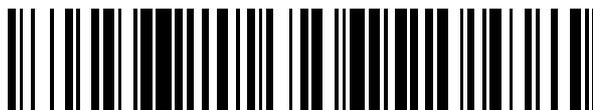


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 670 520**

51 Int. Cl.:

A61K 39/39 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

A61K 39/008 (2006.01)

C07K 14/44 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.05.2012 PCT/EP2012/058453**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.11.2012 WO12152792**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.05.2012 E 12720157 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.03.2018 EP 2707022**

54 Título: **Molécula para tratar un trastorno inflamatorio**

30 Prioridad:

09.05.2011 EP 11165248
09.05.2011 US 201161484167 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
30.05.2018

73 Titular/es:

LABORATORIOS LETI, S.L. (100.0%)
Calle del Sol, 5
28760 Tres Cantos, Madrid, ES

72 Inventor/es:

ALONSO BEDATE, CARLOS;
SOTO ALVAREZ, MANUEL;
RAMIREZ GARCIA, LAURA;
CARNÉS SÁNCHEZ, JERÓNIMO y
ROMÁN ESCUTIA, MARTA

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

ES 2 670 520 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Molécula para tratar un trastorno inflamatorio

5 **Campo de la invención**

[0001] La invención proporciona una fuente de L19 como medicamento, preferiblemente para prevenir o tratar un trastorno inflamatorio en un individuo.

10 **Antecedentes de la invención**

[0002] Las enfermedades inflamatorias inmunes y relacionadas son una manifestación de vías biológicas complejas, frecuentemente interconectadas, que en una fisiología normal responden a un daño o lesión iniciando la reparación del daño o lesión, y generan una respuesta innata y adquirida. La enfermedad o patología ocurre cuando estas vías fisiológicas causan más lesiones o daños, ya sea por una respuesta exagerada causada por una regulación anormal o una sobreestimulación, o por una combinación de ambas. A pesar de la aparición de nuevos fármacos antiinflamatorios como los agentes anti-TNF, las enfermedades inflamatorias continúan representando una importante necesidad médica no satisfecha, a menudo debido a la falta de capacidad de respuesta y resistencia a estos fármacos.

Las enfermedades inflamatorias inmunes y relacionadas que se pueden modular mediante el uso de agentes antiinflamatorios incluyen diabetes autoinmune (y otras similares), diabetes mellitus, uveítis, (1) esclerosis múltiple, artritis reumatoide (AR), enfermedad inflamatoria intestinal (EII), síndrome del intestino irritable, colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn, control del rechazo de aloinjerto después de un trasplante de órgano, enfermedad de injerto contra huésped (EICH), enfermedades inflamatorias pulmonares como el asma y la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) (2), cáncer (4) lupus eritematoso sistémico LES, sarcoidosis, cáncer y psoriasis.

[0003] La AR se considera una enfermedad autoinmune sistémica, controlada mediante tratamiento con fármacos antirreumáticos modificadores del curso de la enfermedad (FARME), generalmente en combinación, para minimizar los efectos secundarios asociados con los fármacos sistémicos. Los efectos secundarios de estos medicamentos incluyen estomatitis ulcerativa, una cifra de glóbulos blancos reducida.

EII es un término que describe un trastorno de inflamación crónica del intestino delgado y/o grueso. Dentro del área de la EII se incluyen la colitis ulcerosa y la enfermedad de Crohn. Si bien las causas exactas no están firmemente establecidas, la EII se considera una enfermedad autoinmune. Actualmente no hay cura disponible, y los tratamientos se centran en la supresión de la respuesta inflamatoria anormal o exagerada. Los tratamientos incluyen corticosteroides (como metotrexato, azatioprina y mercaptopurina) y aminosalicilatos. El uso a largo plazo de corticosteroides se asocia con adelgazamiento de los huesos, infección, cataratas y efectos en el hígado y en la médula ósea. Los aminosalicilatos tienden a ser mejor tolerados, ya que tienen una baja absorción y actúan de manera tópica en la zona afectada. Los efectos secundarios incluyen dolor de cabeza y, rara vez, afecciones más graves, como la pancreatitis.

La psoriasis se trata de diferentes maneras. El uso de corticosteroides por vía tópica es un método común de tratamiento, pero los inconvenientes incluyen la ineficacia y el desarrollo de resistencia. El uso de fototerapia es eficaz para el tratamiento de la psoriasis al aumentar la apoptosis, implicada en la reducción de la inflamación. Los inconvenientes a corto plazo son mayor incomodidad y picazón, con efectos a largo plazo que son el aumento del riesgo de cánceres de piel de las células escamosas y melanoma. Para tratar la psoriasis se utilizan fármacos sistémicos que tienen una variedad de otros efectos sistémicos, a menudo no deseados, y deben ser utilizados bajo supervisión y control rigurosos por un dermatólogo.

[0004] Por lo tanto, aún existe la necesidad de diseñar nuevos tratamientos para una enfermedad inflamatoria como la AR, la EII y la psoriasis que no tengan todos los inconvenientes de los tratamientos existentes.

Descripción de la invenciónFuente de L19

[0005] En un primer aspecto, se proporciona una fuente de L19 para usar como medicamento.

La L19 es una proteína ribosomal. Las proteínas ribosomales son proteínas citosólicas bien conservadas. Por lo tanto, una fuente de L19 puede prepararse a partir de cualquier organismo eucariota, ya sea vegetal o animal, ya sea de mamíferos, reptiles, peces, insectos o cualquier otro organismo portador de cromosomas, como los protozoos. La invención no se limita a una fuente de L19 específica siempre que el producto de la proteína L19 codificada sea capaz de inducir una respuesta antiinflamatoria como se define más adelante en este documento. Los protozoos preferidos incluyen el plasmodio y en particular los miembros de la familia de las tripanosomátidas, más en particular diferentes especies del protozoo tripanosomático *Leishmania*. Hay más de 20 especies conocidas de *Leishmania*, incluyendo especies del subgénero *Leishmania*, que comprende el complejo *L. major*, incluyendo *L. major*, el complejo *L. Donovanii*, incluyendo *L. chagasi*, *L. donovani* y *L. infantum*, el complejo *L. Mexicana*, incluyendo *L. amazonensis* y *L. mexicana*, así como la subespecie *Viannia*,

que comprende el complejo *L. braziliensis*, incluyendo *L. braziliensis* y *L. peruviana* y el complejo *L. guyanensis*, incluyendo *L. guyanensis* y *L. panamensis*. Las especies de *Plasmodium* de particular interés son *Plasmodium falciparum* y *Plasmodium vivax*. Alternativamente, se puede obtener una fuente de L19 de una especie de *Trypanosoma*. Una especie de *Trypanosoma* puede ser *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei*. En una forma de realización preferida, una fuente de L19 se obtiene, se deriva o se origina a partir de una especie de *Leishmania*, preferiblemente *Leishmania major*, *Leishmania infantum*, *Leishmania donovani*, *Leishmania chagasi* y/o *Leishmania braziliensis*. Es más preferida una fuente de L19 obtenida, derivada u originada a partir de *Leishmania major*. El experto en la materia entenderá que una fuente de L19 también se puede preparar mezclando dos o más fuentes de L19 derivadas del mismo organismo o de varios organismos distintos como se identifica en este documento. Aquí se ha demostrado que el uso de una fuente de L19 tiene propiedades deseables, ya que se ha demostrado que el producto de la proteína L19 codificada puede inducir la producción de una respuesta antiinflamatoria en un sujeto tratado.

Una fuente de L19 preferida es una molécula de ácido nucleico, un oligonucleótido, una proteína, un fragmento de proteína y/o un péptido, cada uno derivado de una proteína o polipéptido o molécula de ácido nucleico L19 como se define aquí. Una fuente de L19 comprende o consiste preferiblemente en una proteína L19, un polipéptido L19, un péptido derivado de L19 o un fragmento de proteína L19 y/o una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína L19 o un polipéptido L19 o un fragmento de proteína L19 definido aquí. Una proteína L19 preferida está representada por la SEQ ID N°: 1. Esta proteína L19 preferida está codificada preferiblemente por la SEQ ID N°: 2. Otra proteína L19 preferida de acuerdo con la divulgación está representada por la SEQ ID N°: 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27 o 29. Cada una de estas otras proteínas L19 está preferiblemente codificada por la SEQ ID N°: 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30 respectivamente.

En una primera forma realización de la invención, una fuente de L19 preferida es una molécula de ácido nucleico representada por una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en:

- i. secuencias de nucleótidos que codifican un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 50% de identidad de secuencia o similitud con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 1, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27 o 29,
- ii. secuencias de nucleótidos que comprenden una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 50% de identidad de secuencia o similitud con la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID N°: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28 o 30,
- iii. secuencias de nucleótidos cuya cadena complementaria se hibrida con una molécula de ácido nucleico de la secuencia de (i) o (ii) y
- iv. secuencias de nucleótidos cuyas secuencias difieren de la secuencia de una molécula de ácido nucleico de (iii) debido a la degeneración del código genético.

[0006] En una segunda forma de realización de la invención, una fuente de L19 preferida es un polipéptido codificado por una molécula de ácido nucleico de la primera forma de realización según se ha identificado anteriormente. En una forma de realización más preferida, una fuente de L19 es un polipéptido cuya secuencia de aminoácidos tiene al menos un 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad de secuencia o similitud con un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID N°:1, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29 o 31.

En una primera forma de realización, una fuente de L19 preferida es una molécula de ácido nucleico representada por una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en:

- i. Secuencias de nucleótidos que codifican un polipéptido que incluye una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 89% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°:1,
- ii. Secuencias de nucleótidos que comprenden una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 89% de identidad de secuencia con la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID N°:2,
- iii. Secuencias de nucleótidos cuya cadena complementaria se hibrida a una molécula de ácido nucleico de la secuencia de (i) o (ii) y
- iv. secuencias de nucleótidos cuyas secuencias difieren de la secuencia de una molécula de ácido nucleico de (iii) debido a la degeneración del código genético.

Identificamos varias proteínas L19 y las correspondientes moléculas de ácido nucleico codificantes. Cada una de estas proteínas L19 comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 60%, 70%, 80%, 90%, 95% o más con la SEQ ID N°: 1. Cada una de las moléculas de ácido nucleico que codifica cada una de estas proteínas L19 comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 60%, 70%, 80%, 90%, 95% o más con la SEQ ID N°: 2. Cada una de estas proteínas L19 representa un homólogo de la proteína L19 de *Leishmania major* como se representa por la SEQ ID N°:1

Brevemente, identificamos tres proteínas L19 de *Leishmania braziliensis*, representadas por la SEQ ID N°: 5, 7 o 9. Cada una de estas proteínas está codificada preferiblemente por la siguiente secuencia de nucleótidos SEQ ID N°: 6, 8 o 10, respectivamente.

También identificamos dos proteínas L19 de *Leishmania infantum*, representadas por la SEQ ID N°: 11 o 13. Cada una de estas proteínas está codificada preferiblemente por la siguiente secuencia de nucleótidos SEQ ID N°: 12 o 14, respectivamente.

También identificamos dos proteínas L19 de *Leishmania mexicana*, representadas por la SEQ ID N°: 15 o 17. Cada una de estas proteínas está codificada preferiblemente por la siguiente secuencia de nucleótidos SEQ ID N°: 16 o 18, respectivamente.

También identificamos una proteína L19 de *Leishmania donovani*, representada por la SEQ ID N°: 19. Esta proteína está codificada preferiblemente por la siguiente secuencia de nucleótidos SEQ ID N°: 20.

Además, identificamos cuatro proteínas L19 de *Trypanosoma cruzi*, representadas por la SEQ ID N°: 21, 23, 25 o 27. Cada una de estas proteínas está codificada preferiblemente por la siguiente secuencia de nucleótidos SEQ ID N°: 22, 24, 26 o 28, respectivamente.

También identificamos una proteína L19 de *Trypanosoma brucei*, representada por la SEQ ID N°: 29. Esta proteína está codificada preferiblemente por la siguiente secuencia de nucleótidos SEQ ID N°: 30.

[0007] Preferiblemente, se dice que dicha secuencia de aminoácidos o secuencia de nucleótidos tal y como se define aquí con al menos un 50% de identidad o similitud con un aminoácido identificado específico o secuencia de nucleótidos son funcionales cuando el polipéptido de proteína codificada, fragmento de proteína o péptido es capaz de inducir una respuesta antiinflamatoria tal y como se puede obtener mediante la proteína L19 representada por la SEQ ID N°:1, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27 o 29 al menos en cierta medida. Al menos en cierta medida preferiblemente significa que al menos 50%, al menos 60%, 70%, 80%, al menos 90% o 100% de la respuesta antiinflamatoria es inducida por la SEQ ID N°:1, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27 o 29.

La inducción de una respuesta antiinflamatoria es o se define preferiblemente como la capacidad de inducir una producción detectable de un compuesto antiinflamatorio y/o la capacidad de inducir una reducción de la producción de un compuesto inflamatorio en un sujeto o individuo tratado. Un compuesto antiinflamatorio es preferiblemente una citocina. La citocina más preferida es IL-10. Un compuesto inflamatorio es preferiblemente una citocina. La citocina más preferida es IFN γ y/o TNF α . La producción de IL-10 o IFN γ o TNF α se evalúa preferiblemente al nivel del ARNm usando PCR o al nivel de las proteínas usando ELISA, un ELISPOT o FACS. Todas estas técnicas son conocidas por la persona experta. Muchas publicaciones han implicado la elevación de IL-10 con una reducción de la inflamación, como resultado de una enfermedad. Lo mismo sucede con la elevación de IFN γ o TNF α y la presencia de inflamación. La producción de un compuesto antiinflamatorio se puede evaluar en un sujeto tratado o en una muestra obtenida de dicho sujeto. En este contexto, una muestra puede ser un tejido o un fluido o una célula. El tejido preferido incluye el bazo o la piel o el intestino o los pulmones. El fluido preferido incluye la sangre. Las células preferidas incluyen una PBMC (célula mononuclear de sangre periférica) o células de la piel o células intestinales o células de los pulmones. Una respuesta antiinflamatoria se puede inducir después de al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 días de tratamiento con una fuente de L19. Las fuentes de L19 preferidas son un polipéptido, proteína, fragmento de proteína o péptido L19. La inducción de una respuesta antiinflamatoria también puede ser un aumento de la inducción de una respuesta antiinflamatoria. En este contexto, un "aumento" puede significar un aumento de al menos 1%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100%. La inducción de una respuesta antiinflamatoria también puede ser la reducción del total o la cantidad de IFN γ y/o TNF α . En este contexto, una "reducción" puede significar una reducción de al menos 1%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100%.

En una forma de realización preferida, se produce un compuesto antiinflamatorio y no se detecta ningún compuesto inflamatorio detectable (es decir, IFN γ y/o TNF α). En este contexto, no se detecta IFN- γ ni/o TNF α . La ausencia de TNF α y/o IFN- γ preferiblemente se evalúa utilizando PCR o ELISA. La ausencia de un compuesto inflamatorio se puede evaluar en un sujeto tratado o en una muestra obtenida de dicho sujeto en cuanto al compuesto antiinflamatorio.

En un ensayo preferido, una respuesta antiinflamatoria, más preferiblemente la producción de IL-10 o un aumento de la IL-10, se detecta después de al menos 24 horas o 48 horas o 72 horas de incubación de una fuente de L19, preferiblemente un polipéptido L19 o un péptido L19 con una PBMC. En este ensayo preferido, se detecta una cantidad disminuida de IFN- γ y/o una cantidad disminuida de TNF α , o no se detecta ninguna IFN- γ y/o TNF α detectable después de al menos 24 horas o 48 horas o 72 horas de incubación de una fuente de L19, preferiblemente un polipéptido L19 o un péptido L19 con una PBMC. Más preferiblemente, la IL-10, INF γ y/o TNF α se evalúa(n) por ELISA como se describe en la parte experimental. En otra forma de realización preferida, una fuente de L19 que es capaz de inducir una respuesta antiinflamatoria también es capaz de prevenir y/o retardar el desarrollo de un trastorno inflamatorio o afección o enfermedad y/o es capaz de aliviar uno o más síntoma(s) y/o una o más característica(s) o parámetro(s) de una célula o tejido de un sujeto tratado como se define más adelante en este documento.

[0008] Una fuente de L19 preferida de la invención es una molécula de ácido nucleico de la primera forma de realización de la invención según se ha identificado antes. Esta molécula de ácido nucleico preferida está representada por una secuencia de nucleótidos que deriva de la SEQ ID N°:2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28 o 30, o una secuencia con al menos un 50% de identidad o similitud con la SEQ ID N°:2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28 o 30 o con una parte de las mismas y que puede comprender sustituciones, inserciones, deleciones y nucleótidos o regiones químicas adicionales en el extremo 5' y/o 3' para aumentar la

estabilidad, la solubilidad o la capacidad de direccionamiento. En una forma de realización preferida, una fuente de L19 es una molécula de ácido nucleico cuya secuencia de nucleótidos tiene al menos 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad de secuencia o similitud con la SEQ ID N°: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28 o 30 o con una parte de la misma.

Una fuente de L19 preferida de la invención es una molécula de ácido nucleico de la primera forma de realización según se ha identificado antes. Esta molécula de ácido nucleico preferida está representada por una secuencia de nucleótidos que deriva de la SEQ ID N°:2, o una secuencia con al menos un 89% de identidad con la SEQ ID N°:2, o con una parte de la misma y que puede comprender sustituciones, inserciones, deleciones y nucleótidos o regiones químicas adicionales en el extremo 5' y/o 3' para aumentar la estabilidad, la solubilidad o la capacidad de direccionamiento selectivo.

[0009] Una molécula de ácido nucleico L19 tal y como se define aquí es preferiblemente un oligonucleótido. Un oligonucleótido preferido de la invención tiene una longitud de al menos 8, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100 nucleótidos y deriva de la SEQ ID N°: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28 o 30. Los oligonucleótidos más preferidos comprenden al menos 8, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100 o más nucleótidos contiguos de una molécula de ácido nucleico L19 correspondiente según se ha identificado anteriormente, preferiblemente representados por la SEQ ID N°:2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28 o 30 y cuyo producto codificado es capaz de inducir una respuesta antiinflamatoria como se ha definido anteriormente. En una forma de realización preferida, por lo tanto, una molécula de ácido nucleico L19 tal y como se define aquí es preferiblemente un oligonucleótido que comprende al menos 8, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100 o más nucleótidos contiguos de la SEQ ID N°:2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28 o 30.

Por consiguiente, una fuente de L19 preferida de la invención es un oligonucleótido que comprende al menos 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100 o más nucleótidos contiguos de la SEQ ID N°: 2.

Por consiguiente una fuente de L19 preferida de la invención es un oligonucleótido que comprende al menos 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100 o más nucleótidos contiguos de la SEQ ID N°:2.

[0010] Otra fuente de L19 preferida de la invención es un polipéptido codificado por una molécula de ácido nucleico de la primera forma de realización como se ha identificado anteriormente y/o es un polipéptido cuya secuencia de aminoácidos tiene al menos 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71 %, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad de secuencia o similitud con un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID. NO: 1, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27 o 29 o con una parte del mismo.

[0011] Un polipéptido preferido de la invención está representado por una secuencia de aminoácidos que derivada de la SEQ ID N°:1, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27 o 29 o de una parte de la misma o una secuencia con al menos 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad o similitud con la SEQ ID N°:1, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27 o 29 o con una parte de la misma y que puede comprender sustituciones, inserciones, deleciones y aminoácidos o regiones químicas adicionales en el extremo N o C para aumentar la estabilidad, la solubilidad.

Un polipéptido preferido de la invención está representado por una secuencia de aminoácidos que deriva de la SEQ ID N°: 1, o de una parte de la misma o una secuencia que tiene al menos un 89% de identidad con la SEQ ID N°: 1, o con una parte de la misma y que puede comprender sustituciones, inserciones, deleciones y aminoácidos o regiones químicas adicionales en el extremo N o C para aumentar la estabilidad, la solubilidad.

[0012] Un fragmento de proteína L19 o un péptido derivado de L19 o un polipéptido L19 o una proteína L19 según la descripción como se define aquí es preferiblemente un fragmento que comprende al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 265 o 267 aminoácidos contiguos de una proteína L19 correspondiente, preferiblemente representada por la SEQ ID N°: 1, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27 o 29 y que es capaz de inducir una respuesta antiinflamatoria como se ha definido anteriormente en el presente documento. En una forma de realización preferida, por lo tanto, un fragmento de proteína L19 o un péptido derivado de L19 como se define aquí es preferiblemente un fragmento que comprende al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 265 o 267 aminoácidos contiguos de la SEQ ID N°: 1, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27 o 29. Una fuente de L19 también puede comprender una proteína L19 de longitud completa tal como la representada por la SEQ ID N°: 1, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27 o 29 y comprende aminoácidos adicionales en el extremo N y/o C de la proteína L19.

Un fragmento de proteína L19 o un péptido derivado de L19 o un polipéptido L19 o una proteína L19 según la invención como se define aquí es preferiblemente un fragmento que comprende al menos 14, 15, 16, 17, 18, 19,

20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 265 o 267 aminoácidos contiguos de una proteína L19 correspondiente, representada por la SEQ ID N°: 1 y que es capaz de inducir una respuesta antiinflamatoria como se ha definido anteriormente en esta memoria. En una forma de realización preferida, por lo tanto, un fragmento de proteína L19 o un péptido derivado de L19 como se define aquí es preferiblemente un fragmento que comprende al menos 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 265 o 267 aminoácidos contiguos de la SEQ ID N°: 1. Una fuente de L19 también puede comprender una proteína L19 de longitud completa tal como la representada por la SEQ ID N°: 1 y comprende aminoácidos adicionales en el extremo N y/o C de la proteína L19.

En otra forma de realización preferida, una fuente de L19 comprende o consiste en una proteína o un polipéptido que comprende al menos un fragmento de proteína de una proteína L19. Una fuente preferida de L19 de la invención es un fragmento de proteína que comprende al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 o 13 aminoácidos contiguos de la SEQ ID N°: 1. Una fuente de L19 preferida de la invención es un fragmento de proteína que comprende al menos 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 265 o 267 aminoácidos continuos de la SEQ ID N°: 1.

En una forma de realización, una fuente de L19 es un péptido derivado de la SEQ ID N°: 1 o un fragmento de la SEQ ID N°: 1. Un fragmento o péptido preferido comprende al menos 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42 aminoácidos contiguos de la SEQ ID N°: 1. En el ejemplo 3, tres regiones de L19 y péptidos específicos derivados de L19 se han identificado como capaces de inducir la producción de IL-10. Las regiones preferidas de L19 son las siguientes:

- La región 1 comprende péptidos que tienen la SEQ ID N°: 31, 32 y/o 55,
- La región 2 comprende péptidos que tienen la SEQ ID N°: 42, 43, 44 y/o 56,
- La región 3 comprende péptidos que tienen la SEQ ID N°: 53, 54 y/o 57

[0013] A continuación definimos con mayor detalle estos péptidos o fragmentos de la SEQ ID N°:1. Un fragmento de proteína de la SEQ ID N°:1 que comprende al menos 14 aminoácidos contiguos de la SEQ ID N°:1 y que comprende la SEQ ID N°: 31, 32, 55, 42, 43, 44, 56, 53, 54 y/o 57.

[0014] Un fragmento más preferido de la SEQ ID N°:1 comprende la SEQ ID N°: 31 o 32 o 42 o 43 o 44 o 53 y comprende hasta 40, 39, 38, 37, 36, 35, 34, 33, 32, 31, 30, 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21 o 20 aminoácidos contiguos de la SEQ ID N°:1. Dicho fragmento puede comprender la SEQ ID N°: 31 o 32 o 42 o 43 o 44 o 53 y puede tener una longitud de hasta 40, 39, 38, 37, 36, 35, 34, 33, 32, 31, 30, 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21 o 20 aminoácidos. Dicho fragmento preferiblemente consiste en la SEQ ID N°: 31 o 32 o 42 o 43 o 44 o 53.

Otro fragmento más preferido de la SEQ ID N°:1 comprende la SEQ ID N°: 54 y comprende hasta 40, 39, 38, 37, 36, 35, 34, 33, 32, 31, 30, 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15 o 14 aminoácidos contiguos de la SEQ ID N°:1. Dicho fragmento puede comprender la SEQ ID N°: 54 y puede tener una longitud de hasta 40, 39, 38, 37, 36, 35, 34, 33, 32, 31, 30, 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15 o 14 aminoácidos. Dicho fragmento preferiblemente consiste en la SEQ ID N°:54.

Un fragmento más preferido de la SEQ ID N°:1 comprende la SEQ ID N°: 57 y comprende hasta 40, 39, 38, 37, 36, 35, 34, 33, 32, 31, 30, 29, 28, 27, 26, 25 aminoácidos contiguos de la SEQ ID N°:1. Dicho fragmento puede comprender la SEQ ID N°: 57 y puede tener una longitud de hasta 40, 39, 38, 37, 36, 35, 34, 33, 32, 31, 30, 29, 28, 27, 26, 25 aminoácidos. Dicho fragmento preferiblemente consiste en la SEQ ID N°: 57.

Un fragmento más preferido de la SEQ ID N°:1 comprende la SEQ ID N°: 55 y comprende hasta 40, 39, 38, 37, 36, 35, 34, 33, 32, 31 aminoácidos contiguos de la SEQ ID N°:1. Dicho fragmento puede comprender la SEQ ID N°: 55 y puede tener una longitud de hasta 40, 39, 38, 37, 36, 35, 34, 33, 32, 31 aminoácidos. Dicho fragmento preferiblemente consiste en la SEQ ID N°: 55.

Un fragmento más preferido de la SEQ ID N°:1 comprende la SEQ ID N°: 56 y comprende hasta 50, 49, 48, 47, 46, 45, 44, 43, 42 aminoácidos contiguos de SEQ ID N°:1. Dicho fragmento puede comprender la SEQ ID N°: 56 y puede tener una longitud de hasta 50, 49, 48, 47, 46, 45, 44, 43, 42 aminoácidos. Dicho fragmento preferiblemente consiste en la SEQ ID N°: 56.

Cada uno de los fragmentos preferidos de la SEQ ID N°:1 como se identifica aquí es capaz de inducir una respuesta antiinflamatoria como se ha definido anteriormente en el presente documento.

[0015] La fuente de L19 puede ser una proteína, un producto de la digestión de la proteína y/o un fragmento de la misma, que puede estar en forma purificada o puede estar comprendido/a en una composición bruta, preferiblemente de origen biológico, tal como un lisado bacteriano, lisado de levadura, lisado fúngico, sobrenadante bacteriano, sobrenadante de levadura, sobrenadante fúngico, producto de sonicación o de fijación. Alternativamente, una fuente de L19 puede sintetizarse químicamente o producirse enzimáticamente *in vitro* en un sistema sin células o en un sistema celular. La fuente de una proteína L19, o fragmento de la misma, también puede ser un ácido nucleico que codifique dicho fragmento, o fragmento del mismo, a partir de un modelo de ARN o ADN. Las moléculas de ARN o ADN pueden ser ADN "desnudo", preferiblemente comprendido en vesículas o liposomas, o pueden estar comprendidas en un vector. El vector puede ser cualquier vector de ADN o ARN (recombinante) conocido en la técnica, y preferiblemente es un plásmido; donde los genes que codifican

antígenos de latencia están unidos operativamente a secuencias reguladoras que proporcionan la expresión y traducción de los mensajeros codificados. El vector también puede ser cualquier virus de ADN o ARN, tal como, pero sin limitarse a, adenovirus, virus adenoasociados (VAA), un retrovirus, un lentivirus, virus Vaccinia Ankara modificado (MVA) o virus de la viruela aviar, o cualquier otro vector viral capaz de proporcionar la expresión de dicho polipéptido en un sujeto elegido. Los vectores de ADN pueden ser no integrantes, tales como vectores de replicación episómica, o pueden ser vectores que se integran en el genoma del hospedador mediante integración aleatoria o mediante recombinación homóloga.

[0016] Una fuente de L19 o una composición como se define aquí para su uso de acuerdo con la invención puede ser adecuada para administrarse *in vitro* a una célula, un tejido y/o un órgano de individuos afectados por un trastorno inflamatorio o en riesgo de desarrollarlo, y/o puede ser adecuada para administrarse *in vivo* o *ex vivo* a una célula, un tejido y/o un órgano de tales individuos y/o puede ser adecuada para administrarse *in vivo* a tales individuos. Dependiendo del tipo de fuente utilizada (a base de proteína o a base de ácido nucleico), la persona experta sabrá qué tipo de formulación es el adecuado. Una fuente de L19 puede administrarse como tal (proteína desnuda o ácido nucleico). Alternativamente, puede administrarse una fuente basada en ácido nucleico usando una construcción de ácidos nucleicos como se define aquí. Dicha fuente de L19 o una composición como se define en este documento se puede administrar directa o indirectamente *in vivo*, *in vitro* o *ex vivo* a una célula, tejido y/u órgano de un individuo afectado o en riesgo de desarrollar un trastorno inflamatorio o *in vivo* a dicho individuo. Preferiblemente, dichas células son células de un individuo que padece un trastorno inflamatorio. Preferiblemente, dicho tejido es un tejido de un individuo que padece un trastorno inflamatorio. Dependiendo del trastorno inflamatorio, un tipo determinado de célula o tejido puede ser más adecuado para ser tratado con una fuente de L19 o una composición de la invención. Por ejemplo, un tejido puede ser piel, sangre, intestino, pulmón y se pueden derivar células adecuadas de estos tejidos.

Una fuente de L19 o una composición de la invención se puede administrar indirectamente usando medios adecuados conocidos en la técnica. Una molécula de ácido nucleico tal como se define en una primera forma de realización puede proporcionarse, por ejemplo, a un individuo o célula, tejido u órgano de dicho individuo en forma de un vector de expresión, donde el vector de expresión codifica un transcrito que comprende dicha molécula de ácido nucleico. El vector de expresión se introduce preferiblemente en una célula, tejido, órgano o individuo a través de un vehículo de inserción génica. En una forma de realización preferida, se proporciona un vector de expresión basado en virus que comprende un casete de expresión o un casete de transcripción que dirige la expresión o la transcripción de una molécula según se identifica aquí. Un vehículo de administración preferido es un vector viral tal como un vector de virus adenoasociado (VAA), o un vector retroviral tal como un vector lentivirus y similares. También se puede aplicar de forma adecuada plásmidos, cromosomas artificiales, plásmidos para la recombinación homóloga dirigida y la integración en el genoma humano de las células para el suministro de una molécula de ácido nucleico como se define en una primera forma de realización de la invención o descripción. Se prevén mejoras en los medios para proporcionar a un individuo o una célula, tejido u órgano de dicho individuo una fuente de L19 o una composición como se define en este documento, considerando el progreso que se ha logrado hasta ahora. Cuando se administra una fuente de L19 o una composición, se prefiere que dicha fuente o composición de L19 se disuelva en una solución que sea compatible con el método de administración. Para una administración intravenosa, subcutánea, intramuscular, intradérmica, intratecal y/o intraventricular, se prefiere que la solución sea una solución salina fisiológica.

En el contexto de la invención, un sujeto o un individuo o un paciente o un animal puede ser un ser humano o un animal. Un animal que está incluido dentro del alcance de la invención incluye un mamífero. Los mamíferos preferidos incluyen un perro y un gato.

En una forma de realización preferida, se usa al menos 1 µg de una fuente de L19 para inducir una respuesta antiinflamatoria. Los rangos de dosis de la fuente de L19 como se ha indicado antes son las dosis preferidas para usos *in vitro* o *ex vivo*. El experto comprenderá que, dependiendo de la fuente de L19 utilizada, de la célula, tejido, órgano o sujeto por tratar, del medio utilizado y de las condiciones de transfección e incubación, la dosis de la fuente de L19 utilizada puede variar aún más y puede necesitar una mayor optimización. Una fuente de L19 de acuerdo con la descripción es preferiblemente un medicamento o para usar como un medicamento. Una fuente de L19 de acuerdo con la invención es para usar como un medicamento. Más preferiblemente, dicho medicamento es para prevenir, retrasar y/o tratar un trastorno inflamatorio a un sujeto que lo necesite. Dentro del contexto de la invención, un trastorno inflamatorio es cualquier enfermedad o afección inflamatoria o cualquier afección en la que se produzca inflamación en una etapa dada. Entre los ejemplos de enfermedades o afecciones inflamatorias se incluyen, pero sin limitarse a ellas, artritis reumatoide (AR), artritis reumatoide juvenil, psoriasis, artritis psoriásica, espondilitis anquilosante, enfermedad inflamatoria intestinal (EII) (incluida la enfermedad de Crohn o la colitis ulcerosa), síndrome del intestino irritable hepatitis, sepsis, hepatopatía alcohólica y esteatosis no alcohólica, nefritis, tal como nefritis glomerular, asma, endocarditis, miastenia grave, esclerosis múltiple, diabetes autoinmune (y otras similares), diabetes mellitus, uveítis, (1) control del rechazo de aloinjerto después de un trasplante de órganos, enfermedad de injerto contra huésped (EICH), enfermedades pulmonares inflamatorias incluyendo asma y la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) (2), cáncer (4), lupus eritematoso sistémico (LES), inflamación cutánea inducida por radiación UV, dermatitis atópica y sarcoidosis.

[0017] Como se utiliza en este caso, el término "hepatitis" se refiere a una enfermedad, afección o trastorno gastroenterológico que se caracteriza, al menos en parte, por una inflamación del hígado. Entre los ejemplos de

hepatitis se incluyen, pero de forma no limitativa, la hepatitis asociada al virus de la hepatitis A, al virus de la hepatitis B, al virus de la hepatitis C, o la inflamación del hígado asociada a isquemia/reperfusión.

[0018] En una forma de realización más preferida, dicho medicamento es capaz de aliviar uno o más síntoma(s) de un paciente tratado, y/o una o más característica(s) o parámetro(s) de una célula o tejido u órgano de un paciente tratado se mejora(n) utilizando una fuente de L19 o una composición de la invención. Para cada enfermedad inflamatoria el experto en la materia conoce al menos un síntoma, parámetro o característica, valores de dicho parámetro o característica asociados a dicha enfermedad y cómo evaluar cada uno de éstos. Si un medicamento de la invención es capaz de inducir una respuesta antiinflamatoria como se ha definido antes, se dice que dicho medicamento es capaz de prevenir y/o retardar el desarrollo de un trastorno inflamatorio o afección o enfermedad y/o de mejorar una o más característica(s) o parámetro(s) de una célula o tejido de un sujeto tratado como se define más adelante en el presente documento.

A continuación, proporcionamos un parámetro específico para la artritis reumatoide, la psoriasis y la enfermedad inflamatoria intestinal, respectivamente.

[0019] La artritis reumatoide es una enfermedad sistémica y es una de las formas más comunes de artritis. Se caracteriza por una inflamación de la membrana que recubre la articulación, lo que causa dolor, rigidez, calor, enrojecimiento e hinchazón.

En la técnica se conocen varios modelos animales para la AR. Un ejemplo es el modelo de artritis inducida por colágeno (AIC), en el que los ratones desarrollan una artritis inflamatoria crónica que se parece mucho a la artritis reumatoide humana. Dado que la AIC comparte características inmunológicas y patológicas similares con la AR, esto la convierte en un modelo adecuado para el análisis de tratamientos potenciales para la AR. En este modelo, los mecanismos básicos de patogénesis se conocen a través de los diversos parámetros inmunológicos e inflamatorios relacionados con la artritis mediada por el sistema inmune que se han determinado. Estos parámetros se pueden usar para evaluar la eficacia del compuesto en el modelo AIC (5).

La AR preferiblemente se diagnostica después de haber evaluado el índice de puntuación de la actividad patológica (DAS) o el relacionado DAS28 (6), incluyendo las mediciones de diferentes parámetros y síntomas de un sujeto. La evaluación de dichos índices puede realizarla un clínico al examinar a un sujeto. En una forma de realización más preferida, dicho medicamento es capaz de aliviar uno o más síntoma(s) de un paciente tratado, y/o una o más característica(s) o parámetro(s) de una célula o tejido u órgano de un paciente tratado es/son mejorados/as utilizando una fuente de L19 o una composición de la invención cuando dicho medicamento es capaz de inducir un cambio significativo en la DAS o DAS28. Otras maneras de evaluar la artritis reumatoide también se describen en (6) y en (7). Un medicamento tal y como se define aquí es capaz de mejorar un parámetro si después de al menos una semana, un mes, seis meses, un año o más de tratamiento utilizando una fuente de L19 o una composición de la invención preferiblemente el valor de dicho parámetro ha mejorado en al menos un 1%, 2%, 5%, 10% o más en comparación con el valor de dicho parámetro antes de la aparición del tratamiento. Un medicamento tal y como se define aquí es capaz de aliviar un síntoma o una característica de un paciente o de una célula, tejido u órgano de dicho paciente si después de al menos una semana, un mes, seis meses, un año o más de tratamiento utilizando una fuente de L19 o una composición de la invención dicho síntoma o características ya no son detectables.

[0020] La enfermedad inflamatoria intestinal (EII) es un grupo de afecciones inflamatorias del colon y del intestino delgado entre las que se incluyen la colitis ulcerosa y la enfermedad de Crohn. La colitis ulcerosa se caracteriza por la inflamación del colon, lo que provoca que el colon se vacíe con frecuencia, lo que a su vez provoca diarrea y calambres asociados, fiebre y pérdida de peso. El revestimiento del colon queda dañado y forma úlceras que liberan mucosidad, pus y sangre. Los episodios repetidos pueden provocar la formación de tejido cicatricial y la muerte del tejido del colon o sepsis con una enfermedad grave. Los tratamientos actuales se centran en la supresión del proceso inflamatorio anormal en el revestimiento del colon. Un modelo animal bien caracterizado para la EII humana, la colitis ulcerosa y especialmente la enfermedad de Crohn es el modelo de colitis inducida por el ácido 2,4,6-trinitrobenzenosulfónico/etanol (TNBS). Colitis inducida por la administración intra-rectal de TNBS. Esto induce una respuesta inmune mediada por células T en la mucosa colónica, lo que lleva a una inflamación mucosa masiva, caracterizada por la infiltración de células T y macrófagos en toda la pared del intestino grueso. La naturaleza histopatológica va acompañada de una pérdida de peso progresiva, diarrea con sangre, engrosamiento de la pared del intestino grueso (8). Los modelos animales actuales de inflamación del colon no reflejan completamente la complejidad de la enfermedad en humanos, pero son herramientas valiosas para evaluar la eficacia de los compuestos terapéuticos.

La psoriasis es una enfermedad crónica y común de la piel en la que células nuevas de la piel crecen anormalmente y producen parches inflamados, hinchados y escamosos de la piel, donde la piel vieja no se ha desprendido lo suficientemente rápido. La forma más común es la psoriasis en placas, caracterizada por lesiones cubiertas con escamas blancas plateadas. La psoriasis puede limitarse a unas pocas lesiones o puede abarcar áreas extensas de la piel, y aparece con mayor frecuencia en los codos, las rodillas, el cuero cabelludo y el tronco. Los casos leves de psoriasis se controlan mediante aplicaciones tópicas. Sin embargo, los casos más graves requieren terapia con rayos ultravioleta, lo que es inconveniente, o el uso de terapias inmunosupresoras sistémicas, que, debido a los efectos secundarios tóxicos, a menudo tienen un valor limitado en el uso a largo plazo. Además, la psoriasis recurre con frecuencia, incluso poco después de suspender la terapia inmunosupresora.

Se han desarrollado varios modelos de enfermedad para la evaluación de posibles moduladores de enfermedad. Uno de esos modelos es un modelo *in vivo* de xenoinjerto para la psoriasis con piel psoriásica humana implantada en un ratón con inmunodeficiencia grave (SCID). Las terapias que eliminan o reducen la inflamación pueden analizarse mediante administración a los ratones de SCID, descubriendo el tejido inflamatorio humano. La eficacia del tratamiento puede evaluarse mediante un rango de índices. La psoriasis es una enfermedad que se diagnostica preferiblemente después de haber evaluado el índice de severidad y área de la psoriasis (PASI), evaluación global por parte del médico (PGA) (9) o el índice de psoriasis de la NPF (NPF-PS), incluyendo las mediciones de varios parámetros y síntomas en un sujeto. La evaluación de dichos índices puede ser realizada por un médico al examinar a un sujeto. En una forma de realización más preferida, dicho medicamento es capaz de aliviar uno o más síntoma(s) de un paciente tratado, y/o una o más características o parámetros de una célula o tejido u órgano de un paciente tratado mejora(n) usando una fuente de L19 o una composición de la invención cuando dicho medicamento puede inducir un cambio significativo en el PASI, PGA o NPF-PS. Otras formas de evaluar la psoriasis incluyen el índice de calidad de vida en dermatología (DLQI) (10) y el índice Salford de psoriasis (SPI) también descrito en (11). Un medicamento como se define aquí puede mejorar un parámetro si después de al menos una semana, un mes, seis meses, un año o más de tratamiento usando una fuente de L19 o una composición de la invención, preferiblemente, el valor de dicho parámetro ha mejorado en al menos un 1%, 2%, 5%, 10% o más en comparación con el valor de dicho parámetro antes del inicio del tratamiento.

Un medicamento como se define aquí es capaz de aliviar un síntoma o una característica de un paciente o de una célula, tejido u órgano de dicho paciente si después de al menos una semana, un mes, seis meses, un año o más de tratamiento usando una fuente de L19 o una composición de la invención, dicho síntoma o característica ya no es detectable.

Una fuente de L19 preferida como se define en este documento es para prevenir o tratar un trastorno inflamatorio en un individuo. Un individuo que puede tratarse usando tal fuente de L19 puede haber sido diagnosticado con un trastorno inflamatorio. Alternativamente, un individuo que puede tratarse usando tal fuente de L19 puede no haber sido diagnosticado todavía con un trastorno inflamatorio, pero puede ser un individuo que tenga un mayor riesgo de desarrollar un trastorno inflamatorio en el futuro dado su origen genético. Un individuo preferido es un ser humano.

Composición

[0021] En otro aspecto, se proporciona una composición que comprende una fuente de L19 tal y como se define aquí. En una forma de realización preferida, dicha composición es preferiblemente una composición farmacéutica, dicha composición farmacéutica que comprende un portador, sal, diluyente y/o excipiente farmacéuticamente aceptable.

Dicha composición farmacéutica puede comprender cualquier vehículo, carga, sal, conservante, solubilizante, diluyente y/o excipiente farmacéuticamente aceptable. Tal vehículo, carga, sal, conservante, solubilizante, diluyente y/o excipiente farmacéuticamente aceptable se puede encontrar, por ejemplo, en (12). Cada característica de dicha composición se ha definido anteriormente en este documento.

Si se usan varias fuentes de L19, la dosis como se define aquí puede referirse a la dosis total de todas las fuentes de L19 utilizadas o a la dosis de cada fuente de L19 utilizada o añadida. Por lo tanto, en una forma de realización, se proporciona una composición en la que cada una o la cantidad total de la fuente de L19 utilizada se dosifica en una cantidad de 0,1 mg/kg y 100 mg/kg.

[0022] En la invención es particularmente preferido el uso de un excipiente que ayude a la administración de cada uno de los constituyentes como se define aquí a una célula y/o al interior de una célula. Se prefieren excipientes capaces de formar complejos, nanopartículas, micelas, vesículas, liposomas, proteoliposomas y/o partículas similares a virus (VLP) que liberan cada constituyente como se define aquí, complejo o atrapado en una vesícula o liposoma a través de una membrana celular. Muchos de estos excipientes son conocidos en la técnica. Los excipientes adecuados comprenden polietilenimina (PEI), o polímeros catiónicos similares, incluyendo copolímeros de polipropilenoimina o polietilenimina (PEC) y derivados, anfífilos sintéticos (SAINT-18), lipofectin™, DOTAP y/o proteínas de la cápsida viral que son capaces de autoensamblarse en partículas que puede distribuir cada constituyente como se define aquí a una célula.

[0023] Dependiendo de su identidad, la persona experta sabrá qué tipo de formulación es la más apropiada para cada constituyente como se define aquí. En una forma de realización preferida, la invención proporciona una composición o una preparación que está en forma de un kit de partes que comprende una fuente de L19 como se define en este documento.

[0024] Una medicina o medicamento o composición farmacéutica como se define en este documento puede administrarse local o sistémicamente. Un medicamento se administra preferiblemente por vía parenteral, por ejemplo mediante inyección o infusión por vía intravenosa, subcutánea, intraperitoneal, intramuscular, intradérmica, intraarterial o intralesional. Un modo de administración preferido es subcutáneo o transdérmico. Un ejemplo de administración transdérmica es una crema. La invención no se limita a un modo específico de administración de un medicamento o una fuente de L19 o una composición como se define aquí. Un modo preferido de administración es la administración oral usando una cápsula o un comprimido. Alternativamente, un medicamento o una fuente de L19 o una composición como se define en este documento pueden administrarse

localmente a través de un catéter o una bomba, o un supositorio o una crema. Alternativamente, un medicamento o una fuente de L19 o una composición como se define aquí se pueden administrar de manera tópica. La formulación de un medicamento o una fuente de L19 o una composición como se define en este documento depende del modo de administración deseado y de la aplicación (terapéutica). Un vehículo farmacéutico puede ser cualquier sustancia compatible, no tóxica, adecuada para administrar dicho compuesto a un sujeto. Por ejemplo, se puede usar agua estéril, o sólidos o excipientes inertes como vehículo, habitualmente complementados con adyuvantes, agentes tamponantes, agentes dispersantes y similares farmacéuticamente aceptables. Las composiciones estarán o bien en forma líquida, por ejemplo una suspensión estabilizada de dicho compuesto, o una composición que comprende dicho compuesto, o bien en forma sólida y/o seca: por ejemplo polvo. Para la administración oral y rectal, dicho compuesto puede administrarse en formas de dosificación sólidas, tales como cápsulas, comprimidos, supositorios y polvos, o en formas de dosificación líquidas, tales como elixires, jarabes, crema, ungüento y suspensiones. Otra forma puede ser una forma semisólida o semilíquida en la que dicho compuesto está presente como una forma líquida en o sobre un soporte sólido tal como un parche.

Una composición puede estar en forma líquida, sólida o semilíquida o semisólida como ya se ha definido aquí. En una forma de realización preferida, otros compuestos se usan secuencialmente o simultáneamente con una fuente de L19 o una composición con el fin de mejorar la especificidad del tratamiento terapéutico o profiláctico. Es ventajoso, por ejemplo, usar otros compuestos que potencien adicionalmente la respuesta antiinflamatoria del sujeto tratado. Más preferiblemente, tales compuestos no están presentes en una única composición junto con una fuente o composición de L19. Tal compuesto puede ser un anticuerpo, un FARME (fármacos antiinflamatorios modificadores de la enfermedad), un AINE (agentes antiinflamatorios no esteroideos) y/o un inductor de IL-10 tal como los descritos en la tabla 1 de (13). Un inductor de IL-10 incluye un compuesto seleccionado del grupo que consiste en: cordicepina, una sal de oro, un corticosteroide, ciclosporina A, ST1959 3-(2-etilfenil)-5-(3-metoxifenil)-1H-1,2,4-triazol, SR 31747A, SSR 125329A, aprotinina, linomida, monometilfumarato, agentes que aumentan el AMPc tales como rolipram o cicaprost, una catecolamina, vitamina D3, un aceite de pescado que comprenda un ácido grasopoliinsaturado n-3, una hormona sexual estriol, KM 2210 o bestrabuciol, un IFN de tipo I tal como IFN- τ , IFN- α o IFN- β , un autoantígeno mimético como acetato de glatirámico (copolímero I), una pirimidilpiperazina o un derivado de la misma, 1-etil-3-(3-dimetil aminopropil) urea dihidrocloruro, 5'-metilitioadenosina y una pirfenidona tal como 5-metil-1-fenil-1H-piridin-ona.

Uso

[0025] En un aspecto adicional de la invención, se proporciona el uso de una fuente de L19 o de una composición como se define en este documento para la fabricación de un medicamento para prevenir o tratar un trastorno inflamatorio en un individuo. Cada característica de dicho uso se ha definido anteriormente en este documento.

Un tratamiento en un uso o en un método según la invención es de al menos una semana, al menos un mes, al menos varios meses, al menos un año, al menos 2, 3, 4, 5, 6 años o más. Cada fuente de L19 como se define aquí para su uso de acuerdo con la invención puede ser adecuada para la administración directa *in vivo*, *in vitro* o *ex vivo* a una célula, tejido y/u órgano de personas afectadas por un trastorno inflamatorio o en riesgo de desarrollarlo, y puede administrarse directamente *in vivo* a dichos individuos. La frecuencia de administración de una fuente de L19 o composición de la invención puede depender de varios parámetros tales como la edad del paciente, el número de moléculas (es decir, la dosis), la formulación de dicha molécula. La frecuencia puede ser diaria, semanal o variable entre al menos una vez cada dos semanas, o tres semanas o cuatro semanas o cinco semanas o un período de tiempo más largo.

Método

[0026] En un aspecto adicional de la invención, se proporciona un método para aliviar uno o más síntoma(s) de un trastorno inflamatorio en un individuo, en una célula, tejido u órgano de dicho individuo o para aliviar una o más característica(s) o síntoma(s) de un individuo o una célula, tejido u órgano de dicho individuo, comprendiendo el método administrar a dicho individuo una fuente de L19 o una composición como se define en este documento.

En una forma de realización, dicho método se realiza *in vitro*, por ejemplo, utilizando un cultivo de células o un cultivo de tejidos. Dicho método también puede ser *ex vivo*. Preferiblemente, dicho método es *in vivo*. Cada característica de estos métodos ya se ha definido en este documento. En un método de la invención, una fuente de L19 se puede combinar con un compuesto adicional conocido que se use para tratar un trastorno inflamatorio en un individuo. Tal compuesto puede ser un anticuerpo, un FARME (fármacos antiinflamatorios modificadores de la enfermedad), un AINE (agentes antiinflamatorios no esteroideos) y/o un inductor de IL-10 como se describe en (13). Los inductores de IL-10 preferidos ya se han identificado anteriormente en este documento.

Definiciones

Molécula de ácido nucleico

[0027] Una molécula de ácido nucleico puede ser un ADNc o ADN sintético. El ADN puede ser bicatenario o monocatenario y, si es monocatenario, puede ser la cadena codificante o la cadena no codificante (antisentido). ADN o ARN con una cadena principal modificada por estabilidad o por otras razones son una parte adicional de la invención. Una molécula de ácido nucleico está representada por una secuencia de nucleótidos. Una secuencia de nucleótidos puede ser una variante alélica de la secuencia de nucleótidos de acuerdo con la invención. Si se desea, la secuencia de nucleótidos puede prepararse o alterarse sintéticamente de modo que se pueden usar ventajosamente las preferencias de codones conocidas del huésped de expresión deseado. Dependiendo del tamaño de la molécula de ácido nucleico, podría identificarse como un oligonucleótido. Un oligonucleótido puede comprender al menos 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 nucleótidos.

Polipéptido

[0028] "Polipéptido" como se usa en el presente documento se refiere a cualquier péptido, oligopéptido, polipéptido, producto génico, producto de expresión o proteína. Un polipéptido está representado por una secuencia de aminoácidos. Puede comprender de 2 a 267 (es decir, longitud de SEQ ID N°: 1, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27 o 29) o de 5 a 265 u 8 a 260 o 10 a 250 aminoácidos. Puede comprender más de 267 aminoácidos. El término "polipéptido" abarca moléculas naturales o sintéticas. Un oligopéptido puede comprender de 2 a 20 aminoácidos. Un péptido puede comprender de 5 a 10 o de 5 a 20 o de 5 a 30 o de 5 a 50 aminoácidos.

Identidad/similitud

[0029] "Identidad de secuencia" se define aquí como una relación entre dos o más secuencias de aminoácidos (polipéptido o proteína o péptido o fragmento de proteína) o dos o más secuencias de ácido nucleico (polinucleótido, ácido nucleico o nucleótido u oligonucleótido), según se determina comparando la secuencias. En una forma de realización preferida, la identidad de secuencia se calcula en función de la longitud total de dos SEQ ID N° dadas o parte de las mismas. Parte de las mismas preferiblemente significa al menos 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o 100% de ambas SEQ ID N°. En la técnica, "identidad" también significa el grado de relación de secuencia entre las secuencias de aminoácidos o de ácidos nucleicos, según sea el caso, tal como se determina mediante el emparejamiento entre cadenas de tales secuencias.

[0030] La "similitud" entre dos secuencias de aminoácidos se determina comparando la secuencia de aminoácidos y sus sustitutos de aminoácidos conservados de un polipéptido con la secuencia de un segundo polipéptido. La "identidad" y la "similitud" se pueden calcular fácilmente mediante métodos conocidos, que incluyen, entre otros, los que se describen en Computational Molecular Biology, Lesk, A. M., ed., Oxford University Press, New York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D. W., ed., Academic Press, New York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Part I, Griffin, A. M., and Griffin, H. G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heine, G., Academic Press, 1987; and Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M Stockton Press, New York, 1991; y Carillo, H., and Lipman, D., SIAM J. Applied Math., 48:1073 (1988).

[0031] Los métodos preferidos para determinar la identidad están diseñados para proporcionar la mayor coincidencia entre las secuencias probadas. Los métodos para determinar la identidad y la similitud están codificados en programas informáticos disponibles al público. Los métodos informáticos preferidos para determinar la identidad y la similitud entre dos secuencias incluyen, por ejemplo el paquete de programa GCG (Devereux, J., et al., Nucleic Acids Research 12 (1): 387 (1984)), BestFit, BLASTP, BLASTN y FASTA (Altschul, S. F., J. Mol. Biol. 215: 403 - 410 (1990). El programa BLAST X está a disposición del público a partir de NCBI y otras fuentes (BLAST Manual, Altschul, S., et al., NCBI NLM NIH Bethesda, MD 20894; Altschul, S., et al., J. Mol. Biol. 215: 403 - 410 (1990)) El ampliamente conocido algoritmo de Smith- Waterman también se puede usar para determinar la identidad.

[0032] Los parámetros preferidos para la comparación de secuencias polipeptídicas incluyen los siguientes: Algoritmo: Needleman y Wunsch, J. Mol. Biol. 48: 443-453 (1970); Matriz de comparación: BLOSSUM62 de Hentikoff y Hentikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.. 89: 10915 - 10919 (1992)); Penalización por hueco: 12; y penalización por longitud de hueco: 4. Un programa útil con estos parámetros está disponible al público como el programa "Ogap" de Genetics Computer Group, ubicado en Madison, Wisconsin. Los parámetros antes mencionados son los parámetros predeterminados para las comparaciones de aminoácidos (junto con la ausencia de penalizaciones para los huecos finales).

[0033] Los parámetros preferidos para la comparación de ácidos nucleicos incluyen los siguientes: Algoritmo: Needleman y Wunsch, J. Mol. Biol. 48: 443-453 (1970); Matriz de comparación: coincidencias = + 10, no coincidencias = 0; Penalización por hueco: 50; Penalización por longitud de hueco: 3. Disponible como el programa Gap de Genetics Computer Group, ubicada en Madison, Wisconsin. Anteriormente se han proporcionado los parámetros predeterminados para las comparaciones de ácidos nucleicos.

[0034] Opcionalmente, para determinar el grado de similitud de aminoácidos, la persona experta también puede tener en cuenta las llamadas sustituciones de aminoácidos "conservadoras", como será evidente para el experto. Las sustituciones conservadoras de aminoácidos se refieren a la intercambiabilidad de residuos que tienen cadenas laterales similares. Por ejemplo, un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales alifáticas es glicina, alanina, valina, leucina e isoleucina; un grupo de aminoácidos que tiene cadenas laterales hidroxilo alifáticas es serina y treonina; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales que contienen amida es asparagina y glutamina; un grupo de aminoácidos que tiene cadenas laterales aromáticas es fenilalanina, tirosina y triptófano; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales básicas es lisina, arginina e histidina; y un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales que contienen azufre es cisteína y metionina. Los grupos preferidos de sustitución conservadora de aminoácidos son: valina-leucina-isoleucina, fenilalanina-tirosina, lisina-arginina, alanina-valina y asparagina-glutamina. Las variantes de sustitución de la secuencia de aminoácidos descrita en este documento son aquellas en las que se ha eliminado al menos un residuo de las secuencias descritas y se ha insertado un residuo diferente en su lugar. Preferiblemente, el cambio de aminoácido es conservador. Las sustituciones conservadoras preferidas para cada uno de los aminoácidos naturales son las siguientes: Ala a ser; Arg a lys; Asn a gln o his; Asp to glu; Cys a ser o ala; Gln a asn; Glu a asp; Gly a pro; His a asn o gln; Ile a leu o val; Leu a ile o val; Lys a arg; gln o glu; Met a leu o ile; Phe a met, leu o tyr; Ser a thr; Thr a ser; Trp a tyr; Tyr a trp o phe; y, Val a ile o leu.

Condiciones de hibridación

[0035] Las condiciones de hibridación para una molécula de ácido nucleico pueden tener una rigurosidad baja, media o alta (procedimientos de Southern blot). Condiciones de rigurosidad baja o media o alta significa prehibridación e hibridación a 42 ° C en 5x SSPE, SDS al 0,3%, 200pg/ml de ADN de esperma de salmón fragmentado y desnaturalizado, y 25% o 35% o 50% de formamida para rigurosidades baja o mediana o alta, respectivamente. Posteriormente, la reacción de la hibridación se lava tres veces durante 30 minutos cada una utilizando 2x SSC, SDS al 0,2% y 55°C o 65°C, o 75°C para rigurosidades baja, media o alta, respectivamente

Construcción de ácido nucleico/expresión/secuencias de control

[0036] Una construcción de ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína o un fragmento de proteína como se define aquí. Una construcción de ácido nucleico que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína o fragmento de proteína dado como se define aquí asegurará la expresión de la molécula de ácido nucleico dada, y de la proteína o fragmento de proteína correspondiente en un sujeto tratado. En una forma de realización más preferida, una construcción de ácido nucleico comprende más de una molécula de ácido nucleico, donde cada molécula de ácido nucleico codifica una proteína o fragmento de proteína dado. En una forma de realización aún más preferida, una construcción de ácido nucleico comprende dos, tres, cuatro moléculas de ácido nucleico, donde cada molécula de ácido nucleico codifica una proteína o fragmento de proteína dado. En una forma de realización preferida, una construcción de ácido nucleico comprende un casete de expresión, comprendiendo dicho casete de expresión cada molécula de ácido nucleico necesaria. Cada molécula de ácido nucleico está operativamente unida a otra molécula de ácido nucleico presente. De la manera más preferible, un promotor adecuado está unido operativamente con el casete de expresión para asegurar la expresión de la molécula de ácido nucleico en un sujeto.

"Unido operativamente" se define aquí como una configuración en la que una secuencia de control se coloca apropiadamente en una posición respecto a la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido de la invención de manera que la secuencia de control dirige la producción/expresión del polipéptido de la invención en una célula y/o en un sujeto.

Se entenderá que la expresión incluye cualquier etapa implicada en la producción del polipéptido incluyendo, pero sin limitación, transcripción, modificación postranscripcional, traducción, modificación postraduccional y secreción.

La secuencia de control se define en la presente memoria de tal modo que incluye todos los componentes que son necesarios o ventajosos para la expresión de un polipéptido. Como mínimo, las secuencias de control incluyen un promotor y señales de parada de transcripción y traducción. Opcionalmente, un promotor representado por una secuencia de nucleótidos presente en una construcción de ácido nucleico está unido operativamente a otra secuencia de nucleótidos que codifica una molécula de ácido nucleico como se identifica aquí.

[0037] Un vector de expresión puede ser cualquier vector que pueda someterse convenientemente a procedimientos de ADN recombinante y que pueda provocar la expresión de una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de la invención en una célula y/o en un sujeto. Conforme se usa en el presente documento, el término "promotor" se refiere a un fragmento de ácido nucleico que funciona para controlar la transcripción de uno o más genes o ácidos nucleicos, localizado antes (upstream) con respecto a la dirección de transcripción del sitio de iniciación de la transcripción del gen, y relacionado con el sitio de unión identificado por la presencia de un sitio de unión para la ARN-polimerasa dependiente del ADN, sitios de iniciación de la transcripción y cualquier otra secuencia de ADN, incluyendo, pero sin limitación, sitios de unión al factor de transcripción, sitios de unión a proteínas represoras y activadoras y cualquier otra secuencia de nucleótidos conocida para los expertos en la técnica que actúe directa o indirectamente para regular la cantidad de

transcripción del promotor. Dentro del contexto de la invención, un promotor preferiblemente termina en el nucleótido -1 del sitio de inicio de la transcripción (TSS).

5 [0038] A menos que se indique lo contrario, cada forma de realización como se describe en este documento se puede combinar con otra forma de realización como se describe en este documento.

10 [0039] En este documento y en sus reivindicaciones, el verbo "comprender" y sus conjugaciones se utilizan en su sentido no limitativo para significar que se incluyen los elementos que siguen a la palabra, pero no se excluyen los elementos que no se mencionan específicamente. Además, el verbo "consistir" puede reemplazarse por "consistir esencialmente en", lo que significa que una fuente de L19 o una composición como se define en este documento puede comprender componente(s) adicional(es) a los específicamente identificados, sin que dichos componentes adicionales alteren la característica distintiva de la invención.

15 [0040] Además, la referencia a un elemento por el artículo indefinido "un" o "una" no excluye la posibilidad de que esté presente más de un elemento, a menos que el contexto requiera claramente que exista uno y solo uno de los elementos. El artículo indefinido "un" o "una" por lo general significa "al menos uno/a".

20 [0041] La palabra "aproximadamente" o "alrededor de" cuando se usa en asociación con un valor numérico (aproximadamente 10, alrededor de 10) preferiblemente significa que el valor puede ser el valor dado de 10 sumando o restando un 1% del valor.

[0042] Cada forma de realización tal como se identifica aquí puede combinarse, a menos que se indique lo contrario.

25 [0043] La invención se explica adicionalmente en los siguientes ejemplos. Estos ejemplos no limitan el alcance de la invención, sino que sirven simplemente para aclarar la invención.

Breve descripción de los dibujos

30 [0044]

Figura 1. Purificación de his-LmL19. Gel de SDS-PAGE que muestra los diferentes pasos en la purificación de la proteína rLmL19. (1) Estándar de peso molecular. Total de extractos bacterianos después (2) y antes (3) del paso por la columna. (4) Proteína purificada.

35 **Figura 2. Producción de IFN-gamma e IL-10 por esplenocitos de ratones BALB/c sin tratamiento previo (n = 6) estimulados in vitro con LmL19.** Se muestra el valor P obtenido después del análisis estadístico realizado mediante una prueba t de Student. Las diferencias en la producción de las citocinas entre las células estimuladas con LmL19 o Concanavalina A (ConA) se consideraron significativas cuando $P < 0,05$ *).

40 **Figura 3. Producción de IFN-gamma e IL-10 por PBMC de donante humano sano (n = 3) estimulada in vitro con LmL19.** Se muestran los valores P obtenidos después del análisis estadístico realizado por una prueba t de Student. Las diferencias en la producción de las citocinas entre las células estimuladas con LmL19 o ConA se consideraron significativas cuando $P < 0,05$ *).

Figura 4. Representación esquemática de la proteína recombinante MBP-LmL19.

50 **Figura 5.** Concentración de TNF α en los diferentes grupos de estudio después de 24 horas de incubación (pg/ml). Los valores se presentan como media \pm desviación estándar. #: $p < 0,005$, grupos de prueba sin irradiación en comparación con el grupo de control. *: $p < 0,005$, grupos de prueba irradiados en comparación con el grupo de control/UV.

55 **Figura 6.** Concentración de IL-10 en los diferentes grupos de estudio después de 24 horas de incubación (pg/ml). Los valores se presentan como media \pm desviación estándar. #: $p < 0,005$, grupos de prueba sin irradiación en comparación con el grupo de control. *: $p < 0,005$, grupos de prueba irradiados en comparación con el grupo de control/UV.

60 **Figura 7. Producción de IL-10 del péptido de LmL19.** Se obtuvieron células y cultivos como se indica en el texto. El nivel de IL-10 en sobrenadantes de cultivo se analizó mediante ELISA.

El ensayo se ha realizado una vez utilizando células agrupadas obtenidas de tres ratones sin tratamiento previo (ensayo por duplicado). * $P < 0,05$ cuando cada grupo se comparó con las células no estimuladas.

Ejemplos

65

Ejemplo 1

Clonación y expresión.

5 [0045] El gen se caracterizó después de una búsqueda *in silico* en la base de datos de genoma de *L. Major*. Basándose en la secuencia, se sintetizaron dos oligonucleótidos (véase a continuación) y se emplearon como cebador para una PCR utilizando ADN extraído de parásitos de *L. Major* [clon V1 (MHOM/IL/80(Friedlin))]. El ADN obtenido fue digerido con BamHI/HindIII, clonado en los sitios correspondientes del plásmido pBluescript y secuenciados. La secuencia de ADN obtenida y la secuencia de aminoácidos deducida se muestran a continuación, respectivamente.

10 A. Oligonucleótidos empleados.

[0046] **LmL19D**: cgGGATCCATGACCCCTCTCTCCCTCTC (SEQ ID N°: 3) (Aparece subrayado un sitio de corte BamHI que se incluyó para fines de clonación).

15 **LmL19R**: cccAAGCTTTACTTCTTCGACTTCTTCAC (SEQ ID N°: 4) (Aparece subrayado un sitio de corte HindIII que se incluyó para fines de clonación).

20 B. Secuencia de nucleótidos. (Los sitios de corte de enzimas de restricción están incluidos y marcados en cursiva y subrayados: estos sitios no pertenecen a la molécula de ácido nucleico que codifica L19 de *Leishmania major* o Lm)

[0047] Análisis de secuencia de LmL19 (SEQ ID N°:2 es la secuencia siguiente sin la secuencia subrayada añadida para fines de clonación)

GGATCCATGA CCCCTCTCTC CCTCTCTTCC TCCCGCCACA GTTTTAAGCA
 GAACGAAACG CAGAACATGG TGTCTCTGAA GCTGCAGGCT CGCCTTGCGT
 CGAGCATCCT CGGCTGCGGC
 CGCGCCCGCG TGTGGCTGGA CCCCAACGAG GCGGTGGAGA TCCAGAACGC
 GAACTCGCGC AAGAGCGTGC GCAAGCTGAT CAAGGATGGC TTCATCATCC

 GCAAGCCGGT GAAGGTGCAC TCGCGCGCGC GGTGGCGTAA AATGAAGGAG
 GCGAAGGACA TGGGGCGCCA CAACGGCGTT GGGCGCCGCG AGGGTAGCCG
 CGAGGCCCGC ATGCCGAGCA AGGAGTTGTG GATGCGCCGC CTGCGCATTC
 TGCGCCGCCT GCTGCGCAAG TACCGCGCGG ACAAGAAGAT TGACCGCCAC
 GTGTACCGCG ACCTGTACAT GCGCGCGAAG GGTAACGTGT TCCGCAACAA
 GCGCAACCTT GTGGAGCACA TCCACAAGAT CAAGAATGAG AAGAAGAAGG
 AGCGCCAGCT GGC GGAGCAG CTCGCGGCGA AGCACCTGCG CGACGAGCAG
 AACCGCAACA AGGCTCGCAA GCAGGAGCTG AAGAAGCGCG AGAAGGAGCG
 CGAGCGCGCG AGGCGCGACG ACGCTGCTGC CGCTGCGCAG AAGAAGAAGG
 CGGACGCCGC GAAGAAGTCC GCCGCGCCTG CTGCGAAGTC CGCCGCGCCT
 GCCGCGAAGG CTGCTGCCCC CGCCACGAAG GCCGCTGCTG CTGCCCCCGC
 CACGAAGGGT GCTGCGCCGG TGAAGAAGTC GAAGAAGTAA AAGCTT

25 C. Secuencia de aminoácidos deducida (SEQ ID N°: 1)

[0048]

MTPLSLSSSR HSFKQNETQN MVSLKLQARL ASSILGCGRA RVWLDPNEAV
 EIQNANSRKS VRKLIKDGFI IRKPKVHRSR ARWRKMKEAK DMGRHNGVGR
 REGSREARMP SKELWMRRLR ILRLLRKYR ADKKIDRHVY RDLYMRAKGN
 VFRNKRNLVE HIIKIKNEKK KERQLAEQLA AKHLRDEQNR NKARKQELKK
 REKERERARR DDAAAAQKK KADAAKKSAA PAAKSAAPAA KAAAPATKAA
 AAPATKGAA PVKKSCK*

[0049] El ADN que codifica LmL19 se subclonó en los sitios BamHI/HindIII del plásmido de expresión procariota pQE-30 que permite la obtención de la proteína recombinante fusionada a 6xhistidinas.

5 [0050] Se emplearon cultivos de *Escherichia coli* (cepa M15) transformados con el plásmido recombinante para la expresión de la proteína recombinante. Los primeros ensayos se realizaron a 37 ° C, pero se observó que la proteína se degradaba dentro de la bacteria. Por esa razón, los cultivos fueron inducidos a 30 °C con el fin de disminuir la degradación de la proteína. En estas condiciones, se observó una baja producción de la proteína recombinante intacta. Por lo tanto, rLmL19 se purificó por cromatografía de afinidad en condiciones de
 10 desnaturalización. La proteína purificada obtenida presenta algunas bandas de degradación con menor peso molecular (Fig. 1). Las proteínas recombinantes se pasaron a través de una columna de polimixina-agarosa para eliminar las endotoxinas.

Estimulación de células de bazo de ratones con rLmL19 recombinante.

15 [0051] Se sembraron preparaciones de células individuales de tejido del bazo por duplicado en placas de 24 pocillos a 5×10^6 células/ml. Las células se incubaron en medio RPMI completo suplementado con 2 mM de L-glutamina, penicilina (100 U/ml), estreptomycin (100 µg/ml) y suero bovino fetal solo inactivado con calor al 10% (control de fondo, medio) o estimulado con rLmL19 (12ug/ml) o ConA (1 ug/ ml) a 37°C en 5% de CO2 durante 72 h. La liberación de IFN-gamma e IL-10 en los sobrenadantes de cultivo se evaluó mediante ELISA de tipo
 20 sándwich (Fig. 2). Se puede concluir que la proteína LmL19 recombinante indujo una producción específica de IL-10, sin la producción de IFN-gamma por células de bazo obtenidas de ratones sin tratamiento previo.

Estimulación de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) humanas con rLmL19 recombinante.

25 [0052] Las PBMC se obtuvieron a partir de sangre venosa heparinizada mediante paso por un gradiente de Ficoll Hypaque. Las PBMC se lavaron tres veces y se resuspendieron a una concentración de 5×10^6 células/ml en RPMI suplementado con 2 mM de L-glutamina, penicilina (100 U/ml), estreptomycin (100 µg/ml) (Gibco, NY) y suero AB humano inactivado por calor al 10%). Las células se sembraron en placas de cultivo de tejidos de 24 pocillos a una concentración de 5×10^6 células/ml y se incubaron a 37 °C, 5% de CO2. La estimulación se realizó mediante la adición de rLmL19 (20 µg/ml y 5 µg/ml) y ConA (1 µg/ml) durante 72 h. Como se ha mencionado anteriormente, la liberación de IFN-gamma e IL-10 en los sobrenadantes de cultivo se evaluó mediante ELISA de tipo sándwich (Fig. 3).

30 [0053] Como ocurrió con las células de bazo de ratón, las PBMC de donantes humanos sanos produjeron IL-10 después de la estimulación *in vitro* con la LmL19 recombinante. La producción de esta citocina fue dependiente de la dosis.

Expresión de rLmL19 como proteína de fusión con la proteína de unión a maltosa.

35 [0054] Estos resultados preliminares indicaban que la proteína LmL19 era capaz de inducir la liberación de IL-10 a partir de glóbulos blancos de humano y de ratón. El nivel de producción de la proteína recombinante aún no era óptimo.

40 [0055] Con el fin de mejorar la producción de proteínas, el ADN que codifica la proteína LmL9 se clonó en el vector de expresión procariótico pMal-c2. Este vector permite la producción de proteínas heterólogas en *E. coli* con fusión a la proteína bacteriana MBP. Como se indica en la Fig. 4, la proteína de fusión y la proteína heteróloga se pueden separar usando una proteasa específica (factor Xa) debido a la presencia de un sitio de corte del factor Xa entre ambas proteínas.

[0056] Se emplearon cultivos de *E. coli* (cepa XL1-blue) transformados con el plásmido recombinante para la expresión de la proteína recombinante. La proteína se sobreexpresó como un producto soluble que se purificó por cromatografía de afinidad en condiciones nativas en columnas de amilosa. Usando este sistema, se obtuvo un mayor nivel de proteína recombinante (no se muestra).

5 Ejemplo 2: estudio de la piel

[0057] El objetivo de este estudio era evaluar la capacidad antiinflamatoria de una proteína llamada L19, en explantes de piel humana. Esto se realizó mediante un método de análisis para estudiar la eficacia protectora de esta proteína frente a la radiación con luz ultravioleta (UV) sobre la piel.

10 [0058] La base de este trabajo es la realización de un único estudio inflamatorio en explantes de piel para evaluar la capacidad antiinflamatoria de dicho producto frente a la radiación con luz UV. El estudio se dividió en las siguientes tareas para alcanzar el objetivo propuesto

Análisis de la citotoxicidad básica

15 [0059] Se realizó un único ensayo utilizando la técnica de MTT para determinar la concentración máxima del producto por analizar en el análisis de eficacia. Este es un ensayo colorimétrico basado en la reducción metabólica de sales de tetrazolio (MTT) debido al metabolismo celular (respiración celular) de fibroblastos de ratón (BALB/3T3. Esta reducción metabólica del MTT es causada por la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa, que produce un compuesto azul (formazán) y determina la funcionalidad mitocondrial de las células tratadas. El número de células vivas es proporcional al color azul resultante. El producto se incubó con 8 concentraciones diferentes (6 réplicas de cada concentración) durante 24 horas.

20 Análisis de la eficacia antiinflamatoria

[0060] La eficacia se evaluó mediante un estudio antiinflamatorio que consistió en un único ensayo en explantes de piel en el que se analizaron dos interleucinas presentes en la inflamación causada por radiación UV usando la técnica ELISA.

Los grupos de estudio fueron los siguientes:

- 25
- Grupo de control sano. 3 explantes de piel. Estos no recibieron radiación de luz UV.
 - Grupo dañado. 3 explantes de piel irradiados con luz UV.
 - Grupo de prueba 9. Explantes de piel irradiados con luz UV y luego incubados con Lm L19 recombinante (SEQ ID N°: 1) expresada en *E. coli*.
- 30
- Grupo de prueba 2. 9 explantes de piel no irradiados y luego incubados con Lm L19 (SEQ ID N°: 1) expresada en *E. coli*.

[0061] Tres concentraciones de producto diferentes, 3 réplicas por concentración (la concentración de producto más alta se determinó mediante el examen de toxicidad del producto).

35 [0062] Después de la irradiación de los explantes con luz ultravioleta, se incubó Lm L19 (es decir, SEQ ID N°: 1) expresada en *E. coli*; 24 horas más tarde, se midieron dos interleucinas implicadas en el efecto inflamatorio causado por la luz ultravioleta en la piel, IL-10 y TNF α .

MATERIALES Y MÉTODO

Cultivos celulares

40 [0063] Al igual que el sistema experimental para el análisis de citotoxicidad, el estudio utilizó un cultivo celular de la línea inmortalizada de fibroblastos de ratón de la línea celular BALB/3T3 de la Colección Europea de Cultivos Celulares (ECACC) Cat. No. 86110401.

45 [0064] Los fibroblastos inmortalizados procedentes de la ECACC se cultivaron en un medio DMEM con FCS al 10% (suero fetal bovino). Después de la descongelación, las células se cultivaron en una monocapa en una atmósfera húmeda con un 5% de CO₂ y a una temperatura de 37 °C. Durante este tiempo, el medio de cultivo se cambió cada 2-3 días, de acuerdo con las instrucciones del proveedor. Después de este período, cuando los matraces de cultivo alcanzaron una confluencia del 80%, las células se distribuyeron en placas de 96 pocillos a una concentración de 5.000 células por pocillo.

Estudio de citotoxicidad con criterio de evaluación, MTT

5 [0065] Durante el ensayo de citotoxicidad, las células se trataron con diferentes concentraciones del producto de estudio conocido como L19. Después de 24 horas de tratamiento, se realizó la tinción de MTT. Este ensayo se basa en la reducción metabólica de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazol (MTT) o sales de tetrazolio (amarillas y solubles) producidas por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa que genera un compuesto con un color azul (formazán) que permite la determinación de la funcionalidad mitocondrial de las células tratadas. Este método es ampliamente utilizado para medir la supervivencia y la proliferación celular. La cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de formazán producida. Dado que las células muertas no respiran, no presentan la enzima y, por lo tanto, no pueden reducirla, ya que no presentan succinato-deshidrogenasa. Cuanto mayor es la reducción de MTT, más azul es el color y mayor la viabilidad celular.

[0066] El experimento se realizó en placas de 96 pocillos con células 3T3 cultivadas en una monocapa con una confluencia del 80%. Estos estudios de citotoxicidad nos permitieron determinar los valores LC80, LC50 y LC20 (concentraciones del producto que reducen la viabilidad celular en un 80%, 50% y 20%, respectivamente).

15 [0067] Durante esta tarea, se incubó una placa de fibroblastos inmortalizados con ocho concentraciones distintas de proteína L19 durante 24 horas (1 placa de producto con 6 réplicas por concentración ensayada) y una segunda placa de control de ensayo MTT con dodecil sulfato de sodio (SDS) a ocho concentraciones distintas (1 placa con MTT, con 6 réplicas por concentración sometida a ensayo) como producto de referencia de toxicidad. Esto se utilizó para establecer una curva estándar para la muerte celular. Todas las placas de estudio también se sembraron con fibroblastos en al menos 12 pocillos que se usaron como controles sanos y cultivos de 3T3 con solo el medio de cultivo, donde L19 no se añadió a la placa de estudio ni SDS a la placa de control de muerte celular (Datos SDS: LC20: 0,124 mg/ml, LC50: 0,142 mg/ml, LC80: 0,163 mg/ml).

[0068] De acuerdo con la concentración de proteína L19 suministrada por LETI, la concentración más alta del ensayo fue de 200 µg/ml a diluciones de 1: 2. Las concentraciones finales utilizadas se detallan a continuación:

C2: C3: C4: C5: C6: C8:1.56 µg/ml.

25 [0069] Después de la incubación, las placas se revelaron con MTT y se midió la absorbancia a 540 nm con un lector de placas ELISA. Los resultados obtenidos se utilizaron para calcular los valores de concentración letal LC80, LC50 y LC20 en los cultivos de fibroblastos para los productos sometidos al estudio.

Interleucina-10 y ensayo de determinación de TNFα

30 [0070] El ensayo de cuantificación de interleucina-10 y TNFα se realizó con el sobrenadante de los medios de cultivo de explante de piel. La determinación cuantitativa tanto de IL-10 como de TNFα se realizó con kits de ELISA BD OptEIA™ fabricados por Becton Drive, Franklin Lakes, NJ, EE. UU.): Human TNF ELISA Kit II. La eficacia de la L19 se evaluó mediante la cuantificación de las interleucinas inducidas por radiación UV en explantes de piel humana.

Exposición a luz de simulador solar:

35 [0071] La placa con las muestras de piel se expuso a luz UV/vis emitida por un simulador solar SOL 500 (Dr. Hönle). La intensidad de la luz se midió durante todo el proceso de exposición mediante un medidor de luz UV. Las dosis de radiación se pueden ajustar con estos valores, teniendo en cuenta que durante 5 minutos de exposición las células reciben aproximadamente 1 J/cm² a esa intensidad. El tiempo final de exposición de los explantes de piel fue de 50 minutos, lo que implica una radiación de 10 J/cm².

40 [0072] Los grupos incluidos en el estudio fueron:

- Grupo de control sano. 3 explantes de piel. Estos no recibieron radiación de luz UV.
- Grupo de daño. 3 explantes de piel irradiados con luz UV.
- Grupo de prueba. 9 explantes de piel irradiados con luz UV y luego incubados con LmL19 recombinante (es decir, SEQ ID N°: 1) expresada en *E. coli*.
- 45 • Grupo de prueba 2. 9 explantes de piel no irradiados y luego incubados con LmL19 (es decir, SEQ ID N°: 1).

[0073] Tres concentraciones de producto diferentes, 3 réplicas por concentración (la concentración de producto más alta se determinó mediante el análisis de toxicidad del producto). Después de la irradiación de los explantes con luz ultravioleta (10 J/cm²) se incubaron con el producto L19. Después de 24 horas, se midieron dos interleucinas implicadas en el efecto inflamatorio causado por la luz ultravioleta en la piel, IL-10 y TNF α .

5 [0074] IL-10 y TNF α se cuantificaron mediante la adición de 100 μ l de cada uno de los estándares IL-10 y TNF α incluidos en los kits fabricados por BD Biosciencias (Sets BD OptEIA™ ELISA: IL-10 N° Catálogo 555157 y TNF N° Cat. 555212), así como 100 μ l del medio de cultivo utilizado para incubar cada una de las muestras, todo por duplicado e incubación en placas ELISA a temperatura ambiente durante 2 horas. Los pocillos se lavaron a
10 continuación con PBS, se añadieron 200 μ l de la solución conjugada y se realizó una incubación durante 1 hora. Los pocillos se lavaron de nuevo, se añadieron 200 μ l de la solución de sustrato y se realizó una incubación durante 20 minutos a temperatura ambiente. Por último, se añadieron 50 μ l de la solución de detención y se leyó la absorbancia a 450 nm con una referencia de 540 nm. Los resultados de absorbancia se extrapolaron a la cantidad de IL-10 y TNF α , usando la curva obtenida con los estándares de ambas citocinas como referencia.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

15 Análisis de citotoxicidad básica

Estudio de citotoxicidad de la proteína L19.

[0075] Para determinar la concentración máxima del producto de estudio en el análisis de eficacia, se realizó un ensayo único utilizando la técnica MTT en una línea inmortalizada de fibroblastos, BALB/3T3, que se sembraron en placas de 96 pocillos con una densidad aproximada de 5000 células por pocillo. El producto se incubó a 8
20 concentraciones diferentes (6 réplicas de cada concentración) durante 24 horas.

[0076] Los resultados de este ensayo se usaron para definir las concentraciones necesarias para determinar LC_{so}, LC₅₀ y LC₂₀. LC es la concentración letal de la sustancia. LC_{so} es la concentración de la sustancia a la que muere el 80% de la población celular, LC₅₀ es la concentración de la sustancia a la que muere el 50% de la población celular y LC₂₀ es la concentración tóxica de la sustancia a la que muere el 20% de la población del cultivo celular.
25

[0077] En estos ensayos, cada placa de fibroblastos se incubó con seis concentraciones activas distintas durante 24 horas:

C2: C3: C4: C5: C6: C8: 1,56 μ g/ml.

[0078] Después de la incubación, las placas se revelaron para el análisis con MTT y la absorbancia se midió a 540 nm con un lector de placas ELISA. La siguiente tabla muestra LC₈₀, LC₅₀ y LC₂₀, obtenidas para cada producto (Tabla 1) sin significación estadística:
30

Tabla 1. Resultados para LC₂₀, LC₅₀ y LC₈₀ de proteína L19 de LETI obtenidos por ensayos de citotoxicidad, MTT.

	485.83934	228.357	22.03021
--	-----------	---------	----------

Los valores se expresan como media (μ g / ml)

[0079] Los resultados de este ensayo de citotoxicidad se obtuvieron teniendo en cuenta los valores de absorbancia obtenidos en los cultivos de control sanos que no se incubaron con el producto L19, como referencia de una viabilidad del 100%. Además de los valores de muerte celular, la viabilidad fue del 0% con el producto SDS a una concentración > 175 μ g/ml (Datos del SDS: LC₂₀: 0,124 mg/ml; CL₅₀: 0,142 mg/ml; LC₈₀: 0,163 mg/ml)
35

[0080] Debido a los resultados obtenidos en el ensayo de citotoxicidad, se decidió que para la siguiente tarea, el análisis de eficacia antiinflamatoria de la proteína L19, la concentración más alta para la prueba del producto sería 25 μ g/ml, así como 12,5 μ g/ml y 6,25 μ g/ml.
40

[0081] La elección de la concentración más alta, 25 μ g/ml, se refiere a LC₂₀. Este valor es adecuado para el ensayo del producto en la piel, ya que está en el límite mínimo de toxicidad para el producto. También se debe tener en cuenta que el análisis de toxicidad se realizó en un solo cultivo de fibroblastos. Los monocultivos siempre son más sensibles a la toxicidad de un producto que un cultivo organotípico como el explante de piel.
45

Análisis de la eficacia antiinflamatoria**Estudio sobre la capacidad antiinflamatoria de la proteína L19 después de la irradiación de luz UV en explantes de piel humana.**

5 [0082] Se realizó un tratamiento de explantes de piel humana con proteína L19 (25 µg/ml, 12,5 y 6,25 µg/ml durante 24 horas) (Lm L19 o SEQ ID N°: 1) para estudiar el efecto antiinflamatorio de la proteína. Los grupos de estudio se dividieron en explantes que se irradiaron con luz UV y luego se incubaron con proteína L19 y explantes que se expusieron al producto pero no se irradiaron con luz UV.

10 [0083] El estudio se realizó en cultivos organotípicos de explantes de piel humana obtenidos a partir de cirugía estética. El ensayo usó dos grupos de control; cultivo sin proteína L19 o radiación solar y un grupo de control de daños, cultivo sin la proteína pero irradiado con luz solar. Las concentraciones y condiciones se pueden encontrar a continuación:

- Grupo de control: Explantes de piel en condiciones de cultivo normales.
- Grupo L19-25 µg/ml ; Explantes de piel incubados con 25 µg/ml de proteína durante 24 horas.
- 15 • Grupo L19-12,5 µg / ml ; Explantes de piel incubados con 12,5 µg/ml de proteína durante 24 horas.
- Grupo L19-6,25 µg / ml ; Explantes de piel incubados con 6,25 µg/ml de proteína durante 24 horas.
- Grupo Control/UV: Explantes de piel en condiciones de cultivo normales e irradiados con luz ultravioleta, 10 J/cm².
- 20 • Grupo L19-25 µg/ml/UV: Explantes de piel irradiados con luz UV (10 J/cm²) y luego se incubaron con 25 µg/ml de proteína durante 24 horas.
- Grupo L19-12,5 µg/ml/UV: Explantes de piel irradiados con luz UV (10 J/cm²) y luego se incubaron con 12,5 µg/ml de proteína durante 24 horas.
- Grupo L19-6,25 µg/ml/UV: Explantes de piel irradiados con luz UV (10 J/cm²) y luego se incubaron con 6,25 µg/ml de proteína durante 24 horas.

25 [0084] Al final del período de incubación (24 horas) se realizó la cuantificación en ambas citocinas, IL-10 y TNFα, con la técnica ELISA para determinar la cantidad de estas citocinas. Se realizó un único ensayo en esta tarea, donde se analizó la proteína L19 de Laboratorios LETI. En este ensayo se usaron 3 réplicas de cada condición y cada réplica se analizó mediante la técnica de ELISA por duplicado.

30 [0085] La concentración de TNFα (Figura 5) y la concentración de IL-10 (Figura 6) para estos grupos de estudio se muestran a continuación, tanto para los explantes de piel irradiados con luz UV como los que no fueron irradiados. La Figura 5 muestra la producción de TNFα en explantes de piel en las condiciones a las que se presentaron.

35 [0086] La reacción inflamatoria producida por la radiación UV en el grupo de Control/UV (153,9 ± 44 pg/ml) es significativamente mayor que en el grupo de control sin radiación (22,9 ± 7,3 pg/ml). Esto indica que la radiación con 10 J/cm² de luz ultravioleta (en monocultivo, la radiación utilizada es normalmente de 1 J/cm²) en explantes de piel desencadena una reacción inflamatoria en este caso. Esta reacción es suficiente para ver si la proteína L19 tiene efectos antiinflamatorios después de la incubación en muestras de piel expuestas a este nivel de radiación.

40 [0087] Como se muestra en el gráfico, el estudio estadístico de esta proteína muestra que la producción de TNFα después de la radiación UV disminuye significativamente en los explantes que se incubaron después (durante 24 horas) con la proteína L19 a concentraciones de 25 y 12,5 µg/ml (23,3 ± 2,8 y 25,9 ± 4,8 pg/ml, respectivamente). El grupo de L19-6,25µg/ml/UV mostró una reducción no significativa en la producción de dicha citocina.

45 [0088] Por otro lado, el gráfico también muestra un aumento significativo en la producción de TNFα en los grupos de L19-25 µg/ml, L19-12,5 µg/ml y L19-6,25 µg/ml (que no fueron irradiados) en comparación con el Grupo de control. Todo lo anterior nos lleva a considerar que la proteína L19 podría afectar a la piel de alguna manera, generando una reacción inflamatoria. Este último punto debe ser corroborado por otros estudios.

50 [0089] La disminución significativa en la producción de TNFα en los cultivos con proteína L19 tratados posteriormente con radiación solar en comparación con el grupo de control/UV nos lleva a pensar que esta proteína puede tener un efecto antiinflamatorio. La Figura 6 muestra la producción de IL-10 en explantes de piel en las condiciones en las que se presentaron. El análisis de IL-10 en grupos irradiados y no irradiados incubados con proteína L19 indicó un aumento significativo en la producción de IL-10 en todas las concentraciones de la proteína en estudio frente al grupo de control no irradiado (#; p < 0,005) En el estudio estadístico, este aumento

se observó en menor grado frente al grupo de control irradiado con luz ultravioleta, donde solo el grupo de L19-12,5µg/ml/UV presenta un aumento significativo (*; p <0,005), 363,7 ± 22 pg/ml, frente al grupo de control/UV (203,1 ± 77). Esto se debe a las desviaciones estándar en los otros dos grupos de estudio, L19-6,25µg/ml/UV y L19-25µg/ml/UV (366 ± 94 y 724,8 ± 288 pg/ml), que hacen que el estudio estadístico determine diferencias mayores que una significancia estadística de 0,005. Un aumento en el número de réplicas mejoraría la significación estadística.

[0090] Los datos obtenidos indican un aumento en la producción de IL-10, una citocina antiinflamatoria, lo que corrobora los resultados obtenidos para TNFα, lo que lleva a la posibilidad de que la proteína L19 active una cascada antiinflamatoria en los explantes de piel, con una mayor producción de IL-10.

10 CONCLUSIONES

[0091] En el estudio de citotoxicidad, la toxicidad de la proteína L19 fue muy baja por debajo de valores de 25 µg/ml. La elección de 25, 12,5 y 6,25 µg/ml para realizar la tarea 2 se basó en la detección de citotoxicidad con radiación de luz UV a 10 J/cm², que produce un efecto inflamatorio significativo en muestras de explantes de piel no incubadas con proteína L19 y aumenta significativamente tanto los niveles de TNFα como los niveles de IL-10 (reacción antiinflamatoria intrínseca en la piel).

La proteína L19 causa una reducción detectable en la producción de citocina de TNFα en las muestras de piel irradiadas con luz UV.

La proteína L19 produce un aumento general en los niveles de IL-10 en todos los grupos incubados con la proteína, tanto en lo que respecta a las muestras que se someten a la radiación de luz UV como en las que no lo hacen. De acuerdo con los resultados obtenidos, la capacidad de la proteína L19 para activar un efecto antiinflamatorio es muy alta.

Ejemplo 3: producción mediada de IL-10 de péptidos derivados de LmL19 y LmL19

Objetivo del estudio

[0092] Determinar qué regiones de la L19 (epítomos lineales) son capaces de inducir la producción de IL-10 en cultivos de bazo.

Material

[0093] Se diseñaron y sintetizaron químicamente cuatro péptidos diferentes. Cada uno de ellos corresponde a una región lineal de la proteína L19 de *Leishmania major* (es decir, SEQ ID N°: 1). Cada péptido comprende 20 aminoácidos derivados de L19 de *Leishmania major* (es decir, SEQ ID N°: 1), excepto el péptido 24 que solo comprende 14 aminoácidos. Cada péptido se superpone en 9 aminoácidos con el péptido anterior.

- 1: Péptido 1: **MTPLSLSSSRHSFKQNETQN (SEQ ID N°: 31)**
- 2: Péptido 2: **SFKQNETQNMVSLKLQARLA (SEQ ID N°: 32)**
- 3: Péptido 3: **SLKLQARLASSILGCGRARV (SEQ ID N°: 33)**
- 4: Péptido 4: **ILGCGRARVWLDPNEAVEIQ (SEQ ID N°: 34)**
- 5: Péptido 5: **DPNEAVEIQNANSRKSVRKL (SEQ ID N°: 35)**
- 6: Péptido 6: **NSRKSVRKLIKDGFIRKPV (SEQ ID N°: 36)**
- 7: Péptido 7: **DGFIRKPKVHRSRARWRKM (SEQ ID N°: 37)**
- 8: Péptido 8: **HSRARWRKMKEAKDMGRHNG (SEQ ID N°: 38)**
- 9: Péptido 9: **AKDMGRHNGVGRREGSREAR (SEQ ID N°: 39)**
- 10: Péptido 10: **RREGSREARMPSELWMRRL (SEQ ID N°: 40)**
- 11: Péptido 11: **SKELWMRRLRILRLLRKYR (SEQ ID N°: 41)**
- 12: Péptido 12: **LRLLRKYRADKKIDRHVYR (SEQ ID N°: 42)**
- 13: Péptido 13: **KKIDRHVYRDLYMRAKGNVF (SEQ ID N°: 43)**
- 14: Péptido 14: **YMRAKGNVFRNKRNLVEHIH (SEQ ID N°: 44)**
- 15: Péptido 15: **KRNLVEHIHKIKNEKKKERQ (SEQ ID N°: 45)**
- 16: Péptido 16: **KNEKKKERQLAEQLAAKHLR (SEQ ID N°: 46)**
- 17: Péptido 17: **EQLAAKHLRDEQNRNKARKQ (SEQ ID N°: 47)**
- 18: Péptido 18: **QNRNKARKQELKKREKERER (SEQ ID N°: 48)**
- 19: Péptido 19: **KKREKERERARRDDAAAAAQ (SEQ ID N°: 49)**
- 20: Péptido 20: **RDDAAAAAQKKKADAAKSA (SEQ ID N°: 50)**
- 21: Péptido 21: **KADAAKSAAPAAKSAAPAA (SEQ ID N°: 51)**
- 22: Péptido 22: **AAKSAAPAAKAAAPATKAAA (SEQ ID N°: 52)**
- 23: Péptido 23: **AAPATKAAAAAPATKGAAPV (SEQ ID N°: 53)**
- 24: Péptido 24: **PATKGAAPVKKSKK (SEQ ID N°: 54)**

La proteína recombinante L19 de *Leishmania major* (Lm L19) (es decir, la SEQ ID N°:1) completa expresada en *Escherichia coli* se usó como control

Resultados

5 [0094] Células de bazo de ratones BALB/c sin tratamiento previo (5×10^6 células/ml) (volumen final de 200 μ l) fueron estimuladas con cada péptido individual (100 μ g/ml), con una mezcla de los 24 péptidos (100 μ g/ml), con la proteína de *Leishmania major* recombinante obtenida a partir de bacterias (12 μ g/ml), y no estimuladas. Después de 48 horas y 72 horas, se recogieron los sobrenadantes y se midió la cantidad de IL-10 mediante ELISA como se ha descrito anteriormente en este documento.

10 La LmL19 recombinante obtenida en bacterias fue capaz de inducir la síntesis de IL-10 en células de bazo de ratones sin tratamiento previo. Ninguno de los péptidos fue capaz de inducir la misma cantidad de IL-10 inducida por la proteína. Sin embargo, los péptidos 1, 2, 12, 13, 14, 23 y 24 indujeron cantidades estadísticamente significativas de IL-10.

El nivel de IL-10 inducido fue mayor 72 h después de la estimulación en todos los casos.

Experimentos actuales con péptidos

15 [0095] Estamos repitiendo los experimentos con nuevos péptidos sintetizados para confirmar los resultados obtenidos. De acuerdo con estos resultados, estamos usando los mismos péptidos, pero hemos incluido 3 nuevos péptidos que contienen las secuencias de los péptidos que inducen los niveles más altos de IL-10. La composición de estos péptidos es:

- 20 25: Péptido 1-2 **MTPLSLSSSRHSFKQNETQNMVSLKLQARLA (SEQ ID N°: 55)**
26: Péptido 12-13-14: **LRLLLRKYRADKKIDRHVYRDLYMRAKGNVFRNKRNLVEHIH (SEQ ID N°: 56)**
27: Péptido: 23-24: **AAPATKAAAAAPATKGAAPVKKSKK (SEQ ID N°: 57)**

Ejemplo 4: modelo animal para el estudio del efecto antiinflamatorio de la L19

Objetivo

25 [0096] Los objetivos de este estudio son: probar el efecto antiinflamatorio de nuestra sustancia activa derivada de Lm L19 (es decir, la SEQ ID N°: 1) expresada en *E. coli* y probada en cultivos *ex vivo* de tejido intestinal e; investigar el efecto antiinflamatorio en un modelo animal de la enfermedad de Chron.

Metodología

[0097] Para realizar estos objetivos, se llevarán a cabo dos pasos diferentes:

30 1. Ensayos *in vitro* con explantes de mucosa de pacientes con enfermedad de Crohn, controles sanos y muestras sanas donde la inflamación se ha inducido *in vitro* con PMA-ionomicina. Después de 6 horas de incubación de las muestras con la sustancia activa, los sobrenadantes se analizarán para detectar la presencia de citocinas proinflamatorias, citocinas reguladoras y quimiocinas, como TNF α , IL-10, etc.

Se extraerá ARN de los diferentes tejidos para analizar la expresión de genes que codifican citocinas, quimiocinas, factores de transcripción y señales inflamatorias.

35 Los tejidos se digerirán para obtener células mononucleares de la mucosa, donde se estudiará la expresión de algunos marcadores celulares para estudiar los diferentes estados de las células dendríticas después de la incubación. La población de linfocitos también se investigará para determinar la especificidad de la respuesta a la sustancia activa.

40 2. Estudio *in vivo* del efecto antiinflamatorio de la sustancia activa usando modelos inflamatorios de murino en los que se induce colitis crónica en los animales mediante la ingesta de agua potable con dextrano sulfato de sodio (DSS) durante varios días. La sustancia activa se inoculará por vía subcutánea en los animales antes y después del tratamiento con DSS. Se medirán diferentes parámetros tales como la evaluación cuantitativa de la inflamación intestinal para evaluar la lesión intestinal (14) a (25).

Referencias

- 45 [0098]
1. Zhou, X., et al, Current Drug Targets - Immune, Endocrine & Metabolic Disorders. 5(4), 2005, 465-475
 2. Toshiyuki Y., et al, European Journal of Pharmacology. 533, 2006, 289-301

3. Weiss E., et al, *Journal of the American Academy of Dermatology*, 50(5), 2004, 657-675
4. Wan-Wan L., et al, *The Journal of Clinical Investigation* 117(5), 2007, 1175-83.
5. Wooley, *Curr.Opin. Rheum.* 3:407-20, 1999.
6. van Riel P.L.C.M., (2001), *Best Practice & Research Clinical Rheumatology*, 15: 67-76.
7. Gester A.M., (1999), *Baillière's Clinical Immunology*, 13: 629-644.
8. Neurath et al. *Intern. Rev. Immunol.* 19:51-62, 2000.
9. *Ann Rheum Dis* 2005;64(Suppl II):ii65-ii68. doi: 10.1136/ard.2004.031237)
10. Hongbo Y., et al, *Journal of Investigative Dermatology* (2005) 125, 659-664.
11. Kirby B., et al, *Br J Dermatol* 2000;142:728-32.
12. Remington: *The Science and Practice of Pharmacy*, 20th Edition. Baltimore, MD: Lippincott Williams & Wilkins, 2000).
13. Zhou X. Et al, (2005), *Curr. Drug Targets Immune Endocr. Metabol. Disord.*, 5(4): 465-475.
14. Sartor R.B., *Gastroenterology* 2008; 134(2):577-94.
15. Borruel N., et al, *Gut* 2002; 51: 659-664.
16. Borruel N., et al, *Am J Gastroenterol* 2003; 98: 865-870.
17. Carol M., et al, *J Leukocyte Biol* 2006; 79: 917-922.
18. Muñoz-Provencio D., et al, *Arch Microbiol.* 2008 Oct 31.
19. Llopis M., et al, *Inflamm Bowel Dis.* 2009; 15: 275-283.
20. Lugea A., et al, *Gut* 2000; 46: 515-521.
21. Videla S., et al, *Am J Gastroenterol* 2001; 96: 1486-1493.
22. Medina C., et al, *Scand J Gastroenterol* 2001; 36: 1314-1319.
23. Medina C., et al, *Am J Physiol* 2003; 284: G116-G122.
24. Videla S., et al, *J Pharmacol Exp Ther.* 2006; 316: 940-945.
25. Videla S., et al, *Dig Dis Sci* 2007; 52: 45-51.

LISTADO DE SECUENCIAS

[0099]

<110> Laboratorios LETI SL

30 <120> Molécula para tratar un trastorno antiinflamatorio

<130> P6032062PCT

<150> EP 11165248.3

<151> 2011-05-09

35 <150> US 61/484,67

<151> 2011-05-09

<160> 57

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 267

40 <212> PRT

<213> Leishmania major

<400> 1

ES 2 670 520 T3

Met Thr Pro Leu Ser Leu Ser Ser Ser Arg His Ser Phe Lys Gln Asn
 1 5 10 15

Glu Thr Gln Asn Met Val Ser Leu Lys Leu Gln Ala Arg Leu Ala Ser
 20 25 30

Ser Ile Leu Gly Cys Gly Arg Ala Arg Val Trp Leu Asp Pro Asn Glu
 35 40 45

Ala Val Glu Ile Gln Asn Ala Asn Ser Arg Lys Ser Val Arg Lys Leu
 50 55 60

Ile Lys Asp Gly Phe Ile Ile Arg Lys Pro Val Lys Val His Ser Arg
 65 70 75 80

Ala Arg Trp Arg Lys Met Lys Glu Ala Lys Asp Met Gly Arg His Asn
 85 90 95

Gly Val Gly Arg Arg Glu Gly Ser Arg Glu Ala Arg Met Pro Ser Lys
 100 105 110

Glu Leu Trp Met Arg Arg Leu Arg Ile Leu Arg Arg Leu Leu Arg Lys
 115 120 125

Tyr Arg Ala Asp Lys Lys Ile Asp Arg His Val Tyr Arg Asp Leu Tyr
 130 135 140

Met Arg Ala Lys Gly Asn Val Phe Arg Asn Lys Arg Asn Leu Val Glu
 145 150 155 160

ES 2 670 520 T3

His Ile His Lys Ile Lys Asn Glu Lys Lys Lys Glu Arg Gln Leu Ala
165 170 175

Glu Gln Leu Ala Ala Lys His Leu Arg Asp Glu Gln Asn Arg Asn Lys
180 185 190

Ala Arg Lys Gln Glu Leu Lys Lys Arg Glu Lys Glu Arg Glu Arg Ala
195 200 205

Arg Arg Asp Asp Ala Ala Ala Ala Ala Gln Lys Lys Lys Ala Asp Ala
210 215 220

Ala Lys Lys Ser Ala Ala Pro Ala Ala Lys Ser Ala Ala Pro Ala Ala
225 230 235 240

Lys Ala Ala Ala Pro Ala Thr Lys Ala Ala Ala Ala Ala Pro Ala Thr
245 250 255

Lys Gly Ala Ala Pro Val Lys Lys Ser Lys Lys
260 265

<210> 2

<211> 804

<212> ADN

<213> Leishmania major

5

<400> 2

ES 2 670 520 T3

atgaccctc tctccctctc ttctcccgc cacagtttta agcagaacga aacgcagaac 60
atggtgtctc tgaagctgca ggctcgcctt gcgtcgagca tcctcggctg cggccgcgcc 120
cgcgtgtggc tggaccccaa cgaggcgggtg gagatccaga acgcgaactc gcgcaagagc 180
gtgcgcaagc tgatcaagga tggcttcac atccgcaagc cggatgaagg gactcgcgc 240
gcgcgggtggc gtaaaatgaa ggaggcgaag gacatggggc gccacaacgg cgttggggcgc 300
cgcgagggtg gccgcgaggc ccgcatgccg agcaaggagt tgtggatgcg ccgcctgcgc 360
attctgcgcc gcctgctgcg caagtaccgc gcggacaaga agattgaccg ccacgtgtac 420
cgcgacctgt acatgcgcgc gaagggtaac gtgttccgca acaagcgcaa ccttgtggag 480
cacatccaca agatcaagaa tgagaagaag aaggagcgcc agctggcgga gcagctcgcg 540
gcgaagcacc tgcgcgacga gcagaaccgc aacaaggctc gcaagcagga gctgaagaag 600
cgcgagaagg agcgcgagcg cgcgagggcg gacgacgctg ctgccgctgc gcagaagaag 660
aaggcggacg ccgcgaagaa gtccgccgcg cctgctgcca agtccgccgc gcctgccgcg 720
aaggctgctg cccccgccac gaaggccgct gctgctgcc cccccacgaa gggctgctgcg 780
ccggtgaaga agtcgaagaa gtaa 804

5 <210> 3
<211> 28
<212> ADN
<213> artificial

<220>
<223> cebador

10 <400> 3
cgggatccat gaccctctc tccctctc 28

<210> 4
<211> 30
<212> ADN
<213> artificial

15 <220>
<223> cebador

<400> 4
ccaagcttt tacttctcg acttctcac 30

20 <210> 5
<211> 250
<212> PRT
<213> Leishmania braziliensis

<400> 5

ES 2 670 520 T3

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

Cys Gly Arg Ala Arg Val Trp Leu Asp Pro Asn Glu Ala Met Glu Ile
 20 25 30

Gln Asn Ala Asn Ser Arg Lys Ser Val Arg Lys Leu Ile Lys Asp Gly
 35 40 45

Phe Ile Ile Arg Lys Pro Val Lys Val His Ser Arg Ala Arg Trp Arg
 50 55 60

Lys Met Lys Glu Ala Lys Asp Met Gly Arg His Ser Gly Val Gly Arg
 65 70 75 80

Arg Glu Gly Ser Arg Glu Ala Arg Met Pro Ser Lys Glu Leu Trp Met
 85 90 95

Arg Arg Leu Arg Ile Leu Arg Arg Leu Leu Arg Lys Tyr Arg Ala Asp
 100 105 110

Lys Lys Ile Asp Arg His Val Tyr Arg Asp Leu Tyr Val Arg Ala Lys
 115 120 125

ES 2 670 520 T3

Gly Asn Val Phe Arg Asn Lys Arg Asn Leu Met Glu His Ile His Lys
 130 135 140

Ile Lys Asn Glu Lys Lys Lys Glu Arg Gln Leu Ala Glu Gln Leu Ala
 145 150 155 160

Ala Lys His Gln Arg Asp Glu Gln His Arg Asn Lys Ala Arg Lys Gln
 165 170 175

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

Ala Ala Ala Ala Ala Gln Lys Lys Lys Ala Asp Val Ala Lys Lys Ser
 195 200 205

Ala Ala Pro Ala Thr Lys Ala Ala Ala Val Ser Ala Ala Lys Ala Ala
 210 215 220

Ala Val Ser Val Ser Arg Ala Ala Ala Ala Val Ala Pro Ala Ala Lys
 225 230 235 240

Pro Ala Val Pro Ala Lys Lys Ser Lys Lys
 245 250

- <210> 6
- <211> 753
- <212> ADN
- <213> Leishmania braziliensis

5

<400> 6

ES 2 670 520 T3

	atggtgtctc tgaagctgca ggctcgcctc gcgtcgagca tcctcggctg cggccgcgcc	60
	cgcgtgtggc tggaccccaa cgaggcgatg gagatccaga acgcaaactc gcgcaagagc	120
	gtgcbgcaagc tgatcaagga tggcttcatc attcgtgaagc cggatgaaggt gcactcgcgc	180
	gcgcbggtggc gtaagatgaa ggaggcgaag gacatggggc gccacagcgg cgttggcccg	240
	cgcgagggta gccgcgaggc ccgcatgccg agcaaggagc tgtggatgcb cgcctcgcgc	300
	attctgcgtc gcctgctgcb caagtaccgc gcggacaaga agatcgaccg ccacgtgtac	360
	cgcgacctgt acgtgcgcgc gaagggtaac gtgttccgca acaagcgcga ccttatggag	420
	cacatccaca agatcaagaa cgagaagaag aaggagcggc agctggcggg gcagcttgcb	480
	gcgaagcacc agcgcgacga gcagcacccg aacaaggctc gcaagcagga gctgaagaag	540
	cgcgagaagg agcgcgagcb cgcgagggcb gacgacgctg ctgctgctgc gcagaagaag	600
	aaggcggacg ttgcgaagaa gtctgctgcc cctgctacga aggctgctgc tgtctccgcc	660
	gcgaaggctg ctgctgtctc cgtctcgagg gctgctgctg ctgtggctcc cgctgcgaag	720
5	cctgctgtgc cggcgaagaa gtcgaagaag taa	753
	<210> 7	
	<211> 271	
	<212> PRT	
	<213> Leishmania braziliensis	
10	<400> 7	

ES 2 670 520 T3

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

Cys Gly Arg Ala Arg Val Trp Leu Asp Pro Asn Glu Ala Met Glu Ile
20 25 30

Gln Asn Ala Asn Ser Arg Lys Ser Val Arg Lys Leu Ile Lys Asp Gly
35 40 45

Phe Ile Ile Arg Lys Pro Val Lys Val His Ser Arg Ala Arg Trp Arg
50 55 60

Lys Met Lys Glu Ala Lys Asp Met Gly Arg His Ser Gly Val Gly Arg
65 70 75 80

Arg Glu Gly Ser Arg Glu Ala Arg Met Pro Ser Lys Glu Leu Trp Met
85 90 95

Arg Arg Leu Arg Ile Leu Arg Arg Leu Leu Arg Lys Tyr Arg Ala Asp
100 105 110

Lys Lys Ile Asp Arg His Val Tyr Arg Asp Leu Tyr Val Arg Ala Lys
115 120 125

Gly Asn Val Phe Arg Asn Lys Arg Asn Leu Met Glu His Ile His Lys
130 135 140

Ile Lys Asn Glu Lys Lys Lys Glu Arg Gln Leu Ala Glu Gln Leu Ala
145 150 155 160

Ala Lys His Gln Arg Asp Glu Gln His Arg Asn Lys Ala Arg Lys Gln
165 170 175

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

Ala Ala Ala Ala Ala Gln Lys Lys Lys Ala Asp Val Ala Lys Lys Ser
195 200 205

ES 2 670 520 T3

Ala Ala Pro Ala Thr Lys Ala Ala Ala Val Ser Ala Ala Lys Ala Ala
 210 215 220

Ala Val Ser Ala Ala Lys Ala Ala Ala Val Ser Val Ser Arg Ala Ala
 225 230 235 240

Ala Ala Val Ala Pro Ala Ala Lys Pro Ala Val Pro Ala Lys Ala Ala
 245 250 255

Ala Pro Ala Ala Lys Gly Ala Val Pro Ala Lys Lys Ser Lys Lys
 260 265 270

<210> 8
 <211> 816
 <212> ADN
 5 <213> Leishmania braziliensis

<400> 8

atggtgtctc tgaagctgca ggctcgcctc gcgtcgagca tcctcggctg cggccgcgcc 60
 cgcgtgtggc tggaccccaa cgaggcgatg gagatccaga acgcaaactc gcgcaagagc 120
 gtgcbgaagc tgatcaagga tggcttcatc attcgttaagc cgggtgaaggt gcactcgcgc 180
 gcgcggtggc gtaagatgaa ggaggcgaag gacatggggc gccacagcgg cgttggccgg 240
 cgcgagggta gccgcgaggc cgcgatgccg agcaaggagc tgtggatgcg ccgcctgcgc 300
 attctgcgtc gcctgctgcg caagtaccgc gcggacaaga agatcgaccg ccacgtgtac 360
 cgcgacctgt acgtgcgcgc gaagggtaac gtgttccgca acaagcgcaa ccttatggag 420
 cacatccaca agatcaagaa cgagaagaag aaggagcggc agctggcgga gcagcttgcg 480
 gcgaagcacc agcgcgacga gcagcaccgc aacaaggctc gcaagcagga gctgaagaag 540
 cgcgagaagg agcgcgagcg cgcgaggcgc gacgacgctg ctgctgctgc gcagaagaag 600
 aaggcggacg ttgcbgaagaa gtctgctgcc cctgctacga aggctgctgc tgtctccgcc 660
 gcgaaggctg ctgctgtctc cgccgcgaag gctgctgctg tctccgtctc gagggctgct 720
 gctgctgtgg ctcccgtgct gaagcctgct gtgccggcga aggctgcggc gcctgctgcg 780
 aagggtgctg tgccggcgaa gaagtcgaag aagtaa 816

10 <210> 9
 <211> 176
 <212> PRT
 <213> Leishmania braziliensis

ES 2 670 520 T3

<400> 9

Met Arg Arg Leu Arg Ile Leu Arg Arg Leu Leu Arg Lys Tyr Arg Ala
1 5 10 15

Asp Lys Lys Ile Asp Arg His Val Tyr Arg Asp Leu Tyr Val Arg Ala
20 25 30

Lys Gly Asn Val Phe Arg Asn Lys Arg Asn Leu Met Glu His Ile His
35 40 45

Lys Ile Lys Asn Glu Lys Lys Lys Glu Arg Gln Leu Ala Glu Gln Leu
50 55 60

Ala Ala Lys His Gln Arg Asp Glu Gln His Arg Asn Lys Ala Arg Lys
65 70 75 80

Gln Glu Leu Lys Lys Arg Glu Lys Glu Arg Glu Arg Ala Arg Arg Asp
85 90 95

Asp Ala Ala Ala Ala Ala Gln Lys Lys Lys Ala Asp Val Ala Lys Lys
100 105 110

Ser Ala Ala Pro Ala Thr Lys Ala Ala Ala Val Ser Ala Ala Lys Ala
115 120 125

Ala Ala Val Ser Ala Ala Lys Ala Ala Ala Val Ser Val Ser Arg Ala
130 135 140

Ala Ala Ala Val Ala Pro Ala Ala Lys Pro Ala Val Pro Ala Lys Ala
145 150 155 160

5 Ala Ala Pro Ala Ala Lys Gly Ala Val Pro Ala Lys Lys Ser Lys Lys
165 170 175

<210> 10

<211> 531

<212> PRT

<213> Leishmania braziliensis

10 <400> 10

ES 2 670 520 T3

Ala Thr Gly Cys Gly Cys Cys Gly Cys Cys Thr Gly Cys Gly Cys Ala
1 5 10 15

Thr Thr Cys Thr Gly Cys Gly Thr Cys Gly Cys Cys Thr Gly Cys Thr
20 25 30

Gly Cys Gly Cys Ala Ala Gly Thr Ala Cys Cys Gly Cys Gly Cys Gly
35 40 45

Gly Ala Cys Ala Ala Gly Ala Ala Gly Ala Thr Cys Gly Ala Cys Cys
50 55 60

Gly Cys Cys Ala Cys Gly Thr Gly Thr Ala Cys Cys Gly Cys Gly Ala

ES 2 670 520 T3

Gly Gly Ala Cys Gly Thr Thr Gly Cys Gly Ala Ala Gly Ala Ala Gly
 325 330 335

Thr Cys Thr Gly Cys Thr Gly Cys Cys Cys Cys Thr Gly Cys Thr Ala
 340 345 350

Cys Gly Ala Ala Gly Gly Cys Thr Gly Cys Thr Gly Cys Thr Gly Thr
 355 360 365

Cys Thr Cys Cys Gly Cys Cys Gly Cys Gly Ala Ala Gly Gly Cys Thr
 370 375 380

Gly Cys Thr Gly Cys Thr Gly Thr Cys Thr Cys Cys Gly Cys Cys Gly
 385 390 395 400

Cys Gly Ala Ala Gly Gly Cys Thr Gly Cys Thr Gly Cys Thr Gly Thr
 405 410 415

Cys Thr Cys Cys Gly Thr Cys Thr Cys Gly Ala Gly Gly Gly Cys Thr
 420 425 430

Gly Cys Thr Gly Cys Thr Gly Cys Thr Gly Thr Gly Gly Cys Thr Cys
 435 440 445

Cys Cys Gly Cys Thr Gly Cys Gly Ala Ala Gly Cys Cys Thr Gly Cys
 450 455 460

Thr Gly Thr Gly Cys Cys Gly Gly Cys Gly Ala Ala Gly Gly Cys Thr
 465 470 475 480

Gly Cys Gly Gly Cys Gly Cys Cys Thr Gly Cys Thr Gly Cys Gly Ala
 485 490 495

Ala Gly Gly Gly Thr Gly Cys Thr Gly Thr Gly Cys Cys Gly Gly Cys
 500 505 510

Gly Ala Ala Gly Ala Ala Gly Thr Cys Gly Ala Ala Gly Ala Ala Gly
 515 520 525

Thr Ala Ala
 530

<210> 11
<211> 245
<212> PRT
<213> Leishmania infantum

5 <400> 11

ES 2 670 520 T3

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

Cys Gly Arg Ala Arg Val Trp Leu Asp Pro Asn Glu Ala Val Glu Ile
20 25 30

Gln Asn Ala Asn Ser Arg Lys Ser Val Arg Lys Leu Ile Lys Asp Gly
35 40 45

Phe Ile Ile Arg Lys Pro Val Lys Val His Ser Arg Ala Arg Trp Arg
50 55 60

Lys Met Lys Glu Ala Lys Asp Met Gly Arg His Asn Gly Val Gly Arg
65 70 75 80

Arg Glu Gly Ser Arg Glu Ala Arg Met Pro Ser Lys Glu Leu Trp Met
85 90 95

Arg Arg Leu Arg Ile Leu Arg Arg Leu Leu Arg Lys Tyr Arg Ala Asp
100 105 110

Lys Lys Ile Asp Arg His Val Tyr Arg Asp Leu Tyr Val Arg Ala Lys
115 120 125

Gly Asn Val Phe Arg Asn Lys Arg Asn Leu Val Glu His Ile His Lys
130 135 140

Ile Lys Asn Glu Lys Lys Lys Glu Arg Gln Leu Ala Glu Gln Leu Ala
145 150 155 160

Ala Lys His Leu Arg Asp Glu Gln Asn Arg Asn Lys Ala Arg Lys Gln
165 170 175

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

Ala Ala Ala Ala Ala Gln Lys Lys Lys Ala Asp Ala Ala Lys Lys Ser
195 200 205

Ala Ala Pro Ala Ala Lys Ser Ala Ala Pro Ala Ala Lys Ser Ala Ala
210 215 220

Pro Ala Ala Lys Val Ala Ala Pro Ala Thr Lys Gly Ala Ala Pro Val
225 230 235 240

Lys Lys Ser Lys Lys
245

ES 2 670 520 T3

<210> 12
 <211> 738
 <212> ADN
 <213> Leishmania infantum

5 <400> 12

atggtgtctc tgaagctgca ggctcgcctt gcgtcgagca tcctcggctg cggccgcgcc	60
cgcgtgtggc tggaccccaa cgaggcgggtg gagatccaga acgcgaactc gcgcaagagc	120
gtgcgcaagc tgatcaagga tggcttcatc atccgcaagc cggatgaaggt gcactcgcgc	180
gcgcgggtggc gtaaaatgaa ggaggcgaag gacatggggc gccacaacgg cgttggccgc	240
cgcgagggtg gccgcgagggc ccgcatgccg agcaaggagt tgtggatgcg ccgcctgcgc	300
attctgcgcc gcctgctgcg caagtaccgc gcggacaaga agatcgaccg ccacgtgtac	360
cgagacctgt acgtgcgcgc gaagggtaat gtgttccgca acaagcgcga ccttgtggag	420
cacatccaca agatcaagaa tgagaagaag aaggagcgcc agctggcgga gcagcttgcg	480
gcgaagcacc tgcgcgacga gcagaaccgc aacaaggctc gcaagcagga gctgaggaag	540
cgcgagaagg agcgcgagcg cgcgaggcgc gacgacgctg ctgccgctgc gcagaagaag	600
aaggcggacg ccgcgaagaa gtctgccgcg cctgccgcga agtctgccgc gcctgccgcg	660
aagtctgccg cgctgccgc gaaggttgct gccccgccca cgaagggtgc tgcgccggtg	720
aagaagtcga agaagtaa	738

<210> 13
 <211> 238
 <212> PRT
 <213> Leishmania infantum

10

<400> 13

ES 2 670 520 T3

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

Cys Gly Arg Ala Arg Val Trp Leu Asp Pro Asn Glu Ala Val Glu Ile
 20 25 30

Gln Asn Ala Asn Ser Arg Lys Ser Val Arg Lys Leu Ile Lys Asp Gly
 35 40 45

Phe Ile Ile Arg Lys Pro Val Lys Val His Ser Arg Ala Arg Trp Arg
 50 55 60

Lys Met Lys Glu Ala Lys Asp Met Gly Arg His Asn Gly Val Gly Arg
 65 70 75 80

Arg Glu Gly Ser Arg Glu Ala Arg Met Pro Ser Lys Glu Leu Trp Met
 85 90 95

ES 2 670 520 T3

Arg Arg Leu Arg Ile Leu Arg Arg Leu Leu Arg Lys Tyr Arg Ala Asp
 100 105 110

Lys Lys Ile Asp Arg His Val Tyr Arg Asp Leu Tyr Val Arg Ala Lys
 115 120 125

Gly Asn Val Phe Arg Asn Lys Arg Asn Leu Val Glu His Ile His Lys
 130 135 140

Ile Lys Asn Glu Lys Lys Lys Glu Arg Gln Leu Ala Glu Gln Leu Ala
 145 150 155 160

Ala Lys His Leu Arg Asp Glu Gln Asn Arg Asn Lys Ala Arg Lys Gln
 165 170 175

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

Ala Ala Ala Ala Ala Gln Lys Lys Lys Ala Asp Ala Ala Lys Lys Ser
 195 200 205

Ala Ala Pro Ala Ala Lys Ser Ala Ala Pro Ala Ala Lys Val Ala Ala
 210 215 220

Pro Ala Thr Lys Gly Ala Ala Pro Val Lys Lys Ser Lys Lys
 225 230 235

<210> 14

<211> 717

<212> ADN

5 <213> Leishmania infantum

<400> 14

ES 2 670 520 T3

	atggtgtctc tgaagctgca ggctcgcctt gcgtcgagca tcctcggctg cggccgcgcc	60
	cgcgtgtggc tggaccccaa cgaggcgggtg gagatccaga acgcgaactc gcgcaagagc	120
	gtgcbgcaagc tgatcaagga tggcttcatc atccgcaagc cgggtgaaggt gcactcgcgc	180
	gcgcbggtggc gtaaaatgaa ggaggcgaag gacatggggc gccacaacgg cgttggccgc	240
	cgcgagggta gccgcbgagc ccgcatgccg agcaaggagt tgtggatgcb cgcctcgcgc	300
	attctcgcgc gcctgctgcb caagtaccgc gcggacaaga agatcgcacc ccacgtgtac	360
	cgagacctgt acgtcgcgcg gaagggtaat gtgttccgca acaagcgcga ccttgtggag	420
	cacatccaca agatcaagaa tgagaagaag aaggagcgcg agctggcggg gcagcttgcg	480
	gcgaagcacc tgcgcbgacg gcagaaccgc aacaaggctc gcaagcagga gctgaggaag	540
	cgcgagaagg agcgcgagcb cgcgagggcb gacgacgctg ctgccgctgc gcagaagaag	600
	aaggcggacg ccgcbgagaa gtctgccgcb cctgccgcbg agtctgccgc gcctgccgcb	660
5	aaggttgctg cccccgccac gaagggtgct gcgccggtga agaagtcgaa gaagtaa	717

<210> 15
 <211> 247
 <212> PRT
 <213> Leishmania mexicana

10 <400> 15

ES 2 670 520 T3

Met Val Ser Leu Lys Leu Gln Ala Arg Leu Ala Ser Ser Ile Leu Ser
1 5 10 15

Cys Gly Arg Ala Arg Val Trp Leu Asp Pro Asn Glu Ala Met Glu Ile
20 25 30

Gln Asn Ala Asn Ser Arg Lys Ser Val Arg Lys Leu Ile Lys Asp Gly
35 40 45

Phe Ile Ile Arg Lys Pro Val Lys Val His Ser Arg Ala Arg Trp Arg
50 55 60

Lys Met Lys Glu Ala Lys Asp Met Gly Arg His Asn Gly Val Gly Arg
65 70 75 80

Arg Glu Gly Ser Arg Glu Ala Arg Met Pro Ser Lys Glu Leu Trp Met
85 90 95

Arg Arg Leu Arg Ile Leu Arg Arg Leu Leu Arg Lys Tyr Arg Ala Asp
100 105 110

Lys Lys Ile Asp Arg His Val Tyr Arg Asp Leu Tyr Met Arg Ala Lys
115 120 125

Gly Asn Val Phe Arg Asn Lys Arg Asn Leu Val Glu Tyr Ile His Lys
130 135 140

Ile Lys Asn Glu Lys Lys Lys Ala Arg Gln Leu Ala Glu Gln Leu Ala
145 150 155 160

Ala Lys His Leu Arg Asp Glu Gln Asn Arg Asn Lys Ala Arg Lys Gln
165 170 175

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

Ala Ala Ala Ala Ala Gln Lys Lys Lys Ala Asp Ala Ala Lys Lys Ser
195 200 205

ES 2 670 520 T3

Ala Ala Pro Ala Ala Lys Ser Ala Ala Pro Ala Ala Lys Ala Ala Ala
 210 215 220

Pro Val Ala Lys Ala Ala Ala Ala Pro Ala Ala Lys Gly Ala Ala
 225 230 235 240

Pro Val Lys Lys Ser Lys Lys
 245

<210> 16
 <211> 744
 <212> ADN
 <213> Leishmania mexicana

5

<400> 16

atggtgtctc tgaagctgca agctcggctt gcgtcgagca tcctcagctg cggccgcgcc 60
 cgcgtgtggc tggaccccaa cgaggcgatg gagatccaga acgcgaactc gcgcaagagc 120
 gtgcbgaagc tgatcaagga tggcttcac atccgcaagc cgggtgaaggt gcaactcgcgc 180
 gcgcbgtggc gtaaaatgaa ggaggcgaag gacatggggc gccacaacgg cgttggccgc 240
 cgcgagggta gccgcbgaggc ccgcatgccg agcaaggagt tgtggatgcb cgcctcgcgc 300
 attctcgcgc gcctgctgcb caagtaccgc gcggacaaga agatcbgaccg ccacgtgtac 360
 cbgacactgt acatcgcgcgc gaagggtaac gtgttccgca acaagcbcaa ccttgtggag 420
 tacatccaca agatcaagaa tgagaagaag aaggcbgcgc agctggcbga gcagcttgcg 480
 gcgaagcacc tgcgcbgacga gcagaaccgc aacaaggctc gcaagcbgga gctgcbggaag 540
 cgcgagaagg agcbgcbgagcb cgcgaagcbgc gacgacgctg ctgcbgcbgcb gcagaagaag 600
 aaggcbgagcb ccbgcaagaa gtcbgcbgcb cctgctgcbga agtcbgcbgc gcctgcbgcbg 660
 aaggctgctg cccccgcbgc gaaggcbgct gctgctgccc ccbgcbgcbga ggbtgctgcbg 720
 ccbgtgaaga agtcbgaagaa gtaa 744

<210> 17
 <211> 247
 <212> PRT
 <213> Leishmania mexicana

10

<400> 17

ES 2 670 520 T3

Met Val Ser Leu Lys Leu Gln Ala Arg Leu Ala Ser Ser Ile Leu Ser
1 5 10 15

Cys Gly Arg Ala Arg Val Trp Leu Asp Pro Asn Glu Ala Met Glu Ile
20 25 30

Gln Asn Ala Asn Ser Arg Lys Ser Val Arg Lys Leu Ile Lys Asp Gly

ES 2 670 520 T3

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

ES 2 670 520 T3

<210> 18
 <211> 744
 <212> ADN
 <213> Leishmania mexicana

5 <400> 18

atggtgtctc tgaagctgca agctcggctt gcgtcgagca tcctcagctg cggcccgccc 60
 cgcgtgtggc tggaccccaa cgaggc gatg gagatccaga acgcgaactc gcgcaagagc 120
 gtgcgcaagc tgatcaagga tggcttcac atccgcaagc cgggtgaaggt gcaactcgcgc 180
 gcgcggtggc gtaaaatgaa ggaggcgaag gacatggggc gccacaacgg cgttggccgc 240
 cgcgagggta gccgcgaggc ccgcatgccg agcaaggagt tgtggatgcg ccgcctgcgc 300
 attctgcgcc gcctgctgcg caagtaccgc gcggacaaga agatcgaccg ccacgtgtac 360
 cgagacctgt acatgcgcgc gaagggtaac gtgttccgca acaagcgcaa ccttgtggag 420
 tacatccaca agatcaagaa tgagaagaag aaggcgcgcc agctggcgga gcagcttgcg 480
 gcgaagcacc tgcgcgacga gcagaaccgc aacaaggctc gcaagcagga gctgcggaag 540
 cgcgagaagg agcgcgagcg cgcgaagcgc gacgacgctg ctgccgctgc gcagaagaag 600
 aaggcggacg ccgcgaagaa gtccgccgcg cctgctgcga agtccgccgc gcctgccgcg 660
 aaggctgctg cccccgtcgc gaaggccgct gctgctgccc ccgcggcgaa gggctgctgcg 720
 10 ccggtgaaga agtcgaagaa gtaa 744

<210> 19
 <211> 245
 <212> PRT
 <213> Leishmania donovani

15 <400> 19

ES 2 670 520 T3

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

Cys Gly Arg Ala Arg Val Trp Leu Asp Pro Asn Glu Ala Val Glu Ile
 20 25 30

Gln Asn Ala Asn Ser Arg Lys Ser Val Arg Lys Leu Ile Lys Asp Gly
 35 40 45

Phe Ile Ile Arg Lys Pro Val Lys Val His Ser Arg Ala Arg Trp Arg
 50 55 60

Lys Met Lys Glu Ala Lys Asp Met Gly Arg His Asn Gly Val Gly Arg
 65 70 75 80

Arg Glu Gly Ser Arg Glu Ala Arg Met Pro Ser Lys Glu Leu Trp Met
 85 90 95

Arg Arg Leu Arg Ile Leu Arg Arg Leu Leu Arg Lys Tyr Arg Ala Asp
 100 105 110

Lys Lys Ile Asp Arg His Val Tyr Arg Asp Leu Tyr Val Arg Ala Lys
 115 120 125

ES 2 670 520 T3

Gly Asn Val Phe Arg Asn Lys Arg Asn Leu Val Glu His Ile His Lys
 130 135 140

Ile Lys Asn Glu Lys Lys Lys Glu Arg Gln Leu Ala Glu Gln Leu Ala
 145 150 155 160

Ala Lys His Leu Arg Asp Glu Gln Asn Arg Asn Lys Ala Arg Lys Gln
 165 170 175

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

Ala Ala Ala Ala Ala Gln Lys Lys Lys Ala Asp Ala Ala Lys Lys Ser
 195 200 205

Ala Ala Ser Ala Ala Lys Ser Ala Ala Pro Ala Ala Lys Ser Ala Ala
 210 215 220

Pro Ala Ala Lys Val Ala Ala Pro Ala Thr Lys Gly Ala Ala Pro Val
 225 230 235 240

Lys Lys Ser Lys Lys
 245

- <210> 20
- <211> 738
- <212> ADN
- <213> Leishmania donovani

5

<400> 20

ES 2 670 520 T3

atggtgtctc tgaagctgca ggctcgcctt gcgtcgagca tcctcggctg cggccgcgcc 60
 cgcggtgtggc tggaccccaa cgaggcgggtg gagatccaga atgcgaactc gcgcaagagc 120
 gtgcaagc tgatcaagga tggcttcatc atccgcaagc cggatgaaggt gcaactcgcgc 180
 gcgcgggtggc gtaaaatgaa ggaggcgaag gacatggggc gccacaacgg cgttggccgc 240
 cgcgagggtta gccgcgaggc ccgcatgccg agcaaggagt tgtggatgcg ccgcctgcmc 300
 attctgcmc gcctgctgcm caagtaccgc gcggacaaga agatcgaccg ccaactgtac 360
 cgagacctgt acgtgcmc gaagggtaat gtgttccgca acaagcmca ccttgtggag 420
 cacatccaca agatcaagaa tgagaagaag aaggagcmcc agctggcmga gcagcttgcg 480
 gcgaagcacc tgcgcgacga gcagaaccgc aacaaggctc gcaagcagga gctgaggaag 540
 cgcgagaagg agcgcgagcm cgcgaggcm gcgacgctg ctgccgctgc gcagaagaag 600
 aaggcggacg ccgcgaagaa gtctgccgcm tctgctgcm agtctgccgc gcctgctgcm 660
 aagtctgccg cmcctgccgc gaaggttgct gcccccmca cgaagggtgc tgcgccggtg 720

5 aagaagtcga agaagtaa 738

<210> 21
 <211> 372
 <212> PRT
 <213> Trypanosoma cruzi

10 <400> 21

ES 2 670 520 T3

Met Val Ser Leu Lys Leu Gln Ala Arg Leu Ala Ala Asp Ile Leu Arg
1 5 10 15

Cys Gly Arg His Arg Val Trp Leu Asp Pro Asn Glu Ala Ser Glu Ile
20 25 30

Ser Asn Ala Asn Ser Arg Lys Ser Val Arg Lys Leu Ile Lys Asp Gly
35 40 45

Leu Ile Ile Arg Lys Pro Val Lys Val His Ser Arg Ser Arg Trp Arg
50 55 60

His Met Lys Glu Ala Lys Ser Met Gly Arg His Glu Gly Ala Gly Arg
65 70 75 80

Arg Glu Gly Thr Arg Glu Ala Arg Met Pro Ser Lys Glu Leu Trp Met
85 90 95

Arg Arg Leu Arg Ile Leu Arg Arg Leu Leu Arg Lys Tyr Arg Glu Glu
100 105 110

Lys Lys Ile Asp Arg His Ile Tyr Arg Glu Leu Tyr Val Lys Ala Lys
115 120 125

Gly Asn Val Phe Arg Asn Lys Arg Asn Leu Met Glu His Ile His Lys
130 135 140

Val Lys Asn Glu Lys Lys Lys Glu Arg Gln Leu Ala Glu Gln Leu Ala
145 150 155 160

Ala Lys Arg Leu Lys Asp Glu Gln His Arg His Lys Ala Arg Lys Gln
165 170 175

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

Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Lys Gln Lys Ala Ala Ala Lys Lys Ala
195 200 205

Ala Ala Pro Ser Gly Lys Lys Ser Ala Lys Ala Ala Thr Ala Pro Ala

ES 2 670 520 T3

210		215		220
Lys 225	Ala Ala Ala Ala	Pro 230	Ala Lys Ala Ala Ala	Ala Ala Pro Ala Lys Ala 235 240
Ala Ala Ala	Pro 245	Lys Ala Ala Ala	Ala Pro Ala Lys Ala Ala 250 255	
Ala Pro Ala	Lys 260	Ala Ala Thr Ala	Pro 265	Ala Lys Ala Ala Ala Pro 270
Ala Lys	Ala Ala Thr 275	Ala Pro Ala Lys	Ala Ala Ala Ala Pro Ala Lys 280 285	
Ala Ala Ala	Ala Pro 290	Ala Lys Ala Ala Thr	Ala Pro Ala Lys Ala Ala 295 300	
Ala Ala Pro	Ala Lys 305	Ala Ala Thr Ala Pro	Ala Lys Ala Ala Ala Ala 310 315 320	
Pro Ala Lys	Ala Ala Thr 325	Ala Pro Ala Lys	Ala Ala Ala Ala Pro Ala 330 335	
Lys Ala Ala	Ala Ala Pro 340	Ala Lys Ala Ala Thr	Ala Pro Ala Lys Ala 345 350	
Ala Thr	Ala Pro Ala Lys 355	Ala Ala Thr Ala Pro	Val Gly Lys Lys Ala 360 365	
Gly Gly Lys Lys 370				

<210> 22
 <211> 1119
 <212> ADN
 <213> Trypanosoma cruzi

5

<400> 22

ES 2 670 520 T3

atggtgtcgc tgaagctgca ggctcgtttg gcggcggaca ttctccgctg cggtcgccac 60
 cgtgtgtggc tggatcctaa tgaggcctct gagatttcca atgcaaactc gcgcaagagc 120
 gtgcgcaagt tgatcaagga tggctctgatt attcgcaagc ctgtcaaggt gcactcgcgc 180
 tcccgctggc gccacatgaa ggaggcgaag agcatgggcc gccacgaggg cgctgggcgc 240
 cgcgagggta cccgcgaagc ccgcatgccg agcaaggagc tgtggatgcg ccgtctgcgc 300
 attctccgcc gcctgctgcg caagtaccgc gaggagaaga agattgaccg ccacatctac 360
 cgcgagctgt acgtgaaggc gaaggggaac gtgtttcgca acaagcgtaa cctcatggag 420
 cacatccaca aggtgaagaa cgagaagaag aaggaaaggc agctggctga gcagctcgcg 480
 gcgaagcgcc tgaaggatga gcagcacctg cacaaggccc gcaagcagga gctgcgtaag 540
 cgcgagaagg accgcgagcg tgcgcgtcgc gaagatgctg ccgctgccgc cgccgcgaag 600
 cagaaagctg ctgcaagaa ggccgctgct ccctctggca agaagtccgc gaaggctgct 660
 actgcacctg cgaaggccgc tgctgcacct gcgaaggccg ctgctgcacc tgcgaaggct 720
 gctgctgcac ctgcaaggc tgctgctgca cctgcgaagg ctgctgctgc acctgcgaag 780
 gctgctactg cacctgcgaa ggccgctgct gcacctgcga aggctgctac tgcacctgcg 840
 aaggccgctg ctgcacctgc gaaggctgct gctgcacctg cgaaggctgc tactgcacct 900
 gcgaaggccg ctgctgcacc tgcgaaggct gctactgcac ctgcaaggc cgctgctgca 960
 cctgcgaagg ctgctactgc acctgcgaag gccgctgctg cacctgcgaa ggccgctgct 1020
 gcacctgcga aggctgctac tgcacctgcg aaggccgcta ctgcacctgc gaaggctgct 1080
 5 actgcacccg ttggaagaa ggctggtggc aagaagtga 1119

<210> 23
 <211> 356
 <212> PRT
 <213> Trypanosoma cruzi

10 <400> 23

ES 2 670 520 T3

Met Val Ser Leu Lys Leu Gln Ala Arg Leu Ala Ala Asp Ile Leu Arg
 1 5 10 15

Cys Gly Arg His Arg Val Trp Leu Asp Pro Asn Glu Ala Ser Glu Ile
 20 25 30

Ser Asn Ala Asn Ser Arg Lys Ser Val Arg Lys Leu Ile Lys Asp Gly
 35 40 45

Leu Ile Ile Arg Lys Pro Val Lys Val His Ser Arg Ser Arg Trp Arg
 50 55 60

His Met Lys Glu Ala Lys Ser Met Gly Arg His Glu Gly Ala Gly Arg
 65 70 75 80

Arg Glu Gly Thr Arg Glu Ala Arg Met Pro Ser Lys Glu Leu Trp Met
 85 90 95

Arg Arg Leu Arg Ile Leu Arg Arg Leu Leu Arg Lys Tyr Arg Glu Glu
 100 105 110

Lys Lys Ile Asp Arg His Ile Tyr Arg Glu Leu Tyr Val Lys Ala Lys
 115 120 125

ES 2 670 520 T3

Gly Asn Val Phe Arg Asn Lys Arg Asn Leu Met Glu His Ile His Lys
 130 135 140

Val Lys Asn Glu Lys Lys Lys Glu Arg Gln Leu Ala Glu Gln Leu Ala
 145 150 155 160

Ala Lys Arg Leu Lys Asp Glu Gln His Arg His Lys Ala Arg Lys Gln
 165 170 175

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

Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Lys Gln Lys Ala Ala Ala Lys Lys Ala
 195 200 205

Ala Ala Pro Ser Gly Lys Lys Ser Ala Lys Ala Ala Ala Pro Ala Lys
 210 215 220

Ala Ala Ala Ala Pro Ala Lys Ala Ala Ala Pro Pro Ala Lys Thr Ala
 225 230 235 240

Ala Ala Pro Ala Lys Ala Ala Ala Pro Ala Lys Ala Ala Ala Pro Pro
 245 250 255

Ala Lys Ala Ala Ala Pro Pro Ala Lys Thr Ala Ala Pro Pro Ala Lys
 260 265 270

Thr Ala Ala Pro Pro Ala Lys Ala Ala Ala Pro Pro Ala Lys Ala Ala
 275 280 285

Ala Pro Pro Ala Lys Ala Ala Ala Pro Pro Ala Lys Ala Ala Ala Ala
 290 295 300

Pro Ala Lys Ala Ala Ala Ala Pro Ala Lys Ala Ala Ala Pro Pro Ala
 305 310 315 320

Lys Ala Ala Ala Pro Pro Ala Lys Ala Ala Ala Pro Pro Ala Lys Ala
 325 330 335

Ala Ala Pro Pro Ala Lys Ala Ala Ala Ala Pro Val Gly Lys Lys Ala
 340 345 350

Gly Gly Lys Lys
 355

ES 2 670 520 T3

<210> 24
 <211> 1071
 <212> ADN
 <213> Trypanosoma cruzi

5 <400> 24

atggtgtcgc tgaagctgca ggctcgtttg gcgggcgaca ttctccgctg cggtcgccac 60
 cgtgtgtggc tggaccctaa tgaggcctct gagatctcca atgcaaactc gcgcaagagc 120
 gtgCGcaagt tgatcaagga tggctctgatt attcgcaagc ctgtcaaggt gcactcgcgc 180
 tcccgctggc gccacatgaa ggaggcgaag agcatgggcc gccacgaggg cgctgggcgc 240
 cgcgagggta cccgcgaagc ccgcatgccg agcaaggagc tgtggatgcg ccgtctgcgc 300
 attctccgcc gcctgctgcg caagtaccgc gaggagaaga agattgaccg ccacatttac 360
 cgcgagctgt acgtgaaggc gaaggggaac gtgtttcgca acaagcgtaa cctcatggag 420
 cacatccaca aggtgaagaa cgagaagaag aaggaaaggc agctggctga gcagctcgcg 480
 gcgaagcgcc tgaaggatga gcagcaccgt cacaaggccc gcaagcagga gctgCGtaag 540
 cgcgagaagg accgCGagcg tgcgCGtCGc gaagatgctg ccgctgCCgc cgCCgCGaag 600
 cagaaagctg ctgCGaagaa ggCCgctgct ccctctggca agaagtCCgc gaaggctgct 660
 gcacCCgCGa aggtgctgCt tgcacCCgCg aaggCCgctg ctccacCCgc gaagacCGct 720
 gctgCacCCg cgaaggctgCt tgcacctgCC aaggctgctg ctccacCCgc gaaggctgct 780
 gctccacCCg cgaagacCGc tgctccacCC gcgaagacCG ctgctccacC cgCGaaggct 840
 gctgctccac cCGcgaaggc cGctgctcca cCCgCGaagg cGctgctcc accCGcgaag 900
 gCCgctgctg caccCGcGaa ggCCgctgct gcacCCgCGa aggctgctgC tccacCCgCg 960
 aaggCCgctg ctccacCCgc gaaggctgct gctccacCCg cgaaggctgC tgctccacCC 1020
 gcgaaggctg ctgctgctcc cgttgGaaag aaggctggtg gcaagaagtg a 1071

<210> 25
 <211> 343
 <212> PRT
 <213> Trypanosoma cruzi

10

<400> 25

ES 2 670 520 T3

Met Val Ser Leu Lys Leu Gln Ala Arg Leu Ala Ala Asp Ile Leu Arg
1 5 10 15

Cys Gly Arg His Arg Val Trp Leu Asp Pro Asn Glu Ala Ser Glu Ile
20 25 30

Ser Asn Ala Asn Ser Arg Lys Ser Val Arg Lys Leu Ile Lys Asp Gly
35 40 45

Leu Ile Ile Arg Lys Pro Val Lys Val His Ser Arg Ser Arg Trp Arg
50 55 60

ES 2 670 520 T3

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

ES 2 670 520 T3

Ala Lys Ala Ala Ala Ala Pro Ala Lys Ala Ala Thr Ala Pro Val Gly
 325 330 335

Lys Lys Ala Gly Gly Lys Lys
 340

5 <210> 26
 <211> 1032
 <212> ADN
 <213> Trypanosoma cruzi

<400> 26

atggtgtcgc tgaagctgca ggctcgtttg gcggcggaca ttctccgctg cggtcgccac 60
 cgtgtgtggc tggaccctaa tgaggcctct gagatttcca atgcaaactc gcgcaagagc 120
 gtgCGcaagt tgatcaagga tggctctgatt attcGcaagc ctgtcaaggt gCactcgcgc 180
 tcccGctggc gccacatgaa ggaggcgaag agcatgggcc gccacgaggg cgctgggcgc 240
 cgcgagggta cccgcgaagc ccgcatgccg agcaaggagc tgtggatgcg ccgtctgcgc 300
 attctccgcc gcctgctgcg caagtaccgc gaggagaaga agattgaccg ccacatctac 360
 cgcgagctgt acgtgaaggc gaagggaac gtgtttcgca acaagcgtaa cctcatggag 420
 cacatccaca aggtgaagaa cgagaagaag aaggaaaggc agctggctga gcagctcgcg 480
 gcgaagcgcc tgaaggatga gcagcaccgt cacaaggccc gcaagcagga gctgcgtaag 540
 cgcgagaagg accgcgagcg tgcgcgtcgc gaagatgctg ccgctgccgc cgccgcgaag 600
 cagaaagctg ctgcgaagaa ggccgctgct ccctctggca agaagtccgc gaaggctgct 660
 attgcacctg cgaaggccgc tgctgcacct gcgaaggccg ctgctgcacc tgcgaaggct 720
 gctgctgcac ctgcgaaggc cgctgctgca cctgcgaagg ctgctgctgc acctgcgaag 780
 gctgctactg cacctgcgaa ggctgctgct gcacctgcca agaccgctgc tgcacctgcg 840
 aaggctgctg cacctgcgaa ggccgctgct gcacctgcga aggccgctac tgcacctgcg 900
 aaggctgctg ctgcacctgc gaaggccgct actgcacctg cgaaggctgc tactgcacct 960
 gcgaaggctg ctgctgcacc tgcgaaggcc gctactgcac ccgttgaaa gaaggctggt 1020
 ggcaagaagt ga 1032

10 <210> 27
 <211> 357
 <212> PRT
 <213> Trypanosoma cruzi

ES 2 670 520 T3

<400> 27

Met Val Ser Leu Lys Leu Gln Ala Arg Leu Ala Ala Asp Ile Leu Arg
 1 5 10 15
 Cys Gly Arg His Arg Val Trp Leu Asp Pro Asn Glu Ala Ser Glu Ile
 20 25 30

Ser Asn Ala Asn Ser Arg Lys Ser Val Arg Lys Leu Ile Lys Asp Gly
 35 40 45

Leu Ile Ile Arg Lys Pro Val Lys Val His Ser Arg Ser Arg Trp Arg
 50 55 60

His Met Lys Glu Ala Lys Ser Met Gly Arg His Glu Gly Ala Gly Arg
 65 70 75 80

Arg Glu Gly Thr Arg Glu Ala Arg Met Pro Ser Lys Glu Leu Trp Met
 85 90 95

Arg Arg Leu Arg Ile Leu Arg Arg Leu Leu Arg Lys Tyr Arg Glu Glu
 100 105 110

Lys Lys Ile Asp Arg His Ile Tyr Arg Glu Leu Tyr Val Lys Ala Lys
 115 120 125

Gly Asn Val Phe Arg Asn Lys Arg Asn Leu Met Glu His Ile His Lys
 130 135 140

Val Lys Asn Glu Lys Lys Lys Glu Arg Gln Leu Ala Glu Gln Leu Ala
 145 150 155 160

Ala Lys Arg Leu Lys Asp Glu Gln His Arg His Lys Ala Arg Lys Gln
 165 170 175

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

Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Lys Gln Lys Ala Ala Ala Lys Lys Ala
 195 200 205

Ala Ala Pro Ser Gly Lys Lys Ser Ala Lys Ala Ala Ala Pro Ala Lys
 210 215 220

Ala Ala Ala Ala Pro Ala Lys Thr Ala Ala Pro Pro Ala Lys Ala Ala
 225 230 235 240

Ala Pro Pro Ala Lys Ala Ala Ala Pro Pro Ala Lys Ala Ala Ala Pro
 245 250 255

Pro Ala Lys Ala Ala Ala Pro Pro Ala Lys Ala Ala Ala Pro Pro Ala
 260 265 270

ES 2 670 520 T3

Lys Ala Ala Ala Pro Pro Ala Lys Ala Ala Ala Pro Pro Ala Lys Ala
275 280 285

Ala Ala Pro Pro Ala Lys Ala Ala Ala Ala Pro Ala Lys Thr Ala Ala
290 295 300

Pro Pro Ala Lys Ala Ala Ala Ala Pro Ala Lys Thr Ala Ala Pro Pro
305 310 315 320

Ala Lys Thr Ala Ala Pro Pro Ala Lys Ala Ala Thr Pro Pro Ala Lys
325 330 335

Ala Ala Ala Pro Pro Ala Lys Ala Ala Ala Ala Pro Val Gly Lys Lys
340 345 350

Ala Gly Gly Lys Lys
355

- <210> 28
- 5 <211> 1074
- <212> ADN
- <213> Trypanosoma cruzi

<400> 28

ES 2 670 520 T3

atggtgtcgc tgaagctgca ggctcgtttg gcggcggaca ttctccgctg cggtcgccac 60
 cgtgtgtggc tggaccctaa tgaggcctct gagatttcca atgcaaactc gcgcaagagc 120
 gtgcgcaagt tgatcaagga tggctctgatt attcgcaagc ctgtcaaggt gcactcgcgc 180
 tcccgctggc gccacatgaa ggaggcgaag agcatgggcc gccacgaggg cgctggggcg 240
 cgcgagggta cccgcgaagc ccgcatgccg agcaaggagc tgtggatgcg ccgtctgcgc 300
 attctccgcc gcctgctgcg caagtaccgc gaggagaaga agattgaccg ccacatttac 360
 cgcgagctgt acgtgaaggc gaaggggaac gtgtttcgca acaagcgtaa cctcatggag 420
 cacatccaca aggtgaagaa cgagaagaag aaggaaaggc agctggctga gcagctcgcg 480
 gcgaagcgcc tgaaggatga gcagcaccgt cacaaggccc gcaagcagga gctgcgtaag 540
 cgcgagaagg accgcgagcg tgcgcgtcgc gaagatgctg ccgctgccgc cgccgcgaag 600
 cagaaagctg ctgcgaagaa ggccgctgct ccctctggca agaagtccgc gaaggctgct 660
 gcacctgcca aggctgctgc tgcaccgcg aagaccgctg ctccaccgc gaaggccgct 720
 gctccaccgc cgaaggctgc tgctccacc gcgaaggctg ctgctccacc cgcaaggct 780
 gctgctccac ccgcgaaggc tgctgctcca cccgcgaagg ctgctgctcc accgcgaag 840
 gctgctgctc caccgcgaa ggctgctgct ccaccgcga aggctgctgc tgcaccgcg 900
 aagaccgctg ctccaccgc gaaggctgct gctgcaccgc cgaagaccgc tgctccacc 960
 gcgaagaccg ctgctccacc cgcaaggcc gctactccac ccgcgaaggc tgctgctcca 1020
 5 cccgcgaagg ctgctgctgc tcccgttgg aagaaggctg gtggcaagaa gtga 1074

<210> 29
 <211> 260
 <212> PRT
 <213> Trypanosoma brucei

10 <400> 29

ES 2 670 520 T3

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

ES 2 670 520 T3

Ala Ala Pro Ala Ala Lys Lys Gly Gly Lys Ala Val Ala Pro Ala Thr
 210 215 220

Pro Ala Lys Ala Ala Pro Ala Lys Ala Ala Ala Ala Lys Val Ala Pro
 225 230 235 240

Ala Lys Ala Ala Pro Ala Lys Ala Ala Ser Pro Ala Gly Lys Lys Ala
 245 250 255

Ala Gly Lys Lys
 260

5 <210> 30
 <211> 783
 <212> ADN
 <213> Trypanosoma brucei

<400> 30

atggtgtcac tgaagctcca agctcgctg gcagcggaca tcctgcgctg cggccgcggc 60
 cgcgtgtggt tggaccctaa cgaagcagta gagattcgca atgccaattc acgcaagagt 120
 gtacgcaagt tgatcaaaga cggtttggtg atgcgaaagc ctgttaaggt gcattcgcgc 180
 tcccgcctggc gccagatgaa gttggcgaag agcatgggac gccacgaggg taccggccgc 240
 cgcgagggta ctgcggaagc acgcatgccc agcaaggacc tttggatgcg ccgacttcgc 300
 attcttcgcc gtttgcttcg caagtaccgc gaagaaaaga agattgatcg gcacatctac 360
 cgcgagctgt acatgaaggc aaagggcaac gtgttccgca acaagcgcaa cttatggag 420
 cacatccaca aggtgaagaa cgagaagaag aaggctcgtc agcttgctga gcaactcgcg 480
 gcgaaacgcc taaaggacga gcagaaccgc cgcaaggcac gaaagcagga gctgaagaag 540
 cgtgagaagg aacgtgagcg tgcacgccgt gacgatgccg ctgctgctgc cgctgccaaa 600
 caacgagctg ccgcgaagaa ggctgccgct cccgctgcca agaaggggtg caaggctggt 660
 gcccccgcca ctctgcgaa ggccgccct gcaaaggccg ccgctgcgaa ggttgcccca 720
 gcgaaggcgg ctcccgcaaa ggccgccagc cctgccggga agaaggcagc gggtaagaag 780
 tga 783

10 <210> 31
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> artificial

<220>
 <223> péptido 1

ES 2 670 520 T3

<400> 31

Met Thr Pro Leu Ser Leu Ser Ser Ser Arg His Ser Phe Lys Gln Asn
1 5 10 15

Glu Thr Gln Asn
20

5 <210> 32
<211> 20
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> péptido 2

10 <400> 32

Ser Phe Lys Gln Asn Glu Thr Gln Asn Met Val Ser Leu Lys Leu Gln
1 5 10 15

Ala Arg Leu Ala
20

15 <210> 33
<211> 20
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> péptido 3

<400> 33
Ser Leu Lys Leu Gln Ala Arg Leu Ala Ser Ser Ile Leu Gly Cys Gly
1 5 10 15

20 Arg Ala Arg Val
20

<210> 34
<211> 20
<212> PRT
<213> artificial

25 <220>
<223> péptido 4

<400> 34

ES 2 670 520 T3

Ile Leu Gly Cys Gly Arg Ala Arg Val Trp Leu Asp Pro Asn Glu Ala
 1 5 10 15

Val Glu Ile Gln
 20

5 <210> 35
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> artificial

<220>
 <223> péptido 5

<400> 35
 Asp Pro Asn Glu Ala Val Glu Ile Gln Asn Ala Asn Ser Arg Lys Ser
 1 5 10 15

10 Val Arg Lys Leu
 20

<210> 36
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> artificial

15 <220>
 <223> péptido 6

<400> 36
 Asn Ser Arg Lys Ser Val Arg Lys Leu Ile Lys Asp Gly Phe Ile Ile
 1 5 10 15

Arg Lys Pro Val
 20

20 <210> 37
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> artificial

<220>
 <223> péptido 7

25 <400> 37

Asp Gly Phe Ile Ile Arg Lys Pro Val Lys Val His Ser Arg Ala Arg
 1 5 10 15

Trp Arg Lys Met
 20

ES 2 670 520 T3

<210> 38
<211> 20
<212> PRT
<213> artificial

5 <220>
<223> péptido 8

<400> 38

His Ser Arg Ala Arg Trp Arg Lys Met Lys Glu Ala Lys Asp Met Gly
1 5 10 15

Arg His Asn Gly
20

10 <210> 39
<211> 20
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> péptido 9

15 <400> 39

Ala Lys Asp Met Gly Arg His Asn Gly Val Gly Arg Arg Glu Gly Ser
1 5 10 15

Arg Glu Ala Arg
20

20 <210> 40
<211> 20
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> péptido 10

<400> 40

25 Arg Arg Glu Gly Ser Arg Glu Ala Arg Met Pro Ser Lys Glu Leu Trp
1 5 10 15

Met Arg Arg Leu
20

30 <210> 41
<211> 20
<212> PRT
<213> artificial

ES 2 670 520 T3

Tyr Met Arg Ala Lys Gly Asn Val Phe Arg Asn Lys Arg Asn Leu Val
1 5 10 15

Glu His Ile His
20

5 <210> 45
<211> 20
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> péptido 15

<400> 45

Lys Arg Asn Leu Val Glu His Ile His Lys Ile Lys Asn Glu Lys Lys
1 5 10 15

10 Lys Glu Arg Gln
20

<210> 46
<211> 20
<212> PRT
<213> artificial

15 <220>
<223> péptido 16

<400> 46

Lys Asn Glu Lys Lys Lys Glu Arg Gln Leu Ala Glu Gln Leu Ala Ala
1 5 10 15

Lys His Leu Arg
20

20 <210> 47
<211> 20
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> péptido 17

25 <400> 47

Glu Gln Leu Ala Ala Lys His Leu Arg Asp Glu Gln Asn Arg Asn Lys
1 5 10 15

Ala Arg Lys Gln
20

ES 2 670 520 T3

<210> 48
<211> 20
<212> PRT
<213> artificial

5 <220>
<223> péptido 18

<400> 48

Gln Asn Arg Asn Lys Ala Arg Lys Gln Glu Leu Lys Lys Arg Glu Lys
1 5 10 15

Glu Arg Glu Arg
20

10 <210> 49
<211> 20
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> péptido 19

15 <400> 49

Lys Lys Arg Glu Lys Glu Arg Glu Arg Ala Arg Arg Asp Asp Ala Ala
1 5 10 15

Ala Ala Ala Gln
20

20 <210> 50
<211> 20
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> péptido 20

<400> 50

Arg Asp Asp Ala Ala Ala Ala Ala Gln Lys Lys Lys Ala Asp Ala Ala
1 5 10 15

Lys Lys Ser Ala
20

25 <210> 51
<211> 20
<212> PRT
<213> artificial

30 <220>
<223> péptido 21

ES 2 670 520 T3

<400> 51

Lys Ala Asp Ala Ala Lys Lys Ser Ala Ala Pro Ala Ala Lys Ser Ala
1 5 10 15

Ala Pro Ala Ala
20

<210> 52

<211> 20

5 <212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> péptido 22

<400> 52

Ala Ala Lys Ser Ala Ala Pro Ala Ala Lys Ala Ala Ala Pro Ala Thr
1 5 10 15

Lys Ala Ala Ala
10 20

<210> 53

<211> 20

<212> PRT

<213> artificial

15 <220>

<223> péptido 23

<400> 53

Ala Ala Pro Ala Thr Lys Ala Ala Ala Ala Ala Pro Ala Thr Lys Gly
1 5 10 15

Ala Ala Pro Val
20

<210> 54

20 <211> 14

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> péptido 24

25 <400> 54

Pro Ala Thr Lys Gly Ala Ala Pro Val Lys Lys Ser Lys Lys
1 5 10

ES 2 670 520 T3

<210> 55
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> artificial

5 <220>
 <223> péptido 1-2

<400> 55

Met Thr Pro Leu Ser Leu Ser Ser Ser Arg His Ser Phe Lys Gln Asn
 1 5 10 15

Glu Thr Gln Asn Met Val Ser Leu Lys Leu Gln Ala Arg Leu Ala
 20 25 30

10 <210> 56
 <211> 42
 <212> PRT
 <213> artificial

<220>
 <223> péptido 12-13-14

15 <400> 56

Leu Arg Arg Leu Leu Arg Lys Tyr Arg Ala Asp Lys Lys Ile Asp Arg
 1 5 10 15

His Val Tyr Arg Asp Leu Tyr Met Arg Ala Lys Gly Asn Val Phe Arg
 20 25 30

Asn Lys Arg Asn Leu Val Glu His Ile His
 35 40

20 <210> 57
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> artificial

<220>
 <223> péptido 23-24

<400> 57

Ala Ala Pro Ala Thr Lys Ala Ala Ala Ala Ala Pro Ala Thr Lys Gly
 1 5 10 15

Ala Ala Pro Val Lys Lys Ser Lys Lys
 20 25

25

REIVINDICACIONES

1. Molécula de ácido nucleico capaz de inducir una respuesta antiinflamatoria para uso como medicamento, donde dicha molécula de ácido nucleico está representada por una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en:
- 5 i. secuencias de nucleótidos que codifican un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 89% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°:1,
 ii. secuencias de nucleótidos que comprenden una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 89% de identidad de secuencia con la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID N°:2,
 10 iii. secuencias de nucleótidos cuya cadena complementaria se hibrida a una molécula de ácido nucleico de la secuencia de (i) o (ii) y
 iv. secuencias de nucleótidos cuyas secuencias difieren de la secuencia de una molécula de ácido nucleico de (iii) debido a la degeneración del código genético.
2. Polipéptido capaz de inducir una respuesta antiinflamatoria para uso como medicamento, donde dicho polipéptido está codificado por una molécula de ácido nucleico como se identifica en la reivindicación 1.
- 15 3. Molécula de ácido nucleico o polipéptido para uso como medicamento según las reivindicaciones 1 o 2, donde dicha molécula de ácido nucleico o polipéptido deriva o se origina a partir de *Leishmania major*, *Leishmania braziliensis*, *Leishmania infantum*, *Leishmania Mexicana* o *Leishmania donovani*.
4. Molécula de ácido nucleico o polipéptido para uso como medicamento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde dicho uso es para prevenir o tratar un trastorno inflamatorio en un individuo.
- 20 5. Molécula de ácido nucleico capaz de inducir una respuesta antiinflamatoria para uso como medicamento según la reivindicación 1, 3 o 4, donde la molécula de ácido nucleico es un oligonucleótido que comprende al menos 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100 o más nucleótidos contiguos de la SEQ ID N°: 2.
- 25 6. Polipéptido capaz de inducir una respuesta antiinflamatoria para uso como medicamento según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, donde el polipéptido es un fragmento de proteína que comprende al menos 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 265 o 267 aminoácidos contiguos de la SEQ ID N°: 1.
7. Polipéptido capaz de inducir una respuesta antiinflamatoria para uso como medicamento según la reivindicación 6, que comprende al menos 14 aminoácidos contiguos de la SEQ ID N°: 1 y que comprende la SEQ ID N°: 31, 32, 55, 42, 43, 44, 56, 53, 54 y/o 57.
- 30 8. Molécula de ácido nucleico o polipéptido para uso como medicamento de acuerdo con la reivindicación 4, donde el trastorno inflamatorio es artritis reumatoide (AR), artritis reumatoide juvenil, psoriasis, artritis psoriásica, espondilitis anquilosante, enfermedad inflamatoria intestinal incluyendo enfermedad de Crohn o colitis ulcerativa, hepatitis, sepsis, hepatopatía alcohólica y esteatosis no alcohólica, sarcoidosis, diabetes autoinmune, diabetes mellitus, uveítis, esclerosis múltiple, control del rechazo de aloinjerto después de un trasplante de órgano,
- 35 enfermedad de injerto contra huésped (EICH), enfermedades inflamatorias pulmonares como el asma y la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), cáncer, lupus eritematoso sistémico (LES), sarcoidosis y dermatitis atópica.
9. Composición que comprende al menos una molécula de ácido nucleico y/o un polipéptido como se define en cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde la composición es una composición farmacéutica que comprende un vehículo, adyuvante, sal, diluyente y/o excipiente farmacéuticamente aceptable, y donde dicha composición es para uso como medicamento para prevenir o tratar un trastorno inflamatorio en un individuo.
- 40 10. Composición para uso según la reivindicación 9, donde el trastorno inflamatorio es artritis reumatoide (AR), artritis reumatoide juvenil, psoriasis, artritis psoriásica, espondilitis anquilosante, enfermedad inflamatoria del intestino incluyendo enfermedad de Crohn o colitis ulcerosa, hepatitis, sepsis, enfermedad hepática alcohólica, y esteatosis no alcohólica, sarcoidosis, diabetes autoinmune, diabetes mellitus, uveítis, esclerosis múltiple, control del rechazo de aloinjerto después del trasplante de órganos, enfermedad de injerto contra huésped (EICH), enfermedades inflamatorias pulmonares, incluyendo asma y enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), cáncer, lupus eritematoso sistémico (LES), sarcoidosis y dermatitis atópica.
- 45

Fig 2a

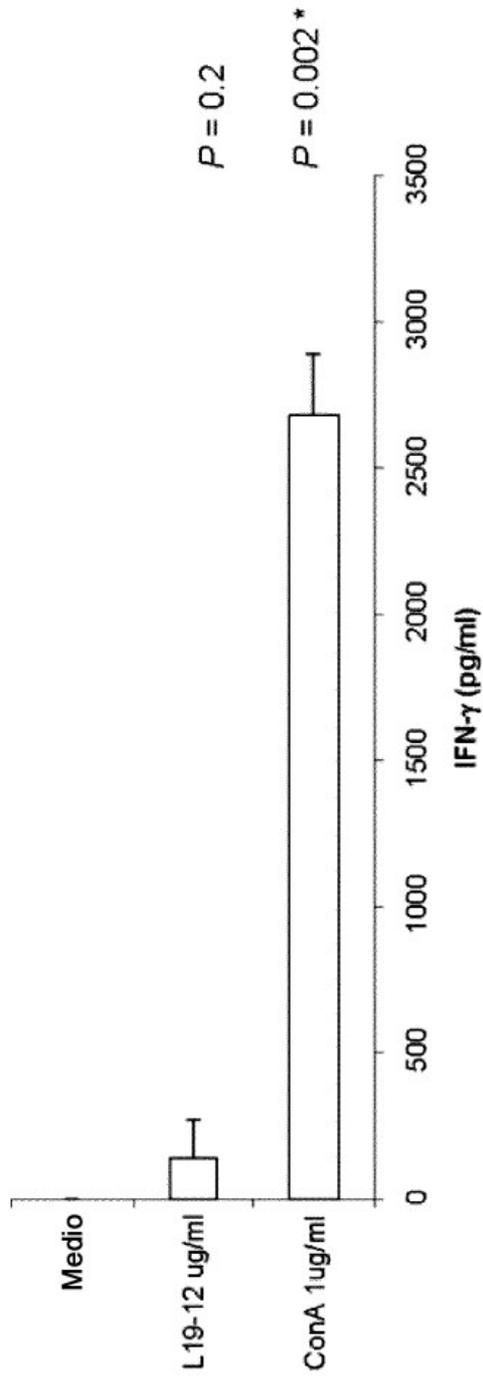
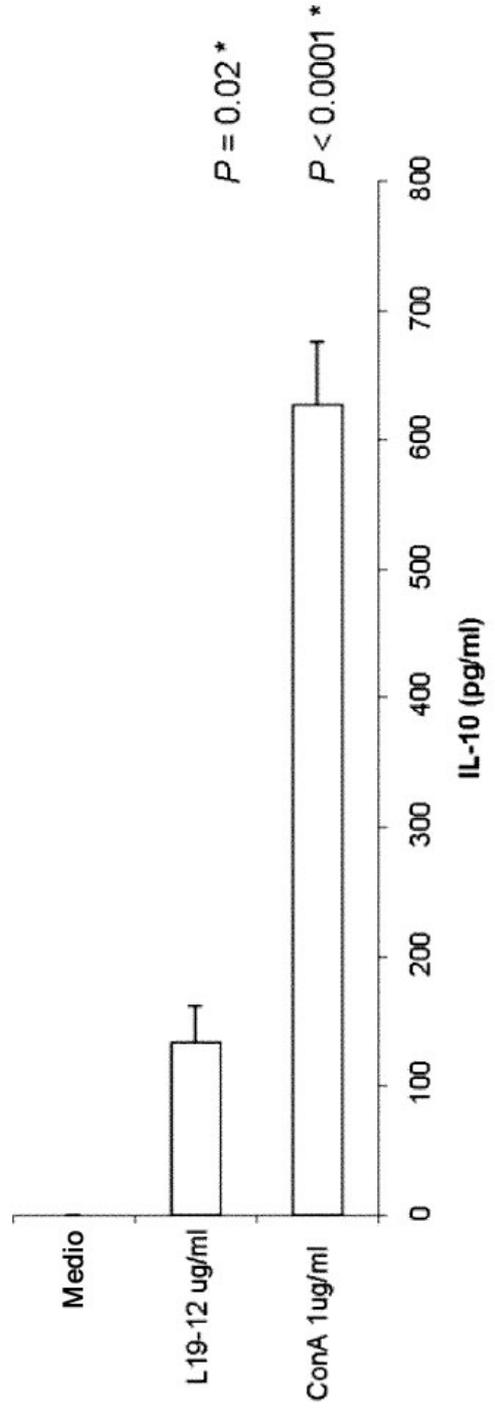


Fig 2b



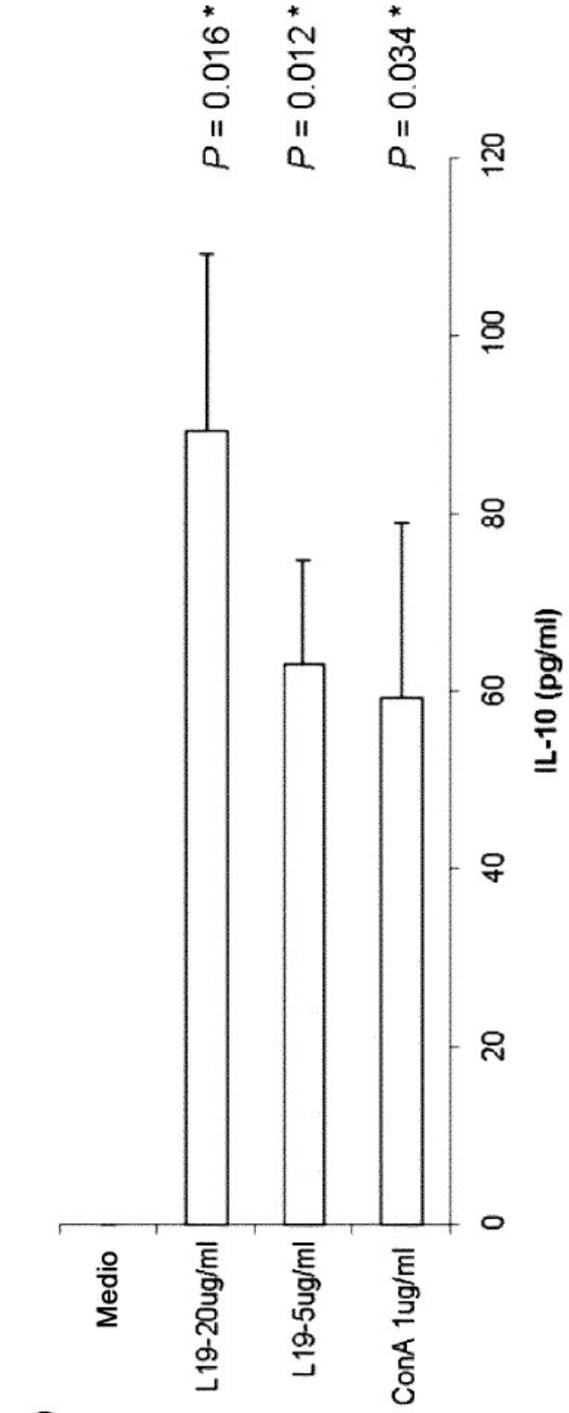
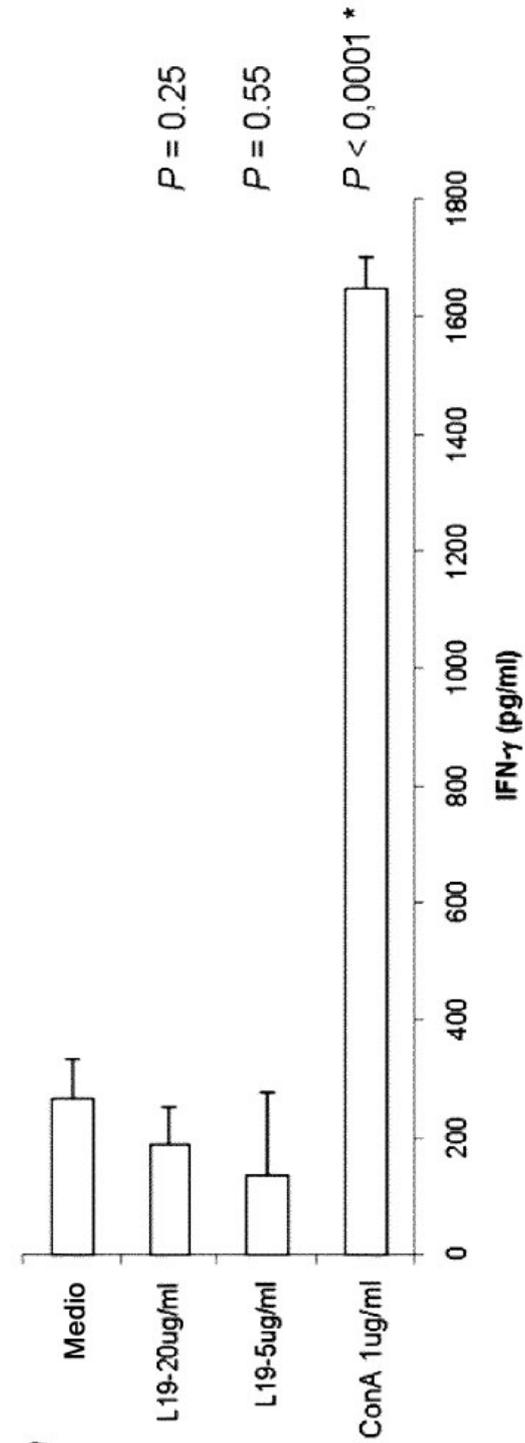


Fig 4

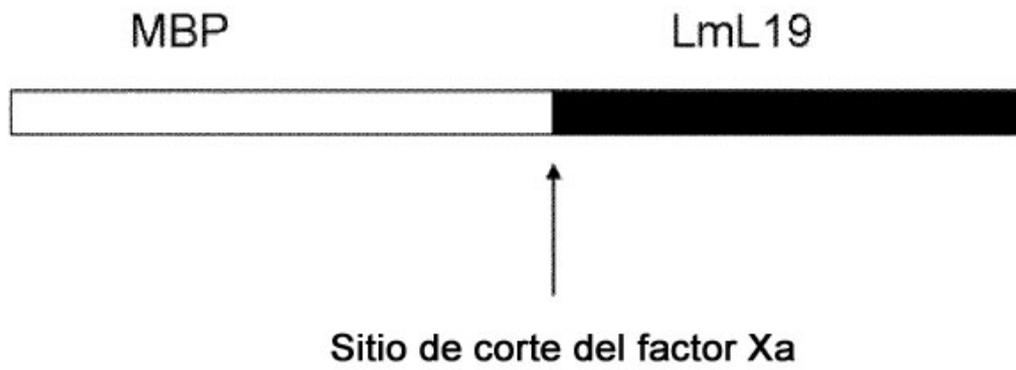


Fig 5

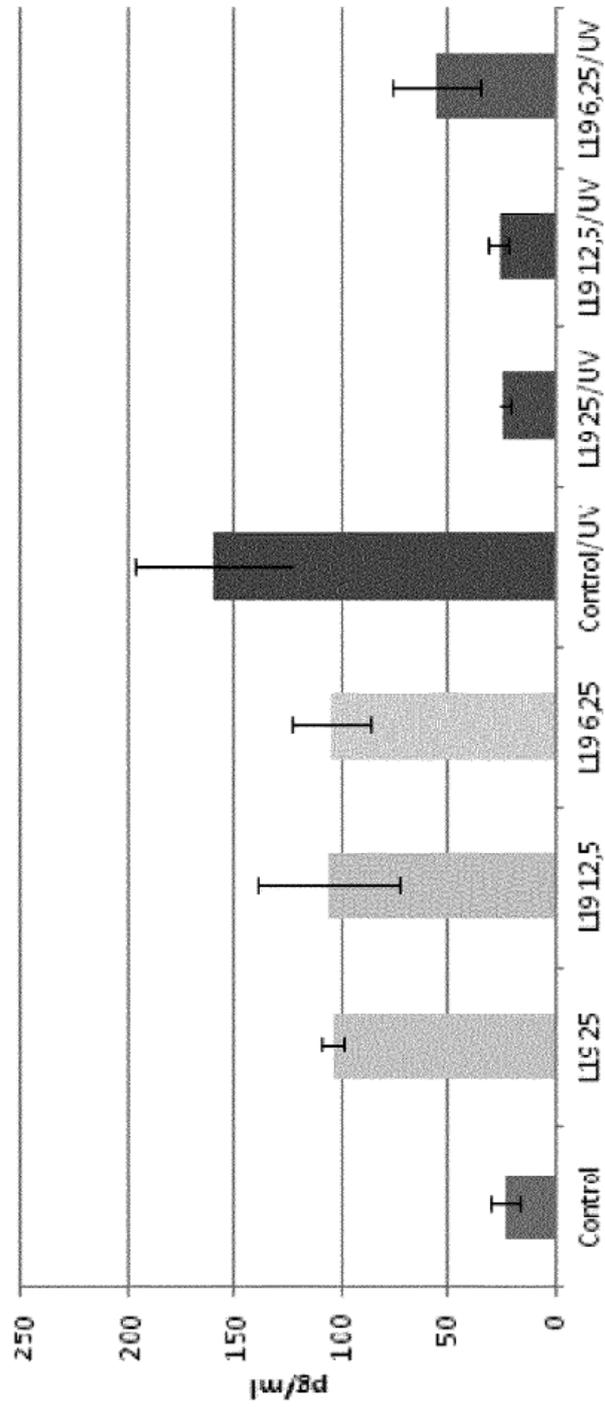


Fig 6

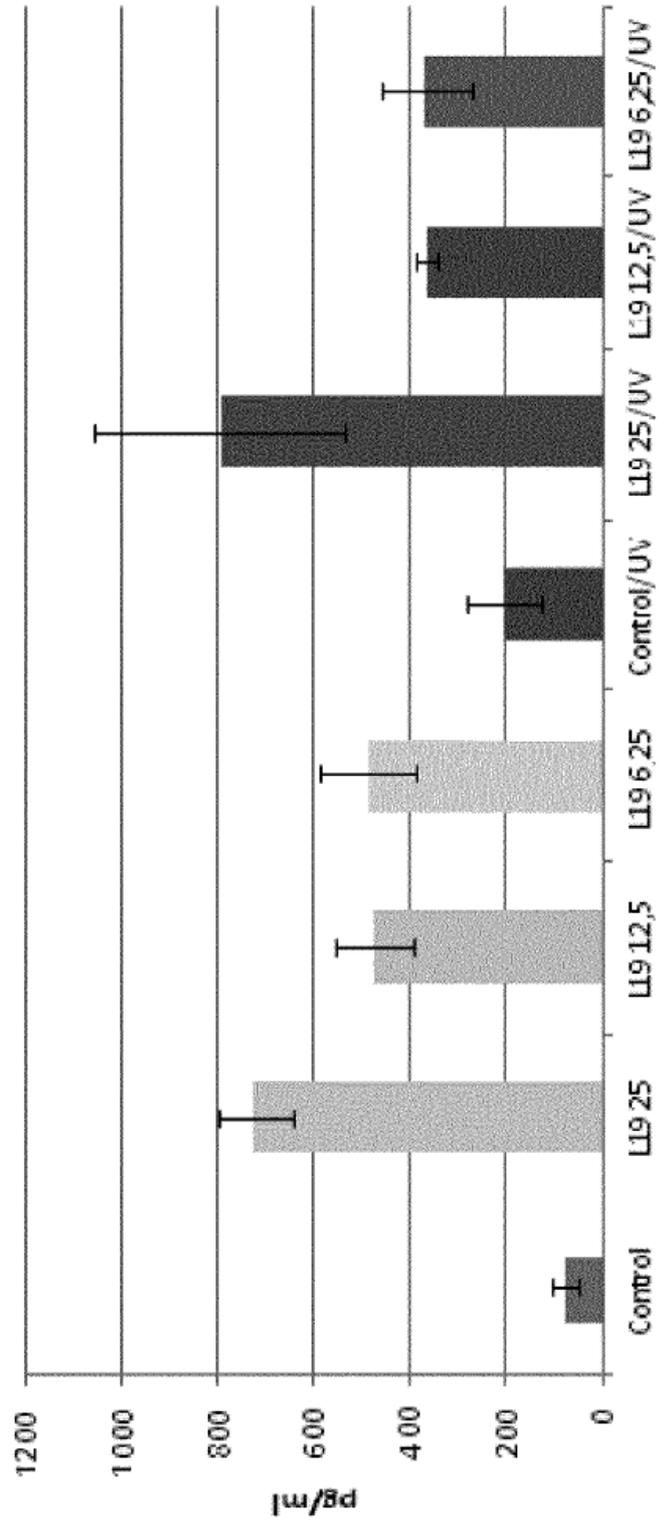


Fig 7

