Ala Glu Leu
    2850                2855                2860
Glu Ala Arg Leu Lys Ala Ile Ala Ala Thr Lys Ala Ser Ile Glu Gln
2865                2870                2875                2880
Glu Arg Glu Ser Ser Arg Ala Ser Leu Glu Glu Arg Leu Arg Gly Ser
                2885                2890                2895
Glu Ala Arg Ala Ala Glu Leu Ala Ala Arg Leu Lys Ala Ala Ala Ala
            2900                2905                2910
Ala Lys Thr Ser Ala Glu Gln Glu Arg Glu Asn Thr Arg Val Thr Leu
        2915                2920                2925
Glu Gln Gln Leu Arg Glu Ser Glu Lys Arg Ala Ala Glu Leu Ala Ser
    2930                2935                2940
Gln Leu Glu Ser Thr Ala Ala Ala Lys Thr Ser Ala Glu Gln Asp Arg
2945                2950                2955                2960
Glu Asn Thr Arg Val Thr Leu Gly Gln Gln Leu Arg Glu Ser Glu Ala
                2965                2970                2975
Arg Ala Ala Glu Leu Lys Ala Glu Leu Glu Ala Ala Ala Ala Ala Lys
            2980                2985                2990
Ser Ser Ala Glu Gln Asp Arg Glu Asn Thr Arg Ala Ala Leu Glu Glu
        2995                3000                3005
Lys Leu Arg Gly Thr Glu Ala Arg Ala Ala Glu Leu Ala Ala Arg Leu
    3010                3015                3020
Lys Ala Ile Ala Ala Met Lys Ala Ser Met Val Gln Glu Arg Glu Ser
```

```
3025                3030                3035                3040
Ala Arg Asp Ala Leu Glu Glu Lys Leu Arg Gly Ser Glu Ala Arg Ala
                3045                3050                3055
Ala Glu Leu Ala Ala Arg Leu Lys Ala Ala Ala Ala Ala Lys Thr Ser
            3060                3065                3070
Ala Glu Gln Glu Arg Glu Asn Thr Arg Val Thr Leu Glu Gln Gln Leu
        3075                3080                3085
Arg Glu Ser Glu Glu Arg Ala Ala Glu Leu Ala Ser Gln Leu Glu Ala
    3090                3095                3100
Ala Ala Ala Ala Lys Ser Ser Ala Glu Gln Asp Arg Glu Asn Thr Arg
3105                3110                3115                3120
Ala Ala Leu Glu Glu Lys Leu Arg Asp Ser Glu Glu Arg Ala Ala Glu
                3125                3130                3135
Leu Gly Thr Arg Val Lys Ala Ser Ser Ala Ala Lys Ala Leu Ala Glu
            3140                3145                3150
Gln Glu Arg Asp Arg Ile Arg Ala Ala Leu Glu Glu Lys Leu Arg Asp
        3155                3160                3165
Ser Glu Ala Arg Ala Ala Glu Leu Thr Thr Lys Leu Glu Ala Thr Val
    3170                3175                3180
Ala Ala Lys Ser Ser Ala Glu Gln Glu Arg Glu Asn Ile Lys Val Ala
3185                3190                3195                3200
Leu Glu Glu Glu Leu Val Asp Ala Arg Ala Lys Leu Ala Gly Met Glu
                3205                3210                3215
Ala Ser Leu Lys Glu Ser Lys Leu Glu Phe Glu Gly Arg Val Gly Glu
            3220                3225                3230
Leu Glu Gly Glu Cys Glu Lys Leu Arg Asn Asp Lys Val Arg Tyr Ala
        3235                3240                3245
Lys Lys Val Gln Ser Leu Glu Tyr Gln Met Arg Ile Asp Glu Ala Arg
    3250                3255                3260
Leu Lys Ala Arg Arg Asp Ala Val His Arg Lys Glu
3265                3270                3275
```

<210> 21

<211> 9

<212> PRT

<213> desconocido

<220>

<223> Secuencia N-terminal del polipéptido de fusión

<400> 21

```
Met His His His His His His Thr Ser
 1               5
```

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido de fusión aislado que comprende dos o más antígenos de Leishmania seleccionados del grupo que consiste en K26, K39, y K9, en el que el antígeno K26 comprende una secuencia que tiene al menos 95% de identidad con SEQ ID NO: 5; el antígeno K39 comprende una secuencia que tiene al menos 95% de identidad con SEQ ID NO: 6; y el antígeno K9 comprende una secuencia que tiene al menos 95% de identidad con SEQ ID NO: 7; y en el que al menos uno de los antígenos se aisla de Leishmania donovani.

2. El polipéptido de fusión de la reivindicación 1, en el que el polipéptido de fusión comprende:

a) una secuencia de K26 que comprende SEQ ID NO: 5, una secuencia de K39 que comprende SEQ ID NO: 6 y una secuencia de K9 que comprende SEQ ID NO: 7; o

b) una secuencia de aminoácidos como se expone en 10-262 de SEQ ID NO: 8; o

c) una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 95% de identidad con respecto a 10-262 de SEQ ID NO: 8.

3. El polipéptido de fusión de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en el que el polipéptido de fusión comprende además una secuencia de aminoácidos N-terminal of MHHHHHHTS (SEQ ID NO: 21).

4. Un polinucleótido aislado que codifica un polipéptido de fusión de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.

5. Una composición farmacéutica que comprende,

(a) un polipéptido de fusión de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, o

(b) un polinucleótido de la reivindicación 4; y

un vehículo fisiológicamente aceptable.

6. Una vacuna que comprende:

(a) un polipéptido de fusión de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, o

(b) un polinucleótido de la reivindicación 4; y

un potenciador de la respuesta inmune no específica.

7. Un método para detectar una infección asintomática o subclínica de Leishmania en una muestra biológica seleccionada del grupo que consiste en sueros, sangre y saliva, que comprende:

(a) poner en contacto una muestra biológica con un polipéptido de fusión que comprende:

i) dos o más antígenos de Leishmania seleccionados entre el grupo que consiste en K26, K39, y K9, en el que el antígeno K26 comprende una secuencia que tiene al menos 95% de identidad con SEQ ID NO: 5; el antígeno K39 comprende una secuencia que tiene al menos 95% de identidad con SEQ ID NO: 6; y el antígeno K9 comprende una secuencia que tiene al menos 95% de identidad con SEQ ID NO: 7; o

ii) la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NOs: 5-7; o

iii) una secuencia de aminoácidos como se expone en 10-262 de SEQ ID NO: 8; o

iv) una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 95% de identidad con respecto a 10-262 de SEQ ID NO: 8.

en el que, opcionalmente, el polipéptido de fusión comprende además una secuencia de aminoácidos N-terminal of MHHHHHHTS (SEQ ID NO: 21); y

(b) detectar en la muestra biológica la presencia de anticuerpos que se unen al polipéptido de fusión, detectando de este modo una infección de Leishmania asintomática o subclínica en la muestra biológica.

8. Un método para identificar un paciente afligido con leishmaniasis visceral asintomática o subclínica que es probable que desarrolle leishmaniasis visceral aguda, que comprende:

(a) poner en contacto una muestra biológica seleccionada del grupo que consiste en suero, sangre y saliva obtenida de un paciente afligido con leishmaniasis visceral asintomática o subclínica con un primer polipéptido que es un polipéptido de fusión que comprende:

i) dos o más antígenos de Leishmania seleccionados del grupo que consiste en K26, K39 y K9, en el que el antígeno K26 comprende una secuencia que tiene al menos 95% de identidad con SEQ ID NO: 5; el antígeno K39 comprende una secuencia que tiene al menos 95% de identidad con SEQ ID NO: 6; y el antígeno K9 comprende una secuencia que tiene al menos 95% de identidad con SEQ ID NO: 7; o

ii) las secuencias de aminoácidos expuestas en SEQ ID NOs: 5-7; o

iii) una secuencia de aminoácidos como se expone en 10-262 de SEQ ID NO: 8; o

iv) una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 95% de identidad con respecto a 10-262 de SEQ ID NO: 8.

en el que, opcionalmente, el polipéptido de fusión comprende además una secuencia de aminoácidos N-terminal of MHHHHHHTS (SEQ ID NO: 21); y

(b) poner en contacto independientemente la muestra biológica con un segundo polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en las SEQ ID NO: 10 o 11; y

(c) detectar en la muestra la presencia de anticuerpos que se unen a al menos uno de los polipéptidos primero y segundo, identificando así a un paciente afectado con leishmaniasis visceral asintomática o subclínica que es probable que desarrolle leishmaniasis visceral aguda.

9. El método de la reivindicación 7, en el que el polipéptido de fusión está unido a un soporte sólido, en el que, opcionalmente, el soporte sólido comprende nitrocelulosa, látex o un material plástico.

10. El método de la reivindicación 8, en el que el primer y segundo polipéptidos se unen cada uno a un soporte sólido separado, en el que, opcionalmente, los soportes sólidos comprenden nitrocelulosa, látex o un material plástico.

11. El método de la reivindicación 7 o 8, en el que la etapa de detección comprende:

(a) eliminar la muestra no unida del soporte o soportes sólidos;

(b) añadir un reactivo de detección al soporte o soportes sólidos; y

(c) determinar el nivel de reactivo de detección unido al soporte o soportes sólidos, con relación a un valor de corte predeterminado.

12. El método de la reivindicación 11, en el que el reactivo de detección comprende un grupo indicador conjugado a un agente de unión, en el que, opcionalmente, el agente de unión se selecciona del grupo que consiste en anti-inmunoglobulina, Proteína G, Proteína A y lectinas; y/o en el que, opcionalmente, el grupo indicador se selecciona del grupo que consiste en radioisótopos, grupos fluorescentes, grupos luminiscentes, enzimas, biotina y partículas de colorantes.

13. Un kit de diagnóstico para detectar leishmaniasis visceral asintomática o subclínica en una muestra biológica seleccionada del grupo que consiste en sueros, sangre y saliva, que comprende:

(a) un polipéptido de fusión que comprende dos o más antígenos de Leishmania seleccionados del grupo que consiste en K26, K39, y K9; en el que el antígeno K26 comprende una secuencia que tiene al menos 95% de identidad con SEQ ID NO: 5; el antígeno K39 comprende una secuencia que tiene al menos 95% de identidad con SEQ ID NO: 6; y el antígeno K9 comprende una secuencia que tiene al menos 95% de identidad con SEQ ID NO: 7; y

(b) un reactivo de detección; en el que, opcionalmente, el reactivo de detección comprende un grupo indicador conjugado a un agente de unión, en el que, opcionalmente, el agente de unión se selecciona del grupo que consiste en anti-inmunoglobulina, Proteína G, Proteína A y lectinas; y/o en el que, opcionalmente, el grupo indicador se selecciona del grupo que consiste en radioisótopos, grupos fluorescentes, grupos luminiscentes, enzimas, biotina y partículas de colorantes.

14. Un kit de diagnóstico para identificar un paciente afligido con leishmaniasis visceral asintomática o subclínica que es probable que desarrolle leishmaniasis visceral aguda, que comprende:

(a) un primer polipéptido que es un polipéptido de fusión que comprende dos o más antígenos de Leishmania seleccionados del grupo que consiste en K26, K39 y K9, en el que el antígeno K26 comprende una secuencia que tiene al menos 95% de identidad con SEQ ID NO: 5; el antígeno K39 comprende una secuencia que tiene al menos 95% de identidad con SEQ ID NO: 6; y el antígeno K9 comprende una secuencia que tiene al menos 95% de identidad con SEQ ID NO: 7;

(b) un segundo polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en las SEQ ID NO: 10 o 11; y

(c) un reactivo de detección; en el que, opcionalmente, el reactivo de detección comprende un grupo indicador conjugado a un agente de unión, en el que, opcionalmente, el agente de unión se selecciona del grupo que consiste en anti-inmunoglobulina, Proteína G, Proteína A y lectinas; y/o en el que, opcionalmente, el grupo indicador se selecciona del grupo que consiste en radioisótopos, grupos fluorescentes, grupos luminiscentes, enzimas, biotina y partículas de colorantes.

15. El kit diagnóstico de la reivindicación 13 o 14, en el que el polipéptido de fusión comprende:

a) una secuencia de K26 que comprende SEQ ID NO: 5, una secuencia de K39 que comprende SEQ ID NO: 6 y una secuencia de K9 que comprende SEQ ID NO: 7; o

b) una secuencia de aminoácidos como se expone en 10-262 de SEQ ID NO: 8; o

c) una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 95% de identidad con respecto a 10-262 de SEQ ID NO: 8.

REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE LA CONSTRUCCIÓN DE FUSIÓN K28

FIG. 1

COMPARACIÓN DE ELISA DE MUESTRAS DE SUERO DE PACIENTES CON LV HUMANOS VENEZOLANOS DE K28, K39 Y K9

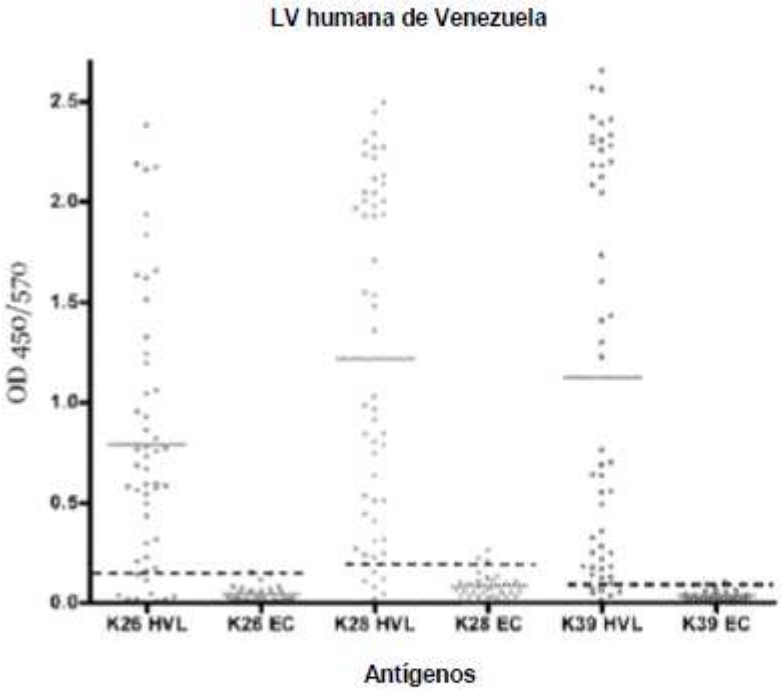

FIG. 2

COMPARACIÓN DE ELISA DE K9, K26, K28 Y K39 USANDO MUESTRAS DE SUERO DE LV CANINO DE VENEZUELA

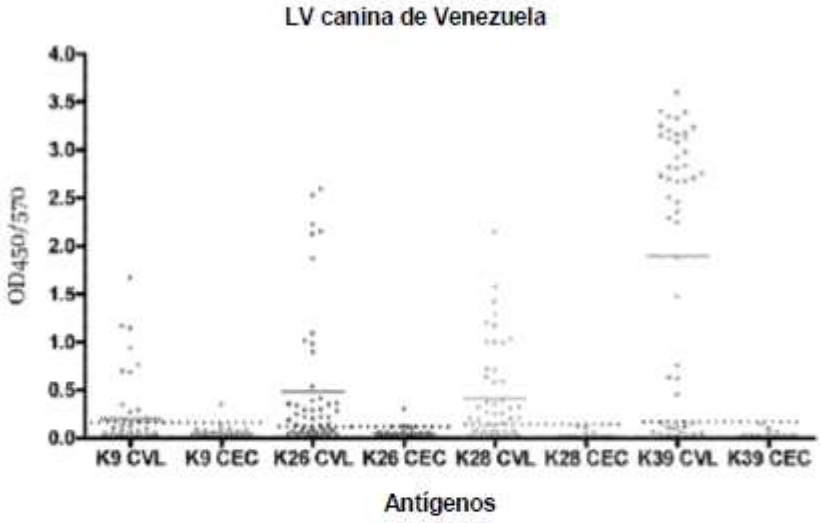

FIG. 3