

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 676 029**

51 Int. Cl.:

A61K 39/015 (2006.01)

C07K 14/445 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.02.2013** **PCT/EP2013/052557**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.08.2013** **WO13117705**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.02.2013** **E 13704077 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.04.2018** **EP 2812024**

54 Título: **Direccionamiento de glicanos de sulfato de condroitina**

30 Prioridad:

09.02.2012 US 201261596931 P

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

16.07.2018

73 Titular/es:

VAR2 PHARMACEUTICALS APS (100.0%)

Ole Maaløes Vej 3

2200 Copenhagen N, DK

72 Inventor/es:

SALANTI, ALI;

THEANDER, THOR, GRUNDTVIG;

DAUGAARD, MADS;

NIELSEN, MORTEN;

DAHLBÄCK, MADELEINE y

CLAUSEN, THOMAS, MANDEL

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 676 029 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

Direccionamiento de glicanos de sulfato de condroitina

Campo de la invención

La presente invención se refiere a fragmentos de unión funcionales que comprenden los fragmentos de unión mínimos de VAR2CSA, a anticuerpos contra tales fragmentos de unión de VAR2CSA, ácidos nucleicos que codifican dichos fragmentos de VAR2CSA, así como a procedimientos para su producción. La invención además se refiere a conjugados y proteínas de fusión de polipéptidos VAR2CSA que incluyen los fragmentos de unión mínimos y su uso, en particular en el tratamiento de afecciones asociadas con la expresión de sulfato de condroitina A (CSA, del inglés "chondroitin sulfate A"), tal como una expresión inapropiada de sulfato de condroitina A (CSA).

Antecedentes de la invención

Los proteoglicanos son proteínas conjugadas con una o más cadenas de glicosaminoglicanos (GAG). Estas proteínas se distribuyen dentro de las células, en la membrana celular y en la matriz extracelular y cumplen una diversidad de funciones: formación de la matriz del cartilago; la organización estructural de tejidos; organizaciones de membranas basales; regulación del papel de las vesículas secretoras; unión de citoquinas, quimiocinas, factores de crecimiento y morfógenos; receptores de proteasa e inhibidores de proteasa; correceptores, receptores del factor de crecimiento tipo tirosina-quinasa; como receptores endocíticos; facilitar la unión celular, interacciones célula-célula y motilidad celular, así como, migración celular.

El parásito de la malaria *Plasmodium falciparum* utiliza proteoglicanos de células hospedadoras en casi todas las etapas de su complejo ciclo de vida. El esporozoito infecta a hepatocitos en el hígado a través de la proteína circunsporozoita expresada en la superficie que interactúa con los proteoglicanos de heparán sulfato altamente sulfatados (HSPG, del inglés "heparan sulfate proteoglycans"). La infección por merozoitos de los eritrocitos está mediada por la unión de EBA-175 a ácido siálico en la glicoforina A. Además, varias proteínas de la proteína 1 de membrana de eritrocitos de *Plasmodium falciparum* (PfEMP1, del inglés "Plasmodium falciparum Erythrocyte Membrane Protein 1"), que median la adhesión endotelial del hospedador, se han descrito como de unión de glicanos. Una de estas es VAR2CSA, que es el único miembro de la familia de proteínas PfEMP1. VAR2CSA se une con alta afinidad a una forma poco sulfatada e inusual de sulfato de condroitina A (CSA), unido a proteoglicanos, llamado proteoglicano de sulfato de condroitina (CSPG, del inglés "Chondroitin Sulfate Proteoglycan"), en los espacios intervellosos de la placenta. VAR2CSA es una gran proteína multidominio (350 kDa) expresada en la superficie de eritrocitos infectados (IE, del inglés "infected erythrocytes") por *P. falciparum*, y la interacción VAR2CSA-CSA es responsable del secuestro de placenta específico en la malaria placentaria (PM, del inglés "placental malaria"). De forma importante, el ectodominio de VAR2CSA de longitud completa recombinante de parásitos de tipo FCR3 y 3D7 ha mostrado afinidad por CSA en el intervalo nano-molar bajo.

CSA pertenece a la familia de glicosaminoglicanos (GAG), que son polímeros lineales de aminoazúcares alternantes y restos de ácido hexurónico, unidos a proteoglicanos. Existen diversos tipos de GAG que incluyen; sulfato de condroitina (CS, del inglés "chondroitin sulfate"), dermatán sulfato (DS o CSB), heparán sulfato (HS) y heparina. Si bien la cadena principal del polisacárido de estos GAG es simple, se produce una considerable diversidad en modificaciones tales como la sulfatación y la epimerización del uronato. Esta es la base para la amplia variedad en estructura de dominio y actividades biológicas de diferentes GAG.

CS interactúa con muchos factores importantes tales como hormonas de crecimiento, citoquinas, quimiocinas y moléculas de adhesión y se cree que está implicado en estabilización estructural, citocinesis, proliferación celular, diferenciación, migración celular, morfogénesis tisular, organogénesis, infección y reparación de lesiones. Las cadenas de CS se componen de unidades alternas de N-acetil-D-galactosamina (GalNAc) y restos de ácido glucurónico. El ácido glucurónico se puede sulfatar en su posición C2 y GalNAc se puede sulfatar en C4 y/o C6, dando lugar a diversas unidades de disacáridos. Modificaciones variables de la cadena principal de azúcar permiten heterogeneidad estructural y funcional de las cadenas de CS. Los parásitos de *P. falciparum* que se adhieren a placenta se asocian específicamente con CSA poco sulfatado con sulfatación solo en C4 de GalNAc.

Los primeros estudios identificaron a CSA como responsable del secuestro de IE en la placenta. El receptor específico, sin embargo, no se conoce. Tras investigaciones posteriores, se descubrió que la placenta humana contenía tres tipos distintos de proteoglicanos de sulfato de condroitina (CSPG), pero que los IE se adherían específicamente a CSPG poco sulfatados en los espacios intervellosos. Lo que es especial para este tipo de CSPG es que solo el 2-8% de las unidades de disacáridos están sulfatadas en C4. En un estudio acompañante, dirigido a identificar los requisitos estructurales específicos para el CSA, se encontró que la adhesión del parásito a CSPG se inhibe mediante CSA que contiene entre 30-50% de sulfatación en C4, con el 50-70% restante de unidades de disacárido sin sulfatar. Se demostró que la inhibición mínima de requisitos de unión para CSA es un dodecasacárido (seis disacáridos) que contiene un mínimo de 2-3 o 4-5 unidades de disacárido sulfatadas en C4.

El proteoglicano 4 de sulfato de condroitina (CSPG4, del inglés "Chondroitin sulfate proteoglycan 4"), también conocido como antígeno asociado a melanoma de alto peso molecular (HMW-MAA, del inglés "High Molecular Weight-Melanoma Associated Antigen") o proteoglicano de sulfato de condroitina asociado a melanoma (MSCP, del

inglés "melanoma-associated chondroitin sulfate proteoglycan"), es un proteoglicano de la superficie celular que se ha demostrado que se expresa mediante células de melanoma.

CSPG4/MSCP/HMV-MAA es un gran proteoglicano que se caracteriza por tener cadenas de CS en la cadena principal de la proteína. La sulfatación de estas cadenas de CS parece estar principalmente en C4 de GalNAc (CSA), aunque el grado de sulfatación no se conoce.

Objeto de la invención

Es un objeto de las realizaciones de la invención proporcionar fragmentos de unión funcionales mínimos de VAR2CSA adecuados para la dirección y/o detección de glicanos de sulfato de condroitina. Otros objetos de las realizaciones de la invención son proporcionar procedimientos para tratar afecciones asociadas con la expresión, tal como expresión inapropiada de los glicanos de sulfato de condroitina, tales como CSA, en los que polipéptidos VAR2CSA o fragmentos de los mismos, solos o como parte de conjugados o proteínas de fusión se utilizan para dirigir y/o detectar tejido o células que tienen una expresión, tal como expresión inapropiada de los glicanos de sulfato de condroitina.

Sumario de la invención

Los presentes inventores han descubierto que VAR2CSA conserva su capacidad de unirse con alta afinidad y especificidad a ciertos proteoglicanos de sulfato de condroitina con elementos estructurales mínimos de la secuencia polipeptídica. Más importante aún, los presentes inventores han encontrado que polipéptidos VAR2CSA se unen con afinidad alta y específica a células y tejidos cancerosos, cuya unión se sugiere, por los presentes inventores, a través de una interacción específica con proteoglicanos de sulfato de condroitina expresados en la superficie de las células cancerosas o en la matriz extracelular circundante. Por consiguiente, los presentes inventores sugieren utilizar esta unión específica y de alta afinidad para dirigir las células cancerosas u otros tejidos o células con expresión alta o de otra manera, tal como expresión inapropiada de este tipo particular de proteoglicanos de sulfato de condroitina.

Por lo tanto, en un primer aspecto, la presente invención se refiere a un fragmento de proteína aislado de VAR2CSA, cuyo fragmento consiste en una secuencia de aminoácidos secuencial de

- a) ID1 y
- b) DBL2Xb y, opcionalmente,
- c) ID2a.

En algunas realizaciones el fragmento de proteína aislado de VAR2CSA de acuerdo con la presente invención comprende ID2a. Además, en el presente documento se describe un anticuerpo que se une específicamente a un fragmento de proteína de VAR2CSA, cuyo fragmento consiste en una secuencia de aminoácidos secuencial de a) ID1 y b) DBL2Xb y, opcionalmente, c) ID2a. En algunos casos, el anticuerpo no se une a polipéptidos VAR2CSA de cadena completa. La presente descripción, además, se refiere a moléculas de ácidos nucleicos que codifican un fragmento de proteína de VAR2CSA, cuyo fragmento consiste en una secuencia de aminoácidos secuencial de a) ID1 y b) DBL2Xb y, opcionalmente, c) ID2a. La descripción, además, se refiere a una sonda de ácidos nucleicos capaz de hibridar con dicha secuencia de ácidos nucleicos en condiciones rigurosas.

En un aspecto adicional la descripción se refiere a un vector que comprende una molécula de ácidos nucleicos aislada de acuerdo con la invención.

En un aspecto adicional, la presente descripción se refiere a una célula hospedadora que comprende un vector una molécula de ácidos nucleicos aislada de acuerdo con la invención. También se describe un procedimiento para producir el fragmento de proteína de acuerdo con la invención, comprendiendo el procedimiento cultivar una célula como se define en el presente documento en un medio de crecimiento apropiado en condiciones que permiten la expresión de la construcción del polinucleótido y recuperar el fragmento de proteína resultante del medio de cultivo.

En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a un conjugado o proteína de fusión que comprende un polipéptido VAR2CSA y una fracción efectora terapéutica o de diagnóstico, tal como una fracción citotóxica, marcador fluorescente y/o un radiomarcador.

Debe entenderse que para un conjugado, proteína de fusión o quimérica que comprende un polipéptido VAR2CSA, puede utilizarse, como se define en el presente documento, cualquier polipéptido VAR2CSA. Por consiguiente, este aspecto no se limita a utilización de fragmentos de unión mínimos. Esto se aplica siempre que se utiliza la expresión polipéptido VAR2CSA y por consiguiente son igualmente relevantes cuando se utilizan para tratamiento médico, selección o diagnóstico.

En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a una composición que comprende un conjugado de acuerdo con la invención.

En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a un fragmento de proteína como se define en el presente documento o a un conjugado de acuerdo con la invención para su uso como un medicamento o agente de

diagnóstico. También se describe en el presente documento un fragmento de proteína, como se define en el presente documento, el anticuerpo de acuerdo con la invención, un polipéptido VAR2CSA o un conjugado de acuerdo con la invención para su uso en diagnóstico.

En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un conjugado de acuerdo con la invención. Además, se describe, en el presente documento, un procedimiento para detectar un fragmento de proteína como se define en el presente documento, o un conjugado de acuerdo con la invención en una muestra simple, comprendiendo dicho procedimiento: a) obtener una muestra biológica; b) poner en contacto dicha muestra biológica con un anticuerpo de acuerdo con la invención; y c) detectar complejos de dicho anticuerpo y dicho fragmento de proteína o conjugado, si los hay; como una indicación de la presencia de dicho fragmento de proteína o conjugado en dicha muestra.

Por consiguiente, se proporcionan procedimientos para medir el nivel de fragmentos de proteína de VAR2CSA en una muestra biológica. Estos se pueden utilizar y aplicar como parte de un tratamiento, para controlar el progreso de un tratamiento o, alternativamente, como parte de un procedimiento de producción que produce polipéptidos VAR2CSA de acuerdo con la presente invención.

En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a la utilización de un conjugado de acuerdo con la invención; para la preparación de un medicamento.

En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a un conjugado de acuerdo con la invención para el tratamiento de cualquier indicación asociada con cáncer. En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a un procedimiento para el tratamiento de cáncer, comprendiendo el procedimiento la administración de cantidades terapéuticamente o profilácticamente eficaces de un conjugado de acuerdo con la invención a un sujeto que lo necesite. También se describe, en el presente documento, un procedimiento para la prevención de la aparición de una indicación o afección asociada con la expresión, tal como expresión inapropiada de CSA, tal como en cáncer, esclerosis múltiple, artritis, artrosis, afecciones patológicas causadas por daño neuronal, afecciones del cartílago y tejido cicatricial, tal como en reumatismo, reparación del cartílago o curación de lesiones, o en psoriasis; comprendiendo el procedimiento la administración de una cantidad terapéuticamente o profilácticamente eficaz de un fragmento de proteína como se define en el presente documento, un polipéptido VAR2CSA o un conjugado de acuerdo con la invención a un sujeto que lo necesite.

En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a la utilización de un conjugado de acuerdo con la invención, como un biomarcador, tal como herramienta para detectar expresión, como expresión inapropiada de CSA en fluidos corporales como sangre, plasma, orina, saliva, heces, fluido cerebroespinal, linfa, fluido gástrico, fluido pleural, fluido de cartílago, esperma y/o tejido para el diagnóstico y/o pronóstico de la enfermedad del cáncer, tal como tumores cerebrales, tumores hepáticos y tumores en el tracto reproductivo.

Debe entenderse que tal como se utiliza en el presente documento, el término biomarcador pretende referirse a la utilización de conjugados y proteínas de fusión de acuerdo con la presente invención cuando se introduce en un organismo para detectar la expresión de CSA como un medio para el diagnóstico y/o pronóstico de una indicación o afección asociada con la expresión de CSA, tal como expresión inapropiada de CSA. También se describe en el presente documento la utilización de un fragmento de proteína, como se define en el presente documento, un polipéptido VAR2CSA o un conjugado de acuerdo con la invención para la inmunización de un sujeto, tal como una vacuna.

En un aspecto adicional, se describe en el presente documento la utilización de un fragmento de proteína, como se define en el presente documento, un polipéptido VAR2CSA o un conjugado de acuerdo con la invención, como una fracción de direccionamiento para el aislamiento de una célula que expresa CD44 y/o CSPG4, y/o cualquier otro proteoglicano, tal como un proteoglicano enumerado en la tabla 1.

Tabla 1. Moléculas potenciales dirigidas por un polipéptido VAR2CSA

Proteína ID 1	Proteína ID 2	Nombre génico
NG2	CSPG4	cspg4
Neuroglicano y	CSPG5	ngc
Neuroglicano C		
Neuropilin 1 CS	NRP-1-CS	NRP1
APLP2 y APP (y cuando se agrega CSA, las proteínas se llaman Appicans)	proteína 2 de tipo precursora del amiloide	APLP2
Snorc		Snorc
Trombomodulina,	CD141	THBD

(continuación)

Proteína ID 1	Proteína ID 2	Nombre génico
Tomoregulina-2	TENB2	TMEFF2
Betaglicano	Receptor III del factor de crecimiento transformante	TGFB3
Syndecan 1	CD138	SDC1
Syndecan 2	CD362	SDC2
Syndecan 3		SDC3
Syndecan 4	Amfiglicano	SDC4
CSPG8	CSPG8	Cd44
Glicano 1-6 (kun 1 og 5)		GPC1-6
Brevican	CSPG7	bcan
lubricin	Proteoglicano 4	<i>PRG4</i>
Proteína 1 de matriz de dentina		DMP1
Neurocan	CSPG3	ncan
Versican	CSPG2	vcn
Aggrecan	CSPG1	acan
Bamecan	CSPG6	smc3
SRPX2	Proteína que contiene repetición de sushi	SRPX2
Serglycin	Proteína del núcleo de proteoglicano hematopoyético	SRGN
Decorin	Familia de proteoglicanos pequeños ricos en leucina (SLRP)	dcn
Biglycan	Familia de proteoglicanos pequeños ricos en leucina (SLRP)	bgn
Lumican	Familia de proteoglicanos pequeños ricos en leucina (SLRP)	lum
Fibromodulin	Familia de proteoglicanos pequeños ricos en leucina (SLRP)	fmod
Keratocan	Familia de proteoglicanos pequeños ricos en leucina (SLRP)	kera
Mimecan	osteoglicano	ogn
Testican 1-3	BM-40/SPARC/osteonectina	<i>SPOCK1</i>
	Familia de proteínas de unión a calcio extracelular.	
fosfacano	Receptor de tipo Z de la proteína tirosina fosfatasa	<i>PTPRZ1</i>
Leprecan	Proteoglicano 1 enriquecido con Prolina de Leucina	LEPRE1
Perlecan	proteína del núcleo de proteoglicano heparán sulfato específico de la membrana basal	HSPG2

También se describe en el presente documento un procedimiento para el aislamiento de células que expresan CD44 y/o CSPG4, y/o cualquier otro proteoglicano, tal como un proteoglicano enumerado en la tabla 1, tal como células madre del cáncer en una muestra biológica, comprendiendo dicho procedimiento:

- a) obtener una muestra biológica que comprende células que expresan CD44 y/o CSPG4 y/o cualquier otro proteoglicano, tal como un proteoglicano enumerado en la tabla 1;
- b) poner en contacto dicha muestra biológica con un fragmento de proteína como se define en el presente documento, un polipéptido VAR2CSA o un conjugado de acuerdo con la invención, opcionalmente acoplado a un soporte sólido; y
- c) purificar y aislar los complejos de dichas células que expresan CD44 y/o CSPG4, y/o cualquier otro proteoglicano, tal como un proteoglicano enumerado en la tabla 1 y dicho fragmento de proteína o conjugado.

Además, se describe en el presente documento un procedimiento de diagnóstico para detectar niveles elevados de CSA en un fluido corporal, tal como sangre, plasma, orina, fluido espinal, derrames de pleura, fluido articular, médula ósea, fluido gástrico, excrementos, semen, esperma, fluido de próstata, saliva, fluido de los ojos, aspirado pulmonar y linfa, en respuesta a una malignidad u otra afección asociada con expresión inapropiada de CSA, comprendiendo el procedimiento las fases de poner en contacto dicho fluido corporal con un fragmento de proteína como se define en el presente documento, un polipéptido VAR2CSA o un conjugado de acuerdo con la invención y detectar los complejos formados con CSA en dicho fluido corporal. También se describe en el presente documento un procedimiento para la purificación de CD44 y/o CSPG4, y/o cualquier otro proteoglicano, tal como un proteoglicano enumerado en la tabla 1 en una muestra biológica, comprendiendo dicho procedimiento:

- 5 a) obtener una muestra biológica que comprende CD44 y/o CSPG4 y/o cualquier otro proteoglicano, tal como un proteoglicano enumerado en la tabla 1;
- b) poner en contacto dicha muestra biológica con un fragmento de proteína como se define en el presente documento, un polipéptido VAR2CSA o un conjugado de acuerdo con la invención, opcionalmente acoplado a un soporte sólido; y
- 15 c) purificar y aislar los complejos de dichos CD44 y/o CSPG4, y/o cualquier otro proteoglicano, tal como un proteoglicano enumerado en la tabla 1 y dicho fragmento de proteína o conjugado.

La presente divulgación también se refiere a un fragmento de proteína como se define en el presente documento, un polipéptido VAR2CSA o un conjugado de acuerdo con la invención o una composición farmacéutica de acuerdo con la invención en combinación con otro cualquier agente anticanceroso adecuado.

20 **Divulgación detallada de la invención**

La presente invención se basa en el hecho de que una parte de una proteína de la malaria, la llamada VAR2CSA, puede unirse a un antígeno específico de cáncer y CSPG extracelular con especificidad muy alta y fuerza de unión muy alta.

- 25 VAR2CSA media la adhesión del parásito exclusivamente al sulfato de condroitina A (CSA) poco sulfatado unido a proteoglicanos (CSPG) en la placenta de mujeres embarazadas. Se ha demostrado que la proteína recombinante se une con alta afinidad y especificidad sin precedentes a CSA. Esto puede deberse a una interacción con CSA que no solo depende de los sulfatos cargados, sino también de la cadena principal de CS. Los inventores de la presente invención prevén que el CS presente en la placenta es muy similar al CS presentado en diversas células cancerosas, incluidas las células madre del cáncer. Esto se confirma por el hecho de que VAR2CSA que expresa parásitos de la malaria se adhiere específicamente a CSA en células de melanoma C32 y en células cáncer de cerebro humano.

- 35 Por consiguiente, la actual invención se basa en la alta afinidad y especificidad entre las proteínas recombinantes VAR2CSA y el CSA poco sulfatado. Mediante el marcaje de esta proteína, la invención se puede utilizar en una amplia gama de aplicaciones que incluyen el rastreo de metástasis *in vivo* y para diagnosticar enfermedades metastásicas. Mediante el acoplamiento de VAR2CSA a un reactivo apoptótico o citotóxico, la invención se puede utilizar para dirigir y eliminar específicamente células cancerosas y células madre cancerosas. Mediante terapia simple utilizando proteína recombinante VAR2CSA, será posible neutralizar la actividad de CSA, inhibiendo así la tumorigénesis y/o metástasis de células cancerosas que expresan CSA. CSA se puede presentar en una variedad de cadenas principales de proteínas, por ejemplo, CSPG4, CD44, biglycan, decorin, versican, agrecan (el CSPG principal en cartílago), perlecan, syndecan y otros enumerados en la tabla 1.

- 45 Se prevé que la presente invención sea particularmente relevante para el cáncer de melanoma maligno que incluye melanoma cutáneo, ocular y conjuntivo que tiene CSPG4 con cadenas de CSA en la superficie de las células de melanoma. Se cree que esta cadena GAG está involucrada en mitosis y metástasis. Sin embargo, CSPG4 no solo es específico para melanoma. Análisis de matriz de micro y tejidos, realizados por los inventores sobre datos de grandes paneles de líneas celulares y tejido humano, sugieren que CSPG4 y otros tipos de proteoglicanos que contienen CSA pueden presentarse en una amplia gama de tipos de cáncer que se originan a partir de las tres capas germinales celulares. Estos tipos de cáncer incluyen carcinomas (carcinoma de mama, carcinoma de páncreas, carcinoma de ovario, carcinoma endometrial, carcinoma hepatocelular, carcinoma de pulmón, carcinoma de colon, carcinoma de próstata, carcinoma de cuello de útero, carcinoma de testículos, carcinoma de piel de células basales, carcinoma de células renales de células claras, carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello creatinizadas, carcinoma de células escamosas de la piel, carcinoma de células escamosas creatinizadas vulvar y carcinoma de células basales de vulva), sarcomas (liposarcoma de mama, fibrosarcoma, condro y liposarcoma desdiferenciado, leiomioma, liposarcoma, liposarcoma mixoide, leiomioma del cuerpo uterino, osteosarcoma, sarcoma de Ewing y rhabdomioma), cánceres hematopoyéticos (leucemia linfática crónica (CLL, del inglés "Chronic lymphatic leukaemia"), leucemia linfática aguda (ALL, del inglés "Acute lymphatic leukaemia"), leucemia mieloide aguda (AML, del inglés "Acute myeloid leukaemia"), linfoma de linfocito B, linfocito T y granular grande), tumores de tejido neuroepitelial, tales como astrocitos (xantastrocitoma pleomórfico, astrocitos fibrilares, astrocitoma anaplásico, glioblastoma multiforme), oligodendroglioma, ependimoma, tumor del plexo coroideo, oligastrocitoma, gliosarcoma, ganglioglioma, retinoblastoma, Neurocitoma, Neuroblastomas (Estesioneuroblastoma y ganglioneuroblastoma), meduloblastoma, tumores rabdoide teratoides atípicos y todos los tipos de cáncer neuroendocrino.

Los proteoglicanos de sulfato de condroitina (CSPG) también constituyen un componente importante de la matriz extracelular del sistema nervioso central (CNS, del inglés "central nerve system") que incluye el ojo y el cartílago articular. CSPG extracelular está críticamente involucrado en la patogénesis de la artritis y la falta de regeneración después del daño neuronal. La pérdida de CSPG extracelular es fundamental para el desarrollo de artritis y artrosis, y las altas concentraciones locales de CSPG extracelular previenen el crecimiento neuronal después del daño neuronal.

Las proteínas recombinantes VAR2CSA no solo pueden utilizarse en el tratamiento de indicaciones asociadas con el crecimiento maligno, tal como en cánceres. Las terapias para aumentar o disminuir la presencia de CSPG en el entorno extracelular pueden utilizarse para tratar la artritis, artrosis y para mejorar recuperación neuronal después del daño neuronal, que incluye esclerosis múltiple. Para estas estrategias, los inventores de la presente invención prevén que VAR2CSA puede utilizarse como un inhibidor directo o como una molécula que se dirige y mantiene fármacos que cambian el metabolismo de CSPG a los tejidos afectados.

Los inventores de la presente invención han identificado una proteína de malaria que se une a CSA en los espacios intervellosos de la placenta con una afinidad por debajo de 10 nM. Se han producido partes recombinantes más pequeñas de VAR2CSA con altos rendimientos que se unen a CSA con características similares a las de la proteína VAR2CSA de longitud completa y nativa. La proteína recombinante VAR2CSA no se une a otros CS como el sulfato de condroitina C (C6S) o los GAG altamente sulfatados tales como el heparán sulfato (HS). Se pueden producir proteínas recombinantes para unirse con alta afinidad a CSA en diversos sistemas de expresión, aquí entre células S2, células T.Ni, células CHO y cepas de *E. coli* que incluyen BL21 y células Shuffle (mr Lifetechnologies).

Los inventores de la presente invención también han identificado un único antígeno pequeño (75 kDa) que se une a CSA con muy alta afinidad (nM) y alta especificidad. La Tabla 3 (véase el ejemplo 2) enumera la afinidad de CSA de todas las proteínas VAR2CSA analizadas utilizando tecnología biosensora.

Los inventores de la presente invención han demostrado que esta proteína recombinante VAR2CSA se une fuertemente a bajas concentraciones a una amplia gama de líneas celulares cancerosas que incluyen melanoma cutáneo (C32, MeWo), carcinoma de pulmón (A549), carcinoma de mama (HCC1395), osteosarcoma (U2OS, MNNG/HOS), rhabdomyosarcoma (RH30) y linfoma de linfocito T cutáneo (tabla 4 y 5). Como molécula de control se utilizó otra proteína VAR2CSA, que es idéntica a la construcción de VAR2CSA de unión mínima excepto por un truncamiento de 151 aminoácidos en la parte C-terminal de la molécula. Este truncamiento elimina la unión a CSA. El VAR2CSA recombinante se une a todas las líneas celulares que expresan CSPG4 y líneas celulares cancerosas que expresan otras moléculas CSPG que tienen cadenas de CSA (por ejemplo, linfoma de linfocito T). La proteína VAR2CSA recombinante no puede interactuar con los glóbulos rojos humanos y las células mononucleares de sangre periférica (PBMC, del inglés "peripheral blood mononuclear cells") (Tabla 4).

Los inventores de la presente invención han demostrado en el presente documento que los parásitos de la malaria se adhieren a células de melanoma C32, probablemente, a través de una interacción específica entre CSPG4 y VAR2CSA. Por lo tanto, se prevé que VAR2CSA recombinante y conjugados del mismo pueden utilizarse como un compuesto terapéutico que dirige CSA en diversas células cancerosas.

Las ventajas de dirigir CSA en células cancerosas con VAR2CSA sobre otras terapias actuales en desarrollo son numerosas:

- 1) La interacción entre VAR2CSA y CSA es, sin precedentes, de alta afinidad y alta especificidad.
- 2) VAR2CSA es una proteína de la malaria refinada de manera evolutiva y, por lo tanto, es poco probable que la terapia rompa la tolerancia y cause reacciones autoinmunes en el paciente.
- 3) VAR2CSA es una proteína estable que está bien caracterizada y se puede expresar altamente en organismos compatibles con la producción de proteínas a gran escala.
- 4) VAR2CSA es una proteína polimórfica con una variedad de serovariantes. La terapia repetida podría ofrecerse mediante diferentes serovariantes para evitar problemas con la neutralización de anticuerpos.
- 5) VAR2CSA se expone de forma natural extracelularmente en el glóbulo rojo infectado por *P. falciparum* y, por lo tanto, es por naturaleza una proteína estable en el suero humano y se ha demostrado que es altamente resistente a proteasas.

La presente invención se centra en la interacción entre VAR2CSA y CSA. Esta interacción es una interacción de alta afinidad y la principal utilización es dirigirse a células cancerosas que expresan CSA.

CSA también puede estar implicado en otras enfermedades y afecciones patológicas como, por ejemplo, artritis, artrosis, esclerosis múltiple y recuperación después de daño neuronal, reparación de cartílago, recuperación de lesiones y en psoriasis. Por consiguiente, se pueden utilizar polipéptidos VAR2CSA o conjugados en el tratamiento de cualquier enfermedad o afección dicha.

Además, la interacción entre VAR2CSA y CSA podría utilizarse como una herramienta biotecnológica, por ejemplo,

para la purificación de proteínas y ensayos de clasificación celular.

Por consiguiente, los inventores de la presente invención prevén diversas utilidades de esta invención:

- 1) Pueden utilizarse polipéptidos o conjugados de VAR2CSA recombinantes rastreables para rastrear tumores y metástasis en pacientes con cáncer.
- 5 2) Pueden utilizarse polipéptidos o conjugados de VAR2CSA recombinantes para dirigir y neutralizar directamente la actividad de CSA en células cancerosas.
- 3) Pueden utilizarse polipéptidos o conjugados de VAR2CSA recombinantes, tales como los polipéptidos VAR2CSA acoplados a una molécula citotóxica, para dirigir células cancerosas con toxicidad adversa mínima al tejido negativo para CSA.
- 10 4) Pueden utilizarse polipéptidos o conjugados de VAR2CSA recombinantes etiquetados como una herramienta de investigación o de desarrollo clínico que estudie CSA en células cancerosas.
- 5) Pueden utilizarse polipéptidos o conjugados de VAR2CSA recombinante marcados en ensayos para clasificar células positivas para CSA en biotecnología y ciencias de la vida. Esto podría hacerse acoplando VAR2CSA recombinante a resinas para que pueda utilizarse para purificar células que expresan CSPG4, tales como células madre de cáncer, que proporcionan una herramienta biotecnológica novedosa y eficaz.
- 15 6) Pueden utilizarse polipéptidos o conjugados de VAR2CSA para el agotamiento *in vitro* de células que expresan CSPG4, tales como células cancerosas, como parte de trasplantes autólogos.
- 7) Podrían utilizarse polipéptidos o conjugados de VAR2CSA en una vacuna anti-CSPG4. Mediante la inmunización de animales con complejos o conjugados CSPG4-VAR2CSA, VAR2CSA podría actuar como un vehículo y potenciador de una respuesta inmune hacia CSPG4 con el objetivo de romper la tolerancia a CSPG4.
- 20 8) Podrían utilizarse polipéptidos o conjugados de VAR2CSA para controlar el aumento de niveles de CSA en fluidos corporales (es decir, orina, fluido espinal, derrames de pleura, articulaciones, médula ósea y linfa) en respuesta a una malignidad. Esto se basa en el hecho de que los polipéptidos VAR2CSA tienen especificidad por CSA poco sulfatado y podrían detectar la progresión del tumor en función de una mayor proporción de CS no sulfatado (COS).
- 25 9) Podrían utilizarse polipéptidos o conjugados de VAR2CSA en el tratamiento de artritis y artrosis. Los polipéptidos VAR2CSA podrían bloquear o dirigirse a fármacos que bloquean la degradación de agregano mediada por proteasas durante la artritis y la artrosis. También podrían utilizarse polipéptidos VAR2CSA para dirigir fármacos antiinflamatorios a los tejidos afectados y liberar inhibidores tales como ADAMTS4 y -5 inhibidores. Podrían utilizarse polipéptidos VAR2CSA para dirigir fármacos que estimulan la producción de agregano por condrocitos. Podrían utilizarse inyecciones i.v. repetidas de agregano acoplado a polipéptidos VAR2CSA para inducir tolerancia a agregano.
- 30 10) Podrían unirse polipéptidos o conjugados de VAR2CSA a CSPG extracelulares en tejido neural para inactivar el efecto de CSPG sobre el crecimiento de neuritas, por ejemplo, bloqueando la señalización a través del receptor tirosina fosfatasa-sigma. Podrían dirigirse péptidos VAR2CSA a fármacos que degradan CSPG o inhiben la producción de CSPG en el tejido neural afectado. Por ejemplo, los siguientes fármacos pueden considerarse acoplados a VAR2CSA: condroitinasa ABC, que corta las cadenas de azúcar del núcleo de la proteína de moléculas de CSPG. Xilocides, que reduce la producción de CSPG o fármacos que inhiben enzimas importantes para la producción de CSPG tal como condroitina sintasa o factor de polimerización de condroitina. Los ejemplos de dichos fármacos incluyen: 4-fluoro-glucosamina, p-nitrofenil-beta-D-xiloxido, 4-metil-umbeliferil-beta-D-xilopiranosida.
- 35 11) También se podrían utilizar polipéptidos o conjugados de VAR2CSA para dirigir y mantener citoquinas tales como IL1-alfa, que estimulan la producción de ADAMTS4, que posteriormente escinden CSPG.
- 40 12) La expresión de CSPG4 en las células cancerosas puede influir en la resistencia a los fármacos. Los tumores en muchos pacientes generalmente responden inicialmente a la terapia, pero la quimiorresistencia se desarrolla con el tiempo y el cáncer progresa. La expresión de CSPG4 está asociada con la resistencia a múltiples fármacos y está mediada por su asociación con la activación de las rutas de PI3K inducidas por integrinas. El polipéptido VAR2CSA recombinante que dirige CSPG4 en células cancerosas puede reducir o dificultar la quimiorresistencia y, por lo tanto, podría utilizarse en terapias de combinación con, por ejemplo, PLX4032, un inhibidor BRAFV600E.
- 45
- 50

Definiciones

La expresión "polipéptido VAR2CSA" como se usa en el presente documento se refiere a la parte extracelular de una proteína específica de proteína 1 de membrana de eritrocito (PfEMP1) expresada por *Plasmodium falciparum* que interactúa con proteoglicanos de sulfato de condroitina (CSPG) y se caracteriza por tener una secuencia de SEQ ID

NO: 55 o SEQ ID NO: 56 o fragmentos o variantes de las mismas con la capacidad de unirse a sulfato de condroitina A (CSA) que podría presentarse en un proteoglicano (CSPG).

En algunas realizaciones, el polipéptido VAR2CSA de acuerdo con la presente invención comprende al menos el fragmento de proteína de VAR2CSA, cuyo fragmento consiste en una secuencia de aminoácidos secuencial de a) ID1 y b) DBL2Xb.

En algunas realizaciones, el polipéptido VAR2CSA de acuerdo con la presente invención comprende al menos el fragmento de proteína de VAR2CSA, cuyo fragmento consiste en una secuencia de aminoácidos secuencial de a) ID1 y b) DBL2Xb y c) ID2a.

Incluido dentro de la definición de un polipéptido VAR2CSA se describen polipéptidos en Salanti A. y col. Mol. Micro 2003 Jul;49(1):179-91, en Khunrae P. y col., J Mol Biol. 2010 Apr 2;397(3):826-34, en Srivastava A. y col., Proc Natl Acad Sci USA. 2010 Mar 16;107(11):4884-9, en Dahlbäck M. y col., J Biol Chem. 2011 May 6;286(18):15908-17, o en Srivastava A. y col., PLoS One. 2011;6(5):e20270.

El término "ID1" como se usa en el presente documento se refiere a un dominio de VAR2CSA caracterizado por tener una secuencia de aminoácidos con al menos un 70 % de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos identificada por 1-152 de SEQ ID NO: 1.

El término "DBL2Xb" como se usa en el presente documento se refiere a un dominio de VAR2CSA caracterizado por tener una secuencia de aminoácidos con al menos un 70 % de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos identificada por 153-577 de SEQ ID NO: 1.

El término "ID2a" como se usa en el presente documento se refiere a un dominio de VAR2CSA caracterizado por tener una secuencia de aminoácidos con al menos 20, al menos 21, al menos 22, al menos 23, al menos 24, al menos 25, al menos 26, al menos 27, al menos 28, al menos 29, al menos 30, al menos 31, al menos 32, al menos 33, al menos 34, al menos 35, al menos 36, al menos 37, al menos 38, al menos 39, al menos 40, al menos 41, al menos 42, al menos 43, al menos 44, al menos 45, al menos 46, al menos 47, al menos 48, al menos 49, al menos 50, al menos 51, al menos 52, al menos 53, al menos 54, al menos 55, al menos 56, al menos 57, al menos 58, al menos 59, al menos 60, al menos 61 o al menos 62, tal como los 63 aminoácidos consecutivos del N-terminal de los aminoácidos 578-640 de SEQ ID NO: 1 y con al menos un 70 % de identidad de secuencia con dicha secuencia de aminoácidos consecutivos.

En algunas realizaciones, una identidad de secuencia de aminoácidos referida en el presente documento al menos al 70% de una cualquiera de las secuencias identificadas por SEQ ID NO: 1-75 o un fragmento de las mismas, se refiere a una secuencia con al menos un 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, o 99 % de identidad de secuencia con esta secuencia.

Los términos "variante" o "variantes", como se usa en el presente documento, se refiere a un polipéptido VAR2CSA que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 55 o SEQ ID NO: 56 o un fragmento del polipéptido VAR2CSA que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1-54, cuyos fragmentos o variantes conservan la capacidad de unirse a sulfato de condroitina A (CSA) en proteoglicanos (CSPG), en el que se han sustituido uno o más aminoácidos por otros aminoácidos y/o en el que se han eliminado uno o más aminoácidos y/o en el que se han insertado uno o más aminoácidos en el polipéptido y/o en el que se han añadido uno o más aminoácidos al polipéptido. Dicha adición puede tener lugar en el extremo N-terminal o en el extremo C-terminal o en ambos. La "variante" o "variantes" dentro de esta definición todavía tienen actividad funcional en términos de ser capaces de unirse a sulfato de condroitina A (CSA). En alguna realización, una variante tiene al menos un 70 %, tal como al menos un 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, o 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de SEQ ID NO: 1-75, tal como la secuencia de SEQ ID NO: 1, 3-5, 10, 11, 29, 34, 36-38, 41, 43-45, 48, 53-56, 60-70, 72-75.

Las frases "variante funcional", "fragmento funcional" y "derivados funcionales" como se usa en el presente documento se refieren a variantes, fragmentos, versiones truncadas, así como a derivados de SEQ ID NO: 55 o SEQ ID NO: 56, tal como una cualquiera de SEQ ID NO: 1, 3-5, 10, 11, 29, 34, 36-38, 41, 43-45, 48, 53-56, 60-70, 72-75, cuyos polipéptidos comprenden partes de secuencia de unión esencial de SEQ ID NO: 55 o SEQ ID NO: 56 y al menos poseen la capacidad de unirse a sulfato de condroitina A (CSA). Debe entenderse que una variante funcional o un fragmento funcional VAR2CSA puede tener dos o tres características seleccionadas entre ser una variante y/o un fragmento y/o un derivado.

Una variante o fragmento funcional de un polipéptido VAR2CSA abarca aquellos que exhiben al menos aproximadamente 25%, tal como al menos aproximadamente 50%, tal como al menos aproximadamente 75%, tal como al menos aproximadamente 90% de la afinidad de unión de tipo silvestre del polipéptido VAR2CSA que se ha producido en el mismo tipo de célula, cuando se prueba en los ensayos como se describe en el presente documento.

La expresión "fragmento inmunológico" como se usa en el presente documento se refiere al fragmento de una secuencia de aminoácidos que posee esencialmente las mismas actividades funcionales y la misma orientación espacial para ser reconocida por un anticuerpo. Por consiguiente, un anticuerpo específico se unirá tanto al polipéptido como a fragmentos inmunológicos de los mismos.

La expresión "otro aminoácido" como se usa en el presente documento significa un aminoácido que es diferente de ese aminoácido presente de manera natural en esa posición. Esto incluye, pero no se limita a, aminoácidos que se pueden codificar por un polinucleótido. En algunas realizaciones, el aminoácido diferente está en forma L natural y se puede codificar por un polinucleótido.

- 5 El término "derivado" como se usa en el presente documento, pretende designar un polipéptido VAR2CSA que muestra sustancialmente la misma o mejor actividad biológica con respecto a VAR2CSA de tipo silvestre identificado por SEQ ID NO: 55 o SEQ ID NO: 56, o un fragmento del mismo, en el que uno o más de los aminoácidos del péptido original se ha modificado químicamente, por ejemplo, mediante alquilación, PEGilación, acilación, formación de éster o formación de amidas o similares.
- 10 El término "construcción" pretende indicar un segmento de polinucleótido que puede estar basado en una secuencia de nucleótidos de origen natural completo o parcial que codifica el polipéptido de interés. La construcción puede contener opcionalmente otros segmentos polinucleotídicos. De manera similar, la expresión "aminoácidos que se pueden codificar por construcciones polinucleotídicas" cubre aminoácidos que se pueden codificar por las construcciones polinucleotídicas definidas anteriormente, es decir, aminoácidos tales como Ala, Val, Leu, Ile, Met, Phe, Trp, Pro, Gly, Ser, Thr, Cys, Tyr, Asn, Glu, Lys, Arg, His, Asp y Gln.
- 15

- El término "vector", como se usa en el presente documento, significa cualquier entidad de ácido nucleico capaz de la amplificación en una célula hospedadora. Por lo tanto, el vector puede ser un vector de replicación autónomo, es decir, un vector, que existe como una entidad extracromosómica, cuya replicación es independiente de la replicación cromosómica, por ejemplo, un plásmido. Alternativamente, el vector puede ser uno que, cuando se introduce en una célula hospedadora, se integra en el genoma de la célula hospedadora y se replica junto con el cromosoma(s) en el que se ha integrado. La elección del vector a menudo dependerá de la célula hospedadora en la que se va a introducir. Los vectores incluyen, pero sin limitación a vectores plasmídicos, vectores de fagos, vectores de virus o cósmidos. Los vectores, normalmente, contienen un origen de replicación y al menos un gen seleccionable, es decir, un gen que codifica un producto que se detecta fácilmente o cuya presencia es esencial para el crecimiento celular.
- 20

- 25 Como se usa en el presente documento, la expresión "medio de crecimiento apropiado" significa un medio que contiene nutrientes y otros componentes requeridos para el crecimiento de las células y la expresión de la secuencia de ácidos nucleicos que codifica el polipéptido VAR2CSA de la invención.

- En el presente contexto, el término "tratamiento" pretende incluir prevención, curación y alivio de los síntomas de una enfermedad, trastorno o afección que implica expresión, tal como expresión inapropiada de CSA, tal como en cáncer. Se incluye así en el término "tratamiento" la administración profiláctica y terapéutica del polipéptido, conjugado o derivado de VAR2CSA de acuerdo con la invención.
- 30

- El término "sujeto" como se usa en el presente documento significa cualquier animal, en particular mamíferos, tales como seres humanos y, puede, cuando sea apropiado, utilizarse de manera intercambiable con el término "paciente".

- 35 La expresión "identidad de secuencia" como se conoce en la memoria, se refiere a una relación entre las secuencias de dos o más moléculas polipeptídicas o dos o más moléculas de ácidos nucleicos, como se determina mediante la comparación de las secuencias. En la memoria, "identidad" también significa el grado de relación de secuencia entre moléculas de ácidos nucleicos o entre polipéptidos, según sea el caso, como se determina mediante el número de coincidencias entre cadenas de dos o más restos de nucleótidos o dos o más restos de aminoácidos. "Identidad" mide el porcentaje de coincidencias idénticas entre la menor de dos o más secuencias con alineaciones de brecha (si las hay) tratadas por un modelo matemático o programa informático particular (es decir, "algoritmos").
- 40

- El término "similitud" es un concepto relacionado, pero a diferencia de "identidad", se refiere a una relación de secuencia que incluye coincidencias idénticas y coincidencias de sustitución conservadoras. Si dos secuencias polipeptídicas tienen, por ejemplo, aminoácidos idénticos (fracción (10/20)) y el resto son todas sustituciones no conservadoras, entonces, el porcentaje de identidad y similitud serían en ambos 50 %. Si, en el mismo ejemplo, hay 5 posiciones más en las que hay sustituciones conservadoras, entonces, el porcentaje de identidad sigue siendo 50 %, pero el porcentaje de similitud sería del 75 % ((fracción (15/20))). Por lo tanto, en los casos en los que hay sustituciones conservadoras, el grado de similitud entre dos polipéptidos será mayor que el porcentaje de identidad entre esos dos polipéptidos.
- 45

- 50 Las modificaciones conservadoras en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1-56, 60-70 y 72-75 (y las modificaciones correspondientes a los nucleótidos codificantes) producirán polipéptidos VAR2CSA que tienen características funcionales y químicas similares a los polipéptidos VAR2CSA de origen natural. Por el contrario, modificaciones sustanciales en las características funcionales y/o químicas de un polipéptido VAR2CSA pueden lograrse mediante la selección de sustituciones en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1-56, 60-70 y 72-75
- 55 que difieren significativamente en su efecto sobre el mantenimiento de (a) la estructura de la cadena principal molecular en el área de la sustitución, por ejemplo, como una conformación en lámina o helicoidal, (b) la carga o hidrofobicidad de la molécula en el sitio diana, o (c) la mayor parte de la cadena lateral.

Por ejemplo, una "sustitución de aminoácido conservadora" puede implicar una sustitución de un resto de

aminoácido nativo por un resto no nativo de manera que hay poco o ningún efecto sobre la polaridad o carga del resto de aminoácido en esa posición. Además, cualquier resto nativo en el polipéptido también puede sustituirse con alanina, como previamente se ha descrito para "mutagénesis de barrido de alanina" (véase, por ejemplo, MacLennan y col., 1998, *Acta Physiol. CSAnd. Suppl.* 643:55-67; Sasaki y col., 1998, *Adv. Biophys.* 35:1-24, que analizan la mutagénesis de barrido de alanina).

Las sustituciones de aminoácidos deseadas (ya sean conservadoras o no conservadoras) se pueden determinar por los expertos en la materia en el momento en que se desean tales sustituciones. Por ejemplo, las sustituciones de aminoácidos se pueden utilizar para identificar restos importantes de un polipéptido VAR2CSA, o para aumentar o disminuir la afinidad de un polipéptido VAR2CSA descrito en el presente documento.

Los restos de origen natural pueden dividirse en clases basadas en las propiedades comunes de la cadena lateral:

1) hidrófoba: norleucina, Met, Ala, Val, Leu, Ile;

2) hidrófila neutra: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;

3) ácida: Asp, Glu;

4) básica: His, Lys, Arg;

5) restos que influyen en la orientación de la cadena: Gly, Pro; y

6) aromática: Trp, Tyr, Phe.

Por ejemplo, sustituciones no conservadoras pueden implicar el intercambio de un miembro de una de estas clases por un miembro de otra clase. Dichos restos sustituidos pueden introducirse en regiones del polipéptido VAR2CSA de *Plasmodium falciparum* que son homólogas con polipéptidos VAR2CSA que no son de *Plasmodium falciparum*, o en las regiones no homólogas de la molécula.

Al hacer tales cambios, puede considerarse el índice hidropático de aminoácidos. A cada aminoácido se le ha asignado un índice hidropático en función de sus características de hidrofobicidad y carga, estas son: isoleucina (+ 4,5); valina (+ 4,2); leucina (+ 3,8); fenilalanina (+ 2,8); cisteína/cistina (+ 2,5); meucionina (+ 1,9); alanina (+ 1,8); glicina (- 0,4); treonina (- 0,7); serina (- 0,8); triptófano (- 0,9); tirosina (- 1,3); prolina (- 1,6); histidina (- 3,2); glutamato (- 3,5); glutamina (- 3,5); aspartato (- 3,5); asparagina (- 3,5); lisina (- 3,9); y arginina (- 4,5).

Se entiende en la materia la importancia del índice hidropático de aminoácidos para conferir función biológica interactiva a una proteína. Kyte y col., *J. Mol. Biol.*, 157:105-131 (1982). Se sabe que ciertos aminoácidos pueden sustituirse por otros aminoácidos que tienen un índice o puntuación hidropática similar y aún retener una actividad biológica similar. Al hacer cambios basados en el índice hidropático, se prefiere la sustitución de aminoácidos cuyos índices hidropáticos están dentro de ± 2 , son particularmente preferidos los que están dentro de ± 1 , y son aún más particularmente preferidos los que están dentro de $\pm 0,5$.

También se entiende en la materia que la sustitución de aminoácidos similares se puede realizar eficazmente sobre la base de la hidrofiliidad, particularmente cuando la proteína o péptido biológica y funcionalmente equivalente creado de ese modo está destinado para su uso en realizaciones inmunológicas, como es el presente caso. La mayor hidrofiliidad promedio local de una proteína, como se rige por la hidrofiliidad de sus aminoácidos adyacentes, se correlaciona con su inmunogenicidad y antigenicidad, es decir, con una propiedad biológica de la proteína.

Los siguientes valores de hidrofiliidad se han asignado a restos de aminoácidos: arginina (+ 3,0); lisina (+ 3,0); aspartato (+ 3,0 $\pm$ 1); glutamato (+ 3,0 $\pm$ 1); serina (+ 0,3); asparagina (+ 0,2); glutamina (+ 0,2); glicina (0); treonina (- 0,4); prolina (- 0,5 $\pm$ 1); alanina (- 0,5); histidina (- 0,5); cisteína (- 1,0); meucionina (- 1,3); valina (- 1,5); leucina (- 1,8); isoleucina (- 1,8); tirosina (- 2,3); fenilalanina (- 2,5); triptofano (- 3,4). Al hacer cambios basados en valores de hidrofiliidad similares, se prefiere la sustitución de aminoácidos cuyos valores de hidrofiliidad están dentro de ± 2 , son particularmente preferidos los que están dentro de ± 1 , y son aún más particularmente preferidos los que están dentro de $\pm 0,5$. También se pueden identificar epítomos de secuencias de aminoácidos primarias sobre la base de hidrofiliidad. Estas regiones también se conocen como "regiones centrales epitópicas".

Un experto en la materia será capaz de determinar variantes adecuadas del polipéptido como se expone en SEQ ID NO: 1-75 utilizando técnicas bien conocidas. Para identificar áreas adecuadas de la molécula que se pueden cambiar sin destruir la actividad, un experto en la materia puede dirigirse a áreas que no se cree que sean importantes para la actividad. Por ejemplo, cuando se conocen polipéptidos similares con actividades similares de la misma especie o de otras especies, un experto en la materia puede comparar la secuencia de aminoácidos de un polipéptido VAR2CSA con dichos polipéptidos similares. Con tal comparación, se pueden identificar restos y porciones de las moléculas que se conservan entre polipéptidos similares. Se apreciará que los cambios en áreas de un polipéptido VAR2CSA que no se conservan en relación con dichos polipéptidos similares tendrían menos probabilidades de afectar negativamente a la actividad biológica y/o estructura del polipéptido VAR2CSA. Un experto en la técnica también sabría que, incluso en regiones relativamente conservadas, se pueden sustituir aminoácidos

químicamente similares por los restos que se producen de forma natural mientras se conserva la actividad (sustituciones de restos de aminoácidos conservadoras). Por lo tanto, incluso las áreas que pueden ser importantes para la actividad biológica o para la estructura pueden estar sujetas a sustituciones conservadoras de aminoácidos sin destruir la actividad biológica o sin afectar negativamente a la estructura polipeptídica.

Además, un experto en la materia puede revisar estudios de estructura-función que identifiquen restos en polipéptidos similares que son importantes para la actividad o estructura. En vista de tal comparación, se puede predecir la importancia de los restos de aminoácidos en un polipéptido VAR2CSA que corresponden a restos de aminoácidos que son importantes para la actividad o estructura en polipéptidos similares. Un experto en la materia puede optar por sustituciones de aminoácidos químicamente similares para dichos restos de aminoácidos importantes predichos de polipéptidos VAR2CSA y otros polipéptidos de la invención.

Un experto en la materia también puede analizar la estructura tridimensional y la secuencia de aminoácidos en relación con esa estructura en polipéptidos similares. En vista de esa información, un experto en la materia puede predecir la alineación de restos de aminoácidos de un polipéptido VAR2CSA con respecto a su estructura tridimensional. Un experto en la materia puede elegir no realizar cambios radicales a los restos de aminoácidos que se predice que estarán en la superficie de la proteína, ya que tales restos pueden implicarse en interacciones importantes con otras moléculas. Además, un experto en la materia puede generar variantes de prueba que contienen una única sustitución de aminoácido en cada resto de aminoácido deseado. Las variantes pueden cribarse utilizando ensayos de actividad como se describe en el presente documento. Dichas variantes podrían utilizarse para recopilar información sobre variantes adecuadas. Por ejemplo, si se descubriera que un cambio en un resto de aminoácido particular da como resultado una actividad destruida, indeseablemente reducida o inadecuada, se evitarían variantes con dicho cambio. En otras palabras, basándose en la información recopilada a partir de dichos experimentos rutinarios, un experto en la materia puede determinar fácilmente los aminoácidos en los que se deben evitar sustituciones adicionales, ya sea solas o en combinación con otras mutaciones.

Se han dedicado varias publicaciones científicas a la predicción de la estructura secundaria. Véase Moulton J., *Curr. Op. in Biotech.*, 7(4):422-427 (1996); Chou y col., *Biochemistry*, 13(2):222-245 (1974); Chou y col., *Biochemistry*, 113(2):211-222 (1974); Chou y col., *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.*, 47:45-148 (1978); Chou y col., *Ann. Rev. Biochem.*, 47:251-276 y Chou y col., *Biophys. J.*, 26:367-384 (1979). Además, los programas de ordenador están actualmente disponibles para ayudar a predecir la estructura secundaria. Un procedimiento para predecir la estructura secundaria se basa en el modelo de homología. Por ejemplo, dos polipéptidos o proteínas, que tienen una identidad de secuencia de más del 30% o una similitud mayor del 40% a menudo tienen topologías estructurales similares. El reciente crecimiento de la base de datos estructurales de proteínas (BDP) ha proporcionado una mayor predictibilidad de la estructura secundaria, que incluye el número potencial de pliegues dentro de la estructura de un polipéptido o proteína. Véase Holm y col., *Nucl. Acid. Res.*, 27(1):244-247 (1999). Se ha sugerido (Brenner y col., *Curr. Op. Struct. Biol.*, 7(3):369-376 (1997)) que hay un número limitado de pliegues en un polipéptido o proteína dada y que una vez que se ha resuelto un número crítico de estructuras, la predicción estructural adquirirá una precisión espectacular.

Los procedimientos adicionales para predecir la estructura secundaria incluyen "enhebrar" (Jones, D., *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 7(3):377-87 (1997); Sippl y col., *Structure*, 4(1):15-9 (1996)), "análisis de perfil" (Bowie y col., *Science*, 253:164-170 (1991); Gribskov y col., *Meth. Enzymol.*, 183:146-159 (1990); Gribskov y col., *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 84(13):4355-4358 (1987)), y "vínculo evolutivo" (véase Home, más arriba y Brenner, más arriba).

La identidad y la similitud de los polipéptidos relacionados se pueden calcular fácilmente mediante procedimientos conocidos. Dichos procedimientos incluyen, aunque sin limitación, aquellos descritos en *Computational Molecular Biology*, Lesk, A. M., ed., Oxford University Press, Nueva York, 1988; *Biocomputing: Informatics and Genome Projects*, Smith, D. W., ed., Academic Press, Nueva York, 1993; *Computer Analysis of Sequence Data*, parte 1, Griffin, A. M., and Griffin, H. G., eds., Humana Press, Nueva Jersey, 1994; *Sequence Analysis in Molecular Biology*, von Heinje, G., Academic Press, 1987; *Sequence Analysis Primer*, Gribskov, M. y Devereux, J., eds., M. Stockton Press, Nueva York, 1991; y Carillo y col., *SIAM J. Applied Math.*, 48:1073 (1988).

Los procedimientos preferidos para determinar la identidad y/o similitud se diseñan para proporcionar la mayor coincidencia entre las secuencias probadas. Se describen procedimientos para determinar la identidad y la similitud en programas de ordenador disponibles públicamente. Los procedimientos preferidos del programa de ordenador para determinar la identidad y la similitud entre dos secuencias incluyen, aunque sin limitación, el paquete del programa GCG, que incluye GAP (Devereux y col., *Nucl. Acid. Res.*, 12:387 (1984); Genetics Computer Group, Universidad de Wisconsin, Madison, Wis.), BLASTP, BLASTN y FASTA (Altschul y col., *J. Mol. Biol.*, 215:403-410 (1990)). El programa BLASTX está disponible públicamente en el Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) y otras fuentes (Manual BLAST, Altschul y col. NCB/NLM/NIH Bethesda, Md. 20894; Altschul y col., ver arriba). El conocido algoritmo de Smith Waterman también se puede utilizar para determinar la identidad.

Ciertos esquemas de alineamiento para alinear dos secuencias de aminoácidos pueden dar como resultado el emparejamiento de solo una región corta de las dos secuencias, y esta pequeña región alineada puede tener una identidad de secuencia muy alta aunque no haya una relación significativa entre las dos secuencias de longitud completa. Por consiguiente, en una realización preferida, el procedimiento de alineamiento seleccionado (programa GAP) dará como resultado una alineación que abarca al menos 50 aminoácidos contiguos del polipéptido diana.

Por ejemplo, utilizando el algoritmo informático GAP (Genetics Computer Group, Universidad de Wisconsin, Madison, Wis.), se alinean dos polipéptidos para los que se determinará el porcentaje de identidad de la secuencia para la coincidencia óptima de sus respectivos aminoácidos (el "espacio emparejado", como se determina por el algoritmo). Una penalización de apertura de hueco (que se calcula como 3 veces la diagonal promedio; la "diagonal promedio" es el promedio de la diagonal de la matriz de comparación que se utiliza; la "diagonal" es la puntuación o número asignado a cada combinación perfecta de aminoácidos por la matriz de comparación particular) y una penalización de extensión de hueco (que generalmente es $\{ \text{fracción } (1/10) \}$ veces la penalización de apertura de hueco), así como una matriz de comparación tal como PAM 250 o BLOSUM 62 se utilizan junto con el algoritmo. Una matriz de comparación estándar (véase Dayhoff y col., Atlas of Protein Sequence and Structure, vol. 5, supp.3 (1978) para la matriz de comparación PAM 250; Henikoff y col., Proc. Natl. Acad. Sci USA, 89:10915-10919 (1992) para la matriz de comparación BLOSUM 62) también se utiliza por el algoritmo.

Los parámetros preferidos para una comparación de secuencia polipeptídica incluyen los siguientes:

Algoritmo: Needleman y col., J. Mol. Biol, 48:443-453 (1970); Matriz de comparación: BLOSUM 62 de Henikoff y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:10915-10919 (1992); Penalización de hueco: 12, Penalización de longitud de hueco: 4, Umbral de similitud: 0.

El programa GAP es útil con los parámetros anteriores. Los parámetros anteriormente mencionados son los parámetros predeterminados para las comparaciones de polipéptidos (junto con la ausencia de penalización para los huecos finales) utilizando el algoritmo GAP.

Los parámetros preferidos para las comparaciones de secuencia moléculas de ácidos nucleicos incluyen los siguientes: Algoritmo: Needleman y col., J. Mol Biol., 48:443-453 (1970); Matriz de comparación: coincidencias = + 10, desajustes = 0, Penalización de hueco: 50, Penalización de longitud de hueco: 3.

El programa GAP es también útil con los parámetros anteriores. Los parámetros anteriormente mencionados son los parámetros predeterminados para las comparaciones de moléculas de ácido nucleico.

Pueden utilizarse otros algoritmos ejemplares, penalización de apertura de hueco, penalización de extensión de hueco, matrices de comparación, umbral de similitud, etc., que incluyen aquellos expuestos en el manual del programa, Wisconsin Package, Versión 9, Septiembre, 1997. Las elecciones particulares que se harán serán evidentes para los expertos en la materia y dependerán de la comparación específica que se realice, tal como ADN a ADN, proteína a proteína, proteína a ADN; y, adicionalmente, si la comparación es entre pares de secuencias dados (en cuyo caso generalmente se prefiere GAP o BestFit) o entre una secuencia y una gran base de datos de secuencias (en cuyo caso se prefiere FASTA o BLASTA).

Los inventores de la presente invención ahora han abordado y encontrado las respuestas a las siguientes preguntas clave relacionadas con el mecanismo molecular detrás de la adhesión placentaria en PM: ¿1) es la adhesión a CSA diferencial descrita relacionada con la secuencia VAR2CSA 2) cuáles son los requisitos estructurales mínimos exactos para la unión de VAR2CSA a CSA 3) qué tipo de interacción química existe entre VAR2CSA y CSA y finalmente 4) se puede utilizar esta información para diseñar un antígeno de vacuna óptimo?

Mediante la expresión de truncamientos idénticos de FCR3 y 3d7 VAR2CSA, los presentes inventores demostraron que VAR2CSA se une a CSA con afinidad y especificidad similar, independientemente del origen de la cepa del parásito. Estas dos secuencias tienen una identidad de secuencia de 79,6 %. Los presentes inventores demuestran además que la alta afinidad de unión a CSA se retiene en varios fragmentos más cortos, y que DBL2X, que incluye pequeñas regiones de los interdominios flanqueantes, forma un núcleo compacto que contiene el sitio de unión de CSA de alta afinidad. *In silico* los presentes inventores definieron supuestos sitios de unión a GAG en VAR2CSA y mediante eliminación y sustitución, los presentes inventores demostraron que las mutaciones en estos sitios no tienen efecto sobre la unión de CSPG. Utilizando la teoría de las interacciones polielectrolito-proteína, los presentes inventores han demostrado que la interacción VAR2CSA-CSA puede no ser, únicamente, dependiente de interacciones iónicas. Finalmente, los presentes inventores han demostrado que varios fragmentos cortos de VAR2CSA son capaces de inducir la producción de anticuerpos que bloquean la adhesión y que los anticuerpos antiadherentes se dirigen a la región de unión a CSA propuesta. Estos datos proporcionan la primera información detallada sobre la naturaleza bioquímica de la interacción entre una molécula de PfEMP1 y su ligando.

Preparación de polipéptidos VAR2CSA y otros polipéptidos de la invención

La invención también se refiere a un procedimiento para preparar polipéptidos VAR2CSA y otros polipéptidos de la invención como se menciona anteriormente. Pueden producirse los polipéptidos VAR2CSA y otros polipéptidos de la invención descritos en el presente documento mediante técnicas de ácido nucleico recombinante. En general, una secuencia de ácidos nucleicos de VAR2CSA de tipo silvestre clonada se modifica para codificar la proteína deseada. Luego, se inserta esta secuencia modificada en un vector de expresión, que a su vez se transforma o transfecta en células hospedadoras. Pueden utilizarse como células hospedadoras células eucariotas superiores, en particular células de mamífero cultivadas. También se pueden utilizar células procariotas tales como *Lactococcus lactis* o *E. coli* para expresar los polipéptidos siempre que estos procariotas sean capaces de producir enlaces disulfuro o la proteína se pueda replegar correctamente. Además, también se pueden utilizar cepas de levadura para expresar la

proteína, aquí entre *Saccharomyces cerevisiae* y *P. Pichia*.

Las alteraciones de la secuencia de aminoácidos se pueden lograr mediante una variedad de técnicas. La modificación de la secuencia de ácidos nucleicos puede ser por mutagénesis específica de sitio. Las técnicas para la mutagénesis específica de sitio son bien conocidas en la materia y se describen en, por ejemplo, Zoller y Smith (DNA 3:479-488, 1984) o "Splicing by extension overlap", Horton y col., Gene 77, 1989, págs. 61-68. Por lo tanto, utilizando las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de VAR2CSA, se pueden introducir la alteración o alteraciones de elección. Asimismo, los procedimientos para preparar una construcción de ADN utilizando la reacción en cadena de la polimerasa que utiliza cebadores específicos son bien conocidos por las personas expertas en la materia (cf. PCR Protocols, 1990, Academic Press, San Diego, California, USA).

Los polipéptidos de la presente invención también pueden comprender restos de aminoácidos de origen no natural. Los aminoácidos de origen no natural incluyen, sin limitación, beta-alanina, desaminohistidina, trans-3-metilprolina, 2,4-metanoprolina, cis-4-hidroxiprolina, trans-4-hidroxiprolina, N-metilglicina, alotreonina, metiltreonina, hidroxietilcisteína, hidroxietilhomocisteína, nitroglutamina, homoglutamina, ácido pipercolico, ácido carboxílico de tiazolidina, deshidroprolina, 3- y 4-metilprolina, 3,3-dimetilprolina, tert-leucina, nor-valina, 2-azafenilalanina, 3-azafenilalanina, 4-azafenilalanina y 4-fluorofenilalanina. Se conocen en la materia diversos procedimientos para la incorporación de restos de aminoácidos de origen no natural en polipéptidos. Por ejemplo, se puede emplear un sistema *in vitro* en el que se suprimen mutaciones sin sentido utilizando ARNt supresores químicamente aminoacilados. Son conocidos en la materia procedimientos para sintetizar aminoácidos y ARNt aminoacilante. Se lleva a cabo la transcripción y traducción de plásmidos que contienen mutaciones sin sentido en un sistema libre de células que comprende un extracto de *E. coli* S30 y enzimas y otros reactivos comercialmente disponibles. Se purifican polipéptidos mediante cromatografía. Véase, por ejemplo, Robertson y col., J. Am. Chem. Soc. 113:2722, 1991; Ellman y col., Methods Enzymol. 202:301, 1991; Chung y col., Science 259:806-9, 1993; y Chung y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:10145-9, 1993). En un segundo procedimiento, se lleva a cabo la traducción en oocitos de *Xenopus* mediante la microinyección de ARNm mutado y ARNt supresor químicamente aminoacilado (Turcatti y col., J. Biol. Chem. 271:19991-8, 1996). En un tercer procedimiento, se cultivan células de *E. coli* en ausencia de un aminoácido natural que se va a reemplazar (por ejemplo, fenilalanina) y en presencia del aminoácido(s) de origen no natural deseado (por ejemplo, 2-azafenilalanina, 3-azafenilalanina, 4-azafenilalanina y 4-fluorofenilalanina). El aminoácido de origen no natural se incorpora en el polipéptido en lugar de su equivalente natural. Véase, Koide y col., Biochem. 33:7470-6, 1994. Los restos de aminoácidos de origen natural se pueden convertir en especies de origen no natural mediante modificación química *in vitro*. Se puede combinar la modificación química con mutagénesis dirigida al sitio para expandir aún más el rango de sustituciones (Wynn y Richards, Protein Sci. 2: 395-403, 1993).

La construcción de ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos VAR2CSA y otros polipéptidos de la invención de la invención puede ser adecuadamente de origen genómico o de ADNc, por ejemplo, obtenida mediante la preparación de una biblioteca genómica o de ADNc y seleccionando secuencias de ADN que codifican todo o parte del polipéptido mediante hibridación utilizando sondas oligonucleotídicas sintéticas de acuerdo con técnicas estándar (cf. Sambrook y col., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1989).

La construcción de ácidos nucleicos que codifican un polipéptido VAR2CSA también se puede preparar sintéticamente mediante procedimientos estándar establecidos, por ejemplo, el procedimiento de fosfoamidita descrito por Beaucage y Caruthers, Tetrahedron Letters 22 (1981), 1859 - 1869 o el procedimiento descrito por Matthes y col., EMBO Journal 3 (1984), 801 - 805. De acuerdo con el procedimiento de fosfoamidita, se sintetizan oligonucleótidos, por ejemplo, en un sintetizador de ADN automático, purificados, recocidos, ligados y clonados en vectores adecuados. Las secuencias de ADN que codifican los polipéptidos VAR2CSA de *Plasmodium falciparum* y otros polipéptidos de la invención también pueden prepararse por reacción en cadena de la polimerasa utilizando cebadores específicos, por ejemplo, como se describe en el documento US 4.683.202, Saiki y col., Science 239 (1988), 487 - 491 o Sambrook y col., ver arriba.

Además, la construcción de ácidos nucleicos puede ser de origen mixto sintético y genómico, sintético mixto y ADNc o genómico mixto y ADNc preparado mediante la unión de fragmentos de origen sintético, genómico o de ADNc (según corresponda), correspondiendo los fragmentos a varias partes de la totalidad de la construcción de ácidos nucleicos, de acuerdo con técnicas estándar.

La construcción de ácidos nucleicos es preferentemente una construcción de ADN. Las secuencias de ADN para su uso en la producción de polipéptidos VAR2CSA y otros polipéptidos de acuerdo con la presente invención codificarán típicamente un pre-pro polipéptido en el extremo amino de VAR2CSA para obtener un procesamiento y secreción postraduccional apropiado de la célula hospedadora.

Las secuencias de ADN que codifican los polipéptidos VAR2CSA de *Plasmodium falciparum* y otros polipéptidos de acuerdo con la presente invención habitualmente se insertan en un vector recombinante que puede ser cualquier vector, que puede someterse convenientemente a procedimientos de ADN recombinante, y la elección del vector dependerá a menudo de la célula hospedadora en la que se va a introducir. Por lo tanto, el vector puede ser un vector de replicación autónomo, es decir, un vector, que existe como una entidad extracromosómica, cuya replicación es independiente de la replicación cromosómica, por ejemplo, un plásmido. Alternativamente, el vector

puede ser uno que, cuando se introduce en una célula hospedadora, se integra en el genoma de la célula hospedadora y se replica junto con el cromosoma(s) en el que se ha integrado.

El vector es preferentemente un vector de expresión en el que la secuencia de ADN que codifica los polipéptidos VAR2CSA de *Plasmodium falciparum* y otros polipéptidos de acuerdo con la presente invención está unida operativamente a segmentos adicionales requeridos para la transcripción del ADN. En general, el vector de expresión procede del ADN plasmídico o viral, o puede contener elementos de ambos. El término, "unido operativamente" indica que los segmentos se disponen de modo que funcionen en concierto para fines previstos, por ejemplo, la transcripción se inicia en un promotor y continúa a través de la secuencia de ADN que codifica el polipéptido.

Los vectores de expresión para su uso en la expresión de polipéptidos VAR2CSA y otros polipéptidos de acuerdo con la presente invención comprenderán un promotor capaz de dirigir la transcripción de un gen clonado o ADNc. El promotor puede ser cualquier secuencia de ADN, que muestra actividad transcripcional en la célula hospedadora de elección y puede proceder de genes que codifican proteínas homólogas o heterólogas a la célula hospedadora.

Los ejemplos de promotores adecuados para dirigir la transcripción del ADN que codifica el polipéptido VAR2CSA de *Plasmodium falciparum* en células de mamífero son el promotor SV40 (Subramani y col., *Mol. Cell Biol.* 1 (1981), 854-864), el promotor MT-1 (gen de metalotioneína) (Palmiter y col., *Science* 222 (1983), 809 - 814), el promotor CMV (Boshart y col., *Cell* 41:521-530, 1985) o el promotor tardío principal del adenovirus 2 (Kaufman y Sharp, *Mol. Cell Biol.* 2:1304-1319, 1982).

Un ejemplo de un promotor adecuado para su uso en células de insectos es el promotor de polihedrina (documento US 4.745.051; Vasuvedan y col., *FEBS Lett.* 311, (1992) 7 - 11), el promotor P10 (J.M. Vlak y col., *J. Gen. Virology* 69, 1988, págs. 765-776), el promotor de proteína básica del virus de la polihedrosis de *Autographa californica* (documento EP 397 485), el promotor del gen 1 temprano inmediato de baculovirus (documento US 5.155.037; documento US 5.162.222) o el promotor del gen retrasado tardío 39K de baculovirus (documento US 5.155.037; documento US 5.162.222).

Los ejemplos de promotores adecuados para su uso en células hospedadoras de levadura incluyen promotores de genes glicolíticos de levadura (Hitzeman y col., *J. Biol. Chem.* 255 (1980), 12073 - 12080; Alber y Kawasaki, *J. Mol. Appl. Gen.* 1 (1982), 419 - 434) o genes de alcohol deshidrogenasa (Young y col., en *Genetic Engineering of Microorganisms for Chemicals* (Hollaender y col., eds.), Plenum Press, New York, 1982) o los promotores TPI1 (documento US 4.599.311) o ADH2-4c (Russell y col., *Nature* 304 (1983), 652 - 654).

Son ejemplos de promotores adecuados para su uso en células hospedadoras de hongos filamentosos, por ejemplo, el promotor ADH3 (McKnight y col., *The EMBO J.* 4 (1985), 2093 - 2099) o el promotor tpiA. Ejemplos de otros promotores útiles son aquellos procedentes del gen que codifica amilasa TAKA de *A. oryzae*, proteinasa aspártica de *Rhizomucor miehei*, alfa-amilasa neutra de *A. niger*, alfa-amilasa estable ácida de *A. niger*, glucoamilasa (gluA) de *A. niger* o *A. awamori*, lipasa de *Rhizomucor miehei*, proteasa alcalina de *A. oryzae*, triosa fosfato isomerasa de *A. oryzae* o acetamidasa de *A. nidulans*. Los promotores TAKA-amilasa y gluA son preferidos. Se mencionan promotores adecuados en, por ejemplo el documento EP 238 023 y EP 383 779.

Las secuencias de ADN que codifican los polipéptidos VAR2CSA de *Plasmodium falciparum* y otros polipéptidos de acuerdo con la presente invención también pueden, si es necesario, conectarse operativamente a un terminador adecuado, tal como el terminador de la hormona de crecimiento humano (Palmiter y col., *Science* 222, 1983, págs. 809-814) o los terminadores TPI1 (Alber y Kawasaki, *J. Mol. Appl. Gen.* 1, 1982, págs. 419-434) o ADH3 (McKnight y col., *The EMBO J.* 4, 1985, págs. 2093-2099). Los vectores de expresión también pueden contener un conjunto de sitios de corte y empalme de ARN situados cadena abajo del promotor y cadena arriba del sitio de inserción para la secuencia de VAR2CSA en sí misma. Los sitios de empalme de ARN preferidos pueden obtenerse a partir de genes de adenovirus y/o inmunoglobulinas. También contiene en los vectores de expresión una señal de poliadenilación situada cadena abajo del sitio de inserción. Las señales de poliadenilación particularmente preferidas incluyen la señal de poliadenilación temprana o tardía de SV40 (Kaufman y Sharp, *ibid.*), la señal de poliadenilación de la región Elb del adenovirus 5, el terminador del gen de la hormona de crecimiento humana (DeNoto y col., *Nucl. Acids Res.* 9:3719-3730, 1981) o la señal de poliadenilación de genes humanos o bovinos de *Plasmodium falciparum*. Los vectores de expresión también pueden incluir una secuencia líder viral no codificante, tal como el líder tripartito de adenovirus 2, localizado entre el promotor y los sitios de empalme de ARN; y secuencias potenciadoras, tales como el potenciador SV40.

Para dirigir los polipéptidos VAR2CSA de *Plasmodium falciparum* y otros polipéptidos de la presente invención en la ruta secretora de las células hospedadoras, se puede proporcionar una secuencia señal secretora (también conocida como secuencia líder, prepro secuencia o pre secuencia) en el vector recombinante. La secuencia señal secretora se une a las secuencias de ADN que codifican los polipéptidos VAR2CSA de *Plasmodium falciparum* y otros polipéptidos de acuerdo con la presente invención en el marco de lectura correcto. Las secuencias señal secretoras se colocan comúnmente en posición 5' de la secuencia de ADN que codifica el péptido. La secuencia de señal secretora puede ser aquella, normalmente asociada con la proteína o puede ser de un gen que codifica otra proteína secretada.

Para la secreción de células de levadura, a secuencia señal secretora puede codificar cualquier péptido señal, lo que asegura una dirección eficaz de los polipéptidos VAR2CSA de *Plasmodium falciparum* expresados y otros polipéptidos de acuerdo con la presente invención en la ruta secretora de la célula. El péptido señal puede ser un péptido señal de origen natural, o una parte funcional del mismo, o puede ser un péptido sintético. Se ha encontrado que los péptidos señal adecuados son el péptido señal del factor alfa (véase el documento US 4.870.008), el péptido señal de la amilasa salival de ratón (véase O. Hagenbuchle y col., *Nature* 289, 1981, págs. 643-646), un péptido señal de la carboxipeptidasa modificada (véase L.A. Valls y col., *Cell* 48, 1987, págs. 887-897), el péptido señal de levadura BAR1 (véase el documento WO 87/02670) o el péptido señal de la proteasa aspártica 3 de levadura (YAP3) (véase M. Egel-Mitani y col., *Yeast* 6, 1990, págs. 127-137).

Para la secreción eficaz en levadura, también puede insertarse una secuencia que codifica un péptido líder cadena abajo de la secuencia señal y cadena arriba de la secuencia de ADN que codifica los polipéptidos VAR2CSA de *Plasmodium falciparum* y otros polipéptidos de acuerdo con la presente invención. La función del péptido líder es permitir que el péptido expresado se dirija desde el retículo endoplasmático al aparato de Golgi y más a una vesícula secretora para la secreción en el medio de cultivo (es decir, exportación de los polipéptidos VAR2CSA de *Plasmodium falciparum* y otros polipéptidos según el presente invención a través de la pared celular o al menos a través de la membrana celular en el espacio periplásmico de la célula de levadura). El péptido líder puede ser el líder del factor alfa de levadura (la utilización del cual se describe en, por ejemplo, el documento US 4.546.082, el documento US 4.870.008, el documento EP 16 201, el documento EP 123 294, el documento EP 123 544 y el documento EP 163 529). Alternativamente, el péptido líder puede ser un péptido líder sintético, es decir, un péptido líder que no se encuentra en la naturaleza. Los péptidos líder sintéticos pueden, por ejemplo, construirse como se describe en el documento WO 89/02463 o el documento WO 92/11378.

Para su uso en hongo filamentoso, el péptido señal puede proceder, convenientemente, de un gen que codifica una amilasa o glucoamilasa de *Apergillus sp.*, un gen que codifica una lipasa o proteasa de *Rhizomucor miehei* o lipasa de *Humicola lanuginosa*. El péptido señal procede, preferentemente, de un gen que codifica amilasa TAKA de *A. oyzae*, alfa-amilasa neutra de *A. niger*, amilasa estable ácida de *A. niger* o glucoamilasa de *A. niger*. Los péptidos señal adecuados se desvelan en, por ejemplo el documento EP 238 023 y EP 215 594.

Para su uso en células de insectos, el péptido señal puede proceder, convenientemente, de un gen de insecto (véase el documento WO 90/05783), tal como el péptido señal precursor de la hormona adipocinética *Manduca sexta* de lepidóptero (véase el documento US 5.023.328).

Los procedimientos utilizados para unir las secuencias de ADN que codifican los polipéptidos VAR2CSA de *Plasmodium falciparum* y otros polipéptidos de acuerdo con la presente invención, el promotor y, opcionalmente, el terminador y/o secuencia señal secretora, respectivamente, y para insertarlos en vectores adecuados que contienen la información necesaria para la replicación, son bien conocidos por los expertos en la materia (véase, por ejemplo, Sambrook y col., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1989).

Los procedimientos para transfectar células de mamífero y expresar secuencias de ADN introducidas en las células se describen en, por ejemplo, Kaufman y Sharp, *J. Mol. Biol.* 159 (1982), 601 - 621; Southern y Berg, *J. Mol. Appl. Genet.* 1 (1982), 327 - 341; Loyter y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79 (1982), 422 - 426; Wigler y col., *Cell* 14 (1978), 725; Corsaro y Pearson, *Somatic Cell Genetics* 7 (1981), 603, Graham y van der Eb, *Virology* 52 (1973), 456; y Neumann y col., *EMBO J.* 1 (1982), 841 - 845.

Las secuencias de ADN clonadas se introducen en células de mamíferos cultivadas mediante, por ejemplo, transfección mediada por fosfato de calcio (Wigler y col., *Cell* 14: 725-732, 1978; Corsaro y Pearson, *Somatic Cell Genetics* 7:603-616, 1981; Graham y van der Eb, *Virology* 52d:456-467, 1973) o electroporación (Neumann y col., *EMBO J.* 1:841-845, 1982). Para identificar y seleccionar células que expresan el ADN exógeno, generalmente se introduce en las células un gen que confiere un fenotipo seleccionable (un marcador seleccionable) junto con el gen o ADNc de interés. Los marcadores seleccionables preferentes incluyen genes que confieren resistencia a fármacos tales como neomicina, higromicina y metotrexato. El marcador seleccionable puede ser un marcador seleccionable amplificable. Un marcador seleccionable amplificable preferente es una secuencia de dihidrofolato reductasa (DHFR). Los marcadores seleccionables son revisados por Thilly (*Mammalian Cell Technology*, Butterworth Publishers, Stoneham, MA). Los expertos en la materia son capaces de elegir fácilmente marcadores seleccionables adecuados.

Pueden introducirse marcadores seleccionables en la célula en un plásmido separado al mismo tiempo que el gen de interés, o pueden introducirse en el mismo plásmido. Si está en el mismo plásmido, el marcador seleccionable y el gen de interés pueden estar bajo el control de diferentes promotores o el mismo promotor, produciendo la última disposición un mensaje dicistrónico. Las construcciones de este tipo son conocidas en la materia (por ejemplo, Levinson y Simonsen, documento U.S. 4.713.339). También puede ser ventajoso añadir ADN adicional, conocido como "ADN portador", a la mezcla que se introduce en las células.

Después de que las células hayan absorbido el ADN, se cultivan en un medio de crecimiento apropiado, normalmente 1-2 días, para comenzar a expresar el gen de interés. Como se usa en el presente documento, la expresión "medio de crecimiento apropiado" significa un medio que contiene nutrientes y otros componentes requeridos para el crecimiento de células y la expresión del polipéptido VAR2CSA de *Plasmodium falciparum* de

interés. Los medios incluyen, generalmente, una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno, aminoácidos esenciales, azúcares esenciales, vitaminas, sales, fosfolípidos, proteínas y factores de crecimiento. La selección del fármaco se aplica luego para seleccionar el crecimiento de células que expresan el marcador seleccionable de una manera estable. Para las células que se han transfectado con un marcador seleccionable amplificable, la concentración del fármaco puede aumentarse para seleccionar un número de copias aumentado de las secuencias clonadas, aumentando de ese modo los niveles de expresión. Luego, los clones de células transfectadas de forma estable se rastrean para determinar la expresión del polipéptido VAR2CSA de *Plasmodium falciparum* de interés.

La célula hospedadora en la que se introducen las secuencias de ADN que codifican los polipéptidos VAR2CSA de *Plasmodium falciparum* y otros polipéptidos de acuerdo con la presente invención puede ser cualquier célula, que sea capaz de producir los polipéptidos modificados postransduccionales e incluya levaduras, hongos y células eucariotas superiores.

Los ejemplos de líneas celulares de mamíferos para su uso en la presente invención son las líneas celulares COS-1 (ATCC CRL 1650), riñón de hámster bebé (BHK) y 293 (ATCC CRL 1573; Graham y col., J. Gen. Virol. 36:59-72, 1977). Una línea celular BHK preferente es la línea celular tk-ts13 BHK (Waechter y Baserga, Proc Natl. Acad. Sci. USA 79: 1106-1110, 1982), en lo sucesivo denominadas células BHK 570. La línea celular BHK 570 ha sido depositada en la American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Dr., Rockville, Md. 20852, con el número de referencia ATCC CRL 10314. Una línea celular tk-ts13 BHK también está disponible en la ATCC con el número de referencia CRL 1632. Además, se pueden utilizar varias otras líneas celulares dentro de la presente invención, incluyendo Rat Hep I (hepatoma de rata; ATCC CRL 1600), Rat Hep II (hepatoma de rata; ATCC CRL 1548), TCMK (ATCC CCL 139), pulmón humano (ATCC HB 8065), NCTC 1469 (ATCC CCL 9.1), CHO (ATCC CCL 61) y células DUKX (Urlaub y Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216-4220, 1980).

Los ejemplos de células de levaduras adecuadas incluyen células de *Saccharomyces spp.* o *Schizosaccharomyces spp.*, en particular cepas de *Saccharomyces cerevisiae* o *Saccharomyces kluyveri*. Se describen procedimientos para transformar células de levadura con ADN heterólogo y producir polipéptidos heterólogos de allí, por ejemplo, en el documento US 4.599.311, el documento US 4.931.373, el documento US 4.870.008, 5.037.743 y el documento US 4.845.075. Se seleccionan células transformadas por un fenotipo determinado por un marcador seleccionable, comúnmente resistente a los fármacos o la capacidad de crecer en ausencia de un nutriente particular, por ejemplo, leucina. Un vector preferente para su uso en levaduras es el vector POT1 desvelado en el documento US 4.931.373. Las secuencias de ADN que codifican los polipéptidos VAR2CSA de *Plasmodium falciparum* y otros polipéptidos de acuerdo con la presente invención pueden precederse de una secuencia señal y, opcionalmente, una secuencia líder, por ejemplo, como se describe anteriormente. Ejemplos adicionales de células de levadura adecuadas son cepas de *Kluyveromyces*, tales como *K. lactis*, *Hansenula*, por ejemplo, *H. polymorpha* o *Pichia*, por ejemplo, *P. pastoris* (véase Gleeson y col., J. Gen. Microbiol. 132, 1986, págs. 3459-3465; documento US 4.882.279).

Ejemplos de otras células de hongos son células de hongo filamentoso, por ejemplo, *Aspergillus spp.*, *Neurospora spp.*, *Fusarium spp.* o *trichoderma spp.*, en particular cepas de *A. oryzae*, *A. nidulans* o *A. niger*. La utilización de *Aspergillus spp.* para la expresión de proteínas se describe en, por ejemplo, el documento EP 272 277, el documento EP 238 023, el documento EP 184 438. La transformación de *F. oxysporum* puede, por ejemplo, llevarse a cabo como se describe por Maladier y col., 1989, Gene 78: 147-156. La transformación de *Trichoderma spp.* se puede realizar, por ejemplo, como se describe en el documento EP 244 234.

Cuando se utiliza un hongo filamentoso como célula hospedadora, se puede transformar con la construcción de ADN de la invención, convenientemente, mediante la integración de la construcción de ADN en el cromosoma del hospedador para obtener una célula hospedadora recombinante. Esta integración generalmente se considera una ventaja ya que es más probable que la secuencia de ADN se mantenga estable en la célula. Puede realizarse la integración de las construcciones de ADN en el cromosoma hospedador de acuerdo con procedimientos convencionales, por ejemplo, mediante recombinación homóloga o heteróloga.

Pueden realizarse la transformación de células de insecto y la producción de polipéptidos heterólogos en las mismas como se describe en el documento US 4.745.051; el documento US 4.879.236; el documento US 5.155.037; 5.162.222; el documento EP 397.485. La línea celular de insecto utilizada como hospedadora puede ser adecuadamente una línea celular de Lepidóptera, tales como células de *Spodoptera frugiperda* o células de *Trichoplusia ni* (véase el documento US 5.077.214). Las condiciones de cultivo pueden ser adecuadamente como se describe en, por ejemplo, el documento WO 89/01029 o el documento WO 89/01028 o cualquiera de las referencias anteriormente mencionadas.

La célula hospedadora transformada o transfectada descrita anteriormente se cultiva a continuación en un medio nutritivo adecuado en condiciones que permiten la expresión del polipéptido VAR2CSA de *Plasmodium falciparum* después de lo cual todo o parte del péptido resultante puede recuperarse del cultivo. El medio utilizado para cultivar las células puede ser cualquier medio convencional adecuado para el crecimiento de las células hospedadoras, tales como medios mínimos o complejos que contienen suplementos apropiados. Los medios adecuados están disponibles a través de proveedores comerciales o pueden prepararse de acuerdo con recetas publicadas (por ejemplo, en catálogos de la American Type Culture Collection). El polipéptido VAR2CSA de *Plasmodium falciparum* producido por las células puede recuperarse luego del medio de cultivo mediante procedimientos convencionales que incluyen la separación de las células hospedadoras del medio mediante centrifugación o filtración, precipitar los

componentes acuosos de la proteína del sobrenadante o filtrado mediante una sal, por ejemplo, sulfato de amonio, purificación mediante una variedad de procedimientos cromatográficos, por ejemplo, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de filtración en gel, cromatografía de afinidad o similares, dependiendo del tipo de polipéptido en cuestión.

5 Puede emplearse tecnología de animales transgénicos para producir los polipéptidos VAR2CSA y otros polipéptidos de la invención. Se prefiere producir las proteínas dentro de las glándulas mamarias de un mamífero hembra hospedador. La expresión en la glándula mamaria y la subsiguiente secreción de la proteína de interés en la leche supera muchas dificultades encontradas en el aislamiento de proteínas de otras fuentes. La leche se recoge fácilmente, está disponible en grandes cantidades y está bien caracterizada bioquímicamente. Además, las
10 principales proteínas de la leche están presentes en la leche a altas concentraciones (normalmente de, aproximadamente, 1 a 15 g/l).

Desde un punto de vista comercial, es claramente preferible utilizar como hospedador una especie que tenga una gran producción de leche. Si bien se pueden utilizar animales más pequeños, como ratones y ratas (y se prefieren en la etapa de prueba de principio), se prefiere utilizar mamíferos de ganado incluyendo, pero sin limitación, cerdos,
15 cabras, ovejas y bovinos. Las ovejas son particularmente preferidas debido a factores tales como la historia previa de transgénesis en esta especie, producción de leche, coste y la rápida disponibilidad de equipos para recolectar leche de oveja (véase, por ejemplo, el documento WO 88/00239 para una comparación de factores que influyen en la elección de especies hospedadoras). En general, es deseable seleccionar una raza de animal hospedador que se haya criado para su uso en productos lácteos, tales como ovejas de Frisia Oriental, o para introducir material lácteo
20 mediante la cría de la línea transgénica en una fecha posterior. En cualquier caso, se deben utilizar animales de buen estado de salud conocido.

Para obtener expresión en la glándula mamaria, se utiliza un promotor de transcripción de un gen de proteínas de la leche. Los genes de proteínas de la leche incluyen aquellos genes que codifican caseínas (véase el documento U.S. 5.304.489), beta lactoglobulina, una lactoalbúmina y proteína ácida de suero de leche. Se prefiere el promotor beta
25 lactoglobulina (BLG). En el caso del gen de la beta lactoglobulina ovina, generalmente se utilizará una región de al menos los 406 pb proximales de la secuencia flanqueante 5' del gen, aunque se prefieren porciones mayores de la secuencia flanqueante 5', hasta aproximadamente 5 kpb, tal como un segmento de ADN de -4,25 kpb que abarca el promotor flanqueante 5' y la porción no codificante del gen de la beta lactoglobulina (véase Whitelaw y col., Biochem. J. 286: 31 39 (1992)). También son adecuados fragmentos similares de ADN promotor de otras especies.

También pueden incorporarse otras regiones del gen de la beta lactoglobulina en construcciones, como pueden ser las regiones genómicas del gen que se va a expresar. En general se acepta en la materia que las construcciones carecen de intrones, por ejemplo, expresan mal en comparación con aquellos que contienen dichas secuencias de ADN (véase Brinster y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 836 840 (1988); Palmiter y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA
30 88: 478 482 (1991); Whitelaw y col., Transgenic Res. 1: 3 13 (1991); documento WO 89/01343; y documento WO 91/02318). En este aspecto, generalmente se prefiere, cuando sea posible, utilizar secuencias genómicas que contienen todos o algunos de los intrones nativos de un gen que codifica la proteína o polipéptido de interés, por lo tanto, se prefiere la inclusión adicional de al menos algunos intrones de, por ejemplo, el gen de beta lactoglobulina. Una de dichas regiones es un segmento de ADN que proporciona el empalme de intrones y la poliadenilación de
35 ARN de la región 3' no codificante del gen de la beta lactoglobulina ovina. Cuando se sustituyen las secuencias naturales 3' no codificantes de un gen, este segmento de beta lactoglobulina ovina puede mejorar y estabilizar los niveles de expresión de la proteína o polipéptido de interés. En otras realizaciones, la región que rodea el ATG de iniciación de la secuencia de VAR2CSA se reemplaza con secuencias correspondientes de un gen de proteína específico de leche. Dicho reemplazo proporciona un entorno de iniciación específico de tejido putativo para mejorar la expresión. Es conveniente reemplazar todas las secuencias de VAR2CSA pre pro y 5' no codificantes con las de,
40 por ejemplo, el gen BLG, aunque pueden reemplazarse las regiones más pequeñas.

Para la expresión de polipéptidos VAR2CSA y otros polipéptidos de acuerdo con la presente invención en animales transgénicos, un segmento de ADN que codifica VAR2CSA se une operativamente a segmentos de ADN adicionales requeridos para su expresión para producir unidades de expresión. Dichos segmentos adicionales incluyen el promotor mencionado anteriormente, así como secuencias que proporcionan la terminación de la transcripción y
50 poliadenilación de ARNm. Las unidades de expresión incluirán además un segmento de ADN que codifica una secuencia de señal secretora unida operativamente al segmento que codifica VAR2CSA modificado. La secuencia de señal secretora puede ser una secuencia de señal secretora nativa o puede ser la de otra proteína, tal como una proteína de leche (véase, por ejemplo, von Heijne, Nucl. Acids Res. 14: 4683 4690 (1986); y Meade y col., documento U.S. 4.873.316). La construcción de unidades de expresión para su uso en animales transgénicos se
55 lleva a cabo convenientemente mediante la inserción de una secuencia de VAR2CSA en un vector de plásmido o fago que contiene los segmentos de ADN adicionales, aunque la unidad de expresión puede construirse esencialmente mediante cualquier secuencia de ligandos. Es particularmente conveniente proporcionar un vector que contiene un segmento de ADN que codifica una proteína de leche y reemplazar la secuencia de codificación para la proteína de leche con la de una variante de VAR2CSA; creando de ese modo una fusión génica que incluye las secuencias de control de la expresión del gen de la proteína de la leche. En cualquier caso, la clonación de las unidades de expresión en plásmidos u otros vectores facilita la amplificación de la secuencia de VAR2CSA. La amplificación se lleva a cabo convenientemente en células hospedadoras bacterianas (por ejemplo, *E. coli*), por lo tanto, los vectores incluirán típicamente un origen de replicación y un marcador seleccionable funcional en células
60

hospedadoras bacterianas. La unidad de expresión se introduce luego en óvulos fertilizados (que incluyen los embriones de la etapa inicial) de la especie hospedadora elegida. Se puede realizar la introducción de ADN heterólogo mediante una de varias rutas, que incluyen microinyección (por ejemplo, patente de Estados Unidos nº 4.873.191), infección retroviral (Jaenisch, Science 240: 1468 1474 (1988)) o integración dirigida al sitio utilizando células madre embrionarias (ES) (revisado por Bradley y col., Bio / Technology 10: 534 539 (1992)). Luego, los óvulos se implantan en los oviductos o úteros de las hembras pseudopreñadas y se les permite desarrollarse a término. Los descendientes que llevan el ADN introducido en su línea germinal pueden pasar el ADN a su progenie de forma normal, forma mendeliana, lo que permite el desarrollo de rebaños transgénicos. Los procedimientos generales para producir animales transgénicos son conocidos en la materia (véase, por ejemplo, Hogan y col., Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1986; Simons y col., Bio/Technology 6: 179 183 (1988); Wall y col., Biol. Reprod. 32: 645 651 (1985); Buhler y col., Bio/Technology 8: 140 143 (1990); Ebert y col., Bio/Technology 9: 835 838 (1991); Krimpenfort y col., Bio/Technology 9: 844 847 (1991); Wall y col., J. Cell. Biochem. 49: 113 120 (1992); documento U.S. 4.873.191; documento U.S. 4.873.316; documento WO 88/00239, documento WO 90/05188, documento WO 92/11757; y documento GB 87/00458). Las técnicas para introducir secuencias de ADN extrañas en mamíferos y sus células germinales se desarrollaron originalmente en el ratón (véase, por ejemplo, Gordon y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 7380 7384 (1980); Gordon y Ruddle, Science 214: 1244 1246 (1981); Palmiter y Brinster, Cell 41: 343 345 (1985); Brinster y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 4438 4442 (1985); y Hogan y col., (ibid.)). Estas técnicas se aceptaron posteriormente para su uso con animales más grandes, que incluyen especies de ganado (véase, por ejemplo, los documentos WO 88/00239, WO 90/05188 y WO 92/11757; y Simons y col., Bio/Technology 6: 179 183 (1988)). En resumen, en la ruta más eficaz utilizada hasta la fecha en la generación de ratones o ganado transgénicos, varios cientos de moléculas lineales del ADN de interés se inyectan en uno de los núcleos pro de un óvulo fertilizado de acuerdo con técnicas establecidas. También se puede emplear la inyección de ADN en el citoplasma de un cigoto.

También se puede emplear la producción en plantas transgénicas. La expresión puede generalizarse o dirigirse a un órgano particular, tal como un tubérculo (véase, Hiatt, Nature 344:469 479 (1990); Edelbaum y col., J. Interferon Res. 12:449 453 (1992); Sijmons y col., Bio/Technology 8:217 221 (1990); y el documento EP 0 255 378).

Purificación de VAR2CSA

Los polipéptidos VAR2CSA y otros polipéptidos de la invención se pueden recuperar del medio de cultivo celular o leche. Los polipéptidos VAR2CSA y otros polipéptidos de la presente invención se pueden purificar mediante una variedad de procedimientos conocidos en la materia que incluyen, pero sin limitación, cromatografía (por ejemplo, de intercambio iónico, de afinidad, hidrófoba, de enfoque y de exclusión de tamaño), procedimientos electroforéticos (por ejemplo, enfoque isoelectrico preparativo (IEF, del inglés "preparative isoelectric focusing"), solubilidad diferencial (por ejemplo, precipitación de sulfato de amonio), o extracción (véase, por ejemplo, Protein Purification, J.-C. Janson y Lars Ryden, editors, VCH Publishers, Nueva York, 1989). Preferentemente, se pueden purificar mediante cromatografía de afinidad en una columna de anticuerpo anti-VAR2CSA. Se puede lograr una purificación adicional mediante medios de purificación química convencionales, tales como cromatografía líquida de alta resolución. Otros procedimientos de purificación, que incluyen precipitación de citrato de bario, son conocidos en la materia y se pueden aplicar a la purificación de los nuevos polipéptidos VAR2CSA y otros polipéptidos descritos en el presente documento (véase, por ejemplo, Scopes, R., Protein Purification, Springer-Verlag, N.Y., 1982).

Para fines terapéuticos, se prefiere que los polipéptidos VAR2CSA y otros polipéptidos de la invención sean sustancialmente puros. Por lo tanto, en una realización preferida de la invención, el y otros polipéptidos de la invención se purifican hasta al menos aproximadamente 90 a 95% de homogeneidad, preferentemente a al menos aproximadamente 98% de homogeneidad. La pureza se puede evaluar mediante, por ejemplo, electroforesis en gel y secuenciación amino-terminal de aminoácidos.

La expresión "polipéptido aislado" se refiere a un polipéptido de la presente invención que (1) se ha separado de al menos aproximadamente el 50 por ciento de polinucleótidos, lípidos, carbohidratos y otros materiales (es decir, contaminantes) con los que está asociado de forma natural. Preferentemente, el polipéptido aislado está sustancialmente libre de cualquier otro polipéptido contaminante u otros contaminantes que se encuentren en su entorno natural, lo que interferiría con su uso terapéutico, diagnóstico, profiláctico y de investigación.

El término "microorganismo" como se usa en el presente documento se refiere a bacterias, hongos, archaea, protistas; plantas y animales microscópicos (tales como algas verdes o plancton), el planario y la ameba. Se incluyen dentro de esta definición los microorganismos patógenos.

Administración y composiciones farmacéuticas

Tratamientos de combinación

El polipéptido, derivado o conjugado de VAR2CSA como se define en la presente memoria descriptiva puede administrarse simultánea o secuencialmente con uno o más de otros agentes cancerígenos y/o utilizarse en un tratamiento de combinación con otras terapias conocidas. Pueden suministrarse los factores en una forma de dosificación única en la que la forma de dosificación única contiene ambos compuestos, o en forma de un kit de partes que comprende una preparación de un polipéptido VAR2CSA como una primera forma de dosificación unitaria

y una preparación de uno o más de otro compuesto como una segunda forma de dosificación unitaria. Siempre que se mencione una primera o segunda o tercera, etc. dosis unitaria a lo largo de esta especificación, esto no indica el orden de administración preferente, pero se realiza, simplemente, por motivos de conveniencia.

5 Otros agentes o terapias contra el cáncer adecuadas que pueden utilizarse en combinación con un polipéptido VAR2CSA incluyen anticuerpos ya en el mercado o en desarrollo, que incluyen Vemurafenib (Hoffmann-La Roche), anticuerpos monoclonales humanos contra MCSP, Therapeutic (Micromet Inc), anti-MCSP utilizando la plataforma de tecnología de anticuerpos BiTE y la transferencia adoptiva de linfocitos T citotóxicas con especificidad para MCSP.

10 Por dosificación "simultánea" de una preparación de un polipéptido VAR2CSA y una preparación de uno o más de otros compuestos se entiende la administración de los compuestos en una forma de dosificación única, o la administración de un primer agente seguido de la administración de un segundo agente con una separación de tiempo de no más de 15 minutos, preferentemente 10, más preferentemente 5, y más preferentemente 2 minutos. Puede administrarse primero cualquier factor.

15 Por dosificación "secuencial" se entiende la administración de un primer agente seguido de la administración de un segundo agente con una separación de tiempo de más de 15 minutos. Puede administrarse primero cualquiera de las dos formas de dosificación unitaria. Preferentemente, ambos productos se inyectan a través del mismo acceso intravenoso. En el presente documento se proporciona una formulación farmacéutica que comprende un polipéptido VAR2CSA que está presente en una concentración de suero/plasma de 0 mg/ml a 1 mg/ml, y en el que la formulación tiene un pH de 2,0 a 10,0. La formulación puede comprender además un sistema tampón, conservante(s), agente(s) de tonicidad, agente(s) quelantes, estabilizadores y tensioactivos. En algunas realizaciones de la invención, la formulación farmacéutica es una formulación acuosa, es decir, una formulación que comprende agua. Dicha formulación es normalmente una solución o una suspensión. En una realizaciones adicional de la invención, la formulación farmacéutica es una solución acuosa. La expresión "formulación acuosa" se define como una formulación que comprende al menos 50 % p/p de agua. Asimismo, la expresión "solución acuosa" se define como una solución que comprende al menos 50 % p/p de agua, y la expresión "suspensión acuosa" se define como una suspensión que comprende al menos 50 % p/p de agua.

En otras realizaciones, la formulación farmacéutica es una formulación liofilizada, en la que el médico o el paciente añade disolventes y/o diluyentes antes de su uso.

30 En otras realizaciones, la formulación farmacéutica es una formulación seca (por ejemplo, liofilizada o secada por pulverización) lista para su uso sin ninguna disolución previa.

En un aspecto adicional, la divulgación se refiere a una formulación farmacéutica que comprende una solución acuosa de un polipéptido VAR2CSA, y un tampón, en la que el polipéptido VAR2CSA está presente en una concentración de suero/plasma de 0-1 mg/ml o superior, y en la que la formulación tiene un pH de aproximadamente 2.0 a aproximadamente 10.0.

35 En otras realizaciones de la invención, el pH de la formulación se selecciona de la lista que consiste en 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3,0, 3,1,3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4,0, 4,1,4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1,5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1,6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1,7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8,0, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, 9,0, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4, 9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9 y 10,0.

40 En una realización adicional de la invención, el tampón se selecciona del grupo que consiste en acetato de sodio, carbonato de sodio, citrato, glicilglicina, histidina, glicina, lisina, arginina, dihidrogeno fosfato de sodio, hidrogeno fosfato de disodio, fosfato de sodio y tris(hidroximetil)-aminometano, bicine, tricine, ácido málico, succinato, ácido maleico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido aspártico o mezclas de los mismos. Cada uno de estos tampones específicos constituye una realización alternativa de la invención.

45 En una realización adicional de la invención, la formulación comprende además un conservante farmacéuticamente aceptable. En una realización adicional de la invención, el conservante se selecciona del grupo que consiste en fenol, o-cresol, m-cresol, p-cresol, p-hidroxibenzoato de metilo, p-hidroxibenzoato de propilo, 2-fenoxietanol, p-hidroxibenzoato de butilo, 2-feniletanol, alcohol benzilo, clorobutanol y tiomerosal, bronopol, ácido benzoico, imidurea, clorohexidina, deshidroacetato de sodio, clorocresol, p-hidroxibenzoato de etilo, cloruro de bencetonio, clorfenesina (3p- clorofenoxipropano-1,2-diol) o mezclas de los mismos. En una realización adicional de la invención, el conservante está presente en una concentración de 0,1 mg/ml a 20 mg/ml. En una realización adicional de la invención, el conservante está presente en una concentración de 0,1 mg/ml a 5 mg/ml. En una realización adicional de la invención, el conservante está presente en una concentración de 5 mg/ml a 10 mg/ml. En una realización adicional de la invención, el conservante está presente en una concentración de 10 mg/ml a 20 mg/ml. Cada uno de estos conservantes específicos constituye una realización alternativa de la invención. La utilización de un conservante en composiciones farmacéuticas es bien conocida por los expertos. Para mayor comodidad, se hace referencia a Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19ª edición, 1995.

En una realización adicional de la invención, la formulación comprende además un agente isotónico. En una realización adicional de la invención, el agente isotónico se selecciona del grupo que consiste en una sal (por

ejemplo, cloruro de sodio), un azúcar o alcohol de azúcar, un aminoácido (por ejemplo, L-glicina, L-histidina, arginina, lisina, isoleucina, ácido aspártico, triptófano, treonina), un alditol (por ejemplo, glicerol (glicerina), 1,2-propanodiol (propilenglicol), 1,3-propanodiol, 1,3-butanodiol) polietilenglicol (por ejemplo, PEG400) o mezclas de los mismos. Puede utilizarse cualquier azúcar tal como mono, di o polisacárido o glicanos solubles en agua, incluyendo, por ejemplo, fructosa, glucosa, manosa, sorbosa, xilosa, maltosa, lactosa, sacarosa, trehalosa, dextrano, pululano, dextrina, ciclodextrina, almidón soluble, almidón hidroxietil y carboximetilcelulosa-Na. En algunas realizaciones, el aditivo de azúcar es sacarosa. El alcohol de azúcar se define como un hidrocarburo C4-C8 que tiene al menos un grupo -OH e incluye, por ejemplo, manitol, sorbitol, inositol, galactitol, dulcitol, xilitol y arabitól. En algunas realizaciones, el aditivo de alcohol de azúcar es manitol. Los azúcares o alcoholes de azúcar mencionados anteriormente pueden utilizarse individualmente o en combinación. No hay un límite fijo para la cantidad utilizada, siempre que el azúcar o el alcohol de azúcar sea soluble en la preparación líquida y no afecte adversamente los efectos estabilizadores logrados utilizando los procedimientos de la invención. En algunas realizaciones, la concentración de azúcar o de alcohol de azúcar está entre aproximadamente 1 mg/ml y aproximadamente 150 mg/ml. En una realización adicional de la invención, el agente isotónico está presente en una concentración de 1 mg/ml a 50 mg/ml. En una realización adicional de la invención, el agente isotónico está presente en una concentración de 1 mg/ml a 7 mg/ml. En una realización adicional de la invención, el agente isotónico está presente en una concentración de 8 mg/ml a 24 mg/ml. En una realización adicional de la invención, el agente isotónico está presente en una concentración de 25 mg/ml a 50 mg/ml. Cada uno de estos agentes isotónicos específicos constituye una realización alternativa de la invención. La utilización de un agente isotónico en composiciones farmacéuticas es bien conocida por los expertos. Para mayor comodidad, se hace referencia a Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19ª edición, 1995.

En una realización adicional de la invención, la formulación comprende además un agente quelante. En una realización adicional de la invención, el agente quelante se selecciona de sales de ácido etilendiaminetetraacético (EDTA), ácido cítrico y ácido aspártico y mezclas de los mismos. En una realización adicional de la invención, el agente quelante está presente en una concentración de 0,1 mg/ml a 5 mg/ml. En una realización adicional de la invención, el agente quelante está presente en una concentración de 0,1 mg/ml a 2 mg/ml. En una realización adicional de la invención, el agente quelante está presente en una concentración de 2 mg/ml a 5 mg/ml. Cada uno de estos agentes quelantes específicos constituye una realización alternativa de la invención. La utilización de un agente quelante en composiciones farmacéuticas es bien conocida por los expertos. Para mayor comodidad, se hace referencia a Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19ª edición, 1995.

En una realización adicional de la invención, la formulación comprende además un estabilizador. La utilización de un estabilizador en composiciones farmacéuticas es bien conocida por los expertos. Para mayor comodidad, se hace referencia a Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19ª edición, 1995.

De manera más particular, las composiciones de la invención son composiciones farmacéuticas líquidas estabilizadas cuyos componentes terapéuticamente activos incluyen un polipéptido que posiblemente exhibe formación de agregados durante el almacenamiento en formulaciones farmacéuticas líquidas. Por "formación de agregados" se entiende una interacción física entre las moléculas polipeptídicas que da como resultado la formación de oligómeros, que pueden permanecer solubles, o grandes agregados visibles que precipitan desde la solución. Por "durante el almacenamiento" se entiende que una composición o formulación farmacéutica líquida, una vez preparada, no se administra inmediatamente a un sujeto. En su lugar, después de la preparación, se envasa para su almacenamiento, ya sea en forma líquida, en estado congelado o en forma seca para su posterior reconstitución en una forma líquida u otra forma adecuada para la administración a un sujeto. Por "forma seca" se entiende que la composición o formulación farmacéutica líquida se seca mediante secado por congelación (es decir, liofilización; véase, por ejemplo, Williams y Polli (1984) J. Parenteral Sci. Technol. 38:48-59), secado por pulverización (véase Masters (1991) in Spray-Drying Handbook (5ª ed; Longman Scientific y Technical, Essex, U.K.), págs. 491-676; Broadhead y col. (1992) Drug Devel. Ind. Pharm. 18:1169-1206; y Mumenthaler y col. (1994) Pharm. Res. 11:12-20), o secado al aire (Carpenter y Crowe (1988) Cryobiology 25:459-470; y Roser (1991) Biopharm. 4:47-53). La formación de agregados por un polipéptido durante el almacenamiento de una composición farmacéutica líquida puede afectar adversamente a la actividad biológica de ese polipéptido, dando como resultado la pérdida de la eficacia terapéutica de la composición farmacéutica. Además, la formación de agregados puede causar otros problemas tales como el bloqueo de tubos, membranas o bombas cuando la composición farmacéutica que contiene polipéptidos se administra utilizando un sistema de infusión.

Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden comprender además una cantidad de una base de aminoácidos suficiente para disminuir la formación de agregados por el polipéptido durante el almacenamiento de la composición. Por "base de aminoácidos" se entiende un aminoácido o una combinación de aminoácidos, en el que cualquier aminoácido dado está presente en su forma de base libre o en su forma de sal. Cuando se utiliza una combinación de aminoácidos, todos los aminoácidos pueden estar presentes en sus formas de base libre, todos pueden estar presentes en sus formas de sal, o algunos pueden estar presentes en sus formas de base libre mientras que otros están presentes en sus formas de sal. En algunas realizaciones, los aminoácidos para utilizar en la preparación de las composiciones de la invención son aquellos que llevan una cadena lateral cargada, tal como arginina, lisina, ácido aspártico y ácido glutámico. Cualquier esteroisómero (es decir, isómero L, D o DL) de un aminoácido particular (por ejemplo, glicina, metionina, histidina, imidazol, arginina, lisina, isoleucina, ácido aspártico, triptófano, treonina y mezclas de los mismos) o combinaciones de estos esteroisómeros, pueden estar presentes en

las composiciones farmacéuticas de la invención siempre que el aminoácido particular esté presente en su forma de base libre o su forma de sal. En algunas realizaciones, se utiliza el L-estereoisómero. Las composiciones de la invención también pueden formularse con análogos de estos aminoácidos. Por "análogo de aminoácido" se entiende un derivado del aminoácido de origen natural que produce el efecto deseado de disminución de la formación de agregados por el polipéptido durante el almacenamiento de las composiciones farmacéuticas líquidas de la invención. Los análogos de arginina adecuados incluyen, por ejemplo, aminoguanidina, ornitina y N-monoetil L-arginina, los análogos de metionina adecuados incluyen etionina y butionina y los análogos de cisteína adecuados incluyen S-metil-L cisteína. Como con los otros aminoácidos, los análogos de aminoácidos se incorporan en las composiciones en su forma de base libre o en su forma de sal. En una realización adicional de la invención, los aminoácidos o análogos de aminoácidos se utilizan en una concentración, que es suficiente para evitar o retrasar la agregación de la proteína.

En una realización adicional de la invención, se puede añadir metionina (u otros aminoácidos o análogos de aminoácidos sulfúricos) para inhibir la oxidación de restos de metionina a sulfóxido de metionina cuando el polipéptido que actúa como agente terapéutico es un polipéptido que comprende al menos un resto de metionina susceptible a tal oxidación. Por "inhibir" se pretende acumulación mínima de especies oxidadas de metionina a lo largo del tiempo. La inhibición de la oxidación de metionina da como resultado una mayor retención del polipéptido en su forma molecular adecuada. Se puede utilizar cualquier estereoisómero de metionina (isómero L, D o DL) o combinaciones de los mismos. La cantidad que se debe agregar debe ser una cantidad suficiente para inhibir la oxidación de los restos de metionina de manera que la cantidad de sulfóxido de metionina sea aceptable para las agencias reguladoras. Normalmente, esto significa que la composición contiene no más de aproximadamente 10 % a aproximadamente 30 % de sulfóxido de metionina. Generalmente, esto se puede lograr mediante la adición de metionina de modo que la relación de metionina añadida a restos de metionina varíe de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 1000:1, tal como 10:1 a aproximadamente 100:1.

En una realización adicional de la invención, la formulación comprende además un estabilizador seleccionado del grupo de polímeros de alto peso molecular o compuestos de bajo peso molecular. En una realización adicional de la invención, el estabilizador se selecciona de polietilenglicol (por ejemplo, PEG 3350), alcohol polivinílico (PVA, del inglés "polyvinyl alcohol"), polivinilpirrolidona, carboxi/hidroxil-celulosa o derivados de los mismos (por ejemplo HPC, HPC-SL, HPC-L y HPMC), ciclodextrinas, sustancias que contienen sulfuro como monotioglicerol, ácido tioglicólico y 2-metiltoetanol y diferentes sales (por ejemplo, cloruro de sodio). Cada uno de estos estabilizadores específicos constituye una realización alternativa de la invención.

Las composiciones farmacéuticas también pueden comprender agentes estabilizantes adicionales, que mejoran adicionalmente la estabilidad de un polipéptido terapéuticamente activo en el mismo. Los agentes estabilizantes de interés particular para la presente invención incluyen, aunque sin limitación, metionina y EDTA, que protegen al polipéptido frente a la oxidación de metionina, y un tensioactivo no iónico, que protege el polipéptido contra la agregación asociada con congelación-descongelación o cizallamiento mecánico.

En una realización adicional de la invención, la formulación comprende además un tensioactivo. En una realización adicional de la invención, el tensioactivo se selecciona de un detergente, aceite de ricino etoxilado, glicéridos poliglicolizados, monoglicéridos acetilados, ésteres de ácidos grasos de sorbitán, polímeros de bloques de polioxipropileno-polooxietileno (por ejemplo, poloxámeros tales como Pluronic® F68, poloxámero 188 y 407, Triton X-100) ésteres de ácidos grasos de polioxietileno de sorbitán, polioxietileno y derivados de polietileno tales como derivados alquilados y alcoxilados (tweens, por ejemplo, Tween-20, Tween-40, Tween-80 y Brij-35), monoglicéridos o derivados etoxilados de los mismos, diglicéridos o derivados de polioxietileno de los mismos, alcoholes, glicerol, lectinas y fosfolípidos (por ejemplo, fosfatidilserina, fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilinositol, difosfatidilglicerol y esfingomielina), derivados de fosfolípidos (por ejemplo, ácido dipalmitoil fosfatídico) y lisofosfolípidos (por ejemplo, palmitoil lisofosfatidil-L-serina y 1-acil-sn-glicero-3-fosfato ésteres de etanolamina, colina, serina o treonina) y alquilo, alcoxilo (éster de alquilo), derivados de alcoxi (alquil éter) de lisofosfatidil y fosfatidilcolinas, por ejemplo, derivados de lauroil y miristoil de lisofosfatidilcolina, dipalmitoilfosfatidilcolina, y modificaciones del grupo principal polar, que son colinas, atenolaminas, ácido fosfatídico, serinas, treoninas, glicerol, inositol y DODAC, DOTMA, DCP, BISHOP, lisofosfatidilserina y lisofosfatidiltreonina de carga positiva, y glicerofosfolípidos (por ejemplo, cefalinas), gliceroglicolípidos (por ejemplo, galactopiransoide), esfingoglicolípidos (por ejemplo, ceramidas, gangliósidos), dodecilsulfocolina, lisolecitina de huevo de gallina, derivados de ácido fusídico (por ejemplo, taurodihidrofusidato de sodio, etc.), ácidos grasos de cadena larga y sales C6-C12 de los mismos (por ejemplo, ácido oleico y ácido caprílico), acilcarnitinas y derivados, derivados N^α-acilados de lisina, arginina o histidina, o derivados acilados de la cadena lateral de lisina o arginina, derivados N^α-acilados de dipéptidos que comprenden cualquier combinación de lisina, arginina o histidina y un aminoácido neutro o ácido, derivado N^α-acilado de un tripéptido que comprende cualquier combinación de un aminoácido neutro y dos aminoácidos cargados, DSS (docusato de sodio, n.º de registro CAS [577-11-7]), docusato de calcio, n.º de registro CAS [128-49-4]), docusato de potasio, n.º de registro CAS [7491-09-0]), SDS (dodecil sulfato de sodio o lauril sulfato de sodio), caprilato de sodio, ácido cólico o derivados del mismo, ácidos biliares y sus sales y conjugados de glicina o taurina, ácido ursodesoxicólico, colato de sodio, desoxicolato de sodio, taurocolato de sodio, glicocolato de sodio, N-Hexadecil-N, N-dimetil-3-amonio-1-propanosulfonato, tensioactivos monovalentes aniónicos (alquil-aril-sulfonatos), tensioactivos zwitteriónicos (por ejemplo, N-alquil-N, N-dimetilamonio-1-propanosulfonatos, 3-colamido-1-propildimetilamonio-1-propanosulfonato, tensioactivos catiónicos (bases de amonio cuaternario) (por ejemplo,

bromuro de cetil-trimetilamonio, cloruro de cetilpiridinio), tensioactivos no iónicos (por ejemplo, dodecil-β-D-glucopiranosido), poloxaminas (por ejemplo, Tetronic's), que son copolímeros de bloques tetrafuncionales derivados de la adición secuencial de óxido de propileno y óxido de etileno a etilendiamina, o el tensioactivo se puede seleccionar del grupo de derivados de imidazolina, o mezclas de los mismos. Cada uno de estos tensioactivos específicos constituye una realización alternativa de la invención.

La utilización de un tensioactivo en composiciones farmacéuticas es bien conocida por los expertos. Para mayor comodidad, se hace referencia a Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19ª edición, 1995.

Es posible que otros ingredientes puedan estar presentes en la formulación farmacéutica peptídica de la presente invención. Dichos ingredientes adicionales pueden incluir agentes humectantes, emulsionantes, antioxidantes, agentes de carga, modificadores de tonicidad, agentes quelantes, iones metálicos, vehículos oleaginosos, proteínas (por ejemplo, albúmina de suero humano, gelatina o proteínas) y un zwitterión (por ejemplo, un aminoácido tal como betaína, taurina, arginina, glicina, lisina e histidina). Dichos ingredientes adicionales, por supuesto, no deberían afectar negativamente a la estabilidad global de la formulación farmacéutica de la presente invención.

Las composiciones farmacéuticas que contienen un polipéptido VAR2CSA de acuerdo con la presente invención pueden administrarse a un paciente que necesite dicho tratamiento en varios sitios, por ejemplo, en sitios tópicos, por ejemplo, sitios de la piel y la mucosa, en sitios que evitan la absorción, por ejemplo, administración en una arteria, en una vena, en el corazón y en sitios que implican absorción, por ejemplo, administración en la piel, bajo la piel, en un músculo o en el abdomen.

La administración tópica puede ser una ventaja particular en el tratamiento de afecciones asociadas con la inflamación local, como en el tratamiento de la inflamación asociada con la quemadura u otras afecciones asociadas con la piel. Por consiguiente, en algunas realizaciones, la administración es mediante administración tópica.

En algunas realizaciones particulares, las gotas oculares pueden utilizarse en afecciones asociadas con el ojo, tal como queratitis, tal como queratitis laminar difusa (DLK, del inglés "diffuse lamellar keratitis").

La administración de composiciones farmacéuticas de acuerdo con la invención puede realizarse a través de varias vías de administración, por ejemplo, lingual, sublingual, bucal, en la boca, oral, en el estómago e intestino, nasal, pulmonar, por ejemplo, a través de los bronquiolos y alveolos o una combinación de los mismos, epidérmica, dérmica, transdérmica, vaginal, rectal, ocular, por ejemplo, a través de la conjuntiva, uretral y parenteral a pacientes que necesitan dicho tratamiento.

Las composiciones de la presente invención se pueden administrar en varias formas de dosificación, por ejemplo, como soluciones, suspensiones, emulsiones, microemulsiones, emulsión múltiple, espumas, pomadas, pastas, yesos, ungüentos, comprimidos, comprimidos recubiertos, enjuagues, cápsulas, por ejemplo, cápsulas de gelatina dura y cápsulas de gelatina blanda, supositorios, cápsulas rectales, gotas, geles, pulverizadores, polvos, aerosoles, inhaladores, gotas para los ojos, ungüentos oftálmicos, enjuagues oftálmicos, pesarios vaginales, anillos vaginales, ungüentos vaginales, soluciones para inyección, soluciones transformadoras *in situ*, por ejemplo, gelificación *in situ*, ajuste *in situ*, precipitación *in situ*, cristalización *in situ*, solución de infusión e implantes.

Las composiciones de la invención pueden componerse adicionalmente o unirse a, por ejemplo, a través de interacciones covalentes, hidrófobas y electrostáticas, un vehículo de fármaco, un sistema de liberación de fármaco y un sistema avanzado de liberación de fármaco para potenciar adicionalmente la estabilidad del polipéptido VAR2CSA, aumentar la biodisponibilidad, aumentar la solubilidad, disminuir los efectos adversos, lograr la cronoterapia bien conocida por los expertos en la materia, y aumentar el cumplimiento del paciente o cualquier combinación de los mismos. Los ejemplos de vehículos, sistemas de liberación de fármaco y sistemas avanzados de liberación de fármacos incluyen, aunque sin limitación, polímeros, por ejemplo, celulosa y derivados, polisacáridos, por ejemplo, dextrano y derivados, almidón y derivados, alcohol de polivinilo, polímeros de acrilato y metacrilato, ácido poliláctico y poliglicólico y copolímeros de bloque de los mismos, polietilenglicoles, proteínas transportadoras, por ejemplo, albúmina, geles, por ejemplo, sistemas de termogelificación, por ejemplo, sistemas de copolímeros de bloque bien conocidos por los expertos en la materia, micelas, liposomas, microesferas, nanopartículas, partículas como virus, partículas como bacterias, cristales líquidos y dispersiones de los mismos, fase L2 y dispersiones de la misma, bien conocida por los expertos en la materia del comportamiento de fase en sistemas de lípidos y agua, micelas poliméricas, emulsiones múltiples, autoemulsiones, automicroemulsiones, ciclodextrinas y derivados de las mismas, y dendrímeros.

Las composiciones de la presente invención son útiles en la formulación de sólidos, semisólidos, polvo y soluciones para administración pulmonar del polipéptido VAR2CSA, utilizando, por ejemplo, un inhalador de dosis medida, un inhalador de polvo seco y un nebulizador, siendo todos los dispositivos bien conocidos por los expertos en la materia.

Las composiciones de la presente invención son especialmente útiles en la formulación de sistemas de liberación de fármacos controlada, sostenida, prolongada, retardada y de liberación lenta. De manera más específica, pero sin limitación, las composiciones son útiles en la formulación de sistemas de liberación sostenida y de liberación controlada parenteral (ambos sistemas conducen a una reducción múltiple en el número de administraciones), bien

conocidos por los expertos en la materia. Incluso más preferentemente, son sistemas de liberación controlada y liberación sostenida administrados por vía subcutánea. Sin limitar el ámbito de la invención, los ejemplos de sistemas y composiciones de liberación controlada útiles son hidrogeles, geles oleaginosos, cristales líquidos, micelas poliméricas, microesferas, nanopartículas.

- 5 Los procedimientos para producir sistemas de liberación controlada útiles para las composiciones de la presente invención incluyen, aunque sin limitación, cristalización, condensación, cocrystalización, precipitación, coprecipitación, emulsificación, dispersión, homogeneización a alta presión, encapsulación, secado por pulverización, microencapsulación, coacervación, separación de fases, evaporación del disolvente para producir microesferas, extrusión y procesos de fluido supercrítico. Se hace referencia general a Handbook of Pharmaceutical Controlled Release (Wise, D.L., ed. Marcel Dekker, New York, 2000) y Drug and the Pharmaceutical Sciences vol. 99: Protein Formulation and Delivery (MacNally, E.J., ed. Marcel Dekker, Nueva York, 2000).

- 10 La administración parenteral puede realizarse mediante inyección subcutánea, intramuscular, intraperitoneal o intravenosa por medio de una jeringa, opcionalmente, una jeringa de tipo pluma. Alternativamente, la administración parenteral se puede realizar por medio de una bomba de infusión. Otra opción es una composición, que puede ser una solución o suspensión para la administración del polipéptido VAR2CSA en forma de un pulverizador nasal o pulmonar. Como otra opción adicional, las composiciones farmacéuticas que contienen el polipéptido VAR2CSA de la invención también se pueden adaptar a la administración transdérmica, por ejemplo, mediante inyección sin aguja o desde un parche, opcionalmente un parche iontoforético, o transmucosal, por ejemplo, administración bucal.

- 15 La expresión "formulación estabilizada" se refiere a una formulación con estabilidad física incrementada, estabilidad química aumentada o estabilidad física y química aumentada.

- 20 La expresión "estabilidad física" de la formulación de proteína como se usa en el presente documento se refiere a la tendencia de la proteína a formar agregados biológicamente inactivos y/o insolubles de la proteína como resultado de la exposición de la proteína a tensiones termomecánicas y/o interacción con interfaces y superficies que son desestabilizadoras, tales como superficies e interfaces hidrófobas. La estabilidad física de las formulaciones de proteínas acuosas se evalúa mediante mediciones de inspección visual y/o turbidez después de exponer la formulación llena en recipientes adecuados (por ejemplo, cartuchos o viales) a estrés mecánico/físico (por ejemplo, agitación) a diferentes temperaturas durante diversos períodos de tiempo. La inspección visual de las formulaciones se realiza en una luz enfocada nítida con un fondo oscuro. La turbidez de la formulación se caracteriza por una puntuación visual que clasifica el grado de turbidez, por ejemplo, en una escala de 0 a 3 (una formulación que no muestra turbidez corresponde a una puntuación visual de 0 y una formulación que muestra turbidez visual a la luz del día corresponde con una puntuación visual de 3). Una formulación se clasifica físicamente inestable con respecto a la agregación de proteínas, cuando muestra turbidez visual a la luz del día. Alternativamente, la turbidez de la formulación puede evaluarse mediante medidas simples de turbidez bien conocidas por la persona experta. La estabilidad física de las formulaciones de proteínas acuosas también se puede evaluar utilizando un agente o sonda espectroscópica del estado conformacional de la proteína. La sonda es preferentemente una molécula pequeña que se une preferencialmente a un conformero no nativo de la proteína. Un ejemplo de una sonda espectroscópica molecular pequeña de estructura proteica es la tioflavina T. La tioflavina T es un colorante fluorescente que se ha utilizado ampliamente para la detección de fibrillas amiloides. En presencia de fibrillas, y tal vez otras configuraciones de proteínas también, tioflavina T da lugar a un nuevo máximo de excitación a aproximadamente 450 nm y una emisión mejorada a aproximadamente 482 nm cuando se une a una forma de proteína de fibrilla. La tioflavina T sin consolidar es esencialmente no fluorescente en las longitudes de onda.

- 35 Se pueden utilizar otras moléculas pequeñas como sondas de los cambios en la estructura de la proteína de estados nativos a no nativos. Por ejemplo, las sondas de "parches hidrófobos" que se unen preferentemente a parches hidrófobos expuestos de una proteína. Los parches hidrófobos generalmente están enterrados dentro de la estructura terciaria de una proteína en su estado nativo, pero quedan expuestos a medida que una proteína comienza a desplegarse o desnaturizarse. Ejemplos de estas pequeñas sondas espectroscópicas moleculares son colorantes aromáticos hidrófobos, tales como antraceno, acridina, fenantrolina o similares. Otras sondas espectroscópicas son complejos de metal-aminoácido, tales como complejos de metal de cobalto de aminoácidos hidrófobos, tales como fenilalanina, leucina, isoleucina, metionina y valina o similares.

- 45 La expresión "estabilidad química" de la formulación de proteína como se usa en el presente documento se refiere a cambios covalentes químicos en la estructura de proteína que conducen a la formación de productos de degradación química con potencial potencia biológica menor y/o potencial aumento de propiedades inmunogénicas en comparación con la estructura de proteína nativa. Se pueden formar diversos productos de degradación química dependiendo del tipo y la naturaleza de la proteína nativa y del entorno al que está expuesta la proteína. La eliminación de la degradación química muy probablemente no puede evitarse por completo y a menudo se observan cantidades crecientes de productos de degradación química durante el almacenamiento y el uso de la formulación de proteínas como es bien conocido por el experto en la materia. La mayoría de las proteínas son propensas a la desamidación, un procedimiento en el que el grupo amida de la cadena lateral en los restos de glutaminilo o asparaginilo se hidroliza para formar un ácido carboxílico libre. Otras rutas de degradación implican la formación de productos de transformación de alto peso molecular en los que dos o más moléculas de proteína se unen covalentemente entre sí mediante transamidación y/o interacciones disulfuro que conducen a la formación de productos de degradación de dímeros, oligómeros y polímeros unidos covalentemente (Stability of Protein

Pharmaceuticals, Ahern. T.J. & Manning M.C., Plenum Press, New York 1992). La oxidación (de, por ejemplo, restos de metionina) se puede mencionar como otra variante de la degradación química. La estabilidad química de la formulación de proteína se puede evaluar mediante la medición de la cantidad de los productos de degradación química en diversos puntos temporales después de la exposición a diferentes condiciones ambientales (la formación de productos de degradación a menudo se puede acelerar, por ejemplo, aumentando la temperatura). La cantidad de cada producto de degradación individual a menudo se determina mediante la separación de los productos de degradación dependiendo del tamaño de la molécula y/o la carga utilizando diversas técnicas de cromatografía (por ejemplo, SEC-HPLC y/o RP-HPLC). Por lo tanto, como se resumió anteriormente, una "formulación estabilizada" se refiere a una formulación con estabilidad física incrementada, estabilidad química aumentada o estabilidad física y química aumentada. En general, una formulación debe ser estable durante su uso y almacenamiento (de acuerdo con el uso recomendado y las condiciones de almacenamiento) hasta que se alcance la fecha de vencimiento.

En algunos casos, la formulación farmacéutica que comprende el polipéptido VAR2CSA es estable durante más de 6 semanas de uso y durante más de 3 años de almacenamiento. En otras realizaciones de la invención, la formulación farmacéutica que comprende el polipéptido VAR2CSA es estable durante más de 4 semanas de uso y durante más de 3 años de almacenamiento. En una realización adicional de la invención, la formulación farmacéutica que comprende el polipéptido VAR2CSA es estable durante más de 4 semanas de uso y durante más de dos años de almacenamiento. En todavía otra realización adicional de la invención, la formulación farmacéutica que comprende el polipéptido VAR2CSA es estable durante más de 2 semanas de uso y durante más de dos años de almacenamiento.

Indicaciones para su uso del polipéptido VAR2CSA y conjugados del mismo

Los polipéptidos VAR2CSA o conjugados de los mismos pueden utilizarse en una amplia gama de indicaciones asociadas con la expresión, tal como expresión inapropiada de CSA, tal como en diversos cánceres, tal como cánceres metastásicos que incluyen melanomas, tal como melanoma C32, sarcomas, carcinomas de pulmón, oligodendrocitomas, tumores de cerebro humano que incluyen gliomas, leucemia, tal como leucemia linfoblástica y leucemia mieloide aguda y carcinoma, tal como carcinomas de células escamosas y carcinomas de mama, carcinomas de células renales, condrosarcomas y carcinomas de células pancreáticas. Los polipéptidos VAR2CSA o conjugados de los mismos también pueden utilizarse para células madre cancerosas y, por consiguiente, se dirigen a las células antes del desarrollo en un cáncer. Otras afecciones asociadas con la expresión, tales como expresión inapropiada de CSA son las afecciones del cartílago y/o el desarrollo de tejido cicatricial.

Los polipéptidos VAR2CSA o conjugados de los mismos pueden utilizarse para identificar, rastrear y dirigir micrometástasis distantes *in vivo*. Prácticamente todos los tumores primarios, incluidos los cánceres del sistema hematopoyético, tienen el potencial de convertirse en enfermedad metastásica, que está altamente asociada con un resultado terapéutico deficiente de los pacientes.

Los polipéptidos VAR2CSA o conjugados de los mismos pueden utilizarse para dirigir compuestos que evitan la degradación o reparación de CSPG extracelulares tales como hormonas de crecimiento, compuestos antiinflamatorios o inhibidores de proteína, a tejido de cartílago, articulaciones y tejido neural.

Los polipéptidos VAR2CSA o conjugados de los mismos pueden utilizarse para dirigir compuestos que mejoran la degradación o evitan la producción de CSPG extracelulares tales como condroitinasa ABC, que corta las cadenas de azúcar del núcleo de la proteína de moléculas de CSPG. Xilocides, que reduce la producción de CSPG o fármacos que inhiben enzimas importantes para la producción de CSPG tales como condroitina sintasa o factor de polimerización de condroitina (tales como 4-fluoro-glucosamina, p-nitrofenil-beta-D-xilóxido, 4-metil-umbeliferil-beta-D-xilopiranosida), a tejido neural dañado.

Puede utilizarse VAR2CSA conjugado a un ácido nucleico, aquí entre ARN interferente pequeño (ARNip), ácidos nucleicos peptídicos (ANP) antisentido, ARN de horquilla pequeña (ARNhc) y ácidos nucleicos bloqueados (LNATM), para eliminar el ARN que codifica moléculas presentadoras de CSA.

Conjugados del polipéptido VAR2CSA

Fracción efectora terapéutica o de diagnóstico, tal como fracciones citotóxicas y detectoras

En algunos aspectos de la presente invención, se proporcionan polipéptidos, proteína de fusión o conjugado de VAR2CSA como se define en la presente divulgación, que comprende además una fracción efectora terapéutica, tal como un agente inflamatorio, una hormona esteroide, un agente o fracción citotóxica o de detección, tal como una molécula orgánica, radionucleido o enzima citotóxica.

En algunos aspectos de la presente invención, el polipéptido VAR2CSA o la proteína de fusión VAR2CSA de acuerdo con la presente invención comprende una secuencia tal como se define por una o más secuencias seleccionadas de SEQ ID NO 57-59, y 71 o una variante funcional o fragmento de la misma.

En algunas realizaciones, el polipéptido VAR2CSA o la proteína de fusión VAR2CSA de acuerdo con la presente invención puede comprender un inhibidor de proteasa, tal como inhibidor de tripsina pancreática básica (BPTI, del

inglés "basic pancreatic trypsin inhibitor") en el extremo, tal como el extremo N de la secuencia de proteína, tal como una secuencia definida por SEQ ID NO: 57.

En algunas realizaciones, el polipéptido VAR2CSA o la proteína de fusión VAR2CSA de acuerdo con la presente invención puede comprender una secuencia de proteínas de toxina, tal como una secuencia como se define por una o más secuencias seleccionadas de SEQ ID NO 58, 59 y 71, tal como una secuencia de proteínas de toxina optimizada para ser menos inmunogénico, tal como una secuencia definida por SEQ ID NO: 59. En algunas realizaciones, la secuencia señal KDEL de SEQ ID NO 58 o 59 está presente en una proteína de fusión VAR2CSA de acuerdo con la presente invención y en algunas realizaciones la secuencia señal KDEL de SEQ ID NO 58 o 59 está ausente en una proteína de fusión VAR2CSA de acuerdo con la presente invención. Por consiguiente, la secuencia de señal KDEL puede ser opcional para las construcciones de acuerdo con la presente invención.

Ejemplos no limitativos de fracciones citotóxicas que pueden fusionarse o conjugarse con polipéptidos VAR2CSA de acuerdo con la invención, son agentes quimioterapéuticos seleccionados de caliqueamicina, cisplatino, adriamicina, auristatin, doxorubicina, maitansinoide, taxol, ecteinascidina, geldanamicina, metotrexato y sus derivados y combinaciones de los mismos y similares adecuados para la terapia del cáncer. Los ejemplos de proteínas citotóxicas fusionadas a polipéptidos VAR2CSA son la exotoxina A de *Pseudomonas*, toxina diftérica, toxina de ricina, proteína antiviral de hierba carmín, saporin, gelonina y variantes de la misma.

Se han descrito conjugados de albúmina con doxorubicina para su uso en cáncer (Kratz y col, J Med Chem 45: 5523-33, 2002) y con metotrexato en artritis reumatoide (Wunder y col, J Immunol 170: 4793-4801, 2003). También se han descrito compuestos que aumentan las especies de oxígeno reactivo, es decir, piperlongumina (Raj y col., Nature 475: 231-234, 2011). Además, pueden utilizarse enzimas terapéuticas, agentes que inducen apoptosis y similares para proporcionar citotoxicidad dirigida, es decir, destrucción de células tumorales.

Los polipéptidos VAR2CSA descritos en el presente documento pueden mediar en la destrucción de células induciendo lisis mediada por citotoxicidad dependiente del complemento (CDC, del inglés *complement dependent cytotoxicity*), lisis mediada por citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC, del inglés *antibody dependent cellular cytotoxicity*), apoptosis, adhesión homotípica y/o fagocitosis, tal como mediante la inducción de lisis mediada por CDC y lisis mediada por ADCC. Los polipéptidos VAR2CSA descritos en el presente documento pueden interactuar con componentes del sistema inmune, preferentemente a través de ADCC o CDC. Sin embargo, Los polipéptidos VAR2CSA de la invención también pueden ejercer un efecto simplemente uniéndose a antígenos tumorales en la superficie celular, por lo tanto, por ejemplo, bloqueando la proliferación de las células.

De acuerdo con la invención, la expresión "fracción efectora terapéutica" significa cualquier molécula, que pueda ejercer un efecto terapéutico. De acuerdo con la invención, una molécula efectora terapéutica es preferentemente guiada selectivamente a una célula, que expresa CSA e incluye agentes anticancerosos, radioisótopos, toxinas, fármacos citostáticos o citolíticos, etc. Los agentes anticancerosos comprenden, por ejemplo, antraciclinas (doxorubicina, daunorubicina, epirubicina, idarubicina, valrubicina, mitoxantrona), agentes alquilantes basados en platino y no platino (cisplatino, carboplatino, oxaliplatino, mecloretamina, ciclofosfamida, clorambucilo, ifosfamida, busulfán, carmustina, dacarbazina, lomustina, procarbazona), alcaloides vinca (vincristina, vinblastina, vinorelbina, vindesina), taxanos (taxol y docetaxel), inhibidores de topoisomerasa I (camptotecina, irinotecan, topotecan), inhibidores de topoisomerasa II (amsacrina, etopósido, etopósido fosfato, tenipósido y otros derivados de alcaloides de origen natural en la raíz de American Mayapple (*Podophyllum peltatum*)), antibióticos citotóxicos no antraciclinos (dactinomicina, bleomicina, plicamicina y mitomicinas), antiesteroides (tal como aminoglucetimidato), análogos nucleósidos (citarabidina, fluorouracilo y mercaptopurina), antimetabolitos (metotrexato y tioguanina), análogos diclorodifenilnitricloroetano (como mitotano), y compuestos que inducen especies de oxígeno reactivo (ROS, del inglés "reactive oxygen species") (que incluyen pero no se limitan a piperlongumina y beta-feniletil isotiocianato). Otros agentes anticancerosos se describen, por ejemplo, en Goodman y Gilman, "The Pharmacological Basis of Therapeutics", 8ª Edición, 1990, McGraw-Hill, Inc., en particular, el capítulo 52 (Antineoplastic Agents (Paul Calabresi y Bruce A. Chabner). Las toxinas pueden ser proteínas tales como la proteína antiviral de la hierba carmín, toxina del cólera, toxina pertussis, ricina, gelonina, abrin, exotoxina de difteria o exotoxina de pseudomonas. Los residuos de toxinas también pueden ser radionucleidos emisores de alta energía tales como cobalto-60. Un polipéptido VAR2CSA puede utilizarse junto con péptidos que penetran en la célula (CPP, del inglés "cell-penetrating peptides") para facilitar el transporte del polipéptido VAR2CSA y cualquier molécula unida al mismo a través de las membranas plasmáticas celulares. Los péptidos que penetran en las células han encontrado numerosas aplicaciones en medicina como agentes de liberación de fármacos en el tratamiento de diferentes enfermedades que incluyen cáncer e inhibidores de virus. Los ejemplos de CPP incluyen, pero no están limitados a: activador transcripcional transactivador (Tat) del virus de la inmunodeficiencia humana; pep-1 (Chariot™); R8, azo-R8; SMOc. (Okuyama M y col. Nat Methods. 2007 Feb;4(2):153-9M; Soane L y Fiskum GJ Neurochem. 2005 Oct;95(1):230-43; Loudet A y col. Org Biomol Chem. 2008 Dec 21;6(24):4516-22).

Radionucleidos

Un polipéptido, una proteína de fusión o conjugado de VAR2CSA de acuerdo con los aspectos descritos en el presente documento acoplados a un quelante de poliaminopolicarboxilato puede utilizarse para proporcionar un polipéptido radiomarcado que consiste en un radioquelato del polipéptido, proteína de fusión o conjugado de VAR2CSA acoplado al quelante y un radionúclido adecuado para imágenes medicas, siendo el radionucleido

seleccionado del grupo que consiste en ^{61}Cu , ^{64}Cu , ^{66}Ga , ^{67}Ga , ^{68}Ga , ^{110}In , ^{111}In , ^{44}Sc , ^{89}Zr y ^{86}Y , o con un radionucleido adecuado para terapia, siendo el radionucleido seleccionado del grupo que consiste en ^{225}Ac , ^{212}Bi , ^{213}Bi , ^{67}Cu , ^{166}Ho , ^{177}Lu , ^{212}Pb , ^{149}Pm , ^{153}Sm , ^{227}Th y ^{90}Y , en el que el radionucleido se une con el polipéptido VAR2CSA, tal como mediante un quelante.

- 5 De acuerdo con ello, los polipéptidos, una proteína de fusión o conjugado de VAR2CSA de acuerdo con los aspectos descritos en el presente documento pueden utilizarse para la radiografía de células cancerosas, que incluyen tumores sólidos o metástasis, tales como en pacientes con melanoma.

En realizaciones de la misma, el polipéptido también puede radiomarcarse con radioisótopos no metálicos utilizando el denominado marcaje indirecto. Por lo tanto, para marcar con, por ejemplo, ^{18}F , ^{76}Br , diferentes isótopos de yodo y ^{211}At , se utilizan para marcar "moléculas enlazadoras" intermedias. Dicha molécula enlazadora debe contener dos fracciones funcionales, uno que proporcione radiomarcaje rápido y eficaz, y otro que permita acoplamiento rápido y eficaz a las proteínas, por ejemplo, a grupos amina, o preferentemente al grupo tiol de una cisteína única. Por ejemplo, un grupo maleimida reacciona con grupos tiol para formar un enlace tioéter estable. La "molécula enlazadora" puede reaccionar primero con la radiomarca y posteriormente con el tiol o el grupo selenotiol de la proteína.

Otras fracciones de detección alternativas incluyen fluoróforos o fluorocromos tales como cualquiera seleccionado de hidroxycumarina, aminocumarina, metoxicumarina, Azul caCSAdA, azul pacífico, naranja pacífico, amarillo lucifer, NBD, R-Ficoeritrina (FE), conjugados PE-Cy5, conjugados PE-Cy7, rojo 613, PerCP, TruRed, FluorX, fluoresceína, BODIPY-FL, TRITC, X-Rodamina, lisamina rodamina B, rojo texas, Alofycocianina (AFC) y conjugados AFC-Cy7.

- 20 Tales conjugados con fracciones detectoras que incluyen fluoróforos o fluorocromos pueden utilizarse para obtener imágenes de células o tumores cancerosos.

Hormonas esteroideas o agentes antiinflamatorios

En algunos ejemplos, los polipéptidos VAR2CSA se conjugan con un agente antiinflamatorio, incluyendo hormonas esteroideas.

- 25 Se sabe que el cartílago y el tejido cicatricial contienen CSPG en grandes cantidades. Por consiguiente, puede ser atractivo dirigir agentes antiinflamatorios tales como compuestos antiinflamatorios no esteroideos, fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad (tales como metotrexato, azatioprina, sulfasalazina, ciclosporina, penicilamina, leflunomida u oro), fármacos antirreumáticos biológicos (tales como inhibidores del factor de necrosis tumoral, antagonistas del receptor de interleuquina 1, anticuerpo CD20, factor de crecimiento de insulina 1) y hormonas esteroideas o compuestos alternativos a dicho tejidos.

En algunos ejemplos, los polipéptidos VAR2CSA se conjugan con un agente antiinflamatorio, tal como compuestos antiinflamatorios no esteroideos, fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad (tales como metotrexato, azatioprina, sulfasalazina, ciclosporina, penicilamina, leflunomida u oro), fármacos antirreumáticos biológicos (tales como inhibidores del factor de necrosis tumoral, antagonistas del receptor de interleuquina 1, anticuerpo CD20, factor de crecimiento de insulina 1) y hormonas esteroideas o compuestos alternativos a dicho tejidos.

Conjugados con CSPG4

En algunos ejemplos, los polipéptidos VAR2CSA se conjugan con CSPG4.

- Se supone que pueden utilizarse conjugados de polipéptidos VAR2CSA con CSPG4 como agente de inmunización. Para el fin de este uso, se supone que el polipéptido VAR2CSA puede funcionar como un chaperón que podría facilitar una visualización de CSPG4 en linfocitos T en una conformación que proporcionaría anticuerpos. Por consiguiente, se supone que pueden utilizarse polipéptidos VAR2CSA conjugados con CSPG4 en una vacuna.

Como se usa en el presente documento, el término "CSPG4" se refiere al proteoglicano 4 de sulfato de condroitina humano de longitud completa de 2322 aminoácidos identificado por Uniprot como Q6UVK1 (CSPG4_HUMAN) así como a variantes, fragmentos funcionales y ortólogos del mismo. CSPG4 también se puede denominar proteoglicano de sulfato de condroitina asociado a melanoma (MCSP, del inglés "melanoma-associated chondroitin sulfate proteoglycan"), antígeno asociado a melanoma de alto peso molecular (HMW-MAA) o antígeno neurona-glía 2 (NG2).

Direccionamiento de CD44 u otros proteoglicanos

- Con el fin de utilizar conjugados de polipéptidos VAR2CSA en el tratamiento de indicaciones de cáncer, se supone que los conjugados de acuerdo con la presente invención pueden utilizarse para dirigirse no solo a células tumorales que expresan CSPG4, sino también a células que expresan CD44, tales como células madre de cáncer, y células que expresan proteoglicanos ejemplificadas, pero no limitadas, a las de la Tabla 1. Este direccionamiento está mediado por la unión a CSA en el antígeno CD44. Por consiguiente, los conjugados de acuerdo con la presente invención pueden utilizarse para dirigir células negativas para CSPG4 pero positivas para CD44. Esto puede utilizarse como una alternativa a, o simultáneamente con, el direccionamiento de células tumorales que expresan

CSPG4.

Utilizar de forma aislada las células madre del cáncer a través de la unión a CD44 y/o CSPG4 y/u otros proteoglicanos, tales como los de la tabla 1.

- 5 La unión específica y de alta afinidad de los polipéptidos VAR2CSA de acuerdo con la presente invención, tal como en forma de conjugados de polipéptidos VAR2CSA, puede utilizarse para aislar células madre, tales como células madre cancerosas que expresan CD44 y/o CSPG4.

Utilizar en aislamiento o detección de células tumorales circulantes (CTC) a través de la unión a proteoglicanos que contienen CSA

- 10 La unión específica y de alta afinidad de los polipéptidos VAR2CSA de acuerdo con la presente invención, tal como en forma de conjugados de polipéptidos VAR2CSA, puede utilizarse para aislar o detectar CTC de origen epitelial y no epitelial, que expresan uno o más proteoglicanos que contienen CSA, tales como los descritos en la tabla 1.

Anticuerpos antiidiotípicos

- 15 Como una alternativa o suplemento al uso de polipéptidos VAR2CSA, también es posible utilizar anticuerpos antiidiotípicos o incluso mimotopos que imitan a VAR2CSA. Las tecnologías para preparar anticuerpos antiidiotípicos que imitan un epítipo antigénico son conocidas en la materia e implican la provisión de un primer anticuerpo monoclonal que se une a polipéptidos VAR2CSA seguido de la producción posterior de un segundo anticuerpo que se une al idiotipo de dicho primer anticuerpo. Los mimotopos se pueden aislar a partir de bibliotecas de péptidos aleatorios que se criban en presencia de fagos frente a anticuerpos que se unen específicamente a polipéptidos VAR2CSA.

- 20 Los anticuerpos antiidiotípicos también pueden prepararse mediante inmunización con anticuerpos inhibidores del hospedador o derivados del paciente contra VAR2CSA con el fin de obtener y seleccionar anticuerpos policlonales y/o monoclonales, tales como anticuerpos humanos contra e inhibir los anticuerpos derivados del hospedador. Aunque VAR2CSA generalmente es una proteína de la malaria evolutivamente refinada que no es probable que cause reacciones autoinmunes en el paciente, dicha reacción inmune no se puede excluir después de un período de tratamiento. Puede utilizarse entonces un anticuerpo antiidiotípico usado en combinación con o como una alternativa a los polipéptidos VAR2CSA.

Realizaciones específicas de la invención

como se describe en el presente documento, un fragmento de proteína aislado de VAR2CSA, puede consistir en una secuencia de aminoácidos secuencial de

- 30 a) ID1 y
b) DBL2Xb y, opcionalmente,
c) ID2a.

En algunos ejemplos, el fragmento de proteína aislado de VAR2CSA de acuerdo con la presente invención comprende ID2a.

- 35 En algunos ejemplos, el fragmento de proteína aislado de VAR2CSA de acuerdo con la presente invención no comprende ID2a.

- 40 En algunos ejemplos, el fragmento de proteína aislado de VAR2CSA comprende además una secuencia de aminoácidos en el extremo N o C, o dentro de la secuencia del fragmento de proteína de VAR2CSA de no más de 100 aminoácidos, tal como no más de 90 aminoácidos, tal como no más de 80 aminoácidos, tal como no más de 70 aminoácidos, tal como no más de 60 aminoácidos, tal como no más de 50 aminoácidos, tal como no más de 40 aminoácidos, tal como no más de 30 aminoácidos, tal como no más de 20 aminoácidos, tal como no más de 18 aminoácidos, tal como no más de 16 aminoácidos, tal como no más de 14 aminoácidos, tal como no más de 12 aminoácidos, tal como no más de 10 aminoácidos, tal como no más de 8 aminoácidos, tal como no más de 6 aminoácidos, tal como no más de 4 aminoácidos, tal como no más de 2 aminoácidos que proceden de cualquier parte de un polipéptido VAR2CSA como se define en el presente documento, que no es parte de ID1, DBL2Xb o ID2a.

- 45 En algunos ejemplos, el fragmento de proteína aislado de VAR2CSA comprende además una secuencia de aminoácidos en el extremo N o C, o dentro de la secuencia del fragmento de proteína de VAR2CSA de no más de 100 aminoácidos, tal como no más de 90 aminoácidos, tal como no más de 80 aminoácidos, tal como no más de 70 aminoácidos, tal como no más de 60 aminoácidos, tal como no más de 50 aminoácidos, tal como no más de 40 aminoácidos, tal como no más de 30 aminoácidos, tal como no más de 20 aminoácidos, tal como no más de 18 aminoácidos, tal como no más de 16 aminoácidos, tal como no más de 14 aminoácidos, tal como no más de 12 aminoácidos, tal como no más de 10 aminoácidos, tal como no más de 8 aminoácidos, tal como no más de 6 aminoácidos, tal como no más de 4 aminoácidos, tal como no más de 2 aminoácidos, cuya secuencia de aminoácidos no procede de cualquier parte de un polipéptido VAR2CSA como se define en el presente documento.

- En algunos ejemplos, el fragmento de proteína se une al sulfato de condroitina A (CSA) en proteoglicanos (CSPG) con una afinidad medida por una K_D inferior a 100 nM, tal como inferior a 80 nM, tal como inferior a 70 nM, tal como inferior a 60 nM, tal como inferior a 50 nM, tal como inferior a 40 nM, tal como inferior a 30 nM, tal como inferior a 26 nM, tal como inferior a 24 nM, tal como inferior a 22 nM, tal como inferior a 20 nM, tal como inferior a 18 nM, tal como inferior a 16 nM, tal como inferior a 14 nM, tal como inferior a 12 nM, tal como inferior a 10 nM, tal como inferior a 9 nM, tal como inferior a 8 nM, tal como inferior a 7 nM, tal como inferior a 6 nM o inferior a 4 nM.
- En algunos ejemplos, el fragmento de proteína comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 70 % de identidad de secuencia con una cualquiera de las secuencias de aminoácidos de 1-577 de SEQ ID NO:1, 1-592 de SEQ ID NO:3, 1-579 de SEQ ID NO:4, 1-576 de SEQ ID NO:5, 1-586 de SEQ ID NO:10, 1-579 de SEQ ID NO:11, 1-565 de SEQ ID NO:29, 1-584 de SEQ ID NO:34, 1-569 de SEQ ID NO:36, 1-575 de SEQ ID NO:37, 1-592 de SEQ ID NO:38, 1-603 de SEQ ID NO:41, 1-588 de SEQ ID NO:43, 1-565 de SEQ ID NO:44, 1-589 de SEQ ID NO:45, 1-573 de SEQ ID NO:48, 1-583 de SEQ ID NO:53, o 1-569 de SEQ ID NO:54.
- En algunos ejemplos, el fragmento de proteína comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 70 % de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos de 578-640 de SEQ ID NO:1,593-656 de SEQ ID NO:3, 580-643 de SEQ ID NO:4, 577-640 de SEQ ID NO:5, 587-650 de SEQ ID NO:10, 580-643 de SEQ ID NO:11, 566-628 de SEQ ID NO:29, 585-647 de SEQ ID NO:34, 570-632 de SEQ ID NO:36, 576-639 de SEQ ID NO:37, 593-655 de SEQ ID NO:38, 604-667 de SEQ ID NO:41, 589-652 de SEQ ID NO:43, 566-628 de SEQ ID NO:44, 590-653 de SEQ ID NO:45, 574-637 de SEQ ID NO:48, 584-646 de SEQ ID NO:53, o 570-632 de SEQ ID NO:54.
- En algunos ejemplos, el fragmento de proteína comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 70 % de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2, 6, 8, 9, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21,22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 30, 31,32, 33, 35, 39, 40, 42, 46, 47, 49, 50, 51, o 52.
- En algunos ejemplos, el fragmento de proteína consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 70 % de identidad de secuencia con una cualquiera de las secuencias de aminoácidos de 1-577 de SEQ ID NO:1, 1-592 de SEQ ID NO:3, 1-579 de SEQ ID NO:4, 1-576 de SEQ ID NO:5, 1-586 de SEQ ID NO:10, 1-579 de SEQ ID NO:11, 1-565 de SEQ ID NO:29, 1-584 de SEQ ID NO:34, 1-569 de SEQ ID NO:36, 1-575 de SEQ ID NO:37, 1-592 de SEQ ID NO:38, 1-603 de SEQ ID NO:41, 1-588 de SEQ ID NO:43, 1-565 de SEQ ID NO:44, 1-589 de SEQ ID NO:45, 1-573 de SEQ ID NO:48, 1-583 de SEQ ID NO:53, o 1-569 de SEQ ID NO:54.
- En algunos ejemplos, el fragmento de proteína consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada de la lista que consiste en SEQ ID NO: 1, 3-5, 10, 11, 29, 34, 36-38, 41, 43-45, 48, 53 y 54.
- En algunos ejemplos, el fragmento de proteína consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene una longitud de menos de 700 aminoácidos, tal como menos de 690 aminoácidos, tal como menos de 680 aminoácidos, tal como menos de 670 aminoácidos, tal como menos de 660 aminoácidos, tal como menos de 650 aminoácidos, tal como menos de 640 aminoácidos, tal como menos de 630 aminoácidos, tal como menos de 620 aminoácidos, tal como menos de 610 aminoácidos, tal como menos de 600 aminoácidos, tal como menos de 590 aminoácidos, tal como menos de 580 aminoácidos, tal como menos de 570 aminoácidos.
- En algunos ejemplos, el fragmento de proteína es sustancialmente puro.
- En algunos ejemplos, el fragmento de proteína tiene una masa molecular de menos de aproximadamente 100 kDa en condiciones no reductoras en una SDS-PAGE.
- En algunos ejemplos, el fragmento de proteína es una proteína recombinante.
- En algunos ejemplos, el fragmento de proteína no está glicosilado.
- La invención se refiere además a un conjugado de acuerdo con la invención para el tratamiento del cáncer.
- En algunas realizaciones, un conjugado o proteína de fusión comprende un fragmento de proteína de VAR2CSA de acuerdo con la presente invención.
- Por consiguiente, un conjugado o proteína de fusión de acuerdo con la presente invención puede comprender una secuencia de aminoácidos con al menos un 70% de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos identificada por cualquier secuencia de SEQ ID NO: 1-75.
- En algunos ejemplos, un polipéptido VAR2CSA consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 60-70, 72-75.
- En algunas realizaciones, el cáncer se selecciona de melanoma cutáneo, ocular o conjuntival. Carcinomas (carcinoma de mama triple negativo y metaplásico, carcinoma de páncreas, carcinoma de ovario, carcinoma endometrial, carcinoma hepatocelular, carcinoma de pulmón, carcinoma de colon, carcinoma de próstata, carcinoma de cuello de útero, carcinoma de testículos, carcinoma de piel de células basales, carcinoma de células renales de células claras, carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello creatinizadas, carcinoma de células escamosas de la piel, carcinoma de células escamosas creatinizadas vulvar y carcinoma de células basales de vulva), sarcomas

- (liposarcoma de mama, fibrosarcoma, condro y liposarcoma desdiferenciado, leiomiosarcoma, liposarcoma, liposarcoma mixoide, leiomiosarcoma del cuerpo uterino, osteosarcoma, sarcoma de Ewing y rhabdomyosarcoma), cánceres hematopoyéticos (leucemia linfática crónica (CLL, del inglés "Chronic lymphatic leukaemia"), leucemia linfática aguda (ALL, del inglés "Acute lymphatic leukaemia"), leucemia mieloide aguda (AML, del inglés "Acute myeloid leukaemia"), linfoma de linfocito B, linfocito T y granular grande), tumores de tejido neuroepitelial, tales como astrocitomas (xantastrocitoma pleomórfico, astrocitomas fibrilares, astrocitoma anaplásico, glioblastoma multiforme), oligodendroglioma, ependimoma, tumor del plexo coroideo, oligoastrocitoma, gliosarcoma, ganglioglioma, retinoblastoma, Neurocitoma, Neuroblastomas (Estesioneuroblastoma y ganglioneuroblastoma), Meduloblastoma y tumores rabdoides teratoides atípicos y cualquier otro subtipo de cáncer que exprese CSA.
- 10 En algunas realizaciones, el cáncer se selecciona de todas las malignencias que expresan CSA que incluyen carcinomas (que incluyen pero no se limitan a carcinoma de mama, carcinoma de páncreas, carcinoma de ovario, carcinoma endometrial, carcinoma hepatocelular, carcinoma de pulmón, carcinoma de colon, carcinoma de próstata, carcinoma de cuello de útero, carcinoma de testículos, carcinoma de piel de células basales, carcinoma de células renales de células claras, carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, carcinoma de células escamosas de la piel, carcinoma de células escamosas creatinizadas vulvar y carcinoma de células basales de vulva), sarcomas (que incluyen pero no se limitan a fibrosarcoma, condro y liposarcoma desdiferenciado, leiomiosarcoma, liposarcoma, liposarcoma mixoide, leiomiosarcoma del cuerpo uterino, osteosarcoma, sarcoma de Ewing y rhabdomyosarcoma, sarcoma sinovial, tumor fibroso solitario), cánceres hematopoyéticos (que incluyen pero no se limitan a leucemia linfática crónica (CLL), leucemia linfática aguda (ALL, del inglés "Acute lymphatic leukaemia"), leucemia mieloide aguda (AML, del inglés "Acute myeloid leukaemia"), linfoma de linfocito B, linfocito T y granular grande), tumores de tejido neuroepitelial, pero no se limitan a astrocitomas (xantastrocitoma pleomórfico, astrocitomas fibrilares, astrocitoma anaplásico, glioblastoma multiforme), oligodendroglioma, ependimoma, tumor del plexo coroideo, oligoastrocitoma, gliosarcoma, ganglioglioma, retinoblastoma, Neurocitoma, Neuroblastomas (Estesioneuroblastoma y ganglioneuroblastoma), meduloblastoma, tumores rabdoides teratoides atípicos y todos los tipos de cáncer neuroendocrino.

Secuencias, que incluyen secuencias de polipéptidos VAR2CSA:

>fcr3 745 aminoácidos | 640 aa; la secuencia subrayada corresponde al dominio ID1 de FCR3, la secuencia en negrita corresponde al dominio DBL2Xb de FCR3. La secuencia restante es ID2a (SEQ ID NO:1)

NYIKGDPYFAEYATKLSFILNPSDANNPSGETANHNDACNCNESGISSVGQAQTS GPSSNKT CITHSSIK
TNKKKECKDKVLGVRENDKDLKICVIEDTSLSGVDNCCCQDLLGILQENCSDNKRGS
SSNDSCDNKNQ
DECQKKLEKVFASLTNGYKCDKCKSGTSRSK
KKWIWKSSGNEEGLQEYANTIGLPPRTQSLY
LGNLPKLENVCEDVKDINFDTKEKFLAGCLIVSFHEGKNLKKRYPQNKNSGNKENLCKALEYSF
ADYGDLIKGTSIWDNEYTKDLELNLQNNFGKLF
GKYIKNNTAEQDTSYSSLDLRESWWNT
NKKYIWTAMKHGAEMNITTCNADGSVTGSGSSCDDIPTIDLIPQYLRFLQEWVENFCEQRQA
KVKDVITNCKSKESGNKCKTECKTKCKDECEKYKKFIEACGTAGGGIGTAGSPWSKRWDQIY
KRYSKHIEDAKRNRKAGTKNCGTSSTTNAASTDENKCVQSDIDSFFKHLIDIGLTPSSYLSN
VLDDNICGADKAPWTTYTTYTTTEKCNKERDKSKSQSSDTLVVVNVPSPLGNTPYRYKYACQC
KIPTNEETCDDRKEYMNQWSCGSARTMKRGYKNDNYELCKYNGVDVKPTTVRSNSSKLD

- 30 >gi|254952610|gb|ACT97135.1| VAR2CSA [Plasmodium falciparum | 341 aa (SEQ ID NO:2)

KCDKCKSGTSRSRKIWTWRKSSGNKEGLQEYANTIGLSPRTQLLYLGNLRKLENVCEDVTDINFDTKEK
 FLAGCLIAAFHEGKNLKKRYLEKKKGDNNKLCCKDLKYSFADYGDLIKGTSIWDNDFTKDELELNLQQIFGK
 LFRKYIKKNISTEQDTSYSSLDLRESWWNTNKKYIWLAMKHGAGMNSTTCSCSGDSSSGENQTNSC
 DDIPTIDLIPQYLRFLQEWVEHFCEQRQAKVKDVITNCKNSCKESGGTCNSDCEKKCKNKCDAYKTFIEDC
 KGVGGTGTAGSSWVKRWYQIYMRYSKYIEDAKRNRKAGTKSCGTSSTTNVSVSTDENKCVQS-

>M24 745 aminoácidos | 656 aa (SEQ ID NO: 3)

DYIKGDPYFAEYATKLSFILNSSDANNPSGETANHNDVCNPNSEISSVGQAQTS DPSSNKT
CNTHSSIKANKKKVCKHVKLGINNNDKVLRV
CVIEDTSLSGVENCCFKDLLGILQENCSDNKS
GSSSNGSCNNKNQEACEKNLEKVLASLTNCYKCDKCKSGTSTVNKNWIWKSSGNKEGLQKE
YANTIGLPPRTHSLYLGNLPKLENVCEDVKDINFDTKEKFLAGCLIAAFHEGKNLKKRYPQNK
DDNNSKLCKALEYSFADYGDLIKGTSIWDNEYTKDLELNLQQIFGKLF
FRKYIKKNISTEQDTSYSSLDLRESWWNTNKKYIWLAMKHGAGMNITTCG
DGSVTGSGSSCDDIPTIDLIPQYLRFL
QEWVEHFCKQRQEKVKDVINSCNSCKNTSSKTKLGDT
CNSDCEKKCKIECEKYKKFIEECRTA
VGGTAGSSWSKRWDQIYKMYSKHIEDAKRNRKAGTKNCGIT
TGTISGESSGANSVTTTENK
CVQSDIDSFFKHLIDIGLTPSSYLSIVLDDNICGDDKAPWTTYTTYTTTTEKCNKERDKSK
SQQSNTSVVVNVPSPLGNTPHGYKYACQCKIPTNEETCDDRKEYMNQWISDTSKNPKGSGSTNNDY
ELYTYNGVKETKLPKLN
SPKLD

>KMVII 745 aminoácidos | 643 aa (SEQ ID NO: 4)

DYIKDDPYSKEYTTKLSFILNSSDANTSSGETANHNDACNCNESEISSVGQAQTSGPSSNKT
ITHSFIKANKKKVCKDVKLGVRNDKVLVRCVIEDTSLSGVDNCCCQDLLGILQENCSDNKR
SSSNGSCNNKNQDECQKKLEKVFVSLTNGYKCDKCKSGTSTVNKKWIWKKSSGNEKGLQKEY
ANTIGLPPRTQSLYLGNLPLKGNVCEDVTDINFDTKKFLAGCLIAAFHEGKNLKSHEKKKGD
NGKKLCKALEYSFADYGDLIKGTSIWDNEYTKDLELNLQKAFGKLFKGYIKKNIASDENTSYSS
LDELRESWWNTNKKYIWTAMKHGAEMNSTMCNADGSGVTGSGSSCDDIPTTDFIPQYLRFLQ
EWVEHFCKQRQEKVNAVIENCNSCKNTSGERKIGGTCNGDCKTECKNKCEAYKNFIEDCKGG
DGTAGSSWVKRWDQIYKRYSKHIEDAKRNRKAGTKSCGPSSITNASVSTDENKCVQSDIDSF
FKHLIDIGLTPSSYLSIVLDENNCGEDNAPWTTYTTTTEKCNKDKKSKSQSCNTAVVVNV
PSPLGNTPHEYKYACQCKIPTTEETCDDRKEYMNQWISDTSKKQKSGSTNNDYELYTYTGVKETKLP
KKLNSPKLD

>1248 745 aminoácidos | 640 aa (SEQ ID NO: 5)

SYVKNDPYSKEYVTKLSFILNPSDANNPSGETANHNDACNPNESEIASVGQAQTSRDLRSQKA
CITHSFIGANKKIVCKDVKLGVRKDKDLKICVIEDDSLGRGVNCCFKDLLGILQENCSDNKS
SSSNGSCNNKNQDECQKKLDEALASLHNGYKCDKCKSGTSRSKKIWTWRKFPNGEGLQKE
YANTIGLPPRTQSLYLGNLRKLENVCKGVTDINFDTKKFLAGCLIAAFHEGKNLKSINKKKND
DNGKKLCKDLKYSFADYGDLIKGTSIWDNEYTKDLELNLQKIFGKLFKRYIKKNIASDENTLYS
SLDELRESWWNTNKKYIWLAMKHGTTCSGSGDNGDGSVTGSGSSCDDMSTIDLIPQYLRFL
QEWVEHFCKQRQEKVKDVIENCKSCKNTSGERIIGGTCGSDCKTKCKGECDAYKNFIEECKRG
DGTAGSPWSKRWDQIYMRYSKYIEDAKRNRKAGTKNCGTSSTTNAENKCVQSDIDSF
IDIGLTPSSYLSIVLDENICGDDKAPWTTYTTTTEKCNKETDKSKSQSCNTAVVVNVPSPL
GNTPHGYKYACECKIPTTEETCDDRKEYMNQWISDTSKKPKGGRSTNNDYELYTYNGVKETKLPKSS
SSKLD

5 >gi|254952618|gb|ACT97139.1| VAR2CSA [Plasmodium falciparum]| 358 aa (SEQ ID NO:6)

KCEKCKSEQSKNNNIWIWRKFPNGEGLQKEYANTIGLPPRTHSLYLGNLPLENVCKDVKDINFDTK
KFLAGCLIAAFHEGKNLKTTPQKNADNNSKLCKDLKYSFADYGDLIKGTSIWDNFTKDLNLQKIF
KLFRKYIKKNIASDENTLYSSDELRESWWNTNKKYIWLAMKHGAEMNSTMCNGDGSVTGSSDSGTT
CSGDNGSISCDDIPTIDLIPQYLRFLQEWVEHFCKQRQEKVPIENCKSCKNTSGERIIGGTCGSDCEK
KCKGECDAYKKFIEECKGGGGGTGTAGSPWSKRWDQIYKRYSKYIEDAKRNRKAGTKSCGPSSTTNA
ASTTESKCVQS

>gi|254952592|gb|ACT97126.1| VAR2CSA [Plasmodium falciparum]| 333 aa (SEQ ID NO:7)

KCDKCKSEQSKNNKNWIWKQFPNGEGLQKEYANTIGLPPRTHSLYLGNLPLENVCKGVTDINFDTK
EKFLAGCLIAAFHEGKNLKTSHKGGDNGKKLCKDLKYSFADYGDLIKGTSIWDNFTKDLNLQKIF
GKLFKRYIKKNISAEQDTSYSSDELRESWWNTNKKYIWLAMKHGTTCSGSGDNGDGSVTGSGSSCD
DMPTTDFIPQYLRFLQEWVEHFCKQRQEKVNAVITNCKSCKESGGTCNSDCEKKCKDECEKYKKFIEECR
TAADGTAGSSWSKRWDQIYKMYSKHIEDAKRNRKAGTKNCGTSSTTNAENKCVQS

10 >gi|90193467|gb|ABD92329.1| proteína de membrana de eritrocito 1 [Plasmodium falciparum]| 269 aa (SEQ ID NO:8)

DYIKDDPYSKEYTTKLSFILNSSDANTSSGETANHNDACNCNESEIASVEQASISDRSSQKAYITHSSIK
TNKKKVCKYVVLGINNNDKVLVRCVIEDTSLSGVENCCFKDLLGILQENCSDNKRGSFNDSCNNNNEE
ACQKKLEKVLASLTNGYKCEKCKSGTSRSKKKWIWKKSSGKEGGLQKEYANTIGLPPRTQSLYLGNLPLK
ENVCKGVTDINFDTKKFLAGCLIAAFHEGKNLKPQHKNDDNNSKLCKDLKYSFADY

>gi|254952616|gb|ACT97138.1| VAR2CSA [Plasmodium falciparum]| 333 aa (SEQ ID NO:9)

KCDKCKSGTSRSKKKWTWRKSSGNEGLQKEYANTIGLPPRTHSLYLGNLRKLENVCEVDINFDTK
KFLAGCLIAAFHEGKNLKTTPQKNDDNNSKLCKALKYSFADYGDLIKGTSIWDNFTKDLNLQKIF
KLFRKYIKKNISTEQHTSYSSDELRESWWNTNKKYIWLAMKHGAEMNGTTCSCSGDSSDDIPTIDLIPQ
YLRFLQEWVEHFCKQRQAKVNAVINSCKNTSGERKLGTCGSECKTECKNKCDAYKEFIDGTGSGG
GTGTAGSSWVKRWDQIYKRYSKYIEDAKRNRKAGSKNCGTSSTTNAESKCVQS

>hb31 745 aminoácidos | 650 aa (SEQ ID NO: 10)

SYVKNNPYSAEYVTKLSFILNSSDANTSSETPSKYYDEVNCNENESEISSVGQAQTSGPSSNKTC
 ITHSSIKTNKKKVCKDVKLGINNNNDKVLRVCVIEDTSLSGVDNCCCQDLLGILQENCSDKNQS
 GSSSNGSCNNKNQDECQKKLEKVFASLTNGYKCDKCKSGTSRSKKKWIWRKSSGNEEGLQKE
 YANTIGLPPRTQSLYLGNLRKLENVCKGVTDINFDTKKEFLAGCLIAAFHEGKNLKTTPQNKK
 KLCKDLKYSFADYGDLIKGTSIWDNEYTKDLELNLQKAFGKLFKRYIKKNISTEQHTLYSSLDE
 LRESWWNTNKKYIWLAMKHGAGMNSTTCCGDGSGVTGSGSSCDDIPTIDLIPQYLRFLQEWV
 EHFKQRQEKVNAVIENCNSCKEKGDTNCGECKTECEKKCKIECEKYKTFIEECVTAVGGTSGS
 PWSKRWDQIYKRYSKYIEDAKRNRKAGTKNCGITTGTISGESSGANSVTTTENKCVQSDID
 SFFKHLIDIGLTPSSYLSIVLDDNICGADNAPWTTYTTYTTYTTTKNCIDIKKKTPKSPINTSV
 VVNVPSPLGNTPHGYKYACQCKIPTTEESCDRKEYMNQWIIDTSKKQKSGSGSTNNDYELYTYNGVK
 ETKLPKSSSSSKLD

>hb32 745 aminoácidos | 643 aa (SEQ ID NO: 11)

SYVKDDPYSAEYVTKLSFILNSSDANTSSETPSKYYDEVNCNENESEISSVGQAQTSGPSSNKTC
 ITHSSIKTNKKKVCKDVKLGINNNNDKVLRVCVIEDTSLSGVDNCCCQDLLGILQENCSDKNQS
 GSSSNGSCNNKNQDECQKKLEKVFASLTNGYKCDKCKSGTSRSKKKWIWRKSSGNEEGLQKE
 YANTIGLPPRTQSLYLGNLPKLENVCKGVTDIIYDTKEKFLSGCLIAAFHEGKNLKTSHKKNND
 DNGKKLCKALEYSFADYGDLIKGTSIWDNDFTKDLELNLQKIFGKLFKRYIKKNNTAEQDTSY
 SSLDELRESWWNTNKKYIWTAMKHGAGMNSTTCSGDGSGVTGSGSSCDDMPTIDLIPQYLRFL
 QEWVEHFCKQRQEKVKDVITNCNSCKEKGDTNCGECKTECKTKCKGECEKYKNFIEECNGTAD
 GGTSGSSWSKRWDQIYKRYSKYIEDAKRNRKAGTKNCGTSSTTNAASTTENKCVQSDIDSF
 FKHLIDIGLTPSSYLSNVLDDNICGEDKAPWTTYTTYTTTKNCIDIQKKTTPKPSQCDTLVVNV
 SPLGNTPHGYKYVCECKIPTTEETCDDRKEYMNQWIIDTSKKQKSGSGSTNNDYELYTYNGVQIKQAAG
 TLKNSKLD

>gi|90|93475|gb|ABD92333.1| proteína de membrana de eritrocito 1 [Plasmodium falciparum] | 269 aa (SEQ ID NO:12)

NYIKGDPYSAEYATKLSFILNSSDTENASEKIQKNNDVCNCNENESEIASVEQAPISDRSSQKACITHSSIK
 ANKKKVCKHVKLGVRENDKDLKICVIEDTSLSGVDNCCCQDLLGILQENCSDNKSNGSSSNGSCNNNNEE
 ICQKKLEKVLASLTNGYKCDKCKSGTSTVNKNWIWKYSGKEGGLQEEYANTIGLPPRTQSLYLGNLPKL
 ENVCEDVKDINFDTKKEFLAGCLIAAFHEGKNLKTSNKKKNDDNNSKLCKALKYSFADY

>gi|254952600|gb|ACT97130.1| VAR2CSA [Plasmodium falciparum] | 344 aa (SEQ ID NO: 13)

KCDKCKSGTSTVNKKWIWKYSGTEGGLQEEYANTIALPPRTQSLYLGNLPKLENVCKDVTDINFDTKKE
 FLAGCLIAAFHEGKNLKTTYLEKKKGDNKKNDNNSKLCKALKYSFADYGDLIKGTSIWDNDFTKDLEL
 NLQQIFGKLFKRYIKKNIASDENTLYSSLDELRESWWNTNKKYIWLAMKHGAGMNSTMNADGSGVTGS
 GSSCDDIPTIDLIPQYLRFLQEWVEHFCKQRQAKVKDVITNCNSCKEKGTCNCGECKTECEKKCKGECD
 AYKKFIEECKGKADEGTSGSSWSKRWDQIYKRYSKYIEDAKRNRKAGTKNCGPSSTTSTAESKCVQS

>gi|254952598|gb|ACT97129.1| VAR2CSA [Plasmodium falciparum] | 334 aa (SEQ ID NO:14)

KCDKCKSEQSKKNNNIWIWKSSGTEGGLQKEYANTIALPPRTQSLYLGNLRKLENVCEDVKDINFDTKKE
 KFLAGCLIAAFHEGKNLKKRYLEKKNNGDNNSKLCKALKYSFADYGDLIKGTSIWDNEYTKDLELNLQKIFG
 KLFRKYIKKNNTAEQHTSYSSLDELRESWWNTNKKYIWLAMKHGTTCSGSGDNGSISCDIPTIDLIPQ
 YLRFLQEWVEHFCEQRQGVNAVIENCNSCKNTSSKTKLGGTCNCGECKTECKGECDAYKEFIECKGTA
 AEGTSGSSWVKRWYQIYMRYSKYIEDAKRNRKAGTKNCGTSSTTSTAESKCVQS

>gi|254952596|gb|ACT97128.1| VAR2CSA [Plasmodium falciparum] | 332 aa (SEQ ID NO:15)

KCDKCKSEQSKKNNNIWIWKSSGTEGGLQKEYANTIALPPRTQSLYLGNLRKLENVCEDVKDINFDTKKE
 KFLAGCLIAAFHEGKNLKKRYLEKKNNGDNNSKLCKALKYSFADYGDLIKGTSIWDNEYTKDLELNLQKIFG
 KLFRKYIKKNNTAEQHTSYSSLDELRESWWNTNKKYIWTAMKHGTTCSGSGDNGSISCDIPTIDLIPQ
 YLRFLQEWVEHFCEQRQEKVKDVITNCNSCKEKGTCNCGECKTECKNKCKDECDAYKKFIEECEGKAAE
 GTSGSSWSKRWDQIYKRYSKYIEDAKRNRKAGTKNCGTSSTTSTAENKCVQS

>gi|90193465|gb|ABD92328.1| proteína de membrana de eritrocito 1 [Plasmodium falciparum] | 267 aa (SEQ ID NO:16)

NYIKDDPYSAEYTTKLSFILNSSDTENASEKIQKNNDVENCNPNESGIACVELAQTSGSSSNKTCNTHSFIK
ANKKKVCKDVKLGINKKDKDLKICVIEDDSLGRVDNCCCQDLLGILQENCSDKNQSGSSSNGSCNNKN
QEACQKKLENVFASLTNGYKCEKCKSEQSKNNKNWIWKKYSVKEEGLQKEYANTIALPPRTQSLYLGNL
PKLGNVCKGVTDINFDTKEKFLAGCLIAAFHEGKNLKTYYLQNKKKLCKALKYSFADY

>gi|90193477|gb|ABD92334.1| proteína de membrana de eritrocito 1 [Plasmodium falciparum] | 263 aa (SEQ ID NO:17)

DYIKGDPYFAEYATKLSFILNSSDANTSSGETANHNDACNPNESEIASVEQASISDRSSQKACNTHSSIK
ANKKKKECKHVKLGVRENDKDLKICVIEDTSLSGVDNCCCQDLLGILQENCSDNKRGSSSNGSCDKNSEE
ICQKKLDEALASHNGYKNQKCKSEQSKNNKNWIWKKSSGNEKGLQKEYANTIGLPPRTQSLYLGNL
KLENVCEVDTDINFDTKEKFLAGCLIAAFHEGKNLKTTPQNKNDNGKKLCKD

5 >gi|254952594|gb|ACT97127.1| VAR2CSA [Plasmodium falciparum] | 338 aa (SEQ ID NO:18)

KCDKCKSEQSKNNNNIWIWKKSSGNKKGLQKEYANTIGLPPRTQSLYLGNLPLENVCKDVTDINFDTKE
KFLAGCLIAAFHEGKNLKSNEKKNDNGKKLCKDLKYSFADYGDLIKGTSIWDNEYTKDLELNLQNNFG
KLFRKYIKKNNTAEQHTLYSSLDELRESWWNTNKKYIWLAMKHGTTCCSSGSGDNGDGSVTGSGSSCDD
MSTIDLIPQYLRFLQEWVEHFCKQRQEKVNAVIENCNSCKNTSSKTKLGGTCNGECKTECEKKCKDECEK
YKEFIEECKRGDGTAGSPWVKRWDQIYMRYSKYIEDAKRNRKAGTKSCGTSAAENKCVQS

>gi|254952602|gb|ACT97131.1| VAR2CSA [Plasmodium falciparum] | 341 aa (SEQ ID NO:19)

KCDKCKSEQSKNNNNIWIWKKSSGDEKGLQKEYANTIALPPRTQSLYLGNLPLENVCKDVTDINFDTKE
KFLAGCLIAAFHEGKNLKTSHQNKNDNGKKNDNGKKLCKALKYSFADYGDLIKGTSIWDNEYTKDLE
LNLQQIFGKLFKRYIKRNNTAEQHTLYSSLDELRESWWNTNKKYIWLAMKHGTTCCSSGSGDNGDGSVTG
SGSSCDDMSTIDLIPQYLRFLQEWVEHFCKQRQEKVKDVTNCSCKECCGGTCGSDCKTKCEAYKKFIEE
CNGTADGGTSGSSWSKRWDQIYKRYSKYIEDAKRNRKAGTKNCGPSSGANSVTTTENKCVQS

>gi|254952660|gb|ACT97160.1| VAR2CSA [Plasmodium falciparum] | 352 aa (SEQ ID NO:20)

KCEKCESEQSKNNKYWIWKKSSGNGEGLQEEYANTIALPPRTHSLCLVCLHEKGGKTQELKNIRTNSE
LLKERIIAAFHEGKNLKTSPQNKNDNGKKLCKDLKYSFADYGDLIKGTSIWDNEYTKDLELNLQKIFGKLF
RKYIKKNNTAEQHTLYSSLDELRESWWNTNKKYIWLAMKHGAGMNSTMCNADGSVTGSSDSGSTTCC
GDNGSISCDMDPTIDLIPQYLRFLQEWVEHFCEQRQEKVNAVITNCKSCKECCGGTCNSDCEKKCKAYKE
FIECKGGGTGTSWSSWSKRWDQIYKRHSKHIEDAKRNRKAGTKNCGITTTGTSGESSGANSVTTTE
NKCVCQS

10

>gi|254952652|gb|ACT97156.1| VAR2CSA [Plasmodium falciparum] | 344 aa (SEQ ID NO:21)

KCDKCKSGTSRSRKIWTWRKFRGNGEGLQKEYANTIGLSPRTQLLYLVCLHEKGGKTQELKNISTNSELL
KEWIIAAFHEGKNLKTTPQKNNDNGKKLCKALKYSFADYGDLIKGTSIWDNDFTKDLELNLQKIFGKLF
RKYIKKNIASDENTSYSSELDELRESWWNTNKKYIWTAMKHGAGMNGTCCGDGSVTGSSDSGSTTCCG
DGSVTGSGSSCDDIPTIDLIPQYLRFLQEWVEHFCEQRQEKVKDVTNCKSCKESEKKCKNKCDAYKEFI
DGTGSGGGTGTAGSSWSKRWDQIYMRYSKYIEDAKRNRKAGTKNCGTSSGANSVTTTENKCVQS

>gi|254952622|gb|ACT97141.1| VAR2CSA [Plasmodium falciparum] | 350 aa (SEQ ID NO:22)

KCEKCKSEQSKNNKIWTWRKFPNGEGLQKEYANTIGLSPRTQLLYLVCLHEKGGKTQHKTISTNSELL
KEWIIAAFHEGKNLKKRYLEKKKGDNNSKLCKDLKYSFADYGDLIKGTSIWDNDFTKDLELNLQKIFGKLF
RKYIKKNIASDENTSYSSELDELRESWWNTNKKYIWTAMKHGAGMNSTMCNGDGSVTGSSDSGSTTCS
GDNGSISCDMDIPTIDLIPQYLRFLQEWVEHFCEQRQEKVKDVIKNCNSCKECCGGTCNGECKTECKNKCK
DECEKYKNFIEVCTGGDGTAGSPWSKRWYQIYMRYSKYIEDAKRNRKAGTKSCGTSSGANSVTTTESK
CVQS

15 >gi|254952626|gb|ACT97143.1| VAR2CSA [Plasmodium falciparum] | 359 aa (SEQ ID NO:23)

KCEKCKSEQSKNNKNWIWRKFPNGEGLQKEYANTIGLPPRTHSLYLVLCLHEKGGKTQELKNIRTNSEL
LKEWIIAAFHEGKNLKKRYHQNNNSGNKKLCKALEYSFADYGDLIKGTSIWDNEYTKDLELNLQKIFGK
LFRKYIKKNISTEQDTLYSSLDELRESWWNTNKKYIWLAMKHGAGMNSTTCCGDGSVTGSSDSGSTTCS
GDNGSISCDMDIPTIDLIPQYLRFLQEWVEHFCEQRQEKVKDVIENCKSCKNTSGERIIGGTCNGECKTEC
EKKCKAACEAYKTFIEECEGKAAEGTSGSSWSKRWYQIYMRYSKYIEDAKRNRKAGTKNCGKSSGANS
VTTTENKCVQS

>gi|90193469|gb|ABD92330.1| proteína de membrana de eritrocito 1 [Plasmodium falciparum] | 270 aa (SEQ ID NO:24)

NYIKDDPYSKEYVTKLSFIPNSSDANNPSGETANHNDEVCPNNESEISSVEHAQTSVLLSQKAYITHSSIK
ANKKKVCKYVKLGVRENDKDLKICVIEDDSLGRVENCCFKDFLRILQENCSDNKRSSSNGSCNNNNEE
ACEKNLDEALASLTNCKYKQCKSGTSTVNNNKWIWKKSSGKEGGLQKEYANTIGLPPRTQSLCLVVCL
DEKEGKTQELKNIRTNSELLKEWIIAAFHEGKNLKKRYHQNKNDNNSKLCKALKYSFADY

>gi|254952644|gb|ACT97152.1| VAR2CSA [Plasmodium falciparum]| 334 aa (SEQ ID NO:25)

KCDKCKSEQSKKNNKYWIWKKYSVKEGGLQKEYANTIALPPRTQSLCLVVCLDEKEGKTQELKNIRTNSE
LLKERIIAAFHEGKNLKYHEKKKGDDGKKLCKDLKYSFADYGDLIKGTISIWDNDFTKDLELNLQKIFGKL
FRKYIKKNNTAEQHTSYSSLDELRESWWNTNKKYIWTAMKHGAEMNGTTCSCSGDSSNDIPTIDLIPQY
LRFLQEWVEHFCEQRQAKVNAVIKNCSCKECGGTGNGECKTECKTKCKGECEKYKEFIEKCEGQAAEG
TSGSSWSKRWYQIYMRYSKYIEDAKRNRKAGTKNCGTSSGANSVTTTENKCVQS

>gi|254952642|gb|ACT97151.11| VAR2CSA [Plasmodium falciparum]| 351 aa (SEQ ID NO:26)

KCDKCKSEQSKKNNKNWIWKKYSGTEGGLQKEYANTIALPPRTQSLYLVLCLHEKEEKTQELKNISTNSEL
LKEWIIAAFHEGKNLISPQNKNDNGKNLCKDLKYSFADYGDLIKGTISIWDNDFTKDLELNLQKIFGKLFR
KYIKKNNTAEQDTLYSSLDELRESWWNTNKKYIWTAMKHGAGMNGTTCGCGDSVTGSSDSGTTCCG
DGSVTGSGSSCDDIPTIDLIPQYLRFLQEWVEHFCEQRQAKVKDVIKNCNSCKECCGTGNGECKTECEK
KCKGECEAYKKFIEKCNNGGGGEGTSGSSWSKRWDQIYMRYSKYIEDAKRNRKAGTKNCGTSSTTNAAE
NKCVQS

>gi|254952658|gb|ACT97159.1| VAR2CSA [Plasmodium falciparum]| 353 aa (SEQ ID NO:27)

KCDKCKSGTSTVNKKWIWKKFPGKEGGLQEEYANTIALPPRTQSLCLVVCLDEKEGKTQHKTISTNSELL
KEWIIAAFHEGKNLISNKKKNDENNSKLCKDLKYSFADYGDLIKGTISIWDNDFTKDLELNLQKIFGKLFR
KYIKKNNTAEQDTSYSSLDELRESWWNTNKKYIWLAMKHGTTCCSSGSGDNGDGSVTGSSDSGTTCC
GDGSVTGSGSSCDDIPTIDLIPQYLRFLQEWVEHFCKQRQAKVKDVIENCKSCKNTSSKTKLGDTCSND
CKTKCKVACEKYKEFIEKCVSAAGGTSGSSWVKRWDQIYMRYSKYIEDAKRNRKAGTKNCGPSSTTSTA
ESKCVQS

>gi|254952640|gb|ACT97150.1| VAR2CSA [Plasmodium falciparum]| 327 aa (SEQ ID NO:28)

KCDKCKSGTSTVNKKWIWKKYSGKEGGLQKEYANTIGLPPRTQSLCLVLCLHEKEGKTQELKNISTNSELL

KEWIIAAFHEGKNLISNKKKNDNGKKLCKDLKYSFADYGDLIKGTISIWDNDFTKDLELNLQKIFGKLFR
RKYIKKNNTAEQDTLYSSLDELRESWWNTNKKYIWTAMKHGAGMNSTTCSCSGDSSNDIPTIDLIPQYL
RFLQEWVEHFCKQRQEKVNAVITNCKSCKESGGTCNSDCEKKCKIECEKYKNFIEKCVTAAGGTSGSSW
SKRWDQIYKMYSKYIEDAKRNRKAGTKNCGPSSTTNAASTDENKCVQS

>dd2full 745 aminoácidos | 628 aa (SEQ ID NO: 29)

**NYIKGDPYFAEYATKLSFILNSSDTENASETPSKYYDEACNCNESEIASVGQAQTSGBPSSNKT
CITHSSIKTNKKKECKDVKLGINNNDKVLRVCVIEDTSLSGVDNCCCQDLLGILQENCSDNKR
GSSSNGSCDKNSEEICQKKLEKVFASLTNGYKCDKCKSGTSRSKKKWIWKKSSGNEEGLQKEY
ANTIGLPPRTQSLCLVLCLHEKEGKTQHKTISTNSELLKEWIIAAFHEGKNLKTSHEKKNDNDNGK
KLCKALEYSFADYGDLIKGTISIWDNEYTKDLELNLQKIFGKLFRKYIKKNNTAEQHTSYSSLDE
LRESWWNTNKKYIWTAMKHGAGMNGTTCSCSGDSSNDMPTIDLIPQYLRFLQEWVEHFCKQ
RQEKVNAVIENCNSCKESGGTCNSDCKTECKNKCEAYKEFIEDCKGGGTGTAGSPWSKRWDQ
IYKRYSKHIEDAKRNRKAGTKNCGTSSTTNAASTDENKCVQSDVDSFFKHLIDIGLTPSSYL
SNVLDDNICGADKAPWTTYTTYTTTKNCIDIQKTPKSQSCDTLVVVNVPSPLGNTPHEYKYAC
ECKIPTTEETCDDRKEYMNQWSCGSAQTVRGRSGKDDYELYTYNGVKETKPLGLTKNSKLD**

>gi|254952636|gb|ACT97148.1| VAR2CSA [Plasmodium falciparum]| 350 aa (SEQ ID NO:30)

KCEKCKSEQSKKNNKNWIWRKFRGTEGGLQEEYANTIGLPPRTQSLCLVVCLDEKGKKTQELKNIRTNSE
LLKEWIIAAFHEGKNLKPISHQNKNSGNKENLCKALKYSFADYGDLIKGTISIWDNDFTKDLELNLQKIFGKL
FRKYIKKNNTAEQHTSYSSLDELRESWWNTNKKYIWTAMKHGAEMNGTTCNADGSVTGSSDSGTTCS
GDNGSISCDDIPTIDLIPQYLRFLQEWVEHFCKQRQEKVNAVINSCKNTSSKTKLGDTCNSDCKTKC
KIECEKYKTFIEKCVTAAGGTSGSPWSKRWDQIYKRYSKYIEDAKRNRKAGTKNCGPSSTTSTAESKCVQ
S

>gi|254952638|gb|ACT97149.1| VAR2CSA [Plasmodium falciparum]| 330 aa (SEQ ID NO:31)

KCDKCKSEQSKKNNKNWIWRKYSNGEGLQKEYANTIGLPPRTHSLYLVCLHEKEGKTQELKNIRTNSEL
LKEWIIAAFHEGKNLKTTYLENKNDENKKLCKALKYSFADYGDLIKGTISIWDNDFTKDLELNLQKIFGKL
FRKYIKKNIASDENTLYSSLDELRESWWNTNKKYIWTAMKHGAEMNGTTCSSGSGDNGSISCDDIPTID
LIPQYLRFLQEWVGHFCKQRQEKVNAVITNCNSCKESGGTCNSDCEKKCKIECEKYKKFIEECRTAAGGT
SGSPWSKRWDQIYKMYSKYIEDAKRNRKAGTKNCGPSSTTSTAESKCVQS

>gi|254952628|gb|ACT97144.1| VAR2CSA [Plasmodium falciparum]| 334 aa (SEQ ID NO:32)

KCDKCKSEQSKKNNKNWIWRKYSNGEGLQKEYANTIGLPPRTHSLYLVCLHEKEGKTQHKISTNSELL
KEWIIAAFHEGKNLKKRYPQNNNSGNKKLCKDLKYSFADYGDLIKGTISIWDNEYTKDLELNLQKAFGKL
FRKYIKKNIASDENTLYSSLDELRESWWNTNKKYIWLAMKHGAEMNGTMCNADGSVTGSSGSSCDDMST
IDLIPQYLRFLQEWVEHFCEQRQAKVKDVINSCKSCSKESGDTNCNSDCEKKCKKNKCDAYKTFIEEFCTADG
GTAGSPWSKRWDQIYKRYSKYIEDAKRNRKAGTKNCGTSSGANSVTTTENKCVQS

>gi|254952630|gb|ACT97145.1| VAR2CSA [Plasmodium falciparum]| 350 aa (SEQ ID NO:33)

KCDKCKSGTSTVNKNWIWKYSGKEEGLQKEYANTIALPPRTHSLYLVCLHEKGKKTQELKNIRTNSELL
KEWIIAAFHEGKNLKTSPQNNNSGNKKLCKALKYSFADYGDLIKGTISIWDNDFTKDLELNLQKIFGKLF
RKYIKKNNTAEQHTSYSSLDELRESWWNTNKKYIWLAMKHGAEMNGTCCGDGSVTGSSDSGTTCS
GDNGSISCDDMPTTDFIPQYLRFLQEWVEHFCKQRQEKVKHVMESCKSCKECGDTNCECKTECEKKC
KNKCEAYKTFIEKCVSADGGTSGSSWSKRWDQIYMRYSKYIEDAKRNRKAGTKNCGTSSTTNAASTAE
NKCVCQS

>P13 745 aminoácidos | 647 aa (SEQ ID NO: 34)

**DYIKDDPYSAEYATKLSFILNPSDANTSSGETANHNDDEVNCNESEIASVELAPISDSSSNKTC
ITHSFIGANKKKECKDVKLGVREKDKDLKICVIEDDSLGRVENCCCQDLLGILQENCSDNKGSGS
SSNGSCDKNSEDECQKKLENVFASLKNGYKCDKCKSGTSTVNKKWIWRKYSNGEGLQKEYA
NTIGLPPRTHSLYLVCLHEKEGKTQHKISTNSELLKEWIIAAFHEGKNLKTSHQNNNSGNKK
KLCKALKYSFADYGDLIKGTISIWDNDFTKDLELNLQKIFGKLFRKYIKKNIASDENTSYSSLDE
LRESWWNTNKKYIWLAMKHGAEMNSTMCNGDGSVTGSSDSGTTCSGDNGSISCDDIPTID
LIPQYLRFLQEWVEHFCKQRQEKVKDVITNCKSKESGDTNCNSDCEKKCKKNKCEAYKKFIEER
RTAAQGTAESSWVKRWDQIYMRYSKYIEDAKRNRKAGTKSCGPSSTTNAASTAENKCVQS
DIDSFFKHLIDIGLTPSSYLSIVLDDNICGADNAPWTTYTTYTTTKNCDIKKKTPKQPSCDTL**

**VVVNVPSPLGNTPEHYKYACQCRTPNKQESCDDRKEYMNQWSSGSAQTVRGRSTNNDYELYTYNGV
KETKPLGLTKNSKLD**

>gi|254952608|gb|ACT97134.1| VAR2CSA [Plasmodium falciparum]| 341 aa (SEQ ID NO:35)

KCDKCKSGTSTVNKKWIWRKSSGNKEGLQKEYANTIGLPPRTQSLYLGNLPKLENVCEDVKDINFDTKEK
FLAGCLIVSFHEGKNLKTSHKKNDDNGKKLCKALEYSFADYGDLIKGTISIWDNEYTKDLELNLQKIFGKL
FRKYIKKNNTAEQDTSYSSLDELRESWWNTNKKYIWTAMKHGAGMNITTCCGDGSSGENQTNSCDDIP
TIDLIPQYLRFLQEWVEHFCKQRQEKVNAVVTNCKSKESGGTCNCECKTKCKNKCEVYKTFIDNVGDG
TAGSPWVKRWDQIYKRYSKHIEDAKRNRKAGTKNCGITTTGTSGESSGATSGVTTTENKCVQS

>7g8 745 aminoácidos | 632 aa (SEQ ID NO: 36)

NYIKDDPYSKEYVTKLSFIPNSSDANTSSEKIQKNNDEVCPNPNESGISSVEQAQTS GPSSNKT
CITHSSIKANKKKCKDVKLGVRENDKDLKICVIEDTSLSGVDNCCCQDLLGILQENCSDNKR
SSSNDSCDNKNQDECQKKLDEALES LNHYKNQCKSGTSTVNKKWIWKSSGNKEGLQKE
YANTIGLPPRTQSLYLGNLPKLENVSKGVTDIIDTKEKFLAGCLIVSFHEGKNLKTSHEKKND
DNGKKLCKALEYSFADYGD LIKGT SIWDNEYTKDLELNLQKAFGKLFRKYIKKNISAEQDTSYS
SLDELRESWWNTNKKYIWIAMKHGAGMNGTTCCGDGSSGENQTNSCDDIPTIDLIPQYLRFL
QEWVEHFCEQRQAKVKDVITNCKSCKNTSGERKIGGTCNGECKTKCKNKCEAYKTFIEHCKGG
DGTAGSSWVKRWDQIYKRYSKHIEDAKRNRKAGTKSCGTSTAENKCVQSDIDSFFKHLIDIG
LTPSSYLSIVLDENNCGEDKAPWTTYTTTNCNDIQKDKSKSQSSDTLVVVNVPSPLGNTPHG
YKYACQCKIPTTEETCDDRKEYMNQWSCGSARTMKRGYKNDNYELCKYNGVDVKPTTVRSSTKLD

>Indo 745 aminoácidos | 639 aa (SEQ ID NO:37)

DYIKGDPYSAEYVTKLSFIPNSSDANNPSEKIQKNNDEVCPNENESEISSVGQASISDPSSNKT
NTHSSIKANKKKVCKDVKLGVRENDKVLKICVIEHTSLRGVDNCCFKDLLGILQEPRIDKNQS
GSSSNGSCDNKNEEACEKNLEKVLASLTNGYKCDKCKSGTSRSKKKWIWKYSGKEGGLQEE
YANTIGLPPRTQSLCLVVCLDEKEGKTQELKNISTNSELLKEWIIAAFPEGKNLKP SPEKKKG
NGKKLCKDLKYSFADYGD LIKGT SIWDNEYTKDLELNLQKIFGKLFRKYIKKNIASDENTLYSS
LDELRESWWNTNKKYIWLAMKHGAGMNSTMCNADGSVTGSGSSCDDMPTIDLIPQYLRFLQ
EWVEHFCKQRQEKVKPVIENCNSCKNTSSERKIGGTCNSDCKTECKNKCEVYKKFIEDCKGG
GTAGSSWSKRWDQIYKRYSKYIEDAKRNRKAGTKNCGPSSTTNAAENKCVQSDIDSFFKHLI
DIGLTPSSYLSIVLDDNICGEDNAPWTTYTTTNCNDKDKKSKSQSCDTLVVVNVPSPL
GNTPHEYKYACECRTPNKQESDDRKEYMNQWISDNTKNPKGSGSGKDYELYTYNGVDVKPTTVRS
SSTKLD

>MC 745 aminoácidos | 655 aa (SEQ ID NO:38)

DYIKGDPYFAEYATKLSFILNSSDANTSSGETANHNDEACNENESEISSVEHASISDPSSNKT
NTHSSIKANKKKVCKHVKLGVRENDKDLRVCVIEHTSLSGVENCCFKDFLRILQENCSDNKS
SSSNGSCDNKNEEACEKNLEKVFASLTNCYKCEKCKSEQSKNNKKWTWRKSSGNKGGLQEE
YANTIGLPPRTQSLCLVVCLDEKEGKKTQELKNIRTNSELLKEWIIAAFHEGKNLKP SHEKKND
DNGKKNDDNNSKLCKDLKYSFADYGD LIKGT SIWDNEYTKDLELNLQKIFGKLFRKYIKKNIA
SDENTLYSSLDELRESWWNTNKKYIWLAMKHGAEMNGTTCNADGSVTGSGSSCDDIPTIDLI
PQYLRFLQEWVEHFCKQRQAKVKDVIENCNSCKESGNKCKTECKNKCEAYKKFIENCKGGD
TAGSSWVKRWDQIYMRYSKYIEDAKRNRKAGTKNCGPSSITNVSASTDENKCVQSDIDSFFK
HLIDIGLTPSSYLSIVLDDNICGDDKAPWTTYTTTNTTYTTTNTTYTTTNTTYTTTNTTYTTTNT
SQSCNTAVVVNVPSPLGNTPHEYKYACECRTPSNKELCDDRKEYMNQWSSGSAQTVRDRSGKDYY
ELYTYNGVKETKLPKKNSSKLD

5

>gi|254952650|gb|ACT97155.1| VAR2CSA [Plasmodium falciparum]| 347 aa (SEQ ID NO:39)

KCDKCKSEQSKNNKYWIWKSSVKEEGLQKEYANTIALPPRTHSLCLVVCLDEKGKKTQELKNISTNSE
LLKERIIAAFHEGKNLKTLYLEKKNADNNSKLCKALKYSFADYGD LIKGT SIWDNEYTKDLELNLQKIFGKL
FRKYIKKNNTAEQHTLYSSLDELRESWWNTNKKYIWLAMKHGAGMNGTTCCGDGSGVTGSSDSGTTCS
GDNGSISCDMPPTDFIPQYLRFLQEWVEHFCKQRQEKVKDVIENCNSCKNNLGKTEINEKCKTECKNK
CEAYKNFIEKFCTADGGTSGSPWSKRWDQIYKRYSKYIEDAKRNRKAGTKNCGTSSTTSTAENKCVQS

>gi|254952648|gb|ACT97154.1| VAR2CSA [Plasmodium falciparum]| 335 aa (SEQ ID NO:40)

KCEKCKSGTSTVNKYWIWRKSSGNKEGLQKEYANTIALPPRTHSLCLVVCLDEKEGKTQELKNISTNSEL
LKERIIAAFHEGENLKTSHEKKKGDDGKKNADNNSKLCKALKYSFADYGD LIKGT SIWDNEYTKDLELNL

QKIFGKLFRKYIKKNIASDENTSYSLLDELRESWWNTNKKYIWLAMKHGAGMNGTTCSCSGDSSDDMP
TTDFIPQYLRFLQEWVEHFCKQRQENNVAVIENCNSCKECCGTCNSDCEKKCKTECKNKCEAYKNFIEKF
CTADGGTSGYSWSKRWDQIYKRYSKYIEDAKRNRKAGTKSCGTSTTSTAESKCVQS

10

>ghana2 745 aminoácidos | 667 aa (SEQ ID NO: 41)

**SYVKNNPYSKEYVTKLSFILNPSDANNPSETPSKYYDEVCCNCNESGACVGGQAQTS GPSSNKT
CITHSFIGANKKKVKCKDVKLGVREKDKDLKICVIEDTYLSGVDNCCFKDFLGMLQENCSDNKS
GSSSNGSCNNKNQDECEKNLDEALASLTNGYKCEKCKSGTSTVNKYWIWRKSSGNKEGLQKE
YANTIALPPRTHSLCLVVCLDEKEGKTQHKTISTNSELLKEWIAAFHEGKNLKTSHEKKKGDD
GKKNADNNSKLCKALKYSFADYGD LIKGT SIWDNDFTKDLELNLQKIFGKLFRKYIKKNIASD
ENTSYSSLDELRESWWNTNKKYIWLAMKHGAGMNSTTCCGDG SVTGSSDSGSTTCCGDG SV
TGSGSSCDDMPTTDFIPQYLRFLQEWVEHFCKQRQENVNAVIENCNSCKECCGTCNSDCEKK
CKTECKGECDAYKEFIEKCN GGAAEGTSGSSWSKRWDQIYKRYSKYIEDAKRNRKAGTKNCG
TSSTTSTAESKCVQSDIDSFFKHLIDIGLTPSSYLSIVLDENICGADNAPWTTYTTT TTTT
TTEKCNKETDKSKLQQCNTSVVVNVPSPLGNTPHGYKYVCECRTPNKQETCDDRKEYMNQWISD
NTKNPKGSRSTNNDYELYTYNGVQIKPTTVRSNSTKLD**

>gj|254952634|gb|ACT97147.1| VAR2CSA [Plasmodium falciparum]| 348 aa (SEQ ID NO:42)

KCDKCKSEQSKKNNKNWIWKKSSGNEKGLQKEYANTIGLPRTQSLCLVVCLDEKEGKTQELKNIRTNS
ELLKEWIAAFHEGKNLKTSHEKKKGDNNSKLCKDLKYSFADYGD LIKGT SIWDNEYTKDLELNLQNNFG
KLFRKYIKKNIASDENTSYSSLDELRESWWNTNKKYIWLAMKHGAGMNSTTCSGSGSTTCSGSGSTT
CSSGSGDSCDDMPTIDLIPQYLRFLQEWVEHFCKQRQEKVNAVIKNCNSCKESGGTCNGECKTECKNKC
EAYKTFIEEFCTADGGTSGSPWSKRWDQIYKMYSKHIEDAKRNRKAGTKNCGPSSTTNVSVSTDENKCV
QS

>ghana1 745 aminoácidos | 652 aa (SEQ ID NO: 43)

**DYIKDDPYFAEYVTKLSFILNSSDANNPSGETANHNDEVCCNPNESGASVEQAQTS DPSSNKT
CNTHSSIKANKKKVKCKHVKLGVRENDKDLKICVIEHTSLSGVENCCCQDFLRILQENCSDNKS
GSSSNGSCNNKNQEACEKNLEKVLASLTNCYKCDKCKSEQSKKNNKNWIWKKSSGNEKGLQ
KEYANTIGLPRTQSLCLVVCLDEKEGKTQELKNIRTNSELLKEWIAAFHEGKNLKKRYPQNK
NDDNNSKLCKDLKYSFADYGD LIKGT SIWDNEYTKDLELNLQNNFGKLFRKYIKKNISTEQDT
LYSSLDELRESWWNTNKKYIWLAMKHGAGMNSTTCSGSGSTTCSGSGSTTCSGSGDSCD
DMPTTDFIPQYLRFLQEWVEHFCKQRQEKVNAVIKNCNSCKESGGTCNGECKTECKNKCEAY
KTFIEEFCTADGGTSGSPWSKRWDQIYKMYSKHIEDAKRNRKAGTKNCGPSSTTNVSVSTDE
NKCVCQSDIDSFFKHLIDIGLTPSSYLSIVLDDNICGEDKAPWTTYTTT TTTTCKCNKETDKSKS
QSCNTAVVVNVPSPLGNTPHGYKYACECKIPTTEETCDDRKEYMNQWIIDTSKKQKSGSGKDDYE
LYTYNGVDVKPTTVRSNSTKLD**

>V1S1 745 aminoácidos | 628 aa (SEQ ID NO: 44)

**DYIKDDPYSAQYTTKLSFILNPSDANTSSEKIQKNND EACNCNESGISSVGQAQTS GPSSNKT
CITHSSIKANKKKVKCKDVKLGINNNDKVLRCVIEDTSLSGVDNCCCQDLLGILQENCSDNKR
GSSSNGSCNNNNEEACEKNLDEAPASLHNGYKNQKCKSGTSRSKKKWIWKKSSGNEKGLQE
EYANTIGLPRTQSLCLVCLHEKEGKTQHKTISTNSELLKEWIAAFHEGKNLKTSHEKKNDN
GKKLCKALEYSFADYGD LIKGT SIWDNEYTKDLELNLQKAFGKLFRKYIKKNNTAEQDTSYSSL
DELRESWWNTNKKYIWIAMKHGAGMNGTTCSCSGDSSNDMPTIDLIPQYLRFLQEWVEHFC
EQRQAKVKDVITNCKSCKESGNCKCKTECKTKCKDECEKYKTFIEDCN GGGTG TAGSSWVKRW
DQIYKRYSKHIEDAKRNRKAGTKNCGPSITNAAASTDENKCVQSDIDSFFKHLIDIGLTPSS
YLSNVLDENSCGDDKAPWTTYTTT TTTTNCNDIQKDKSKSQPINTSVVVNVPSPLGNTPYRYKY
ACECKIPTTEESCDDRKEYMNQWSCGSARTMKRGYKNDNYELCKYNGVDVKPTTVRSNSSKLD**

>raj116_var25 745 aminoácidos | 653 aa (SEQ ID NO: 45)

**DYIKGDPYFAEYATKLSFILNPSDTENASETPSKYYDEACNPNESEIASVEQAQTS GPSSNKT
ITHSSIKTNKKKECKDVKLG VRENDKDLKICVIEDTSLSGVDNCCFKDLLGILQENCSDNKRGS
SSNDSCNNNNNEEACEKNLDEALASLTNGYKCDKCKSGTSTVNKKWTRWRKSSGNEEGLQKEYA
NTIGLPPRTQSLCLVCLHEKEGKTKHKTISTNSELLKEWIIAAFHEGKNLKTSHEKKNDDNGKK
LCKALEYSFADYGDLIKGTSIWDNEYTKDLELNLQKAFGKLF RKYIKKNNTAEQDTSYSSLDEL
RESWWNTNKKYIWTAMKHGAEMNGTTCSSGSGDNGDSSITGSSDSGSTTCSGDNGSISCD
IPTTDFIPQYLRFLQEWVEHFCEQRQAKVKDVINSCNSCNESSGTCNGECKTKCKDECEKYKK
FIEDCNGGDGTAGSSWVKRWDQIYKRYSKHIEDAKRNRKAGTKNCGPSSITNAAASTDENKC
VQSDVDSFFKHLIDIGLTPSSYLSIVLDENSCGDDKAPWTTYTTTTEKCNKERDKSKSQSS**

**DTLVVVNVPSPLGNT PHEYKYACECKIPTNEETCDDRKYMNQWISDTSKKQKSGSGKDYELYTY
NGVQIKQAAGRSSSTKLD**

>gi|31323048|gb|AAP37940.1| var2csa [Plasmodium falciparum]| 490 aa (SEQ ID NO:46)

KCDKCKSEQSKNNNNKWIWKYSGNGEGLQKEYANTIGLPPRTQSLCLVCLHEKEGKTQHKTISTNSEL
LKEWIIAAFHEGKNLKKRYPQNKNDNNSKLCAL EYSFADYGDLIKGTSIWDNEYTKDLELNLQKAFGK
LFRKYIKKNNTAEQDTSYSSLDELRESWWNTNKKYIWTAMKHGAEMNGTTCSSGSGDNGDSSCDDIPT
IDLIPQYLRFLQEWVEHFCKQRQAKVKDVINSCNSCKNTSGERKIGGTCNSDCEKKCKVACDAYKTFIEE
CRTAVGGTAGSSWVKRWDQIYKRYSKHIEDAKRNRKAGTKNCGPSSITNAAENKCVQSDIDSFFKHLID
IGLTPSSYLSNVLDENSCGADKAPWTTYTTT TTTTTEKCNKERDKSKSQSNTSVVVNVPSPL
GNT PHEYKYACECKIPTTEETCDDRKEYMNQWIIDNTKNPKGSGSTDNDYELYTYNGVQIKQAAGRSSST
KLD

>gi|254952620|gb|ACT97140.1| VAR2CSA [Plasmodium falciparum]| 335 aa (SEQ ID NO:47)

KCEKCKSGTSTVNKKWIWRKSSGKEGGLQKEYANTIGLPPRTQSLYLGNLPKLENVCKGVTDIYDTKEK
FLSGCLIAAFHEGKNLKT TYLEKKNDNNGKKLCKALEYSFADYGDLIKGTSIWDNEYTKDLELNLQKIFGK
LFRKYIKKNNTAEQDTSYSSLDELRESWWNTNKKYIWIAMKHGAGMNGTTCSSGSGDSSNDIPTTDFIP
QYLRFLQEWVENFCEQRQAKVKPV IENCNSCKESGGTCNGECKTKCKVACDAYKKFIDGTGSGGGS RPT
GIAGSSWSKRWDQIYKRYSKHIEDAKRNRKAGTKNCGPSSITNVSVSTDENKCVQS

>T2C6 745 aminoácidos | 637 aa (SEQ ID NO: 48)

**NYIKDDPYSKEYVTKLSFIPNSSDANTSSEKIQKNNDEV CNPNESGISSVEQAQTS DPSSNKT
CITHSSIKANKKKECKDVKLG VRENDKDLKICVIEHTSLSGVDNCCFKDFLRMLQEPRIDKNQ
RGSSSNGSCDKNSEEACEKNLDEALASLTNGYKCDKCKSEQSKNNNNKWIWKFPKGEGGLQ
EEYANTIGLPPRTQYLCLVCLDEKEGKTQELKNIRTNSELLKEWIIAAFHEGKNLKT TYPQKK
NDDNGKKLCKDLKYSFADYGDLIKGTSIWDNEYTKNVELNLQNNFGKLF RKYIKKNNTAEQD
TSYSSLDELRESWWNTNKKYIWLAMKHGAEMNSTTCCGDG SVTGSGSSCDDIPTIDLIPQYL
RFLQEWVEHFCKQRQAKVKDVITNCNSCKESGNKCKTECKNKCKDECEKYKKFIEACGTAVG
GTGTAGSPWSKRWDQIYKRYSKHIEDAKRNRKAGTKNCGPSSITNAAENKCVQSDIDSFFKH
LIDIGLTPSSYLSIVLDDNICGADKAPWTTYTTT TENCIDIQKTPKSQSCDTLVVVNVPSPL
GNTPHGYKYACQCRTPNKQESCDDRKEYMNQWIIDNTKNPKGSGSGKDYELCKYNGVKETKPLGLT
KNSKLD**

>gi|254952632|gb|ACT97146.1| VAR2CSA [Plasmodium falciparum]| 330 aa (SEQ ID NO:49)

KCDKCKSEQSKNNNNKWIWRKFPKGEGGLQKEYANTIGLPPRTQSLCLVCLHEKEGKTQHKTISTNSEL
KEWIIAAFHEGKNLKT TYLEKKNAENKKKLCKALKYSFADYGDLIKGTSIWDNEYTKDLELNLQKIFGKLF
RKYIKKNNTAEQDTSYSSLDELRESWWNTNKKYIWTAMKHGAGMNGTMCNADGSVTGSGSSCDDMPT
TDFIPQYLRFLQEWVEHFCKQRQAKVKDV IENCKSCKESGNKCKTECKNKCDAYKTFIEECGTAVGGTAG
SSWVKRWDQIYKRYSKHIEDAKRNRKAGTKNCGTSSTTNAASTAENKCVQS

>gi|90193487|gb|ABD92339.1| proteína de membrana de eritrocito 1 [Plasmodium falciparum] | 269 aa (SEQ ID NO:50)

NYIKDDPYSKEYVTKLSFILNSSDAENASETPSKYYDEACNCN ES GISSVEQASISDRSSQKACNTHSFIG
ANKKKVCKHVKLG VRENDKDLKICVIEDDSL RGVENCCFKDFLRMLQEPRIDKNQRGSSSNDSCNNNNNE
EACEKNLDEALASLHNGYKNQKCKSEQSKNNNNKWIWKSSGKEGGLQKEYANTIGLPPRTQSLCLVCL
HEKEGKTQHKTISTNSELLKEWIIIDAFHEGKNLKT TYLEKKKGDN GKKLCKALKYSFADY

>gi|254952646|gb|ACT97153.1| VAR2CSA [Plasmodium falciparum]| 347 aa (SEQ ID NO:51)

KCDKCKSEQSKKNNKNWIWKKSSGKEGGLQKEYANTIALPPRTQSLCLVVCLHEKEGKTQHKISTNSE
LLKEWIIDAFHEGKNLKTTYPEKQADNGKKNADNNSKLCKDLKYSFADYGDLIKGTSIWDNEYTKDLEL
NLQQIFGKLFKRYIKKNIASDENTLYSSDELRESWWNTNKKYIWTAMKHGAEMNGTTCSSGSGDSSSG
ENQTNSCDDIPTIDLIPQYLRFLQEWVEHFCEQRQAKVKDVITNCKSCKESGGTCNSDCKTKCKGECEKY
KKFIEKCKGGGTGEGTSGSSWVKRWYQIYMRYSKYIEDAKRNRKAGTKSCGTSSGANSVTTTESKCVQ
S

>gi|90193485|gb|ABD92338.1| proteína 1 de membrana de eritrocito [Plasmodium falciparum] | 269 aa (SEQ ID NO:52)

DYIKDDPYSKEYTTKLSFILNSSDANTSSEKIQKNNDEVCPNESEISSVEQAQTSRPSSNKTCTHSSIK
ANKKKVCKDVKLGVRENDKVLRVVIEHTSLSGVENCCCQDLLGILQENCSDNKRGSNSGSCDKNSEE

5

ACEKNLDEALASLTNCYKNQKCKSEQSKKNNKNWIWKKSSGNEKGLQKEYANTIGLPPRTQSLCLVCLH
EKEGKTQELKNISTNSELLKEWIIAAFHEGKNLKTTPQKNDDNGKKLFDLKYFADY

>MTS1 745 aminoácidos | 646 aa (SEQ ID NO: 53)

DYIKDDPYSKEYTTKLSFILNSSDANTSSEKIQKNNDEVCPNESEISSVEQAQTSRPSSNKTCTHSSIKANKKKVCKDVKLGVRENDKVLRVVIEHTSLSGVENCCCQDLLGILQENCSDNKRGSNSGSCDKNSEEACEKNLDEALASLTNCYKNQKCKSEQSKKNNKNWIWKKSSGKEGGLQKEYANTIGLPPRTQSLCLVVCLDEKGGKTQELKNIRTNSELLKEWIIAAFHEGKNLKTTYPEKKNDDNGKKLCKALEYSFADYGDLIKGTSIWDNEYTKDLELNLQKAFGKLFKRYIKKNNTAEQDTSYSSDELRESWWNTNKKYIWTAMKHGAGMNGTTCSSGSGDSSNDIPTTDFIPQYLRFLQEWVENFCEQRQAKVKDVIENCNSCKNTSGERKIGDTCNSDCEKKCKDECEKYKKFIEDCKGGDGTAGSSWVKRWDQIYKRYSKHIEDAKRNRKAGTKNCGITTGTISGESSGATSGVTTTENKCVQSDIDSFFKHLIDIGLTTTPSSYLSNVLDDNICGEDNAPWTTYTTTTEKCNKETDKSKSQSNTAVVVNVPSPLGNTPHGYKYACECKIPTTEETCDDRKEYMNQWSCGSAQTVRDRSGKDDYELCKYNGVQIKQAAGTLKNSKLD

>Q8I639 (Q8I639_PLAF7) Plasmodium falciparum (aislado 3D7), parte extracelular de 632 aa (SEQ ID NO:54)

NYIKGDPYFAEYATKLSFILNSSDANNPSEKIQKNNDEVCPNESEISSVEQAQTSRPSSNKTCTHSSIKANKKKVCKHVKLGVRENDKDLRVVIEHTSLSGVENCCCQDFLRILQENCSDNKSGLSSNGSCNNKNQEQACEKNLEKVLASLTNCYKCDKCKSEQSKKNNKNWIWKKSSGKEGGLQKEYANTIGLPPRTQSLCLVVCLDEKGGKTQELKNIRTNSELLKEWIIAAFHEGKNLKPSEKKNDDNGKKLCKALEYSFADYGDLIKGTSIWDNEYTKDLELNLQKIFGKLFKRYIKKNNTAEQDTSYSSDELRESWWNTNKKYIWLAMKHGAGMNSTTCCGDGSGVTGSGSSCDDIPTIDLIPQYLRFLQEWVEHFCKQRQEKVKPVIENCNSCKESGGTCNGECKTECKNKCEVYKKFIEDCKGGDGTAGSSWVKRWDQIYKRYSKYIEDAKRNRKAGTKNCGPSSTTNAENKCVQSDIDSFFKHLIDIGLTTTPSSYLSIVLDDNICGADKAPWTTYTTTTEKCNKETDKSKLQQCNTAVVVNVPSPLGNTPHGYKYACQCKIPTNEETCDDRKEYMNQWSCGSARTMKRGYKNDNYELCKYNGVDVKPTTVRSNSSKLD

10

>Q8I639 (Q8I639_PLAF7) Plasmodium falciparum (aislado 3D7), parte extracelular de 2730 aa completa (SEQ ID NO:55)

MDKSSIANKIEAYLGAKSDDSKIDQSLKADPSEVQYYGSGGDGYLRLKNICKITVNHSDSGTNDPCDRIP
 PPYGDNDQWKCAIILSKVSEKPENVFVPPRRQRMCIINNLEKLNVDKIRDKHAFLADVLLTARNEGERIVQ
 NHPDTNSSNVCNALERSFADIADIIRGTDLWKGTSNLEQNLIKQMFAKIRENDKVLQDKYPKDQNYRKL
 REDWWNANRQKVWEVITCGARSNDLLIKRGWRTSGKSNNGDNKLELCRKCGHYEEKVPTKLDYVPQFLR
 WLTEWIEDFYREKQNLIDDMERHREECTSEDHKSKEGTSYCSTCKDKCKKYCECVKKWKSEWENQKNK
 YTELYQQNKNETSQKNTSRYDDYVKDFFKKLEANYSSLENIYKGDOPYFAEYATKLSFILNSSDANNPSEKI
 QKNNDEVCCNCSNESGIASVEQEQISDPSSNKTCTHSSSIKANKKKVCKHVKLGVRENDKDLRVCVIEHTSL
 SGVENCCCQDFLRILQENCSDNKS GSSSSNGSCNNKNQEACEKNLEKVLASLTNCYKCDKCKSEQSKKN
 NKNWIWKKSSGKEGGLQKEYANTIGLPPRTQSLCLVCLDEKGGKTQELKNIRTNSELLKEWIIAAFHEG
 KNLKPSHEKKNDNDNGKKLCKALEYSFADYGDLIKGTSIWDNEYTKDLELNLQKIFGKLFKRYIKNNNTAEQ
 DTSYSSLDLRESWWNTNKKYIWLAMKHGAGMNSTTCCGDGSGVTGSGSSCDDIPTIDLIPQYLRFLQE
 WVEHFCKQRQEKVKPIENCKSCKESGGTCNGECKTECKNKCEVYKKFIEDCKGGDGTAGSSWVKRW
 DQIYKRYSKYIEDAKRNRKAGTKNCGPSSTTNAAENKCVQSDIDSFFKHLIDIGLTPSSYLSIVLDDNIC
 GADKAPWTTYTTYTTTEKCNKETDKSKLQQCNTAVVVNVPSPLGNTPHGYKYACQCKIPTNEETCDDRKE
 YMNQWSCGSARTMKRGYKNDNYELCKYNGVDVKPTTVRSNSSKLDDKDVTFNLFQWVNKEIQYQIEQ
 YMTNTKISCNNEKNVLSRVSDAAQPKFSDNERDRNSITHEDKNCKEKCKCYSLWIEKINDQWDKQKD
 NYNKFQRKQIYDANKGSQNKKVLSNFFSCWEEYIQKYFNGDWSKIKNIGSDTFFELIKKCGNDSG
 DGETIFSEKLNNAEKKCKENESTNNKMKSSETSCDCSEPIYIRGCQPKIYDGKIFPGKGGEKQWICKDTII
 HGDTNGACIPPRQTQNLVGLWDKRYGGRSNIKNDTKESLKQIKNAIQKETELLYEYHDKGTAIISRN
 MKGQKEKEEKNNDNSNGLPKGFCHAVQRSFIDYKNMILGTSVNIYIYIGKLQEDIKKIEKGTTKQNGKTV
 GSGAENVNAWWKGIEGEMWDAVRCAITKINKKQKNGTFSIDECGIFPPTGNDEDQSVSWFKEWSEQF
 CIERLQYEKNIRDACTNNGQGDKIQGDCKRKCEEYKKYISEKKQEWKQKTKYENKYVGKSASDLLKEN
 YPECISANFDFIFNDNIEYKTYYPYGDYSSICSCEQVKYIYENNAEKKNNKSLCHEKGNDRTWSKKYIKKL
 ENGRTELEGVYVPPRRQQCLCLYELFPIIIKNKNDITNAKKELLETLQIVAEREAYYLWKQYHAHNDTTYLAHK
 KACCAIRGSFYDLEDIIKGNLDLVHDEYTKYIDSKLNEIFDSSNKNDIETKRARTDWWENEIAVNPITGAN

KSDPKTIRQLVWDAMQSGVRKAIDEEKEKKKPNENFPPCMGVQHIGIAKPQFIRWLEEWTFNEFCEKYTKY
 FEDMKSNCNLRKGADDCCDDNSNIECKKACANYTNWLNPKRIEWNGMSNYNKKIYRKSNESEDGKDYS
 MIMPTVIDYLNKRCNGEINGNYICCSCKNIGENSTSGTVNKKLQKKETQCEDNKGPLDLMNKVLNKMMD
 PKYSEHKMKCTEVYLEHVEEQLEIDNAIKDYKLYPLDRCFDDKSKMKVCDLIGDAIGCKHKTKLDELDE
 WNDVDMRDPYNKYKGVLIPIPRRRQLCFSRIVRGPANLRNLKEFKEEILKGAQSEGKFLGNYYNEDKDKEK
 ALEAMKNSFYDYEYIIGSDMLTNIQFKDIKRKLDRLLEKETNNTTEKVDWETNKKSIWNAMLCGYKKS
 GNKIIDPSWCTIPTTETPPQFLRWIKWGTNVCIQKEEHKEYVKSCKSNVTNLGAQESKKNCTSEIKKY
 QEWSRKRSIQWEAISEGYKKYKGMDEFKNTFKNIKEPDANEPNANEYLKKHCSKCPGFMQEQITKYT
 NIGNEAFKQIKEQVDIPAELEDVIYRLKHHEYDKGNDYICNKYKNINVMKKNDDTWTDLVKNSSDINK
 GVLLPPRRKNLFLKIDESDICKYKRDPKLFKDFIYSSAISEVERLKKVYGEAKTKVVHAMKYSFADIGSIIKG
 DDMMENSSDKIGKILGDGVGQNEKRKKWWDMMNKYHIWESMLCGYKHAYGNISENDRKMLDIPNND
 DEHQFLRWFEWTFCTKRNELYENMVTACNSAKCNTSNGSVDKKECTEACKNYSNFILIKKKEYQSL
 NSQYDMNYKETKAEEKESPEYFKDKCNGECSCLSEYFKDETRWKNPYETLDDTEVKNNCMCKPPPPASN
 NTSDILQKTIPFGIALALGSI AFLMKKKPKTPVDLLRVLDIPKGDYGIPTPKSSNRYIPYASDRYKKGKTYIY
 MEGDTSGDDDKYIWDL

>FCR3 (SEQ ID NO:56) parte extracelular de 2734 aa completa (577 aa corr. resaltada ID1-DBL2b)

[illegible]

>BPTI, inhibidor de proteasa (SEQ ID NO:57)
RPDFCLEPPYTGPCKARIIRYFYNAGLCQTFVYGGCRAKRNFKSAEDCMRTCGGA

- 5 >PE38, Exotoxina A de *Pseudomonas* (SEQ ID NO:58), (el subrayado de KDEL representa una secuencia señal, que puede ser opcional para las construcciones de acuerdo con la presente invención)

RHRQPRGWEQLEQCGYPVQRLVALYLAARLSWNQVDQVIRNALASPGSGGDLGEAIREQPEQARLALT
AAAESERFVRQGTGNDEAANGPADSGDALLERNYPTGAFLGDGGDISFSTRGTQNWTVRLLQAH
QLEERGYVFGYHGTFLAAQSIVFGGVRARSQDLDAIWRGFYIAGDPALAYGYAQDQEPDARGRIRNG
ALLRVYVPRSSLPGFYRTSLTAAPEAAGEVERLIGHPLPLRLDAITGPEEEGGRLETILGWPLAERTVVIPS
AIPTDPRNVGGDLDPSSIPDKEOASALPDYASOPGKPPRKDEL

>PE38LR, variante de PE38 (SEQ ID NO: 59) (el subrayado de KDEL representa una secuencia de señal, que puede ser opcional para las construcciones de acuerdo con la presente invención)

RHRQPRGWEQLYPTGAEFLDGGDISFSTRGTQNWTVERRLLQAHQRQLEERGYVVFVGYHGTFLEAAQSIV
FGGVRRARSQDLDAIWRGFYIAGDPALAYGYAQDQEPDARGRIRNGALLRVYVPRSSLPGFYRTSLTLAAP
EAAGEVERLIGHPLPLRLDAITGPEEEGGRLETILGWPLAERTTVIPSIAIPTDPRNVGGDLDPSSIPDKEQAI
SALPDYASQPGKPPRKDEL

Secuencias de polipéptidos VAR2CSA fusionadas con fragmentos truncados de exotoxina A de *Pseudomonas* (PE38)

Proteínas VAR2CSA-PE38 fusionadas pueden tener modificaciones tales como un inhibidor de proteasa (BPTI) en N-terminal y/o una secuencia optimizada de PE38 que es menos inmunogénica (PE38LR)

- 5 >BPTI-ID1-ID2aFCR3-PE38LR, (SEQ ID NO: 60) la secuencia subrayada corresponde al dominio ID1 de FCR3, la secuencia en negrita corresponde al dominio DBL2Xb de FCR3, la secuencia subrayada y en negrita es ID2a

RPDFCLEPPYTGPCKARIIRYFYNAGLCQTFVYGGCRAKRNNFKSAEDCMRTCGGANYIKGDPYFAEYA
TKLSFILNPSDANNPSGETANHND EACNCNESGISSVGQAQTSGPSSNKT CITHSSIKTNKKKECKDVKL
GVRENDKDLKICVIEDTSLSGVDNCCCQDLLGILQENCSDNKRGSNDSCDNKNQDECQKKLEKVFAS
LTNGYKCDKCKSGTSRSK KKW IWKSSGNEEGLQE EYANTIGLPPRTQSLYLG NLPKLENVCE
DVKDINFDTKEKFLAGCLIVSFHEGKNLKKRYPQNKNSGNKENLCKALEYSFADYGD LIGKTSI
WDNEYTKDLELNLQNNFGKLF GKYIKKNNTAEQDTSYSSLDELRESWWNTNKKYIWTAMKH
GAEMNITTCNADGSVTGSGSSCDDIPTIDLIPQYLRFLQEWVENFCEQRQAKVKDVITNCKSC
KESGNKCKTECKTKCKDECEKYKKFIEACGTAGGGIGTAGSPWSKRWDQIYKRYSKHIEDAK
RNRKAGTKNCGTSSTTNAAASTDENKCVQSDIDSFFKHLIDIGLTPSSYLSNVLDDNICGAD
KAPWTTYTTYTTTEKCNKERDKSKSQSSDTLVVVNVPSPLGNTPYRYKYACQCKIPTNEETCD
DRKEYMNQWSCGSARTMKRGYKNDNYELCKYNGVDVKPTTVRSNSSKLDRHRQPRGWEQLYP
TGAEFLGDGGDISFSTRGTQNWTVRLLQAHRQLEERGYVFGYHGTFLAAQSI VFGGVRARSQDLDAI
WRGFYIAGDPALAYGYAQDQEPDARGRIRNGALLRVYVPRSSLPGFYRTSLTLAAPEAAGEVERLIGHPLP
LRDLAITGPEEEGGRLETILGWPLAERTVVIPSAIPTDPRNVGGDLDPSSIPDKEQAISALPDYASQPGKPP
RKDEL

>BPTI-ID1-ID2aFCR3-PE38 (SEQ ID NO:61)

RPDFCLEPPYTGPCKARIIRYFYNAGLCQTFVYGGCRAKRNNFKSAEDCMRTCGGANYIKGDPYFAEYA
TKLSFILNPSDANNPSGETANHND EACNCNESGISSVGQAQTSGPSSNKT CITHSSIKTNKKKECKDVKL
GVRENDKDLKICVIEDTSLSGVDNCCCQDLLGILQENCSDNKRGSNDSCDNKNQDECQKKLEKVFAS
LTNGYKCDKCKSGTSRSK KKW IWKSSGNEEGLQE EYANTIGLPPRTQSLYLG NLPKLENVCE
DVKDINFDTKEKFLAGCLIVSFHEGKNLKKRYPQNKNSGNKENLCKALEYSFADYGD LIGKTSI
WDNEYTKDLELNLQNNFGKLF GKYIKKNNTAEQDTSYSSLDELRESWWNTNKKYIWTAMKH
GAEMNITTCNADGSVTGSGS SCDDIPTIDLIPQYLRFLQEWVENFCEQRQAKVKDVITNCKSC
KESGNKCKTECKTKCKDECEKYKKFIEACGTAGGGIGTAGSPWSKRWDQIYKRYSKHIEDAK
RNRKAGTKNCGTSSTTNAAASTDENKCVQSDIDS FFKHLIDIGLTPSSYLSNVLDDNICGAD
KAPWTTYTTYTTTEKCNKERDKSKSQSSDTLVVVNVPSPLGNTPYRYKYACQCKIPTNEETCD
DRKEYMNQWSCGSARTMKRGYKNDNYELCKYNGVDVKPTTVRSNSSKLDPEGGSLAALTAHQACHL
PLETFTRHRQPRGWEQLEQCGYPVQRLVALYLAARLSWNQVDQVIRNALASPGSGDLGEAIREQPEQAR
LALTAAAESERFVRQGTGNDEAGAANGPADSGDALLERNYPTGAEFLGD

GGDISFSTRGTQNWTVRLLQAHRQLEERGYVFGYHGTFLAAQSI VFGGVRARSQDLDAIWRGFYIA
GDPALAYGYAQDQEPDARGRIRNGALLRVYVPRSSLPGFYRTSLTLAAPEAAGEVERLIGHPLPLRLDAITG
PEEEGGRLETILGWPLAERTVVIPSAIPTDPRNVGGDLDPSSIPDKEQAISALPDYASQPGKPPRKDEL

- 10 >ID1-ID2aFCR3-PE38 (SEQ ID NO:62)

NYIKGDPYFAEYATKLSFILNPSDANNPSGETANHND EACNCNESGISSVGQAQTSGPSSNKT CITHSSIK
TNKKKECKDVKLGVRENDKDLKICVIEDTSLSGVDNCCCQDLLGILQENCSDNKRGSNDSCDNKNQ
DECQKKLEKVFASLTNGYKCDKCKSGTSRSK KKW IWKSSGNEEGLQE EYANTIGLPPRTQSLYLG NLPK
LENVCE
DVKDINFDTKEKFLAGCLIVSFHEGKNLKKRYPQNKNSGNKENLCKALEYSFADYGD LIGKTSI
WDNEYTKDLELNLQNNFGKLF GKYIKKNNTAEQDTSYSSLDELRESWWNTNKKYIWTAMKH
GAEMNITTCNADGSVTGSGSSCDDIPTIDLIPQYLRFLQEWVENFCEQRQAKVKDVITNCKSC
KESGNKCKTECKTKCKDECEKYKKFIEACGTAGGGIGTAGSPWSKRWDQIYKRYSKHIEDAK
RNRKAGTKNCGTSSTTNAAASTDENKCVQSDIDS FFKHLIDIGLTPSSYLSNVLDDNICGAD
KAPWTTYTTYTTTEKCNKERDKSKSQSSDTLVVVNVPSPLGNTPYRYKYACQCKIPTNEETCD
DRKEYMNQWSCGSARTMKRGYKNDNYELCKYNGVDVKPTTVRSNSSKLDPEGGSLAALTAHQACHL
PLETFTRHRQPRGWEQLEQCGYPVQRLVALYLAARLSWNQVDQVIRNALASPGSGDLGEAIREQPEQAR
LALTAAAESERFVRQGTGNDEAGAANGPADSGDALLE RNYPTGAEFLGDGGDISFSTRGTQNWTVRLLQAHRQLEERGYVFGYHGTFLAAQSI VFGGVRARSQ
DLDAIWRGFYIAGDPALAYGYAQDQEPDARGRIRNGALLRVYVPRSSLPGFYRTSLTLAAPEAAGEVERLI
GHPLPLRLDAITGPEEEGGRLETILGWPLAERTVVIPSAIPTDPRNVGGDLDPSSIPDKEQAISALPDYASQ
PGKPPRKDEL

>ID1-ID2aFCR3-PE38LR (SEQ ID NO:63)

NYIKGDPYFAEYATKLSFILNPSDANNPSGETANHNDACNCNESGISSVGQAQTSGPSSNKTCTHSSIK
TNKKKECKDVKLGVRENDKDLKICVIEDTSLSGVDNCCCQDLLGILQENCSDNKRGSNDSCDNKNQ
DECQKKLEKVFASLTNGYKCDKCKSGTSRSKKKWIWKSSGNEEGLQEEYANTIGLPPRTQSLYLGNLPLK
LENVCEDVKDINFDTKEKFLAGCLIVSFHEGKNLKKRYPQNKNSGNKENLCKALEYSFADYGDLIKGTISI
DNEYTKDLELNLQNNFGKLFKGKIKKNNTAEQDTSYSSLDLRESWWNTNKKYIWTAMKHGAEMNITTC
NADGSVTGSGSSCDDIPTIDLIPQYLRFLQEWVENFCEQRQAKVKDVITNCKSCKESGNKCKTECKTKCK
DECEKYKKFIEACGTAGGGIGTAGSPWSKRWDQIYKRYSKHIEDAKRNRKAGTKNCGTSSTTNAAASTD
ENKCVQSDIDSFFKHLIDIGLTPSSYLSNVLDDNICGADKAPWTTYTTYTTTEKCNKERDKSKSQSSDTL
VVVNVPSPLGNTPYRYKYACQCKIPTNEETCDDRKEYMNQWSCGSARTMKRGYKNDNYELCKYNGVDV
KPTTVRSNSSKLDHRHQRPRGWEQLYPTGAFLGDGGDISFSTRGTQNWTVRLLQAHRLQLEERGYVFGV
YHGTFLAAQSIIVFGGVRARSQDLDAIWRGFYIAGDPALAYGYAQDQEPDARGRIRNGALLRVYVPRSSL
PGFYRTSLTLAAPEAAGEVERLIGHPLPLRLDAITGPEEEGGRLETILGWPLAERTVVIPSAIPTDPRNVGGD
LDPSSIPDKEQAISALPDYASQPGKPPRKDEL

>BPTI-DBL1-ID2aFCR3-PE38LR (SEQ ID NO:64)

RPDFCLEPPYTGPCKARIIRYFYNAGLCQTFVYGGCRAKRNFKSAEDCMRTCGGANHSDSGKYDPCE
KKLPPYDDNDQWKCCQNSSDGSCKPENICVPPRRERLCTYNLENLKFDKIRDNNAFLADVLLTARNEGE
KIVQNHPTDNSSNVCNALERSFADLADIIRGTDQWKGTNSNLEKNLQMFAKIRENDKVLQDKYPKDQK
YTKLREAWWNANRQKVWEVITCGARSNDLLIKRGWRTSGKSDRKNFELCRKCGHYEKEVPTKLDYVP
QFLRWLTEWIEDFYREKQNLIDDMERHREECTREDHKSKEGTSYCSTCKDKCKKYCECVKKWKTWEN
QENKYKDLYEQNKNTSQKNTSRYDDYVKDFFEKLEANYSSLENYIKGDPYFAEYATKLSFILNPSDANNP
SGETANHNDACNCNESGISSVGQAQTSGPSSNKTCTHSSIKTNKKKECKDVKLGVRENDKDLKICVIE
DTSLSGVDNCCCQDLLGILQENCSDNKRGSNDSCDNKNQDECQKKLEKVFASLTNGYKCDKCKSGT
SRSKKKWIWKSSGNEEGLQEEYANTIGLPPRTQSLYLGNLPLKLENVCEDVKDINFDTKEKFLAGCLIVSF
HEGKNLKKRYPQNKNSGNKENLCKALEYSFADYGDLIKGTISIWDNEYTKDLELNLQNNFGKLFKGKIKKN
NTAEQDTSYSSLDLRESWWNTNKKYIWTAMKHGAEMNITTCNADGSVTGSGSSCDDIPTIDLIPQYLR
FLQEWVENFCEQRQAKVKDVITNCKSCKESGNKCKTECKTKCKDECEKYKKFIEACGTAGGGIGTAGSP
WSKRWDQIYKRYSKHIEDAKRNRKAGTKNCGTSSTTNAAASTDENKCVQSDIDSFFKHLIDIGLTPSSY
LSNVLDDNICGADKAPWTTYTTYTTTEKCNKERDKSKSQSSDTLVVVNVPSPLGNTPYRYKYACQCKIPT
NEETCDDRKEYMNQWSCGSARTMKRGYKNDNYELCKYNGVDVKPTTVRSNSSKLDHRHQRPRGWEQLY
PTGAFLGDGGDISFSTRGTQNWTVRLLQAHRLQLEERGYVFGVYHGTFLAAQSIIVFGGVRARSQDLDA
AIWRGFYIAGDPALAYGYAQDQEPDARGRIRNGALLRVYVPRSSLPGFYRTSLTLAAPEAAGEVERLIGH
LPLRLDAITGPEEEGGRLETILGWPLAERTVVIPSAIPTDPRNVGGDLDPSSIPDKEQAISALPDYASQPGK
PPRKDEL

>BPTI-DBL1-ID2aFCR3-PE38 (SEQ ID NO:65)

RPDFCLEPPYTGPCKARIIRYFYNAGLCQTFVYGGCRAKRNFKSAEDCMRTCGGANHSDSGKYDPCE
KKLPPYDDNDQWKCCQNSSDGSCKPENICVPPRRERLCTYNLENLKFDKIRDNNAFLADVLLTARNEGE
KIVQNHPTDNSSNVCNALERSFADLADIIRGTDQWKGTNSNLEKNLQMFAKIRENDKVLQDKYPKDQK
YTKLREAWWNANRQKVWEVITCGARSNDLLIKRGWRTSGKSDRKNFELCRKCGHYEKEVPTKLDYVP
QFLRWLTEWIEDFYREKQNLIDDMERHREECTREDHKSKEGTSYCSTCKDKCKKYCECVKKWKTWEN
QENKYKDLYEQNKNTSQKNTSRYDDYVKDFFEKLEANYSSLENYIKGDPYFAEYATKLSFILNPSDANNP
SGETANHNDACNCNESGISSVGQAQTSGPSSNKTCTHSSIKTNKKKECKDVKLGVRENDKDLKICVIE
DTSLSGVDNCCCQDLLGILQENCSDNKRGSNDSCDNKNQDECQKKLEKVFASLTNGYKCDKCKSGT
SRSKKKWIWKSSGNEEGLQEEYANTIGLPPRTQSLYLGNLPLKLENVCEDVKDINFDTKEKFLAGCLIVSF
HEGKNLKKRYPQNKNSGNKENLCKALEYSFADYGDLIKGTISIWDNEYTKDLELNLQNNFGKLFKGKIKKN
NTAEQDTSYSSLDLRESWWNTNKKYIWTAMKHGAEMNITTCNADGSVTGSGSSCDDIPTIDLIPQYLR
FLQEWVENFCEQRQAKVKDVITNCKSCKESGNKCKTECKTKCKDECEKYKKFIEACGTAGGGIGTAGSP
WSKRWDQIYKRYSKHIEDAKRNRKAGTKNCGTSSTTNAAASTDENKCVQSDIDSFFKHLIDIGLTPSSY
LSNVLDDNICGADKAPWTTYTTYTTTEKCNKERDKSKSQSSDTLVVVNVPSPLGNTPYRYKYACQCKIPT
NEETCDDRKEYMNQWSCGSARTMKRGYKNDNYELCKYNGVDVKPTTVRSNSSKLDPEGGSLAALTAHQ
ACHLPLETFRHRQRPRGWEQLEQCGYPVQRLVALYLAARLSWNQVDQVIRNALASPGSGGDLGEAIREQ
PEQARLALTLAAESERFVRQGTGNDEAGAA_nGADSGDALLERNYPTGAFLGDGGDISFSTRGTQNW
TVRLLQAHRLQLEERGYVFGVYHGTFLAAQSIIVFGGVRARSQDLDAIWRGFYIAGDPALAYGYAQDQEP
DARGRIRNGALLRVYVPRSSLPGFYRTSLTLAAPEAAGEVERLIGHPLPLRLDAITGPEEEGGRLETILGWPL
AERTVVIPSAIPTDPRNVGGDLDPSSIPDKEQAISALPDYASQPGKPPRKDEL

>DBL1-ID2aFCR3-PE38LR (SEQ ID NO:66)

NHSDSGKYDPCEKKLPYDDNDQWKCQONSSDGSQKPNICVPPRRERLCTYNLENLKFDDKIRDNNAF
ADVLLTARNEGEKIVQNHPTDNSSNVCNALERSFADLADIIRGTDQWKGTNSNLEKNLQMFADKIREND
KVLQDKYPKDQKYTKLREAWWNANRQKVWEVITCGARSNDLLIKRGWRTSGKSDRKKNFELCRKCGHY
EKEVPTKLDYVPQFLRWLTEWIEDFYREKQNLIDDMERHREECTREDHKSKEGTSYCSTCKDKCKKYCEC
VKKWKTEWENQENKYKDLYEQNKNTSQKNTSRYDDYVKDFFEKLEANYSSLENYIKGDPYFAEYATKL
SFILNPSDANNPSGETANHNDACNCNESGISSVQQAQTSQPSSNKTCTHSSIKTNKKKECKDVKLGV
ENDKDLKICVIEDTSLSGVDNCCCQDLLGILQENCSDNKRGSNDSCDNKNQDECQKKLEKVFASLTN
GYKCDKCKSGTSRSKKKWIWKKSSGNEEGLQEEYANTIGLPPRTQSLYLGNLPKLENVCEDVKDINFDTK
EKFLAGCLIVSFHEGKNLKKRYPQNKNSGNKENLCKALEYSFADYGDILKGTSIWDNEYTKDLELNLQNN
FGKLFGKYIKKNNTAEQDTSYSSLDLRESWWNTNKKYIWTAMKHGAEMNITTCNADGSVTGSGSSCD
DIPTIDLIPQYLRFLQEWVENFCEQRQAKVKDVITNCKSCKESGNKCKTECKTKCKDECEKYKKFIEACGT
AGGGIGTAGSPWSKRWDQIYKRYSKHIEDAKRNRKAGTKNCGTSSTTNAASTDENKCVQSDIDSFFK
HLIDIGLTPSSYLSNVLDNICGADKAPWTTYTTYTTTEKCNKERDKSKSQSSDTLVVVNVPSPLGNT
RYKYACQCKIPTNEETCDDRKEYMNQWSCGSARTMKRGYKNDNYELCKYNGVDVKPTTVRSNSSKLD
HRQPRGWEQLYPTGAFLGDGGDISFSTRGTQNWTVRLLQAHRLQLEERGYVFGYHGTFLAAQSI
GGVRARSQDLDAIWRGFYIAGDPALAYGYAQDQEPDARGRIRNGALLRVYVPRSSLPGFYRTSLT
AAGEVERLIGHPLPLRLDAITGPEEEGGRLETILGWPLAERTTVVIPSIAIPTDPRNVGGDLDPSSIPDKEQAIS
ALPDYASQPGKPPRKDEL

>DBL1-ID2aFCR3-PE38 (SEQ ID NO:67)

NHSDSGKYDPCEKKLPYDDNDQWKCQONSSDGSQKPNICVPPRRERLCTYNLENLKFDDKIRDNNAF
ADVLLTARNEGEKIVQNHPTDNSSNVCNALERSFADLADIIRGTDQWKGTNSNLEKNLQMFADKIREND
KVLQDKYPKDQKYTKLREAWWNANRQKVWEVITCGARSNDLLIKRGWRTSGKSDRKKNFELCRKCGHY
EKEVPTKLDYVPQFLRWLTEWIEDFYREKQNLIDDMERHREECTREDHKSKEGTSYCSTCKDKCKKYCEC
VKKWKTEWENQENKYKDLYEQNKNTSQKNTSRYDDYVKDFFEKLEANYSSLENYIKGDPYFAEYATKL
SFILNPSDANNPSGETANHNDACNCNESGISSVQQAQTSQPSSNKTCTHSSIKTNKKKECKDVKLGV
ENDKDLKICVIEDTSLSGVDNCCCQDLLGILQENCSDNKRGSNDSCDNKNQDECQKKLEKVFASLTN
GYKCDKCKSGTSRSKKKWIWKKSSGNEEGLQEEYANTIGLPPRTQSLYLGNLPKLENVCEDVKDINFDTK
EKFLAGCLIVSFHEGKNLKKRYPQNKNSGNKENLCKALEYSFADYGDILKGTSIWDNEYTKDLELNLQNN
FGKLFGKYIKKNNTAEQDTSYSSLDLRESWWNTNKKYIWTAMKHGAEMNITTCNADGSVTGSGSSCD
DIPTIDLIPQYLRFLQEWVENFCEQRQAKVKDVITNCKSCKESGNKCKTECKTKCKDECEKYKKFIEACGT
AGGGIGTAGSPWSKRWDQIYKRYSKHIEDAKRNRKAGTKNCGTSSTTNAASTDENKCVQSDIDSFFK
HLIDIGLTPSSYLSNVLDNICGADKAPWTTYTTYTTTEKCNKERDKSKSQSSDTLVVVNVPSPLGNT
RYKYACQCKIPTNEETCDDRKEYMNQWSCGSARTMKRGYKNDNYELCKYNGVDVKPTTVRSNSSKLD
EGGSLAALTAHQACHLPLETFRHRQPRGWEQLEQCGYPVQRLVALYLAARLSWNQVDQVIRNALASPG
SGGDLGEAIREQPEQARLALTAAAESEFVRQGTGNDEAGAANGPADSGDALLERNYPTGAFLGDGG

DISFSTRGTQNWTVRLLQAHRLQLEERGYVFGYHGTFLAAQSIFFGGVRARSQDLDAIWRGFYIAGDP
ALAYGYAQDQEPDARGRIRNGALLRVYVPRSSLPGFYRTSLTAAPEAAGEVERLIGHPLPLRLDAITGPEE
EGGRLETILGWPLAERTTVVIPSIAIPTDPRNVGGDLDPSSIPDKEQAISALPDYASQPGKPPRKDEL

>ID1-ID2a3D7-PE38 (SEQ ID NO:68)

LSFILNSSDANNPSEKIQKNNDDEVCCNCNESGIAVEQEISDPSSNKTCTHSSIKANKKKVKCHVKLV
RENDKDLRVCVIEHTSLSGVENCCCQDFLRILQENCSDNKSNGSSNGSCNNKNQEACEKNLEKVLASLT
NCYKCDKCKSEQSKNNKNWIWKKSSGKEGGLQKEYANTIGLPPRTQSLCLVCLDEKGGKTQELKNIR
TNSSELLKEWIIAAFHEGKNLKPSEKKNDDNGKKLCKALEYSFADYGDILKGTSIWDNEYTKDLELNLQKI
FGKLFRKYIKKNNTAEQDTSYSSLDLRESWWNTNKKYIWLAMKHGAGMNSTTCCGDGSVTGSGSSCD
DIPTIDLIPQYLRFLQEWVEHFCKQRQEKVKPVIENCKSCKESGGTCNGECKTECKNKCEVYKKFIEDCKG
GDGTAGSSWVKRWDQIYKRYSKYIEDAKRNRKAGTKNCGPSSTTNAAEKNCVQSDIDSFFKHLIDIGLT
TPSSYLSIVLDNICGADKAPWTTYTTYTTTEKCNKETDKSKLQCCNTAVVVNVPSPLGNTPHGYKYACQ
CKIPTNEETCDDRKEYMNQWSCGSARTMKRGYKNDNYELCKYNGVDVKPTTVRSNSSKLDPEGGSLAA
LTAHQACHLPLETFRHRQPRGWEQLEQCGYPVQRLVALYLAARLSWNQVDQVIRNALASPGSGGDLGE
AIREQPEQARLALTAAAESEFVRQGTGNDEAGAANGPADSGDALLERNYPTGAFLGDGGDISFSTRG
TQNWTVRLLQAHRLQLEERGYVFGYHGTFLAAQSIFFGGVRARSQDLDAIWRGFYIAGDPALAYGYA
QDQEPDARGRIRNGALLRVYVPRSSLPGFYRTSLTAAPEAAGEVERLIGHPLPLRLDAITGPEEEGGRLET
ILGWPLAERTTVVIPSIAIPTDPRNVGGDLDPSSIPDKEQAISALPDYASQPGKPPRKDEL

>ID1-ID2a3D7-PE38LR (SEQ ID NO:69)

LSFILNSSDANNPSEKIQKNNDEVCCNCNESGSIASVEQEIQISDPSSNKTCTHSSIKANKKKVCKHVKLGV
RENDKDLRVCVIEHTSLSGVENCCCQDFLRILQENCSDNKGSSSSNGSCNNKNQEACEKNLEKVLASLT
NCYKCDKCKSEQSKNNKNWIWKKSSGKEGGLQKEYANTIGLPPRTQSLCLVCLDEKGKKTQELKNIR
TSELLKEWIIAAFHEGKNLKPSEHKNDNGKKLCKALEYSFADYGDLIKGTSIWDNEYTKDLELNLQKI
FGKLFKRYIKNNNTAEQDTSYSSDELRESWWNTNKKYIWLAMKHGAGMNSTTCCGDGSVTSGSSCD
DIPTIDLIPQYLRFLQEWVEHFCKQRQEKVKPIENCKSCKESGGTCNGECKTECKNKCEVYKKFIEDCKG
GDGTAGSSWVKRWDQYKRYSKYIEDAKRNRKAGTKNCGPSSTTNAENKCVQSDIDSFFKHLIDIGLT
TPSSYLSIVLDDNICGADKAPWTTYTTYTTTECKNKETDKSKLQQCNTAVVVNVPSPLGNTPHGYKYACQ
CKIPTNEETCDDRKEYMNQWSCGSARTMKRGYKNDNYELCKYNGVDVKPTTVRSNSSKLDHRHQPRG
WEQLYPTGAFLGDGGDISFSTRGTQNWTVRLLQAHRLQLEERGYVFGYHGTFLAAQSIIVFGGVRAR
SQDLDAIWRGFYIAGDPALAYGYAQDQEPDARGRIRNGALLRVYVPRSSLPGFYRTSLTAAPEAAAGEVER
LIGHPLPLRLDAITGPEEEGGRLETILGWPLAERTVVIPSAIPTDPRNVGGDLDPSSIPDKEQAISALPDYAS
QPGKPPRKDEL

>ID1-DBL2bFCR3-PE38LR (SEQ ID NO:70)

NYIKGDPYFAEYATKLSFILNPSDANNPSGETANHNDEACNCNESGISSVGQAQTS GPSSNKTCTHSSIK
TNKKKECKDVKLGVRENDKDLKICVIEDTSLSGVDNCCCQDLLGILQENCSDNKGSSSSNDSCDNKNQ
DECQKKLEKVFASLTNGYKCDKCKSGTSRSKKKIWKKSSGNEEGLQEEYANTIGLPPRTQSLYLGNLKP
LENVEDVKDINFDTKEKFLAGCLIVSFHEGKNLKKRYPQNKNSGNKENLCKALEYSFADYGDLIKGTSIW
DNEYTKDLELNLQNNFGKLFKRYIKNNNTAEQDTSYSSDELRESWWNTNKKYIWTAMKHGAGMNITTC
NADGSVTSGSSCDDIPTIDLIPQYLRFLQEWVENFCEQRQAKVKDVITNCKSCKESGNKCKTECKTKCK
DECEYKKFIEACGTAGGGIGTAGSPWSKRWDQYKRYSKYIEDAKRNRKAGTKNCGTSSTTNAAASTD
ENKCVQSDIDSFFKHLIDIGLTPSSYLSNVLDDNICGADKAPWTTYTTYTTTECKNKERDKSKSQSSDTL
VVNVNPSPLGNTPYRYKYRHRQPRGWEQLYPTGAFLGDGGDISFSTRGTQNWTVRLLQAHRLQLEERG
YVFGYHGTFLAAQSIIVFGGVRARSQDLDAIWRGFYIAGDPALAYGYAQDQEPDARGRIRNGALLRVYV
PRSSLPGFYRTSLTAAPEAAAGEVERLIGHPLPLRLDAITGPEEEGGRLETILGWPLAERTVVIPSAIPTDPR
NVGGDLDPSSIPDKEQAISALPDYASQPGKPPRKDEL

>DT388, secuencia de toxina diftérica (SEQ ID NO: 71)

MGADDVVDSSKSFVMENFSSYHGTKPGYVDSIQKGIQKPKSGTQGNYYYYWKGFYSTDNKYDAAGYS
VDNENPLSGKAGGVVKVTPGLTKVLALKVDNAETIKKELGLSLTEPLMEQVGTTEFIKRFGDGASRVVLS
LPFAEGSSSVEYINNWEQAKALSVELEINFETRGRGQDAMYEYMAQACAGNRVRRSVGSSLSCINLDW
DVIRDKTKTKIESLKEHGPIKNKMSESPNKTVSEEKAKQYLEEFHQTALEHPELSELKTVGTNPVFAGAN
YAAWAVNVAQVIDSETADNLEKTTAALSILPGIGSVMGIADGAVHHNTEEIVAQSIALSSLMVAQAIPLVG
ELVDIGFAAYNFVESIINLFQVVHNSYNRPAYSPGHKTQPMHEF

Secuencias de polipéptidos VAR2CSA fusionadas con fragmentos truncados de toxina diftérica

>DT388-DBL1-ID2a 3D7 (SEQ ID NO:72)

MGADDVVDSSKSFVMENFSSYHGTKPGYVDSIQKGIQKPKSGTQGNYYYYWKGFYSTDNKYDAAGYS
VDNENPLSGKAGGVVKVTPGLTKVLALKVDNAETIKKELGLSLTEPLMEQVGTTEFIKRFGDGASRVVLS
LPFAEGSSSVEYINNWEQAKALSVELEINFETRGRGQDAMYEYMAQACAGNRVRRSVGSSLSCINLDW
DVIRDKTKTKIESLKEHGPIKNKMSESPNKTVSEEKAKQYLEEFHQTALEHPELSELKTVGTNPVFAGAN
YAAWAVNVAQVIDSETADNLEKTTAALSILPGIGSVMGIADGAVHHNTEEIVAQSIALSSLMVAQAIPLVG
ELVDIGFAAYNFVESIINLFQVVHNSYNRPAYSPGHKTQPMHEFHSDSGTNDPCDRIPPPYGDNDQWKCA
IILSKVSEKPVNFVPPRRQRMCIINLEKLNVDKIRDKHAFLADVLLTARNEGERIVQNHPTDNSSNVCNA
LERSFADIADIIRGTDLWKGTSNLEQNLKQMFAKIRENDKVLQDKYPKDQNYRKLREDWWNANRQKV
WEVITCGARSNDLLIKRGWRTSGKSNGDNKLELCKRCKGHYEEKVPTKLDYVPQFLRWLWTEWIEDFYREK
QNLIDDMERHREECTSEDHKSKEGTSYCSTCKDKCKKYCECVKKWKSEWENQKNKYTELYQQNKNETS
QKNTSRYDDYVKDFFKKLEANYSSLENYIKGDPYFAEYATKLSFILNSSDANNPSEKIQKNNDEVCCNCNES
GSIASVEQEIQISDPSSNKTCTHSSIKANKKKVCKHVKLGVRENDKDLRVCVIEHTSLSGVENCCCQDFLRIL
QENCSDNKGSSSSNGSCNNKNQEACEKNLEKVLASLTNCYKCDKCKSEQSKNNKNWIWKKSSGKE
GGLQKEYANTIGLPPRTQSLCLVCLDEKGKKTQELKNIRNTSELLKEWIIAAFHEGKNLKPSEHKNDNG
GKKLCKALEYSFADYGDLIKGTSIWDNEYTKDLELNLQKIFGKLFKRYIKNNNTAEQDTSYSSDELRESW
WNTNKKYIWLAMKHGAGMNSTTCCGDGSVTSGSSCDDIPTIDLIPQYLRFLQEWVEHFCKQRQEKVK
PVIENCKSCKESGGTCNGECKTECKNKCEVYKKFIEDCKGGDGTAGSSWVKRWDQYKRYSKYIEDAKR
NRKAGTKNCGPSSTTNAENKCVQSDIDSFFKHLIDIGLTPSSYLSIVLDDNICGADKAPWTTYTTYTTT
EKNKETDKSKLQQCNTAVVVNVPSPLGNTPHGYKYACQCKIPTNEETCDDRKEYMNQWSCGSARTMK
RGYKNDNYELCKYNGVDVKPTTVRSNSSKLDGR

>DT388-DBL1-ID2a FCR3 (SEQ ID NO:73)

MGADDVVDSSKSFVMENFSSYHGTPGYVDSIQKGIQKPKSGTQGNYYYYDDWKGFYSTDNKNYDAAGYS
VDNENPLSGKAGGVVKVTPGLTKVLALKVDNAETIKKELGLSLTEPLMEQVGTTEFIKRFDGASRVVLS
LPFAEGSSSVVEYINNWEQAKALSVELEINFETRGRGQDAMYEYMAQACAGNRVRRSVGSSSLSCINLDW
DVIRDKTKTKIESLKEHGPIKNKMSESPNKTVSEEKAKQYLEEFHQTALEHPELSELKTVTGTNPVFAGAN
YAAWAVNVAQVIDSETADNLEKTTAALSILPGIGSVMGIADGAVHHNTEEIVAQSIALSSLMVAQAIPLVG
ELVDIGFAAYNFVESIINLFQVVHNSYNRPAYSPGHKTQPMHEFHSDSGKYDPCEKKLPPYDDNDQWKC
QQNSSDGSKGPNICVPPRRERLCTYNLENLKFDRKIRDNNAFLADVLLTARNEGEKIVQNHPTDNSSNVC
NALERSFADLADIIRGTDQWKGNTSNLEKNLQMFAKIRENDKVLQDKYPKDQKYTKLREAWWNANRQ
KVWEVITCGARSNDLLIKRGWRTSGKSDRKKNFELCRKCGHYEKEVPTKLDYVPQFLRWLTEWIEDFYRE
KQNLIDDMERHREECTREDHKSKEGTSYCSTCKDKCKKYCECVKKWKTEWENQENKYKDLYEQNKNT
SQKNTSRYDDYVKDFFEKLEANYSSLENIYKGPYFAEYATKLSFILNPSDANNPSGETANHNDACNCN
ESGISSVGQAQTS GPSSNKT CITHSSIKTNKKKECKDVKLGVRENDKDLKICVIEDTSLSGVDNCCCQDL
LGILQENCSDNKRGSNDSCDNKNQDECQKKLEKVFASLTNGYKCDKCKSGTSRSKKKWIWKKSSG
NEEGLQEEYANTIGLPPRTQSLYLGNLPKLENVCEDVKDINFDTKEKFLAGCLIVSFHEGKNLKKRYPQNK
NSGNKENLCKALEYSFADYGD LIGTSIWDNEYTKDLELNLQNNFGKLF GKYIKKNNTAEQDTSYSSLDE
LRESWWNTNKKYIWTAMKHGAEMNITTCNADGSVTGSGSSCDDIPTIDLIPQYLRFLQEWVENFCEQRQ
AKVKDVITNCKSCKESGNKCKTECKTKCKDECEKYKKFIEACGTAGGGIGTAGSPWSKRWDQIYKRYSK
HIEDAKRNRKAGTKNCGTSSTTNAAASTDENKCVQSDIDSFFKHLIDIGLTPSSYLSNVLDNIGGADK
APWTTYTTYTTTEKCNKERDKSKSQSSDTLVVVNVPSPLGNTPYRYKYACQCKIPTNEETCDDRKEYMNQ
WSCGSARTMKRGYKNDNYELCKYNGVDVKPTTVRSNSSKLD SGR

>DT388-ID1-ID2a 3D7 (SEQ ID NO:74)

MGADDVVDSSKSFVMENFSSYHGTPGYVDSIQKGIQKPKSGTQGNYYYYDDWKGFYSTDNKNYDAAGYS
VDNENPLSGKAGGVVKVTPGLTKVLALKVDNAETIKKELGLSLTEPLMEQVGTTEFIKRFDGASRVVLS
LPFAEGSSSVVEYINNWEQAKALSVELEINFETRGRGQDAMYEYMAQACAGNRVRRSVGSSSLSCINLDW
DVIRDKTKTKIESLKEHGPIKNKMSESPNKTVSEEKAKQYLEEFHQTALEHPELSELKTVTGTNPVFAGAN
YAAWAVNVAQVIDSETADNLEKTTAALSILPGIGSVMGIADGAVHHNTEEIVAQSIALSSLMVAQAIPLVG
ELVDIGFAAYNFVESIINLFQVVHNSYNRPAYSPGHKTQPMHEFSLFILNSSDANNPSEKIQKNNDEVCCNC
NESGIAVEQEISDPSSNKT CITHSSIKANKKKVCKHVKLGVRENDKDLRVCVIEHTSLSGVENCCCQD
FLRILQENCSDNKGSSSSNGSCNNKNQEACEKNLEKVLASLTNCYKCDKCKSEQSKNNKNWIWKKSS
GKEGGLQKEYANTIGLPPRTQSLCLVVCLDEKGGKTQELKNIRTNSELLKEWIAAFHEGKNLKP SHEKKN
DDNGKKLCKALEYSFADYGD LIGTSIWDNEYTKDLELNLQKIFGKLF RYIKKNNTAEQDTSYSSLDEL
ESWWNTNKKYIWLAMKHGAGMNSTTCCGDGSVTGSGSSCDDIPTIDLIPQYLRFLQEWVEHFCKQRQE

KVKPVIENCKSCKESGGTCNGECKTECKNKCEVYKKFIEDCKGGDGTAGSSWVKRWDQIYKRYSKYIED
AKRNRKAGTKNCGPSSTTNAAENKCVQSDIDSFFKHLIDIGLTPSSYLSIVLDNIGGADKAPWTTYTTY
TTTEKCNKETDKSKLQQCNTAVVVNVPSPLGNTPHGYKYACQCKIPTNEETCDDRKEYMNQWSCGSART
MKRGYKNDNYELCKYNGVDVKPTTVRSNSSKLD SGR

>DT388-ID1-ID2a FCR3 (SEQ ID NO:75)

MGADDVVDSSKSFVMENFSSYHGTPGYVDSIQKGIQKPKSGTQGNYYYYDDWKGFYSTDNKNYDAAGYS
VDNENPLSGKAGGVVKVTPGLTKVLALKVDNAETIKKELGLSLTEPLMEQVGTTEFIKRFDGASRVVLS
LPFAEGSSSVVEYINNWEQAKALSVELEINFETRGRGQDAMYEYMAQACAGNRVRRSVGSSSLSCINLDW
DVIRDKTKTKIESLKEHGPIKNKMSESPNKTVSEEKAKQYLEEFHQTALEHPELSELKTVTGTNPVFAGAN
YAAWAVNVAQVIDSETADNLEKTTAALSILPGIGSVMGIADGAVHHNTEEIVAQSIALSSLMVAQAIPLVG
ELVDIGFAAYNFVESIINLFQVVHNSYNRPAYSPGHKTQPMHEFNYIKGPYFAEYATKLSFILNPSDANNP
SGETANHNDACNCNESGISSVGQAQTS GPSSNKT CITHSSIKTNKKKECKDVKLGVRENDKDLKICVIE
DTSLSGVDNCCCQDLLGILQENCSDNKRGSNDSCDNKNQDECQKKLEKVFASLTNGYKCDKCKSGT
SRSKKKWIWKKSSGNEEGLQEEYANTIGLPPRTQSLYLGNLPKLENVCEDVKDINFDTKEKFLAGCLIVSF
HEGKNLKKRYPQNKNSGNKENLCKALEYSFADYGD LIGTSIWDNEYTKDLELNLQNNFGKLF GKYIKKN
NTAEQDTSYSSLDELRESWWNTNKKYIWTAMKHGAEMNITTCNADGSVTGSGSSCDDIPTIDLIPQYLR
FLQEWVENFCEQRQAKVKDVITNCKSCKESGNKCKTECKTKCKDECEKYKKFIEACGTAGGGIGTAGSP
WSKRWDQIYKRYSKHIEDAKRNRKAGTKNCGTSSTTNAAASTDENKCVQSDIDSFFKHLIDIGLTPSSY
LSNVLDNIGGADKAPWTTYTTYTTTEKCNKERDKSKSQSSDTLVVVNVPSPLGNTPYRYKYACQCKIPT
NEETCDDRKEYMNQWSCGSARTMKRGYKNDNYELCKYNGVDVKPTTVRSNSSKLD SGR

Ejemplos**Ejemplo 1 Producción de proteínas recombinantes VAR2CSA truncadas**

Todos los truncamientos de proteínas se produjeron de acuerdo con los límites de dominio definidos previamente (Dahlbäck M, Jorgensen LM, Nielsen MA, Clausen TM, Ditlev SB, y col. J Biol Chem 286: 15908-15917). A fin de simplificar, se divide el dominio CIDR_{PAM} en dos dominios ID2a e ID2b, en el que ID2a es la parte N-terminal de CIDR_{PAM} que no contiene la secuencia similar a CIDR e ID2b corresponde a la secuencia similar a CIDR. También se utiliza un nuevo borde DBL2X que incorpora 93 aminoácidos de ID2a. Para simplificar llamamos a este borde DBL2Xb, mientras que el borde anterior se denominará DBL2Xa. Los cebadores utilizados en la clonación se enumeran en la Tabla 2. Los fragmentos se expresaron en células de insecto infectadas con baculovirus como proteínas solubles como se describe en el Procedimiento 1. La mayoría de las proteínas se produjeron basándose en el genotipo de FCR3. Algunos fragmentos de FCR3 no se expresaron y, en cambio, se hicieron basándose en el genotipo 3D7. Las proteínas se utilizaron indistintamente en el análisis ya que se muestra que el VAR2CSA recombinante de ambos genotipos se une por igual a CSA. Todas las proteínas mostraron un cambio en la movilidad del gel cuando se compararon muestras reducidas y no reducidas mediante SDS-PAGE (Procedimiento 2). Esto es consistente con la formación de puentes disulfuro intramoleculares. Algunas proteínas formaron complejos de alto peso molecular detectados por SDS-PAGE no reducida. Esto es probablemente debido a la formación de puentes disulfuro intermoleculares entre cisteínas desapareadas. Esto se confirmó mediante la reducción de los complejos a proteína monomérica utilizando DTT.

Tabla 2: Clonación de cebadores

Cebadores FCR3		
Proteína	Cebador directo	Cebador inverso
ID 1 -ID2b	AACATACATCAAGGGGAC (SEQ ID NO:76)	CTTGTTGATATTGGTGTGGT (SEQ ID NO:77)
DBL1X-ID2a	CACAGCGATAGCGGCAAG (SEQ ID NO:78)	GTCCAGCTTGTGGAGTT (SEQ ID NO:79)
ID 1 -ID2a	AACATACATCAAGGGGAC (SEQ ID NO:80)	GTCCAGCTTGTGGAGTT (SEQ ID NO:81)
ID1-DBL2Xa	AACATACATCAAGGGGAC (SEQ ID NO:82)	AGCGCGTTGGTGTGGA (SEQ ID NO:83)
ID1-DBL2Xb	AACATACATCAAGGGGAC (SEQ ID NO:84)	GTACTTGTACCGGTAGGG (SEQ ID NO:85)
DBL1X-DBL2Xb	CACAGCGATAGCGGCAAG (SEQ ID NO:86)	GTACTTGTACCGGTAGGG (SEQ ID NO:87)
Cebadores 3d7		
Proteína	Cebador directo	Cebador inverso
DBL2X-DBL4e	CTGACCAACTGCTACAAG (SEQ ID NO:88)	GGTCCAGAGGGTACAGCTT (SEQ ID NO:89)
ID1-DBL3e	CTGTCCCTTCATCCTGAAC (SEQ ID NO:90)	TTCAGCGTTGTTGACTCGTA (SEQ ID NO:91)
ID1-DBL4e	CTGTCCCTTCATCCTGAAC (SEQ ID NO:92)	GTCCAGAGGGTACAGCTT (SEQ ID NO:93)
DBL1X-ID2b	CACCTGACTCTGGCACC (SEQ ID NO:94)	AGAGGACTTCATCTTGTGTTGGT (SEQ ID NO:95)
ID 1 -ID2b	CTGTCCCTTCATCCTGAAC (SEQ ID NO:96)	AGAGGACTTCATCTTGTGTTGGT (SEQ ID NO:97)
DBL1X-ID2a	CACCTGACTCTGGCACC (SEQ ID NO:98)	GTCCAGCTTAGAGGAGTT (SEQ ID NO:99)
ID 1 -ID2a	CTGTCCCTTCATCCTGAAC (SEQ ID NO:100)	GTCCAGCTTAGAGGAGTT (SEQ ID NO:101)
DBL1X-DBL2Xa	CACCTGACTCTGGCACC (SEQ ID NO:102)	GGCGGCGTTGGTGTGTA (SEQ ID NO:103)
ID1-DBL2Xa	CTGTCCCTTCATCCTGAAC (SEQ ID NO:104)	GGCGGCGTTGGTGTGTA (SEQ ID NO:105)
DBL1X-DBL2Xb	CACCTGACTCTGGCACC (SEQ ID NO:106)	GTACTTGTATCCGTGGGG (SEQ ID NO:107)
ID1-DBL2Xb	CTGTCCCTTCATCCTGAAC (SEQ ID NO:108)	GTACTTGTATCCGTGGGG (SEQ ID NO:109)
Mutación de sitios supuestos de unión a CSA		
PCR1		
Fragmento 1		
Proteína	Directa	Inversa
DBL1X-ID2a (Eliminación de DSM)	CACAGCGATAGCGGCAAG (SEQ ID NO:110)	GGTGTGGAAGTTGATGTCCGGGCAGATTGCCAGGTA (SEQ ID NO: 111)
Alanina sub. K (626.629.630), R (631)	CACAGCGATAGCGGCAAG (SEQ ID NO:112)	AGCTGCGGCCAGATTAGCGCCCTCGTGGAAAGACAC (SEQ ID NO: 113)
Alanina sub. K (459.460.461.464)	CACAGCGATAGCGGCAAG (SEQ ID NO:114)	AGCGCATTCAGCTGCGGCGCTTGGCTTTGATGGAGCT (SEQ ID NO: 115)

(continuación)

Mutación de sitios supuestos de unión a CSA			
PCR1			
Fragmento 2			
Proteína	Directa	Inversa	
DBL1X-ID2a (Eliminación de DSM) Alanina sub. K (626.629.630), R (631) Alanina sub. K (459.460.461.464)	CACAGCGATAGCGGCAAG (SEQ ID NO:116) GCTAATCTGGCCGCGAGCTTACCCCCAGAAATAAGAAC (SEQ ID NO: 118) GCCGCAGCTGAATGCGCTGACGTGAAGCTGGGCGTG (SEQ ID NO: 120)	GTCCAGCTTGCTGGAGTT (SEQ ID NO:117) GTCCAGCTTGCTGGAGTT (SEQ ID NO:119) GTCCAGCTTGCTGGAGTT (SEQ ID NO:121)	
PCR2			
Construcción final			
Proteína	Directa	Inversa	
DBL1X-ID2a (Eliminación de DSM) Alanina sub. K (626.629.630), R (631) Alanina sub. K (459.460.461.464)	CACAGCGATAGCGGCAAG (SEQ ID NO: 122) CACAGCGATAGCGGCAAG (SEQ ID NO: 124) CACAGCGATAGCGGCAAG (SEQ ID NO: 126)	GTCCAGCTTGCTGGAGTT (SEQ ID NO:123) GTCCAGCTTGCTGGAGTT (SEQ ID NO:125) GTCCAGCTTGCTGGAGTT (SEQ ID NO:127)	

Ejemplo 2 VAR2CSA de FCR3 y 3D7 se une a CSA con afinidad y especificidad similares

Los eritrocitos infectados con FCR3 (IE) se adhieren mucho más fuerte a CSA *in vitro* en comparación con 3D7 o NF54 (IE). Si las diferencias están relacionadas con las diferencias de secuencia del VAR2CSA expresado, la información podría utilizarse para definir los restos implicados en el procedimiento de adhesión. Para probar esto, se produjo una serie de fragmentos 3D7 VAR2CSA superpuestos, idénticos a los que se probaron previamente para FCR3.

Las proteínas se rastrearon primero para la unión específica de CSPG en un ensayo de unión en fase sólida (ELISA) (descrito en el Procedimiento 3). Las proteínas que se unen específicamente a CSPG se purificaron adicionalmente por cromatografía de exclusión por tamaño, para obtener proteína monomérica pura, y se sometieron a análisis cinético en una microbalanza de cristal de cuarzo (Attana A100) (procedimiento 2 y 4, respectivamente). Los fragmentos VAR2CSA 3D7 mostraron características de unión muy similares a sus homólogos FCR3 en el ensayo de unión en estado sólido. Lo mismo es cierto en el análisis cinético (Tabla 3). Los sensogramas muestran datos de asociación y disociación recopilados a diferentes concentraciones de proteínas. Esto permite la determinación de la constante de velocidad de asociación (k_{on}), constante de velocidad de disociación (k_{off}) y la constante de equilibrio (K_D). Junto con los niveles máximos de respuesta, estos parámetros dan una estimación de la afinidad de unión de CSPG. No hay diferencia aparente entre los fragmentos 3D7 y FCR3. Algunos fragmentos muestran una menor afinidad, pero esta característica se mantiene en los homólogos de los fragmentos. Esto indica que las proteínas VAR2CSA 3D7 y FCR3 se pliegan y funcionan de la misma manera.

Tabla 3: Afinidad de unión a CSA de proteínas VAR2CSA producidas. La afinidad se da como un valor de K_D (nM) determinada en experimentos de cinética utilizando un biosensor de microbalanza de cristal de cuarzo (Attana A100). N/A: proteínas para las cuales no se pudo determinar el valor de K_D , debido a la falta de unión a CSA.

Fragmento VAR2CSA	FCR3		3D7
	Baculo	E. coli	Baculo
FV2	5,2*		8,2
ID1-DBL4ε	8,6*		9,4
ID1-DBL3ε	0,3*		8,5
DBL2X-DBL4ε	2,4*		1,2
DBL1-ID2b	1,5*		
DBL1-ID2a	8,0	3,5	29,5
ID1-ID2a	7,6	18,3	5,7
DBL1X-DBL2Xb		14,6	
DBL1X-DBL2Xa	N/A		
ID1-DBL2Xb			21,8
ID1-DBL2Xa			N/A

* Proteínas publicadas en (Dahlbäck y col., JBC, 2011)

Ejemplo 3- El sitio de unión núcleo-CSA se encuentra dentro del dominio DBL2X

Se ha sugerido que la región mínima de unión a CSA en VAR2CSA se encuentra dentro de DBL2X-ID2b, con la necesidad de dominios flanqueantes para la unión de afinidad completa (Dahlbäck M, Jorgensen LM, Nielsen MA, Clausen TM, Ditlev SB, y col. J Biol Chem 286: 15908-15917). Aquí se han analizado fragmentos más cortos de VAR2CSA para mapear adicionalmente las regiones requeridas para la unión de CSA.

Las proteínas truncadas se cribaron primero para unirse a un proteoglicano CSA (CSPG) en ELISA y luego se purificaron adicionalmente para obtener monómeros para su examen en la microbalanza de cristal de cuarzo (Procedimientos 3, 2 y 4, respectivamente). La región de unión mínima es ID1-DBL2Xb (Tabla 3). Esta región mostró una afinidad de unión de 21.8 nM, que es comparable a la de VAR2CSA de longitud completa.

Los IE placentarios son altamente selectivos para CSPG placentaria poco sulfatados. No se adhieren a ningún otro glucosaminoglicano (GAG), tal como heparán sulfato (HS). Lo mismo es cierto para la proteína VAR2CSA recombinante de longitud completa. El ensayo de unión en estado sólido mostró que los fragmentos VAR2CSA, que contienen la región de unión mínima a CSA, se unían específicamente a CSA. Para confirmar esto, se analizaron adicionalmente los fragmentos de unión mínima para la unión a un proteoglicano de heparán sulfato (HSPG) en la microbalanza de cristal de cuarzo (Procedimiento 4). Ninguno de los fragmentos se unió a HSPG.

Ejemplo 4 - Anticuerpos inducidos contra nuevas regiones de unión mínima inducen una potente respuesta inmune antiadherente del parásito

Una vacuna basada en VAR2CSA contra PM debe ser capaz de inducir una fuerte respuesta inmune protectora. En esto, el aspecto más importante es la formación de anticuerpos anti-IgG de VAR2CSA capaces de inhibir el

secuestro placentario. Se ha examinado el mecanismo molecular subyacente a la interacción VAR2CSA-CSA con el fin de diseñar antígenos de vacuna óptimos. Para probar si los fragmentos recombinantes VAR2CSA producidos mostraron la capacidad de inducir una adhesión que bloquea la respuesta inmune, se utilizaron en inmunizaciones de ratas (Procedimiento 6).

Se analizó el suero específico del fragmento VAR2CSA para determinar la capacidad para inhibir la adhesión de IE a CSPG (Procedimiento 11). Los anticuerpos producidos contra todos los fragmentos de unión a CSA eran inhibidores muy potentes de la unión. De hecho, la unión se inhibió casi en un 100% en todos los casos. DBL1X-DBL2Xa e ID1-DBL2Xa no fueron buenos inhibidores, lo que concuerda con la falta de unión de estos fragmentos a CSA (Tabla 3). Los datos implican que las proteínas de unión a CSA se pliegan adecuadamente y apoyan la localización de la región de unión mínima definida anteriormente.

Ejemplo 5 - Los epítomos responsables de la inducción de anticuerpos antiadherentes se encuentran dentro de la región de unión mínima

Para examinar si la respuesta inhibitoria anti-FV2 se dirige hacia la región de unión mínima, se afinan anticuerpos FV2 purificados en cuatro de los fragmentos de VAR2CSA descritos anteriormente (Procedimiento 7). A continuación, se analizaron los anticuerpos específicos de los fragmentos para determinar la capacidad de inhibir VAR2CSA que expresa la unión del parásito a CSPG (Procedimiento 11). Los anticuerpos purificados sobre DBL1X-ID2a, ID1-ID2a e ID1-DBL4ε inmovilizado, inhibieron completamente la adhesión del parásito. Además, las muestras agotadas de FV2 perdieron una parte significativa de su capacidad inhibitoria. Esto indica que los epítomos que inducen anticuerpos antiadhesivos están presentes dentro de estos fragmentos. Los anticuerpos purificados en DBL1X-DBL2Xa muestran una capacidad inhibitoria reducida, consistente con la falta de unión de estos fragmentos a CSA (Tabla 3). Los datos sugieren que los epítomos responsables de la inducción de anticuerpos inhibidores están ubicados dentro de la región de unión mínima (aquí ilustrada por ID1-ID2a).

Ejemplo 6 - La mutación de sitios de unión de GAG putativos en la región de unión mínima no tiene ningún efecto sobre la unión a CSPG

Caracterizar la naturaleza de la interacción entre VAR2CSA y CSA es importante para el diseño de vacunas de PM multivalentes. En esto, una parte importante es la identificación del sitio específico de unión a CSA y la caracterización de las interacciones químicas subyacentes. El análisis de secuencia de la región de unión mínima a CSA reveló dos sitios de unión a GAG putativos conservados. Uno está ubicado en la región ID1 y tiene el clásico motivo Cardin-Weintraub XBBBXXBX (Cardin, A. D. y Weintraub, H. J. (1989) *Arteriosclerosis* 9, 21-32) (458-NKKKECKD-465). Otro, en DBL2X, tiene el mismo motivo en inverso (625-GKNLKKRY-632). También se ha hipotetizado que un motivo de secuencia dimórfica (DSM), que se encuentra en la parte N-terminal de DBL2X, está implicado en la unión de CSA (Sander, A. F., Salanti, A., Lavstsen, T., Nielsen, M. A., Magistrado, P., Lusingu, J., Ndam, N. T. y Arnot, D. E. (2009) *PLoS One* 4, e6667). Para probar si estos sitios putativos tenían una función en la unión de CSA, se sustituyen los aminoácidos básicos en los sitios de unión de GAG clásicos con alaninas y se hizo una eliminación de diez aminoácidos (590-KLENVCEDEVK-603) en el medio de un bucle expuesto en la superficie dentro de la región DSM. Todas las mutaciones se realizaron en el fragmento DBL1X-ID2a.

La sustitución de aminoácidos básicos en los supuestos sitios de unión de GAG ID1 y DBL2X, con alaninas no tuvo ningún efecto sobre la unión de CSPG. No se observó disminución en la unión a CSPG en comparación con la proteína de tipo silvestre en ELISA (Procedimiento 3). La construcción con cuatro sustituciones de alanina, Alanina Sub. K (459,460,461,464), muestra una unión de HSPG considerable, que podría causarse por un cambio en la estructura de la proteína en respuesta a la mutación. Las dos mutaciones, Alanina Sub. K(626, 629, 630), R(631) y Alanina Sub. K(459,460,461,464), muestran la cinética de unión de CSPG similar al control positivo (Procedimiento 4). Esto es evidente por valores de K_D y respuestas máximas similares.

La eliminación de la región DSM no redujo la unión a CSPG (Procedimientos 3 y 4). El mutante knock out de DSM muestra una unión considerable a HSPG en ELISA. Es probable que esto se deba a una clonación errónea en la que se perdieron 100 aminoácidos de DBL1X. Es importante destacar que la unión a CSPG no se vio afectada.

Ejemplo 7

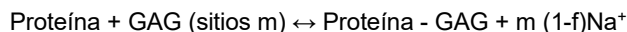
La unión de VAR2CSA a CSPG no depende de interacciones iónicas

La mutación de los motivos clásicos de unión de GAG de Cardin-Weintraub no tuvo ningún efecto sobre la unión de CSPG. Esto indica que el mecanismo de unión VAR2CSA-CSA difiere del modo general de unión a sulfato en los modelos clásicos de unión a GAG. Existen ejemplos de proteínas de unión a GAG que muestran poca dependencia de las interacciones iónicas con la estructura de GAG sulfatada. Para comprobar si este era el caso, se examinó la dependencia iónica de acuerdo con la teoría de los polielectrolitos (Record, M. T., Jr., Lohman, M. L. y De Haseth, P. (1976) *J Mol Biol* 107, 145-158).

Los glicosaminoglicanos, como el ADN, son polímeros muy cargados, a los que a menudo se hace referencia como polielectrolitos. Los grupos cargados negativamente incurren en un alto grado de energía de repulsión dentro de cada polímero. Cationes monovalentes, tales como Na^+ , interactúan con los grupos cargados negativamente para minimizar la energía de repulsión. La unión de aminoácidos básicos a los grupos sulfato desplaza los cationes

unidos y conduce a la liberación de energía libre. La liberación favorable de iones Na^+ unidos se denomina efecto polielectrolito.

La teoría establece que la unión de una proteína a un GAG puede describirse mediante:



- 5 en la que m es el número de iones Na^+ liberados tras la unión de una sola proteína y f es la fracción de aniones no protegidos por los iones Na^+ . De acuerdo con la teoría, el valor de K_D observado se relaciona con las contribuciones iónicas y no iónicas mediante:

$$\text{Log}K_{D,\text{observado}} = \text{Log}K_{D,\text{no iónico}} + m(1-f)\text{Log}[\text{Na}^+]$$

- 10 En la que $K_{D,\text{no iónico}}$ es la constante de disociación en ausencia de interacciones iónicas. Un gráfico de $\text{Log}K_{D,\text{observado}}$, vs $\text{Log}[\text{Na}^+]$ es lineal con una pendiente de $m(1-f)$. Por lo tanto, si se conoce la fracción de aniones no protegidos (f), se puede determinar el número de interacciones iónicas implicadas en la unión. Para la heparina ($1-f$) es 0,8 (Olson, S. T., Halvorson, H. R. y Bjork, I. (1991) J Biol Chem 266, 6342-6352). El valor no se conoce para CSA, pero ($1-f$) no puede exceder 1. Por lo tanto, se puede estimar el número máximo de interacciones iónicas implicadas. Además, cuando $[\text{Na}^+] = 1 \text{ M}$, $\text{Log}[\text{Na}^+] = 0$, lo que significa que a esta concentración de Na^+ , $\text{Log}K_{D,\text{observado}} = \text{Log}K_{D,\text{no iónico}}$.

- 15 Se prueba la unión de FV2, DBL1X-ID2a e ID1-ID2a a CSPG en un ensayo de unión en estado sólido a diferentes concentraciones de NaCl (150 mM, 200 mM, 250 mM, 300 mM), realizando valoraciones de unión de proteína 400 nM-1,65 nM en una serie de dilución 1:2 (Procedimiento 5). Los valores de K_D observados se determinaron como la concentración de proteína que proporciona la respuesta semimáxima (B_{max}). Esto se hizo utilizando la regresión no lineal (ajuste de mínimos cuadrados con pendiente de Hill) en Graphpad Prism. Las concentraciones más altas de sal no se incluyeron en el análisis ya que la unión se inhibió casi por completo. Esto es probablemente debido a un cambio en la estructura de la proteína. Esta noción se respalda por el hecho de que $\text{Log}K_{D,\text{observado}}$ frente a $\text{Log}[\text{Na}^+]$, era lineal solo entre 150 mM y 300 mM, lo que sugiere que otros factores juegan un papel a concentraciones más altas de NaCl.

- 25 $\text{Log}K_{D,\text{observado}}$ frente a $\text{Log}[\text{Na}^+]$ muestra una relación lineal. La pendiente $m(1-f)$ oscila entre 2,7 para ID1-ID2a y 3,4 para longitud completa (FV2). No se conoce el valor de f , pero el número máximo de interacciones iónicas implicadas en la unión debe estar entre 2 y 3. Es interesante que el valor para la proteína de longitud completa sea mayor que para los fragmentos cortos, lo que indica que esta proteína produce una interacción iónica adicional con CSPG. Los valores de K_D a NaCl 150 mM sirven como punto de referencia, ya que esta es la concentración fisiológica de NaCl. Al extrapolar la relación lineal y encontrar el intercepto y se encuentra que $K_{D,\text{no iónico}} = 5,9 \mu\text{M}$ para FV2, $K_{D,\text{no iónico}} = 3,4 \mu\text{M}$ para DBL1X-ID2a, y $K_{D,\text{no iónico}} = 0,7 \mu\text{M}$ para ID1-ID2a. Comparando los valores logarítmicos de estos y el punto de referencia (NaCl 150 mM), se estima que entre el 25-35% de la unión a VAR2CSA se puede explicar mediante interacciones iónicas. Esto sugiere que la alta afinidad de CSA por VAR2CSA no se puede explicar mediante interacciones iónicas con la estructura de GAG sulfatada sola. La alta afinidad se puede lograr a través de un sitio de unión complejo que hace una interacción multivalente con la cadena principal de carbohidratos de CSA.

Ejemplo 8

La región de unión mínima a CSA de VAR2CSA se une específicamente a una amplia gama de células cancerosas

- 40 Se han asociado muchas células cancerosas diferentes con una alta expresión del proteoglicano CSPG4. Esta molécula se describió inicialmente como un marcador para el melanoma, pero se ha encontrado recientemente en muchas formas de cáncer, que incluyen las células madre de cáncer. Se sabe que la(s) cadena(s) de CS asociada(s) a CSPG4 son principalmente CSA. Se analizó uno de los fragmentos de VAR2CSA más pequeños (ID1-ID2a) para la unión a una gama grande de varias líneas de células cancerosas mediante citometría de flujo (Procedimientos 12a y 12b). La proteína de unión no CSA ID1-DBL2Xa se utilizó como control negativo. La proteína recombinante VAR2CSA (ID1-ID2a) se une fuertemente a 75 nM a todas las líneas celulares cancerosas que transcriben CSPG4 (datos de microensayo), que incluye el melanoma cutáneo (C32, MeWo), carcinoma de pulmón (A549), carcinoma de mama (HCC1395), osteosarcoma (U2OS, MNNG/HOS), rabdomiosarcoma (RH30) (Tabla 4 y 5). Esta proteína también se une fuertemente al linfoma cutáneo de linfocitos T, que no expresa CSPG4 (Tabla 4). La proteína de control negativo ID1-DBL2Xa no se unió a ninguna de las líneas celulares probadas (Tabla 4).
- 50 Además, ID1-ID2a no interactuó con los glóbulos rojos humanos, que se utilizaron como células de control. Las células de ovario de hámster chino (CHO) de tipo silvestre y deficientes en GAG también se analizaron para la interacción ID1-ID2a. La fuerte interacción observada para ID1-ID2a con células CHO de tipo silvestre se abolió por completo cuando se analizó la línea celular CHO-745, en la que se rompe la síntesis de GAG. También se verificó la especificidad de CSA de la interacción mediante la inhibición de la unión de VAR2CSA a las células premezclando VAR2CSA con CSA, CSC o HS. CSC y HS no tuvieron ningún efecto sobre la unión, mientras que CSA anuló eficazmente la unión de VAR2CSA a las células cancerosas.

55 Siguiendo estos resultados, se cribó una gama más grande de células cancerosas mediante citometría de flujo (Tabla 6 y 7) utilizando el fragmento de VAR2CSA DBL1-ID2a o ID1-ID2a. El fin principal de este examen es

identificar las líneas celulares adecuadas para el modelado de xenoinjertos *in vivo*.

Tabla 4. Tinción de líneas celulares cancerosas y células de control negativo utilizando el dominio de unión mínimo de VAR2CSA (ID1-ID2a).

Se incubaron células con medio solo (blanco) o proteínas recombinantes (ID1-DBL2 o ID1-ID2a) a 75 nM durante 30 minutos, seguido de incubación con anti-V5-FITC (Invitrogen) a 1:800, se lavaron las células tres veces entre cada incubación. Se muestran los valores medios de fluorescencia FITC registrados a partir de un mínimo de 5000 células utilizando un citómetro de flujo FC500 (Becton Dickinson).			
Tipo celular	Blanco	ID1-DBL2Xa	ID1-ID2a
C32	5,77	6,94	63,81
MyLa 2059	5,61	5,61	145,35
MyLa 1850	5,87	5,6	137,86
Cho de tipo silvestre	3,09	4,35	34,79
Cho 745	4,24	4,29	4,38
PBMC	1,34	1,36	1,67
Eritrocitos	1,11	1,17	1,07

Tabla 5. Tinción de líneas celulares de cáncer utilizando VAR2CSA recombinante

Se incubaron células con medio solo (blanco) o proteínas recombinantes (DBL1-ID2a o ID1-ID2a) a 75 nM durante 30 minutos, seguido de incubación con anti-V5-FITC (Invitrogen) a 1:800, se lavaron las células tres veces entre cada incubación. Se muestra la puntuación media de la intensidad de fluorescencia FITC registrada a partir de un mínimo de 4 imágenes de campo de alta potencia utilizando un microscopio HAL100 Zeiss. ST: Sin Tinción; +: débil; ++: media; +++: fuerte; ++++: Muy fuerte.		
Tipo celular	Blanco	DBL1-ID2a
U2OS	ST	+++
MG63	ST	++++
MDA-MB-231	ST	+++
TC32	ST	+
TC71	ST	++
MNNG	ST	+++
CHLA9	ST	++
CHLA10	ST	++
RH30	ST	+++
RH18	ST	++
PC3	ST	+++

Tabla 6 Cribado de diversas líneas celulares de cáncer humano para la unión de VAR2CSA recombinante (utilizando DBL1-ID2a o ID1-ID2a).

Se midió la unión por citometría de flujo como se describe en el PROCEDIMIENTO 12. ST: Sin Tinción; +: débil; ++: media; +++: fuerte; ++++: Muy fuerte.				
Línea celular	Control	VAR2CSA 75 nM	VAR2CSA 150 nM	Comentarios
MeWo	ST	+++	++++	Melanoma (morfología de fibroblasto, procedente de ganglio linfático)
A549	ST	+++	+++	Adenocarcinoma de pulmón (K-RasG12S)
HCC1395	ST	+++	++++	Carcinoma ductal invasivo de mama TNM estadio 1 grado 3; ninguna metástasis ganglionar; Her2-neg, ER-neg, PR-neg (Triple negativo)
RH30	ST	+++	++++	Rabdomiosarcoma (TPp53 negativo; PAX7-FOXO1A fusión positiva; inestable altamente genómica (> 50 reordenamientos cromosómicos))
MNNG	ST	+++	+++	Osteosarcoma de niña caucásica de 13 años (TPR-Met positivo)

(continuación)

Se midió la unión por citometría de flujo como se describe en el PROCEDIMIENTO 12. ST: Sin Tinción; +: débil; ++: media; +++: fuerte; ++++: Muy fuerte.				
Línea celular	Control	VAR2CSA 75 nM	VAR2CSA 150 nM	Comentarios
U2OS	ST	+++	+++	Osteosarcoma de niña caucásica de 15 años (IGF-R1 y TPR-II positivo; TPp53 de tipo silvestre, pRb de tipo silvestre, p16-neg; altamente aneuploide)
H1792	ST	++	++	Adenocarcinoma de pulmón (K-RasG12S: TPp53het))
MDA-MD-435	ST	++	+++	Carcinoma de mama de origen melanocítico (ER-neg, Her2-pos, PR-pos)
MG63	ST	+++	++++	Osteosarcoma
TC32	ST	++	++	Sarcoma de Ewing
CHLA9	ST	++	++	Sarcoma de Ewing
CHLA10	ST	++	++	Sarcoma de Ewing
TC71	ST	++	++	Sarcoma de Ewing
HOS	ST	+++	++++	Osteosarcoma
PC3	ST	++	++	Carcinoma de próstata
SKNMC	ST	++	+++	Sarcoma de Ewing
MCF-7	ST	+	++	Carcinoma de mama

Tabla 7 Cribado de más líneas celulares de cáncer de células humanas para la unión de VAR2CSA recombinante (utilizando DBL1-ID2a o ID1-ID2a)

Se midió la unión por citometría de flujo como se describe en el PROCEDIMIENTO 12. Los valores mostrados son intensidad media de fluorescencia utilizando una concentración de proteína de 200 nM.			
Tipo celular	Control negativo	ID1-ID2a	Comentarios
GP202	21,63	111,37	Carcinoma gástrico
NCI-N87	7,18	207,72	Carcinoma gástrico
MKN45	4,22	55,4	Carcinoma gástrico
MKN28	6,9	103,84	Carcinoma gástrico
AGS	7,25	18,21	Carcinoma gástrico
KatoIII	7,33	18,76	Carcinoma gástrico
SNU-1	4,33	155,79	Carcinoma gástrico
SNU-638	8,47	8,49	Carcinoma gástrico
IPA220	7,72	13,67	Carcinoma gástrico
MDA-231	3,39	63,43	Mama triple negativo
T47D	3,63	48,13	Mama luminal
LNCap	6,58	24,86	Próstata
PC3	5,2	29,82	Próstata
Ovc316	1,89	7,24	Células madre de cáncer de ovario
Tipo celular	Blanco	DBL1-ID2a	
NALM-6	6,19	8,22	Leucemia linfática aguda (LLA)
697	3,23	30,36	LLA
AMO-1	2,68	35,22	Mielomatosis
KMM-1	2,82	16,1	Mielomatosis
MOLP-8	2,44	19,24	Mielomatosis
KMS-12-PE	3,02	7,14	Mielomatosis
KMS-12-BM	2,2	3,25	Mielomatosis
U2932	4,24	16,83	Linfoma difuso de linfocitos B grandes (DLBCL)
SU-DHL8	ND	3,75	DLBCL

(continuación)

Se midió la unión por citometría de flujo como se describe en el PROCEDIMIENTO 12. Los valores mostrados son intensidad media de fluorescencia utilizando una concentración de proteína de 200 nM.			
Tipo celular	Control negativo	ID1-ID2a	Comentarios
SU-DHL5	2,19	10,28	DLBCL
Oci_Ly19	3,38	18,96	DLBCL
HBL1	6,53	39,53	DLBCL
Farage	2,8	3,28	DLBCL
RIVA	2,26	3,32	DLBCL
WSU-FSCCL	4,89	22,32	Linfoma de células escindidas pequeñas y foliculares de bajo grado
U-698-M	2,24	2,85	Linfoma linfoblástico del (6) (q15q22)

Ejemplo 9***El VAR2CSA recombinante se une a las células cancerosas con alta afinidad***

Se analizó la afinidad de unión del fragmento VAR2CSA recombinante DBL1-ID2a a las líneas celulares cancerosas, el melanoma C32 y dos líneas celulares Cho (descritas en el ejemplo 8) utilizando un biosensor de microbalanza de cristal de cuarzo (Attana Cell200). Se analizó una serie de dilución doble (25-400 nM) de la proteína para determinar su unión a la superficie celular, con la regeneración de la superficie de unión entre cada nueva inyección de proteína. Se estimó que la afinidad de unión estaba en el rango nano-molar (Tabla 8), que es similar a la afinidad de unión al receptor puro (Tabla 3).

Tabla 8. Afinidad de unión estimada (K_D) de DBL1-ID2a recombinante (E. coli) a células cancerosas que expresan CSA (C32 y Cho de tipo silvestre) y falta de unión a una línea celular negativa a CSA (Cho 745)

N/A: K_D no pudo determinarse debido a la falta de unión a las células	
Tipo celular	K_D (nM)
Células de melanoma C32	13
Cho de tipo silvestre	1,4
Cho 745	N/A

Ejemplo 10***La proteína VAR2CSA recombinante se une a tejido canceroso con alta afinidad***

Se investiga la unión de VAR2CSA recombinante a tejido de cáncer primario obtenido de pacientes humanos utilizando inmunohistoquímica (IHC, del inglés "immunohistochemistry"). El procedimiento se desarrolló utilizando tejido de placenta humana como control positivo y tejido de amígdalas y hepático como control negativo. Se optimizó el protocolo de tinción en la plataforma Ventana Discovery XT sin recuperación de epítomos. Se incubó tejido embebido en parafina manchado en portaobjetos de vidrio con V5-VAR2CSA 0,1-500 nM (ID1-ID2a) o proteína de control V5 (DBL4) durante 1 hora a temperatura ambiente, se lavó durante 8 minutos, se incubó con anticuerpo anti-V5 de ratón 1:700 durante 30 minutos, se lavó durante 8 minutos. Se detectó posteriormente el anti-V5 unido utilizando HRP anti-ratón UltraMap. V5-VAR2CSA tiñe la placenta humana en concentraciones de 0,5 nM sin tinción en amígdala o hígado normal. La tinción se puede bloquear completamente mediante la adición de 200 µg/µl de CSA al tampón de reacción. La proteína de control V5 no tiñe el tejido de placenta humana a ninguna concentración probada. Una micromatriz de tejido (TMA, del inglés "tissue micro-array") multiorgánico que representa 24 órganos normales mostró una tinción baja o ausente cuando se tiñó con V5-VAR2CSA 1 nM, mientras que las muestras de cáncer de mama, colon, recto, próstata, riñón, hígado, vejiga, páncreas, células escamosas, pulmón, vesícula, estómago, testículos, ovario, útero, glándula suprarrenal, tiroides y timo, sistema hematopoyético y tejido conectivo (sarcomas) se tiñeron positivamente con intensidades iguales o superiores a las del tejido de control positivo de placenta humana (Tabla 9).

Tabla 9. Detección de CSA en muestras de tumores humanos primarios utilizando VAR2CSA recombinante. La tabla muestra el número de casos positivos/totales de casos teñidos como se describe en el Ejemplo 10 para grupos principales de cáncer. La tinción positiva se define como la intensidad igual o superior a la observada en el tejido de placenta.

Grupo de cáncer	Proporción positiva
Carcinoma de vejiga	44/56
Carcinoma de próstata	71/76
Carcinoma de mama	64/75
Melanoma	5/6
Sarcoma	23/25
Carcinoma de células escamosas de esófago	2/3
Adenocarcinoma de estómago	3/3
Carcinoma de colon	2/3
Adenocarcinoma rectal	3/3
Carcinoma de hígado	3/3
Carcinoma renal	3/3
Carcinoma de pulmón	2/3
Carcinoma de cuello de útero	3/3
Carcinoma de ovario	2/3
Linfoma de linfocitos B difuso	1/3
Astrocitoma	3/3
Carcinoma de páncreas	3/3

5 Ejemplo 11

Inhibición de los parámetros de transformación in vitro mediante proteínas VAR2CSA recombinantes

Se investiga *in vitro* el efecto inhibitor del VAR2CSA no acoplado sobre la morfología de células tumorales mediante tres ensayos diferentes:

- i) El **ensayo de formación de colonias en agar blando** aborda si VAR2CSA puede inhibir la capacidad de células cancerosas para proliferar en una matriz tridimensional.
- ii) El **ensayo de migración** aborda si VAR2CSA puede inhibir la capacidad de células cancerosas para migrar verticalmente hacia un quimioatrayente en una cámara boyden.
- iii) El **ensayo de invasión** aborda si VAR2CSA puede inhibir la capacidad de células cancerosas para invadir a través de una membrana basal artificial.

Ensayo de formación de colonias en agar blando: Se tratan células con VAR2CSA 25-100 nM durante 24 horas antes de sembrarse en matriz de agar blando y se dejan durante 10-12 días a 37 ° C. Se capturan imágenes por un microscopio de contraste de fases y se cuantifican por el software ImageJ. El VAR2CSA recombinante inhibe la formación de colonias en agar blando del osteosarcoma MG63 y las células del rhabdomyosarcoma RH30 en concentraciones entre 75 y 150 nM.

Ensayo de invasión de células recubiertas con el extracto de membrana basal (EMB): Para modelar el procedimiento invasivo, se utiliza la plataforma de invasión de células recubiertas con EMB CultreCoat® 24 Well (Cedarlane) de acuerdo con los protocolos del fabricante, con las siguientes modificaciones. Las células son privadas de suero un día antes de los ensayos en presencia o ausencia de VAR2CSA 25-100 nM. Al día siguiente, las células mantenidas en las condiciones anteriores se colocan en placas en las cámaras superiores (1x10⁵ células/pocillo) de placas, mientras que las cámaras inferiores contienen medios empobrecidos en suero como control negativo o medios suplementados con FBS al 10 %. Luego se incuban las células durante otras 18 horas. Se recogen las células que invaden a través del EMB utilizando un tampón de disociación que contiene Calceína AM, que se convierte en un compuesto altamente fluorescente en las células vivas. Se mide la fluorescencia emitida utilizando un lector de placa fluorescente, se analiza mediante el software FLUOStar, se ajusta a una curva estándar y se convierte en el número correspondiente de células.

Ensayo de migración. El ensayo de migración es esencialmente el mismo procedimiento que el ensayo de invasión celular recubierto con el Extracto de Membrana basal (BME, del inglés "Basement Membrane Extract"), pero sin BME.

Se inhibe la capacidad de migración e invasión del osteosarcoma MG63, el rhabdomyosarcoma RH30 y el cáncer de mama triple negativo MDA-MB-231 por VAR2CSA recombinante 75-150 nM.

Ejemplo 12**Análisis de eventos de señalización intracelular que controlan los parámetros de transformación de células cancerosas reguladas por proteoglicanos que contienen CSA.**

CSPG4 facilita la proliferación, la migración y la invasión a través de un mecanismo dependiente de la quinasa Ras, Rac1 y PI3. A base de los resultados obtenidos en el EJEMPLO 10, se investigan los eventos de señalización intracelular que conducen a una posible inhibición de la proliferación, migración e invasión mediada por VAR2CSA. Esto se hace con procedimientos de biología molecular y bioquímica de última generación que incluyen, pero sin limitación, los ensayos de activación de Rac1, la inmunotransferencia de los componentes de la ruta y las mediciones en células de la generación de especies de oxígeno reactivo (ROS). Esta línea de experimentos aclarará las rutas de señalización afectadas por la unión de VAR2CSA a los proteoglicanos que contienen CSA.

Ensayos de activación de Rac1: Se realizan ensayos de actividad Rac1 en líneas celulares de cáncer humanas apropiadas que no se tratan o se tratan con VAR2CSA recombinante, de acuerdo con los protocolos del fabricante (Thermo Scientific).

Ensayos de especies de oxígeno reactivo (ROS): Se miden niveles de ROS brutos con CM-H2DCFDA (Invitrogen) de acuerdo con las directrices del fabricante. Se medirán los niveles de superóxido utilizando dihidroetidinio (DHE). En presencia del anión superóxido O_2^- , dihidroetidinio se oxida rápidamente a oxietidio, que se une al ADN y emite luz en los rangos de 570-580 nm cuando se excita a 488 nm. Para el cultivo celular, después de los tratamientos apropiados, se lavan las células en solución salina equilibrada de Hank (HBSS, del inglés "Hank's Balanced Salt Solution"), se incuban durante 30-60 minutos en HBSS que contiene DHE 10 μ M, se lavan en HBSS y se analizan directamente para fluorescencia de oxietidio con un microscopio HAP100 de epi-fluorescencia (Zeiss). Para secciones tumorales, se cortan tumores congelados rápidamente en secciones de 20 μ m utilizando un criostato, se lavan y se tratan con DHE como se describe para las líneas celulares, se montan en portaobjetos y se analizan como para líneas celulares. Se analiza la emisión de oxietidinio y se cuantifica utilizando el software ImageJ. Para todas las muestras tumorales, se realiza la tinción con hematoxilina y eosina (H&E) una al lado de la otra para verificar la integridad y la patología del tejido, utilizando procedimientos estándar. Los datos preliminares indican que el VAR2CSA recombinante inhibe la generación de ROS en las células MG63 y U2OS.

Inmunodetección. Para la inmunotransferencia, se detectan proteínas separadas por SDS-PAGE y transferidas a una membrana de nitrocelulosa con los anticuerpos primarios relevantes y secundarios apropiados, los reactivos de transferencia Western ECL (Thermo Scientific) y la película (Kodak y Covance (HA)). Para microscopía, se fijan células en formaldehído al 4%, se incuban con anticuerpos primarios apropiados, se incuban con anticuerpos secundarios conjugados con FITC apropiados y se analizan mediante microscopía como se describe en el EJEMPLO 9. Las líneas celulares de cáncer humano (MDA-MB-231, MG63, U2OS, TC32, TC71 y RH30) se privaron de suero durante 24 h con VAR2CSA recombinante (ID1-ID2a) o proteína de control (DBL4), y los lisados se prepararon a 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 12 h después de la adición del suero a las células. Utilizando este enfoque, VAR2CSA 100 nM inhibió eficazmente la fosforilación del protooncogén de la tirosina proteína quinasa Src en T416, la fosforilación de la quinasa de adhesión focal (FAK, del inglés "Focal Adhesion Kinase") en T397, la fosforilación de la quinasa 1 y 2 regulada por señal extracelular (ERK, del inglés "Extracellular-Signal-regulated Kinase") en Thr202/Tyr204 para la ERK1 humana y Thr185/Tyr187 para la ERK2 humana. Esto sugiere que la VAR2CSA recombinante inhibe la señalización de ERK canónica en células cancerosas.

Ejemplo 13**Análisis imparcial de eventos de señalización intracelular modificados por VAR2CSA recombinante.**

El amplio impacto de VAR2CSA en los eventos de señalización intracelular se puede analizar utilizando la tecnología de microensayo de expresión. Se privaron de suero células de osteosarcoma MG63 durante 24 h sin tratamiento, VAR2CSA o Control (DBL4) y se recogió el ARN después de 1 h de adición de suero. Se sometió el ARN total a pruebas de calidad (RIN <8), se utilizó como plantilla para la construcción de la sonda Affymetrix® y se hibridó con el sistema de chips Affymetrix U133Aplus2.0®. Esta lectura proporciona una instantánea de las rutas de señalización activadas o inactivadas después de que se haya agregado nuevamente 1 h de suero. Los datos preliminares confirmaron un efecto inhibitorio sobre la señalización de ERK.

EJEMPLO 14**Inhibición del crecimiento de células cancerosas in vivo mediante proteínas VAR2CSA recombinantes**

Basándose en los resultados del análisis *in vitro*, se seleccionarán líneas celulares apropiadas para modelos de xenoinjertos subcutáneos y metastásicos *in vivo* en ratones inmunocomprometidos. El estudio *in vivo* aborda cinco preguntas principales:

- i) ¿pueden administrarse *i.v.* o *i.p.* trazas de VAR2CSA recombinante y unirse a células de cáncer humano *in vivo*?
- ii) ¿puede la administración *i.v.* o *i.p.* de VAR2CSA recombinante inhibir la formación de tumores *in vivo*?
- iii) ¿puede la administración *i.v.* o *i.p.* de VAR2CSA recombinante inhibir el crecimiento de tumores estabilizados *in vivo*?
- iv) ¿puede la administración *i.v.* o *i.p.* de VAR2CSA recombinante inhibir propagación metastásica de células de cáncer humano *in vivo*?
- v) ¿puede la administración *i.v.* o *i.p.* de VAR2CSA recombinante cambiar los eventos de señalización gobernados por proteoglicanos que contienen CSA en células de cáncer humano *in vivo* (patología y bioquímica post mortem)?

Modelos *in vivo*: Las líneas celulares de cáncer humano seleccionadas que representan tipos de cáncer que muestran una fuerte unión a VAR2CSA se inoculan por vía subcutánea en ratones inmunocomprometidos Rag2m o SCID a aproximadamente 5×10^6 células/animal. Cuando se establece el tumor, los ratones reciben la primera inyección de vehículo (solución salina) y VAR2CSA recombinante (1 mg/kg). Se repite el tratamiento una vez a la semana durante un período experimental de aproximadamente 30 días. Se miden pesos de los animales y volúmenes tumorales cada segundo o tercer día y, al finalizar, se extraen los tumores y se dividen en dos mitades, con una mitad congelada rápidamente en nitrógeno líquido y la otra mitad en parafina. Se procesan los tumores congelados rápidamente para la detección de superóxido (DHE) como se describe en el EJEMPLO 11 (junto con la tinción correspondiente con hematoxilina y eosina [H&E] de las mismas muestras tumorales).

Ejemplo 15

Seguimiento de micro-metástasis *in vivo* mediante péptidos VAR2CSA recombinantes acoplados a marcador.

Se combinará VAR2CSA recombinante con diferentes moléculas marcadoras aplicables en colaboración con colaboradores externos o se subcontratará mediante un acuerdo basado en un contrato. Las moléculas VAR2CSA recombinantes marcables se analizan en cuanto a su capacidad para rastrear e informar micrometástasis en modelos de xenoinjerto y ratón transgénico. Los modelos *in vivo* se establecen como se describe en el EJEMPLO 12. Para la prueba *in vivo* de VAR2CSA acoplado a marcador, se analizan ratones con cáncer metastásico mediante imágenes *in vivo* para determinar la capacidad de VAR2CSA para rastrear y unirse a micro-metástasis.

Ejemplo 16

Internalización de proteínas VAR2CSA recombinantes

El VAR2CSA recombinante es internalizado por las células cancerosas. Esto se demostró mediante la conjugación primero del fragmento VAR2CSA (DBL1-ID2a) con un fluoróforo y luego el análisis de la captación de VAR2CSA tanto por imágenes *in vivo* como en células fijas. Se sembraron líneas celulares de cáncer (melanoma C32 y MDA-MB-231) y se cultivaron durante la noche hasta una confluencia del 60-80%. Se incubaron las células con VAR2CSA conjugado con fluoróforo durante 10-15 minutos a 4 °C para permitir la unión superficial de VAR2CSA. Luego, se lavaron las células para eliminar VAR2CSA sin unir, y posteriormente se incubaron a 37 °C para iniciar la internalización durante 10 minutos, 1 h, 2 h, 4 h y hasta 22 h. Se utilizó transferrina conjugada con fluoróforo para seguir la absorción clásica dependiente de clatrina de la transferrina que termina en los lisosomas. Además, para algunos experimentos se utilizó dextrano conjugado con fluoróforo para detectar lisosomas. El análisis de imágenes *in vivo* mostró que VAR2CSA comienza a alcanzar los lisosomas después de alrededor de 4 h, y después de 22 h, todos los VAR2CSA se pueden localizar en los compartimentos lisosomales. Sin embargo, la colocalización de VAR2CSA y transferrina fue escasa, y VAR2CSA se absorbió mucho más lentamente que la transferrina. El hecho de que VAR2CSA recombinante sea absorbido por las células cancerosas, permite fusionar o conjugar VAR2CSA con compuestos citotóxicos que se activan dentro de la célula cancerosa. La Tabla 10 resume el resultado de las líneas celulares de cáncer indicadas analizadas para la internalización de VAR2CSA recombinante.

Tabla 10. Se incubaron células con medio solo (blanco) o proteínas recombinantes (DBL1-ID2a o ID1-ID2a) a 75 nM durante 1 hora, seguido de incubación con anti-V5-FITC (Invitrogen) a 1:800, se lavaron las células tres veces entre cada incubación. Se muestra la puntuación media de la intensidad de fluorescencia FITC en la membrana plasmática o las estructuras intracelulares registrada a partir de un mínimo de 4 imágenes de campo de alta potencia utilizando un microscopio HAL100 Zeiss.

El sistema de puntuación es: +: débil; ++: media; +++: fuerte; ++++: Muy fuerte.		
Línea celular	Localización de la membrana plasmática (después de 1 h)	Localización intracelular (después de 1 h)
U2OS	+	++++
RH30	+	+++
MG63	+	++++

(continuación)

El sistema de puntuación es: +: débil; ++: media; +++: fuerte; ++++: Muy fuerte.		
Línea celular	Localización de la membrana plasmática (después de 1 h)	Localización intracelular (después de 1 h)
MeWo	+	++++
HOS	+	+++
MDA-MB-231	+	++++
SKNMC	++++	(+)
RH18	+	+++
TC71	+	++
TC3	+	++

Ejemplo 17**La proteína VAR2CSA-toxina fusionada mata las células cancerosas**

5 Los fragmentos del gen VAR2CSA DBL1-ID2a e ID1-ID2a se han fusionado con la exotoxina A de *Pseudomonas* y la toxina diftérica como diversas construcciones (SEQ ID NO: 60-70, 72). Estas proteínas VAR2CSA-toxina fusionadas se expresan en *E. coli*. La construcción de proteína llamada BPTI-ID1-ID2a-FCR3-PE38LR (SEC ID NO: 60), que se basa en ID1-ID2a de VAR2CSA y PE38, se ha producido y analizado con éxito para la unión a células cancerosas (Tabla 11) así como actividad citotóxica como se describe en el Procedimiento 13.

10 Los datos preliminares muestran que esta proteína VAR2CSA-toxina fusionada se une a las células cancerígenas que expresan CSA y es capaz de inducir la muerte celular (CI50 para la línea celular U2OS está por debajo de 1 nM).

Tabla 11. Unión de VAR2CSA-PE38 a células cancerosas analizadas por citometría de flujo

La unión de DBL1-ID2a (proteína desnuda) e ID1-ID2a-PE38 a 200 nM a células Myla2059 (linfoma de linfocitos T) se detectó con anticuerpo HIS anti-PENTA y anticuerpo anti-FITC de ratón y se analizó mediante citometría de flujo. La unión se da como intensidad media de fluorescencia (MFI, del inglés "mean fluorescence intensity"). a) se trataron células con condroitinasa ABC para eliminar las cadenas CS de la superficie celular, b) se mezcló proteína con CSA soluble (400 ug/m) antes de la adición a las células, c) el control es igual a las células teñidas con la primera y segunda capa de anticuerpos solamente.			
	DBL1-ID2a	ID1-ID2a-PE38	Control ^c
Unión a células	24,7	12,4	2,3
Unión a células ^a tratadas	4,4	2,5	2,5
Inhibición de unión ^b	3,2	2,1	-

Ejemplo 18**Análisis del efecto antitumoral de compuestos citotóxicos unidos a VAR2CSA recombinante**

15 Basándose en los resultados en el EJEMPLO 14, se buscará VAR2CSA recombinante unido a compuestos citotóxicos relevantes y probado *in vivo* para el rendimiento. El acoplamiento de compuestos relevantes a VAR2CSA se realizará en colaboración con colaboradores externos o se subcontratará mediante un acuerdo. En particular, se analiza si estas fusiones de VAR2CSA- compuestos pueden:

- i) administrarse específicamente en el entorno tumoral *in vivo*.
- ii) concentrarse por arriba y retenerse específicamente en el entorno tumoral *in vivo*.
- 20 iii) matar específicamente células tumorales con daño mínimo a tejidos normales *in vivo*.

Los modelos *in vivo* se establecen como se describe en el EJEMPLO 12. Se tratan los ratones con conjugados de VAR2CSA citotóxicos, y se ensaya el efecto como se describe para la proteína no conjugada en el EJEMPLO 12.

Ejemplo 19**Purificación de células madre que expresan CSA a partir de poblaciones de células heterogéneas.**

25 Se ha informado que las células madre pluripotentes expresan altos niveles de CSPG4. Las células madre también expresan otros proteoglicanos que contienen CSA, tales como CD44, que pueden unirse a VAR2CSA. Por consiguiente, VAR2CSA recombinante se conjugará con una resina apropiada (perlas), se mezclará con una población celular heterogénea que contiene células madre o células madre cancerígenas y se buscará purificada mediante protocolos de centrifugación convencionales. Se analizarán células purificadas para la expresión de

diversos marcadores de células madre, que incluyen CD44, CD31, CD4, OCT4, SOX2, Nestin y Nanog, mediante inmunotransferencia (como en el EJEMPLO 11), microscopía y FACS (como en el EJEMPLO 9). Un rasgo común de las células madre del cáncer es la alta expresión de aldehído deshidrogenasa 1A (ALDH1 alta). Esto se puede medir de forma conveniente utilizando el kit AldeFluor® (Stem Cell Technologies). La unión de VAR2CSA recombinante a MDA-MB-231 detecta una subpoblación de células ALDH1 alta, lo que sugiere que VAR2CSA puede unirse a células madre de cáncer humano.

Ejemplo 20

Identificación y direccionamiento de células madre de cáncer que expresan CD44.

CD44 es actualmente el marcador más popular para las células madre del cáncer y es un proteoglicano que contiene CSA que puede unirse a VAR2CSA recombinante. Utilizando los mismos enfoques que en el EJEMPLO 12-15, se investigará si los péptidos VAR2CSA recombinantes no modificados y modificados pueden localizar, unir, purificar y, potencialmente, matar las células madre de cáncer positivas para CD44 altamente resistentes.

Ejemplo 21

Detección de células tumorales circulantes

Se examinará si VAR2CSA recombinante puede utilizarse como un marcador pronóstico para las recurrencias del cáncer. Se diseminan células cancerosas a través del sistema sanguíneo después del desprendimiento del tumor primario. Un riesgo posterior de la aparición de células tumorales circulantes (CTC) es la extravasación y la metástasis. Los ensayos actuales utilizados para detectar CTC tienen poca sensibilidad y no se pueden correlacionar directamente con el riesgo de metástasis. Utilizando perlas magnéticas unidas a VAR2CSA y citometría de flujo, se investiga el valor pronóstico de detectar CS que expresan células cancerosas en el flujo sanguíneo. Este procedimiento podría utilizarse como un examen rápido e indoloro de pacientes.

Ejemplo 22

Identificación de moléculas CSPG potenciales que se localizaron por VAR2CSA

Se rastreó la proteína VAR2CSA recombinante (DBL1-ID2a) con una etiqueta V5 para unirse a una gama de células HEK293 transfectadas que expresan >3000 receptores de membrana humana. Se ha identificado un conjunto de 25 receptores como posibles objetivos de VAR2CSA (Tabla 12). La interacción entre VAR2CSA y estos receptores se verificará adicionalmente mediante el análisis de la especificidad de unión a través de la inhibición con CSA y HS, tanto en el sistema HEK293 como en ELISA.

Tabla 12. Receptores que se identificaron experimentalmente como posibles objetivos de VAR2CSA.

Gen ID	Nombre	UniProt/SwissProt
BCAN	Brevican	PGCB HUMAN, Q96GW7
BDKRB2	Receptor de bradiquinina B2	BKRB2 HUMAN, P30411
CA9	Anhidrasa carbónica IX	CAH9 HUMAN, Q16790
CCR10	receptor 10 de quimiocina (motivo C-C)	CCR10 HUMAN, P46092
CD44	Molécula CD44 (grupo sanguíneo indio)	CD44 HUMAN, P16070
CDH8	Cadherin 8, tipo 2	CADH8 HUMAN, P55286
CFB	Factor de complemento B	CFAB HUMAN, P00751
GABBR2	receptor del ácido gamma-aminobutírico (GABA) B, 2	GABR2 HUMAN, Q75899
GPC3	Glypican 3	GPC3 HUMAN, P51654
GPC5	Glypican 5	GPC5 HUMAN, P78333
GPR65	Receptor unido a proteína G 65	PSYR HUMAN, Q8IYL9

(continuación)

Gen ID	Nombre	UniProt/SwissProt
GPRC5B	Receptor unido a proteína G, familia C, grupo 5, miembro B	GPC5B HUMAN, Q9NZH0
KCNA2	canal de tensión de potasio, subfamilia relacionada con el agitador, miembro 2	KCNA2 HUMAN, P16389
PKD2	enfermedad renal poliquística 2 (autosómica dominante)	PKD2 HUMAN, Q13563
PODXL2	2 similar a podocalixina	PDXL2 HUMAN, Q9NZ53
PTPRG	proteína tirosina fosfatasa, tipo de receptor, G	PTPRG HUMAN, P23470
S100A9	Proteína A9 de unión a calcio S100	S10A9 HUMAN, P06702
SDC1	Syndecan 1	SDC1 HUMAN, P18827
SDC4	Syndecan 4	SDC4 HUMAN, P31431
STX2	Sintaxina 2	STX2 HUMAN, P32856
STXBP5	proteína de unión a syntaxina 5 (tomosina)	STXB5 HUMAN, Q5T5C0
TGFB3	factor de crecimiento transformante, receptor beta III	TGBR3 HUMAN, Q03167
TMEFF1	proteína transmembrana con dos dominios 1 similares a EGF y similares a folistatin	TEFF1 HUMAN, Q8IYR6
TMEFF2/TENB2	proteína transmembrana con dos dominios 2 similares a EGF y similares a folistatin	TEFF2 HUMAN, Q9UIK5
TMEM154	Proteína de transmembrana 154	(Ninguna)
BCAN	Brevican	PGCB HUMAN, Q96GW7
BDKRB2	Receptor de bradiquinina B2	BKRB2 HUMAN, P30411
CA9	Anhidrasa carbónica IX	CAH9 HUMAN, Q16790
CCR10	receptor 10 de quimiocina (motivo C-C)	CCR10 HUMAN, P46092
CD44	Molécula CD44 (grupo sanguíneo indio)	CD44 HUMAN, P16070
CDH8	Cadherin 8, tipo 2	CADH8 HUMAN, P55286
CFB	Factor de complemento B	CFAB HUMAN, P00751
GABBR2	receptor B del ácido gamma-aminobutírico (GABA, del inglés "gamma-aminobutyric acid"), 2	GABR2 HUMAN, Q75899
GPC3	Glypican 3	GPC3 HUMAN, P51654
GPC5	Glypican 5	GPC5 HUMAN, P78333
GPR65	Receptor unido a proteína G 65	PSYR HUMAN, Q8IYL9
GPRC5B	Receptor unido a proteína G, familia C, grupo 5, miembro B	GPC5B HUMAN, Q9NZH0
KCNA2	canal de tensión de potasio, subfamilia relacionada con el agitador, miembro 2	KCNA2 HUMAN, P16389

(continuación)

Gen ID	Nombre	UniProt/SwissProt
PKD2	enfermedad renal poliquística 2 (autosómica dominante)	PKD2 HUMAN, Q13563
PODXL2	2 similar a podocalixina	PDXL2 HUMAN, Q9NZ53
PTPRG	proteína tirosina fosfatasa, tipo de receptor, G	PTPRG HUMAN, P23470
S100A9	Proteína A9 de unión a calcio S100	S10A9 HUMAN, P06702
SDC1	Syndecan 1	SDC1 HUMAN, P18827
SDC4	Syndecan 4	SDC4 HUMAN, P31431
STX2	Sintaxina 2	STX2 HUMAN, P32856
STXBP5	proteína de unión a syntaxina 5 (tomosina)	STXB5 HUMAN, Q5T5C0
TGFR3	factor de crecimiento transformante, receptor beta III	TGBR3 HUMAN, Q03167
TMEFF1	proteína transmembrana con dos dominios 1 similares a EGF y similares a folistatin	TEFF1 HUMAN, Q8IYR6
TMEFF2/TE NB2	proteína transmembrana con dos dominios 2 similares a EGF y similares a folistatin	TEFF2 HUMAN, Q9UIK5
TMEM154	Proteína de transmembrana 154	(Ninguna)
THBD	Trombomodulina	TRBM HUMAN, P07204
CSPG5	proteoglicano 5 de sulfato de condroitina (neuroglicano C)	CSPG5 HUMAN, Q95196
STXBP5	proteína de unión a syntaxina 5 (tomosina)	STXB5 HUMAN, Q5T5C0

DISCUSIÓN

La malaria es una de las enfermedades infecciosas más comunes y uno de los mayores problemas de salud a nivel mundial. Las mujeres embarazadas son especialmente vulnerables a la infección, a pesar de la inmunidad previamente adquirida. En este estudio se han abordado preguntas clave relacionadas con el mecanismo molecular detrás de la interacción VAR2CSA-CSA en PM.

El trabajo anterior ha sugerido que la región mínima de unión a CSA en VAR2CSA es DBL2X-ID2b, con la necesidad de DBL1X o DBL3X para la unión de afinidad completa (Dahlbäck, M., Jorgensen, L. M., Nielsen, M. A., Clausen, T. M., Ditlev, S. B., Resende, M., Pinto, V. V., Arnot, D. E., Theander, T. G. y Salanti, A. J Biol Chem 286, 15908-15917). En la continuación de este trabajo, se realizan más truncamientos de VAR2CSA, que se localizan en la región DBL2X. Se muestra que el núcleo del sitio de unión a CSA se encuentra dentro del dominio DBL2X que incluye pequeñas partes de las regiones interdominio flanqueantes. El enlace no depende de la región ID2b, o de los dominios flanqueantes DBL1X o DBL3X, como se ha sugerido anteriormente. Esto es evidente por la unión específica de CSPG de ID1-ID2a e ID1-DBL2Xb (Tabla 3). La región de unión mínima es ID1-DBL2Xb, que une CSPG con características comparables a las de VAR2CSA de longitud completa.

Es interesante que estos nuevos datos mapeen el sitio de enlace núcleo-CSA en un solo dominio. Se ha demostrado previamente que la unión de DBL2X (y cualquier otro dominio DBL único) a CSA es no específica y de afinidad débil (Resende, M., Ditlev, S. B., Nielsen, M. A., Bodevin, S., Bruun, S., Pinto, V. V., Clausen, H., Turner, L., Theander, T. G., Salanti, A. y Dahlbäck, M. (2009) Int J Parasitol 39, 1195-1204). Está claro que ID1 y las partes de los interdominios de ID2a son esenciales para el enlace de CSA. DBL1X-DBL2Xa e ID1-DBL2Xa no se une a CSPG. Los dos bordes C-terminal DBL2X (DBL2Xa y DBL2Xb) difieren en 93 aminoácidos. Como la eliminación de estos aminoácidos elimina la unión, deben ser importantes para la unión a CSA.

La región de unión mínima ID1-DBL2Xb es mucho más pequeña que VAR2CSA de longitud completa, que tiene un peso molecular de solo 62 kDa. Es poco probable que otros truncamientos sustanciales de VAR2CSA sean funcionales en la unión de CSA. Nuestros datos redefinen DBL2X como un dominio funcional más grande, que incorpora partes de los interdominios flanqueantes ID1 e ID2a.

Una vacuna basada en VAR2CSA contra PM debe ser capaz de inducir una fuerte respuesta inmune protectora. En esto, el aspecto más importante es la generación de anticuerpos IgG capaces de inhibir la adhesión del parásito específico de la placenta. Para probar las características inmunogénicas de los fragmentos producidos, los utilizamos en la inmunización de ratas. Los sueros producidos contra todos los fragmentos que contienen el sitio de unión a CSA inhibieron la adhesión del parásito a CSA. De forma importante, los sueros producidos contra ID1-ID2a dieron como resultado una inhibición casi completa. Esto sugiere que los fragmentos mínimos de unión a CSA conservan la capacidad para inducir una fuerte respuesta inmune antiadherente. Esta conclusión se confirmó adicionalmente por el hecho de que los anticuerpos purificados a partir de suero anti-FV2 en ID1-ID2a retuvieron la mayor parte de la actividad de bloqueo de adhesión, y que la muestra de anti-FV2 empobrecida de anticuerpo anti-ID1-ID2a perdió la mayor parte de la actividad. Esto indica que los epítomos necesarios para la inducción de anticuerpos bloqueadores de la adhesión se localizan dentro de esta región.

En este estudio, se han probado sueros anti-VAR2CSA en la inhibición homóloga de los parásitos FCR3 que se unen a CSA. Es importante que una vacuna sea capaz de inhibir la adhesión placentaria independientemente del origen de la cepa del parásito. Una gran preocupación en el desarrollo de vacunas es, por lo tanto, la gran diversidad interclonal entre las variantes de parásitos. Mientras que VAR2CSA recombinante de longitud completa es muy inmunogénico, los anticuerpos producidos no son inhibidores cruzados (Avril, M., Hathaway, M. J., Srivastava, A., Dechavanne, S., Hommel, M., Beeson, J. G., Smith, J. D. y Gamain, B. PLoS One 6, e16622). Un estudio reciente muestra que la vacunación con ADN con ID1-DBL2X de FCR3, induce anticuerpos que son inhibidores cruzados, que inhiben la adhesión de CSA de otras cepas de laboratorio, así como de parásitos aislados en el campo (Bordbar, B., Tuikue-Ndam, N., Bigey, P., Doritchamou, J., Scherman, D. y Deloron, P. Vaccine). Esto respalda la utilización de este pequeño fragmento en una vacuna de PM.

Cardin y Weintraub predijeron que un sitio de unión a GAG tomaría una de dos formas (Cardin, A. D. y Weintraub, H. J. (1989) Arteriosclerosis 9, 21-32). Estas son X-B-B-X-B-X y X-B-B-B-X-B-X, en las que X es cualquier resto hidropático y B es cualquier resto básico, con preferencia por arginina. Ambos describen un sitio de unión para un disacárido sulfatado. Si bien pueden ocurrir muchas interacciones, se cree que la interacción iónica entre los sulfatos cargados negativamente y los aminoácidos básicos es la más importante. Se mutan dos de dichos sitios dentro de la región de unión mínima; 625-GKNLKKRY-632 en DBL2X y 458-NKKKECKD-465 en ID1. También se elimina una gran región dentro de un motivo de secuencia dimorfa (DSM) ubicado en la parte N-terminal de DBL2X, ya que se ha sugerido que tiene una función en la unión. La eliminación de la región DSM no tuvo efecto sobre la unión a CSA. Tampoco hubo ninguna sustitución en los supuestos sitios de unión a GAG. Esta es una clara indicación de que estos sitios tienen poca o ninguna función en la unión a CSA.

Se ha demostrado que el requisito mínimo de unión para el receptor de CSA humano es un dodecasacárido con 2-4 monosacáridos de GalNAc sulfatados en C4 (Alkhalil, A., Achur, R. N., Valiyaveetil, M., Ockenhouse, C. F. y Gowda, D. C. (2000) J Biol Chem 275, 40357-40364). Es notable que los parásitos que expresan VAR2CSA, *in vivo*, son muy específicos para CSA que porta solo unidades de disacáridos sulfatados C4 al 2-8%. Para examinar si la formación del complejo VAR2CSA-CSA depende de las interacciones iónicas, se prueba la unión a diferentes concentraciones de sal. La unión de ID1-ID2a, DBL1X-ID2a y FV2 en NaCl 150 mM-300 mM muestra una relación lineal cuando se traza $\text{Log}(K_D, \text{observado})$ frente a $\text{Log}[\text{Na}^+]$. Encontramos que la unión depende de un máximo de 2-3 interacciones iónicas. Es interesante que el valor para la proteína de longitud completa sea mayor que para los fragmentos más cortos, lo que indica que esta proteína produce una interacción iónica adicional con CSA. En este estudio, se examinan los fragmentos que contienen la región de unión de alta afinidad específica de CSA. Es posible que se produzcan más interacciones en las regiones cadena abajo de la proteína, pero que el sitio central se encuentre dentro de DBL2X. La extrapolación y el resultado del intercepto Y ($[\text{Na}^+] = 1 \text{ M}$, $\text{Log}[\text{Na}^+] = 0$) dice que $K_{D, \text{no iónico}} = 5,9 \mu\text{M}$ para FV2, $K_{D, \text{no iónico}} = 3,4 \mu\text{M}$ para DBL1X-ID2a, y $K_{D, \text{no iónico}} = 0,7 \mu\text{M}$ para ID1-ID2a. Esto indica que solo el 25-30% de la unión a VAR2CSA-CSA se puede explicar mediante interacciones iónicas. Esto está en contraste con otras proteínas de unión a GAG, que han mostrado hasta un 80-90% de dependencia en interacciones iónicas en ensayos similares (Faller, B., Mely, Y., Gerard, D. y Bieth, J. G. (1992) Biochemistry 31, 8285-8290; Hileman, R. E., Fromm, J. R., Weiler, J. M. y Linhardt, R. J. (1998) Bioessays 20, 156-167).

Los datos sugieren que la interacción VAR2CSA-CSA no se ajusta a las interacciones convencionales de GAG-proteína. La hipótesis es que la alta afinidad de CSA se logra a través de una interacción multivalente, que puede incluir múltiples sitios de unión haciendo interacciones no iónicas con la cadena principal de carbohidratos CSA. Parte de la interacción es iónica y se necesita cierto grado de sulfatación para la unión de VAR2CSA. Por lo tanto, es probable que exista una interacción entre los aminoácidos básicos y los sulfatos, pero que este no es el factor determinante de la afinidad.

En este estudio, se ha definido un pequeño fragmento de VAR2CSA de un solo dominio que se puede producir en células eucariotas como una proteína de unión a CSA funcional y que tiene la capacidad de inducir anticuerpos altamente bloqueadores de la adhesión. Este fragmento tiene el potencial de ser un candidato poderoso para una vacuna contra PM.

Los datos identifican una pequeña parte recombinante de VAR2CSA que se une específicamente a CSA mediando así la unión placentaria de eritrocitos infectados. Se muestra que este fragmento de VAR2CSA también se une específicamente a las células cancerosas, a través de una interacción con CSA presentada en CSPG4 u otras cadenas principales de proteínas que se identificaron en este estudio. Además, se encuentra que la unión de

polipéptidos VAR2CSA, basados en este pequeño fragmento, a las células cancerosas inhibe la migración y la invasión de las células. Estos polipéptidos VAR2CSA también inhiben la señalización de ERK canónica, y se encuentra que los polipéptidos VAR2CSA que están fusionados a una toxina matan eficazmente a las células cancerosas.

5 PROCEDIMIENTOS

PROCEDIMIENTO 1 - Clonación y expresión de proteínas en células de insectos

Se amplificaron fragmentos de la secuencia VAR2CSA a partir de los genes VAR2CSA FCR3 (n.º de referencia de GenBank GU249598) o 3D7 (n.º de referencia de GenBank JQ247428) optimizados por codones utilizando cebadores específicos (Tabla 2). Se amplificaron fragmentos simples en una PCR de un paso. Se realizaron construcciones de sustitución de aminoácidos en una PCR de dos etapas. La primera PCR amplificó dos fragmentos de la plantilla de FCR3 optimizada por codones, que contenía extremos complementarios superpuestos. La segunda PCR amplificó la construcción total, utilizando los dos fragmentos superpuestos como plantilla con cebadores específicos para los bordes externos. Se secuenciaron todos los fragmentos para verificación. Se clonaron los fragmentos en el vector de baculovirus pAcGP67-A (BD Biosciences), modificado para contener una etiqueta V5 y His en el terminal C. Se expresaron las proteínas en células de insecto infectadas con baculovirus como proteína soluble secretada en el sobrenadante del cultivo celular. En resumen, Se cotransfectó ADN de baculovirus Bakpak6 linealizado (BD Biosciences) con los plásmidos pAcGP67-A, en células de insecto Sf9 para la generación de partículas de virus recombinantes. Se utilizaron 10 ml de la segunda amplificación para infectar células High-Five en 400 ml de medio libre de suero (10486, GIBCO) a una densidad de 1×10^6 células/ml. Se recogió la proteína recombinante secretada del sobrenadante 3 días después de la infección inicial. Se filtró el sobrenadante (0,2 μ m), se dializó y se concentró antes de la purificación de la proteína.

PROCEDIMIENTO 2 - Purificación de proteínas y SDS-PAGE

Se dializó el sobrenadante filtrado que contenía la proteína recombinante secretada utilizando un flujo cruzado ÄKTA (GE Healthcare). Se realizó la diálisis en NaH_2PO_4 10 mM (pH 7,4, Sigma-Aldrich) y NaCl 500 mM. Se filtró la solución resultante (0,2 μ m) y se añadió imidiazol hasta una concentración final de 15 mM. Luego, se purificó la proteína en una columna HisSelect de 1 ml (H8286, Sigma-Aldrich). Se eluyó la proteína unida con NaH_2PO_4 10 mM (pH 7,4), NaCl 500 mM e imidiazol 500 mM. Se purificaron adicionalmente las proteínas necesarias para las mediciones en microbalanza de cristal de cuarzo y SAXS para obtener monómeros mediante cromatografía de exclusión de tamaño utilizando una columna HiLoad 16/60 Superdex 200 (GE Healthcare) en Tris 20 mM (pH 8) y NaCl 200 mM. Se verificó la pureza y la integridad estructural de la proteína mediante SDS-PAGE.

PROCEDIMIENTO 3 - ELISA

Se incubaron placas de microtitulación Falcon (351172, BD Biosciences) a una concentración de 3 μ g/ml para CSPG (bovino) (D8428, Sigma) o HSPG (H4777, Sigma) y 100 μ g/ml para CSA (C9819, Sigma), CSC (400675, Seikagaku) y CSB (C3788, Sigma) durante la noche a 4 °C. Luego se bloquearon las placas con tampón de unión a TSM (Tris 20 mM, NaCl 150 mM, CaCl_2 2 mM, Tween-20 al 0,05%, BSA al 1%, pH 7,4 a 25 °C) durante 2 horas a 37 °C en un agitador. Se preparó una serie de dilución de 2 veces (1,56 mM-100 mM) de proteína en tampón de unión a TSM y se añadió a las placas, que se incubaron durante 1 hora a 37 °C en un agitador. Todas las medidas se realizaron por triplicado. Se lavaron las placas tres veces en tampón de lavado TSM (Tris 20 mM, NaCl 150 mM, CaCl_2 2 mM, Tween-20 al 0,05%, pH 7,4 a 25 °C). Luego se incubaron las placas con anticuerpo anti-V5-HRP 1:3000 (R96125, Invitrogen) en tampón de unión a TSM durante 1 hora a 37 °C en un agitador. Se lavaron las placas tres veces en tampón de lavado TSM. Finalmente, se desarrollaron las placas con sustrato de o-fenilendiamina (DAKO) durante 15 minutos. Se inactivó la reacción con H_2SO_4 2,5 M. La absorbancia se midió a 490 nm.

PROCEDIMIENTO 4 - Microbalanza de cristal de cuarzo (Attana A100)

se realizaron experimentos en un Attana A100 (Attana AB), utilizando chips de poliestireno (3611-3103 Attana AB) chapados en oro de 10 MHz, cristal de cuarzo AT-cut. Se filtraron todos los tampones y reactivos a 0,2 μ m. El ligando fue CSPG (Bovino) (D8428, Sigma) o HSPG (H4777, Sigma), recubierto a una concentración de 100 μ g/ml. Se realizó el recubrimiento en estado estacionario mediante la adición de la solución de ligando y la incubación durante 30 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se bloqueó la placa con PBS que contenía BSA sin Ig al 0,1 % (BSA-50, Rockland), 30 minutos a temperatura ambiente. Se lavó Attana A100 con SDS al 1% antes de cada experimento, utilizando el programa de lavado diario predefinido del fabricante. Después del lavado, se cambió el tampón de migración a PBS a un caudal de 25 μ l/min, a 25 °C y se permitió que la máquina se estabilizara a un cambio máximo en la frecuencia de 0,5 Hz/min. Una vez estabilizado, se inyectó PBS varias veces para mostrar que el procedimiento de inyección afectó mínimamente a la línea de base. Antes de la inyección de la muestra, se inyectó PBS como un blanco. Se inyectó el analito en una serie de dilución 1:3 (0,25 μ g/ml-60 μ g/ml) comenzando con la concentración más baja. El tiempo de asociación se estableció en 84 segundos y el tiempo de disociación en 5 minutos. Debido a la alta afinidad de unión, no fue posible regenerar la superficie de unión después de las inyecciones. Se procesaron los datos recopilados en el software Attester Evaluation (Attana AB). Se ajustaron las curvas en un modelo simple 1:1. Se determinaron k_{on} y k_{off} mediante ajuste de curvas y se calculó K_D basándose en $K_D = k_{off} / k_{on}$.

PROCEDIMIENTO 5 - Ensayo de titulación de sal

Se probó la dependencia iónica de la unión de VAR2CSA-CSA en un ensayo de unión basado en ELISA. Se recubrió CSPG a 3 µg/ml. Se añadió una serie de dilución 1:2 (400-1,56 nM) de proteína en varias concentraciones diferentes de NaCl (150 mM, 200 mM, 250 mM y 300 mM). Todas los experimentos se realizaron por triplicado. Se calcularon los valores de K_D para cada serie de valoración en Graphpad Prism utilizando regresión no lineal (ajuste de mínimos cuadrados con pendiente de colina).

PROCEDIMIENTO 6 - Inmunizaciones de animales y extracción de suero

Todas las vacunas para animales cumplen con las regulaciones nacionales y europeas. Se inyectaron por vía subcutánea ratas Wistar con 30 µg de proteína recombinante en adyuvante completo de Freund (F5881, Sigma-Aldrich). Se aumentó la inmunización tres veces a intervalos de 3 semanas con 15 µg de proteína en adyuvante incompleto de Freund (F5506, Sigma-Aldrich). Se tomaron muestras de sangre una semana después de cada refuerzo y se extrajo el suero por centrifugación.

PROCEDIMIENTO 7 - Purificación de afinidad IgG

Se purificaron grupos de sueros de ratas inmunizadas con VAR2CSA FCR3 de longitud completa (FV2) mediante afinidad en 1 ml de columna HP activada por NHS (HP activado HiTrap NHS, 17-0716-01, GE Healthcare), que contiene proteínas FCR3 multidominio inmovilizadas (DBL1X-DBL2Xa, DBL1X-ID2a o ID1-DBL4e) y FV2 de longitud completa. Se realizó purificación de acuerdo con el protocolo del fabricante. En resumen, se realizó el acoplamiento de ligando a columna añadiendo 1 ml de solución de tampón de acoplamiento 1:1 (NaHCO_3 0,2 M, NaCl 0,5 M, pH 8,3) y ligando (concentración 0,5-10 mg/ml) a la columna. Se selló la columna y se incubó durante 30 min a temperatura ambiente, seguido de incubación a 4 °C durante la noche. Se lavó la columna con 6 ml de tampón A (etanolamina 0,5 M, NaCl 0,5 M, pH 8,3), 6 ml de tampón B (acetato 0,1 M, NaCl 0,5 M, pH 4) y, finalmente, 6 ml de tampón A. Después de un periodo de incubación de 30 minutos a temperatura ambiente, se repitió el lavado en orden inverso (tampón B, A, B). Se inyectó 8-10 ml de PBS para ajustar el pH antes de la purificación del suero. Se pasó la muestra a través de la columna 3-5 veces. Se lavó la columna con 10 ml de PBS antes de que se eluyeran los anticuerpos con 10 ml de tampón de elución (ácido cítrico 0,1 M, pH 2,7).

PROCEDIMIENTO 8 - Cultivos de parásitos de *P. falciparum*

Se mantuvieron en cultivo parásitos del tipo FCR3 de *P. falciparum* utilizando hematocrito al 5 % (Human Blood-group 0 Rh+) en medio de parásito RPMI-1640 (BE12115F, Lonza) suplementado con NaHCO_3 25 mM, 0,125 µg/ml de sulfato de gentamicina (BE02012E, Lonza), 0,125 µg/ml de AlbuMAX II (11021029, Invitrogen) y suero humano normal al 2 %. Se analizaron los IE repetidamente en células BeWo (CCL98, ATCC) para mantener el fenotipo de adhesión CSA. Además, se analizaron los aislados como micoplasma negativos y se genotipificaron regularmente mediante PCR utilizando cebadores GLURP (proteína rica en glutamato) y MSP-2 anidados (proteína de superficie de Merozoita 2).

PROCEDIMIENTO 9 - Purificación de trofozoitos en etapa tardía

Se enriquecieron cultivos de parásitos para el estadio tardío de trofozoito y esquizonte en un fuerte campo magnético utilizando una columna MACS CS (130-041-305, Miltenyi Biotec) y un imán Vario-MACS (Miltenyi Biotec). En resumen, se aplicó la suspensión de cultivo del parásito a la columna. Luego se lavó la columna con suero de ternera fetal al 2 % (F6178, Sigma-Aldrich) en PBS. Se eluyeron los eritrocitos infectados en etapa tardía de la columna después de la separación del imán, se centrifugaron y resuspendieron en suero de ternera fetal al 2 % en PBS y se diluyeron a una concentración de 2×10^6 IE/ml.

PROCEDIMIENTO 10 - Citometría de flujo (FCM, del inglés "Flow Cytometry")

Se midió la unión de anticuerpos al VAR2CSA nativo en los eritrocitos infectados con trofozoitos purificados en la última etapa mediante citometría de flujo (FCM). 100 µl de parásitos purificados en etapa tardía a una concentración de 2×10^5 IE/ml en PBS con FCS al 2 % se marcaron con suero (reducido para unión no específica mediante preincubación con eritrocitos no infectados) en una concentración final de 1:10. Se lavaron las células tres veces en PBS con FCS al 2 %. Luego se marcaron adicionalmente las células con bromuro de etidio (15585011, Invitrogen) en una concentración final de 2 µg/ml y una dilución 1:100 de anticuerpo anti-IgG de rata secundario marcado con FITC (62-9511, Invitrogen). Como controles negativos, también se incubaron los parásitos de última etapa con suero de ratas inmunizadas con un antígeno distinto de VAR2CSA y con anticuerpos secundarios solos. Se recogieron datos de 5000 IE positivos con bromuro de etidio utilizando un citómetro de flujo FC500 (Beckmann Coulter). Finalmente, se determinó la intensidad de fluorescencia media utilizando el software WinList 5.0 (Verify Software House).

PROCEDIMIENTO 11 - Inhibición de parásitos que unen CSPG

Se analizaron anticuerpos séricos en cuanto a su capacidad para inhibir la unión de IE a CSPG. Esto se hizo en un formato de placa de 96 pocillos utilizando un procedimiento de lavado estandarizado por robot. Se recubrieron los pocillos con 2 µg/ml de CSPG (D8428, Sigma-Aldrich). Se añadieron por triplicado a los pocillos un total de 2×10^5 IE

en etapa tardía marcados con tritio (Monohidrocloreto de hipoxantina, PerkinElmer, NET177005MC) en 100 µl. Luego se incubaron los IE marcados con suero durante 90 minutos a 37 °C. Se arrastraron los IE independientes por un robot de pipeteo (Beckman Coulter). Se determinó la proporción de IE adheridos mediante recuento de centelleo líquido en un Topcount NXT (Perkin Elmer).

5 **PROCEDIMIENTO 12a - Ensayos de unión a células cancerosas**

Se utilizó citometría de flujo (FCM) para probar la reactividad del polipéptido de unión mínima VAR2CSA a CSPG expresado en la superficie de varias líneas celulares. Se cultivaron células en RPMI suplementado con suero bovino fetal al 10% (células CHO, C32), Hams F12 (BeWo), se mantuvieron en dióxido de carbono al 5% a 37 °C o se purificaron a partir de una muestra de sangre humana en tampón CPD (glóbulos rojos). Se expusieron secuencialmente alícuotas de células (1×10^5) al polipéptido de unión mínima VAR2CSA (150, 75 o 37 nM) y α -V5-FITC (1:800) (Invitrogen) diluido en FACS2 (PBS + FCS al 2 %) durante 30 minutos a + 4 °C en oscuridad con agitación suave. Se utilizaron como controles negativos una versión truncada del polipéptido de unión mínima y el tampón FACS2. Se sincronizaron las células intactas según la señal de dispersión directa y lateral. Se adquirieron los datos utilizando un citómetro de flujo FC500 (Beckman Coulter) a partir de un mínimo de 5000 células. Se procesaron y analizaron todas las muestras relacionadas con una línea celular particular en un único ensayo.

15 **PROCEDIMIENTO 12b - Ensayos de unión a células cancerosas**

Como alternativa al ensayo de citometría de flujo anterior, se incubaron células con el polipéptido de unión mínima VAR2CSA y α -V5-FITC (1:500) (Invitrogen) diluido en HBSS. Se utilizó el polipéptido VAR2CSA a las mismas concentraciones que se escribieron anteriormente. Después de la tinción de α -V5-FITC, se lavaron las células 3 veces en HBSS, se recogieron en un tampón de separación de células sin enzimas (Invitrogen) y se analizaron en un FACS Calibur (BD Biosciences) para intensificar la señal de FL-1.

Abreviaturas CIDR, región entre dominios rica en cisteína; CSA, sulfato de condroitina A; CSPG, proteoglicano de sulfato de condroitina; DBL, dominio de unión Duffy; FCM, citometría de flujo; FV2, ectodominio de longitud completa de la proteína VAR2CSA sin segmento N-terminal; HSPG, proteoglicano de heparán sulfato; ID, interdominio; IE, eritrocito infectado de *P. Falciparum*; NTS, segmento N terminal; PM, malaria placentaria; PfEMP1, Proteína 1 de membrana de eritrocitos de *Plasmodium falciparum*; PM, malaria placentaria.

25 **PROCEDIMIENTO 13 - Prueba de citotoxicidad *in vitro* de proteínas fusionadas con VAR2CSA-toxina**

Se sembraron líneas celulares cancerosas en placas de 96 pocillos, con 500,0 células/pocillo un día antes del experimento. El día del experimento, se añadió una serie de dilución de 10 veces (que varía de 10 µg/ml a 0,01 ng/ml) de toxina VAR2CSA fusionada y proteína de control (VAR2CSA sin toxina) a pocillos separados. Se hicieron series de dilución similares, que también contenían 400 µg/ml de CSA, para ambas proteínas y se añadieron a pocillos separados. Se incubaron las células con proteínas durante 72 horas a 37 °C. Se analizó la muerte celular mediante un ensayo de proliferación celular MTT, en el que la lectura es la absorbancia a 570 nm.

30 **PROCEDIMIENTO 14: Tinción de muestras de tejido humano incluidas en parafina**

Se investiga la unión de VAR2CSA recombinante a tejido de cáncer primario obtenido de pacientes humanos utilizando inmunohistoquímica (IHC, del inglés "immunohistochemistry"). Se incubó el tejido embebido en parafina descubierto en portaobjetos de vidrio sin recuperación de antígeno con variantes V5-VAR2CSA de 0,1-500 nM o proteína de control V5 (DBL4) durante 1 hora a temperatura ambiente, se lavó durante 8 minutos, se incubó con anticuerpo anti-V5 de ratón 1:700 durante 30 minutos, se lavó durante 8 minutos. Se detectó posteriormente el anti-V5 unido utilizando HRP anti-ratón UltraMap utilizando la plataforma Ventana Discovery XT.

REIVINDICACIONES

1. Un conjugado que comprende un polipéptido VAR2CSA y una fracción efectora terapéutica o de diagnóstico seleccionada de un agente anticanceroso o un soporte sólido; o una proteína de fusión que comprende un polipéptido VAR2CSA y un agente anticanceroso.
- 5 2. El conjugado o proteína de fusión de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el polipéptido VAR2CSA es o comprende un fragmento de proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos secuencial de
 - a) ID1 y
 - b) una secuencia de aminoácidos con al menos un 70 % de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos identificada por 153-577 de SEQ ID NO: 1.
- 10 3. El conjugado o proteína de fusión de acuerdo con la reivindicación 2, cuyo fragmento comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 70 % de identidad de secuencia con una cualquiera de las secuencias de aminoácidos de 1-577 de SEQ ID NO:1, 1-592 de SEQ ID NO:3, 1-579 de SEQ ID NO:4, 1-576 de SEQ ID NO:5, 1-586 de SEQ ID NO:10, 1-579 de SEQ ID NO:11, 1-565 de SEQ ID NO:29, 1-584 de SEQ ID NO:34, 1-569 de SEQ ID NO:36, 1-575 de SEQ ID NO:37, 1-592 de SEQ ID NO:38, 1-603 de SEQ ID NO:41, 1-588 de SEQ ID NO:43, 1-565 de SEQ ID NO:44, 1-589 de SEQ ID NO:45, 1-573 de SEQ ID NO:48, 1-583 de SEQ ID NO:53, o 1-569 de SEQ ID NO:54.
- 15 4. El conjugado o proteína de fusión de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2-3, cuyo fragmento comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 70 % de identidad de secuencia con una de las secuencias de aminoácidos de 578-640 de SEQ ID NO:1, 593-656 de SEQ ID NO:3, 580-643 de SEQ ID NO:4, 577-640 de SEQ ID NO:5, 587-650 de SEQ ID NO:10, 580-643 de SEQ ID NO:11, 566-628 de SEQ ID NO:29, 585-647 de SEQ ID NO:34, 570-632 de SEQ ID NO:36, 576-639 de SEQ ID NO:37, 593-655 de SEQ ID NO:38, 604-667 de SEQ ID NO:41, 589-652 de SEQ ID NO:43, 566-628 de SEQ ID NO:44, 590-653 de SEQ ID NO:45, 574-637 de SEQ ID NO:48, 584-646 de SEQ ID NO:53, o 570-632 de SEQ ID NO:54.
- 20 5. El conjugado o proteína de fusión de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2-4, cuyo fragmento comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 70 % de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2, 6, 8, 9, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 30, 31, 32, 33, 35, 39, 40, 42, 46, 47, 49, 50, 51, o 52.
- 25 6. El conjugado o proteína de fusión de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que el agente anticanceroso se selecciona de caliqueamicina, auristatin, doxorubicina, maitansinoide, taxol, ecteinascidina, geldanamycin, metotrexato y sus derivados, proteínas citotóxicas tales como exotoxina A de *Pseudomonas*, toxina diftérica, toxina de ricina, proteína antiviral de hierba carmín, saporin, gelonina y variantes funcionales, fragmentos y combinaciones de los mismos.
- 30 7. El conjugado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que la fracción efectora de diagnóstico es una perla magnética.
- 35 8. Una composición que comprende el conjugado como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1-7.
9. Un conjugado o proteína de fusión de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-7 para su uso como un medicamento o agente de diagnóstico.
10. Una composición farmacéutica que comprende un conjugado o proteína de fusión como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1-7.
- 40 11. Un polipéptido VAR2CSA o un conjugado o proteína de fusión como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1-7 para el tratamiento de un cáncer o para su uso *in vivo* como un biomarcador en un tejido y o fluido corporal para el diagnóstico y/o pronóstico de una enfermedad de cáncer.
- 45 12. Utilización *in vitro* de un polipéptido VAR2CSA o un conjugado o proteína de fusión como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, como un biomarcador en un tejido y/o fluido corporal para el diagnóstico y/o pronóstico de una enfermedad de cáncer.
13. Utilización de un polipéptido VAR2CSA o un conjugado o proteína de fusión como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1-7 como una fracción de direccionamiento para el aislamiento de una célula cancerosa.
14. Un procedimiento para el aislamiento y/o detección de células cancerosas, tales como células madre de cáncer o células cancerosas circulantes (CTC) en una muestra biológica, comprendiendo dicho procedimiento:
 - a) poner en contacto una muestra biológica que comprende células cancerosas de un conjugado o proteína de fusión de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-7 o un conjugado o proteína de fusión que comprende un polipéptido VAR2CSA y un marcador fluorescente y/o un radiomarcador, opcionalmente unido a un soporte sólido; y;
 - b) purificar, aislar y/o detectar los complejos de dichas células cancerosas y dicho conjugado.
- 50