

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 728 865**

51 Int. Cl.:

A61K 39/008 (2006.01)

C12N 9/10 (2006.01)

C12N 9/24 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.03.2014 PCT/US2014/032276**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.10.2014 WO14160987**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.03.2014 E 14775190 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.05.2019 EP 2978447**

54 Título: **Vacunas que comprenden polipéptidos de Leishmania para el tratamiento y el diagnóstico de la leishmaniasis**

30 Prioridad:

28.03.2013 US 201361806368 P
13.05.2013 US 201361822545 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
29.10.2019

73 Titular/es:

**INFECTIOUS DISEASE RESEARCH INSTITUTE
(100.0%)
1616 Eastlake Avenue East, Suite 400
Seattle, Washington 98102, US**

72 Inventor/es:

**DUTHIE, MALCOLM;
GUDERIAN, JEFF y
REED, STEVEN, G.**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

Observaciones:

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

ES 2 728 865 T3

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

DESCRIPCIÓN

Vacunas que comprenden polipéptidos de *Leishmania* para el tratamiento y el diagnóstico de la leishmaniasis

Antecedentes**Campo técnico**

- 5 La presente invención se refiere en general a composiciones y métodos para prevenir, tratar y detectar leishmaniasis en pacientes. Más particularmente, la invención se refiere a composiciones y métodos que comprenden antígenos de *Leishmania* y polipéptidos de fusión, así como a polinucleótidos que codifican dichos antígenos y polipéptidos de fusión.

Descripción de la técnica relacionada

- 10 Los organismos de *Leishmania* son parásitos intracelulares obligados que causan un amplio espectro clínico de enfermedades llamadas leishmaniasis. Los organismos de *Leishmania* son parásitos protozoarios intracelulares del género *Leishmania*. Los organismos de *Leishmania* se dirigen a macrófagos del huésped; causando así un amplio espectro de enfermedades clínicas en los seres humanos y animales domésticos, principalmente perros. En algunas infecciones, el parásito puede permanecer latente durante muchos años. En otros casos, el huésped puede desarrollar una variedad de formas de leishmaniasis. Las leishmaniasis se clasifican de forma general en tres tipos de enfermedades, leishmaniasis cutánea (LC), leishmaniasis mucosal (LM) y leishmaniasis visceral (LV), según las manifestaciones clínicas.

- 20 La leishmaniasis es un problema grave en gran parte del mundo, incluyendo Brasil, China, África oriental, India y áreas de Oriente Medio. La enfermedad también es endémica en la región mediterránea, incluyendo el sur de Francia, Italia, Grecia, España, Portugal y el norte de África. El número de casos de leishmaniasis ha aumentado dramáticamente en los últimos 20 años, y ahora existen millones de casos de esta enfermedad en todo el mundo. Cada año se diagnostican aproximadamente 2 millones de casos nuevos, el 25% de los cuales son leishmaniasis viscerales.

- 25 Se notificó leishmaniasis visceral (LV) en 88 países, pero aproximadamente el 90% de los casos de LV ocurren en Brasil, India, Sudán, Bangladesh y Nepal (Mendez et al. *J Immunol* 2001; 166 (8): p. 5122-8). La incidencia anual se estima en aproximadamente 500.000 casos de LV, y la población en riesgo es de 350 millones (Engwerda et al. *Eur J Immunol* 1998; 28 (2): p. 669-80; Squires et al. *J Immunol* 1989; 143 (12): p. 4244-9). La leishmaniasis visceral, generalmente causada por especies del complejo de *L. donovani*, es decir, *L. donovani* y *L. infantum* (chagasi). *L. donovani* es el agente causal de la leishmaniasis visceral en África y Asia, *L. infantum*/chagasi en los países mediterráneos y en el Nuevo Mundo (Piedrafita et al. *J Immunol* 1999; 163 (3): p. 1467-72). La LV es una enfermedad grave y debilitante que se desarrolla con una infección visceral que afecta el bazo, el hígado y los ganglios linfáticos, que, sin tratamiento, generalmente es una enfermedad mortal. Los síntomas de la leishmaniasis visceral aguda incluyen hepatoesplenomegalia, fiebre, leucopenia, anemia e hipergammaglobulinemia. La LV activa es generalmente mortal a menos que se trate adecuadamente.

- 35 Los parásitos de *Leishmania* se transmiten por la picadura de las moscas de la arena y los promastigotes infectantes se diferencian en y se replican como amastigotes dentro de los macrófagos en el huésped mamífero. En común con otros patógenos intracelulares, las respuestas inmunes celulares son fundamentales para la protección frente a la leishmaniasis. Las respuestas inmunitarias de Th1 desempeñan un papel importante en la mediación de la protección frente a *Leishmania*, incluyendo las funciones de las células T CD4+ y CD8+, IFN- γ , IL-12, TNF- α y NO, mientras que se han reportado efectos inhibidores para IL-10 y TGF- β (Engwerda et al. *Eur J Immunol* 1998; 28 (2): p. 669-80; Murphy et al. *Eur J Immunol*. 2001; 31 (10): p. 2848-56; Murray et al. *J Exp Med*. 1999; 189 (4): p.741-6; Murray et al. *Infect Immun*. 2000; 68 (11): p. 6289-93; Squires et al. *J Immunol* 1989; 143 (12): p. 4244-9 6; Taylor y Murray. *J Exp Med*. 1997; 185 (7): p. 1231-9; Kaye y Bancroft. *Infect Immun*. 1992; 60 (10): p. 4335-42; Stern et al. *J Immunol*. 1988; 140 (11): p. 3971-7; Wilson et al. *J Immunol*. 1998; 161 (11): p. 6148-55).

- 45 La inmunización frente a la leishmaniasis en modelos animales puede efectuarse mediante la administración de vectores de ADN que codifican antígenos (Gurunathan et al. *J Exp Med*. 1997; 186 (7): p. 1137-47; Piedrafita et al. *J Immunol*. 1999; 163 (3): 1467-72; Mendez et al. *J Immunol*. 2001; 166 (8): p. 5122-8) o mediante la administración de proteínas formuladas con adyuvantes que inducen Th1, incluyendo IL-12 (Afonso et al. *Science*. 1994; 263 (5144): p. 235-7; Stobie et al. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000; 97 (15): p. 8427-32; Kenney et al. *J Immunol*. 1999; 163 (8): p. 4481-8) o ligandos de TLR tales como oligonucleótidos CpG (Rhee et al. *J Exp Med*. 2002; 195 (12): p. 1565-73; Stacey y Blackwell. *Infect Immun*. 1999; 67 (8): p. 3719-26; Walker et al. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999; 96 (12): p. 6970-5) y monofosforil lípido A (Coler et al. *Infect Immun*. 2002; 70 (8): p. 4215-25; Skeiky et al. *Vaccine*. 2002; 20 (2728): p. 3292-303).

- 55 A pesar de algunas evidencias de que las vacunas de subunidades pueden ser efectivas en ciertos modelos de LV (Basu et al. *J Immunol*. 2005; 174 (11): p. 7160-71; Stager et al. *J Immunol*. 2000; 165 (12): p. 7064-71; Ghosh et al. *Vaccine*. 2001; 20 (12): p. 59-66; Wilson et al. *Infect Immun*. 1995; 63 (5): p. 2062-9; Tewary et al. *J Infect Dis*. 2005; 191 (12): p. 2130-7; Aguilar-Be et al. *Infect Immun*. 2005; 73 (2): p. 812-9. Rafati et al. *Vaccine*. 2006; 24 (12): 2169-75), ha faltado el progreso hacia la definición de candidatos a antígeno efectivos frente a LV in vivo.

El documento WO2012/064659 describe composiciones y métodos para prevenir, tratar y detectar leishmaniasis. Las composiciones comprenden generalmente polipéptidos de fusión que comprenden antígenos de *Leishmania*, en particular, antígenos SMT y NH o partes inmunogénicas o variantes de los mismos, así como polinucleótidos que codifican dichos polipéptidos de fusión.

5 Las composiciones pueden incorporarse en vacunas.

El documento WO2009/143006 describe composiciones y métodos para prevenir, tratar y detectar leishmaniasis. Las composiciones comprenden generalmente polipéptidos de fusión que comprenden múltiples antígenos de *Leishmania*, en particular, KMPI I, SMT, A2 y/o CBP, o partes inmunogénicas o variantes de los mismos, así como polinucleótidos que codifican dichos polipéptidos de fusión. Las composiciones pueden incorporarse en vacunas.

10 Gamboa-Leon et al., *Vaccine*, 24 (22), 4863 - 4873 (2006) ensaya la inmunoterapia frente a la infección por *Leishmania chagasi* o la vacuna de ADN bivalente VR1012-NH36. Los autores reportan que la vacuna de ADN NH36 fue altamente efectiva como una nueva herramienta para la terapia y el control de la leishmaniasis visceral.

15 Dirlei Nico et al. reportan que han identificado el dominio de la nucleósido hidrolasa de *L. donovani* (NH36) responsable de su inmunogenicidad y eficacia protectora frente a la leishmaniasis visceral murina. Usando péptidos generados recombinantes que abarcan la secuencia completa de NH36 y la saponina, los autores reportan que la protección frente a *L. chagasi* está relacionada con su dominio C-terminal (aminoácidos 199-314) y está mediada principalmente por una respuesta dirigida por células T CD4+ con una contribución menor de las células T CD8+. Véase, "Adaptive Immunity against Leishmania Nucleoside Hydrolase Maps Its C-Terminal Domain as the Target of the CD4+ T Cell-Driven Protective Response", (*PLOS Neglected Tropical Diseases* vol. 4, no. 11, 9 de noviembre de 2010)

20 Las estrategias que emplean vacunas consistentes en organismos completos para prevenir o tratar la leishmaniasis no han sido efectivas en los seres humanos. Además, se necesitan reactivos más efectivos para diagnosticar con precisión la leishmaniasis en los pacientes. Por consiguiente, sigue existiendo una necesidad significativa de composiciones inmunogénicas y vacunas que puedan prevenir, tratar y/o diagnosticar eficazmente la leishmaniasis en los seres humanos y otros mamíferos (p. ej., caninos). La presente invención satisface estas necesidades y ofrece
25 otras ventajas relacionadas.

Resumen breve

La presente invención proporciona composiciones, kits y métodos para prevenir, tratar y detectar leishmaniasis, como se muestra en las reivindicaciones. Lo siguiente también se describe en la presente memoria:

30 En un aspecto, la descripción proporciona un polipéptido de fusión que comprende un polipéptido de nucleótido hidrolasa (NH) no específico de *Leishmania*, un polipéptido de esterol 24-c-metiltransferasa (SMT) de *Leishmania* y un polipéptido de *Leishmania* seleccionado del grupo que consiste en supuesto polipéptido HSP70 mitocondrial (mtHSP70), un polipéptido de cisteína polipeptidasa B (CpB), una secuencia de polipéptido de histona H2BN (H2BN), un polipéptido A2 (A2) y un polipéptido de antígeno p21 (p21). En algunas partes de la descripción, el polipéptido de fusión comprende un polipéptido de nucleósido hidrolasa (NH) no específico de *Leishmania*, un polipéptido de esterol
35 24-c-metiltransferasa (SMT) de *Leishmania* y uno o más de un polipéptido de *Leishmania* seleccionado del grupo que consiste en un supuesto polipéptido HSP70 mitocondrial (mtHSP70), un polipéptido de cisteína polipeptidasa B (CpB), una secuencia de polipéptido de histona H2BN (H2BN), un polipéptido A2 (A2), un polipéptido de antígeno p21 (p21) y polipéptido de un factor de iniciación eucariótico putativo 4a (Leif).

40 En algunas partes de la descripción, el polipéptido de fusión comprende un polipéptido NH de *Leishmania*, un polipéptido SMT de *Leishmania*, un polipéptido H2BN de *Leishmania* y un polipéptido A2 de *Leishmania*. En algunas partes de la descripción, el polipéptido de fusión comprende un polipéptido NH de *Leishmania*, un polipéptido SMT de *Leishmania*, un polipéptido mtHSP70 de *Leishmania* y un polipéptido A2 de *Leishmania*. En algunas partes de la descripción, el polipéptido de fusión comprende un polipéptido NH de *Leishmania*, un polipéptido SMT de *Leishmania*, un polipéptido A2 de *Leishmania* y un polipéptido p21 de *Leishmania*. En algunas partes de la descripción, el polipéptido de fusión comprende un polipéptido NH de *Leishmania*, un polipéptido SMT de *Leishmania*, un polipéptido mtHSP70 de *Leishmania* y un polipéptido p21 de *Leishmania*. En algunas partes de la descripción, el polipéptido de fusión comprende un polipéptido NH de *Leishmania*, un SMT de *Leishmania* y un polipéptido mtHSP70 de *Leishmania*. En algunas realizaciones, el polipéptido de fusión comprende un polipéptido NH de *Leishmania*, un polipéptido SMT de *Leishmania* y un polipéptido CpB de *Leishmania*. En algunas partes de la descripción, el polipéptido de fusión
50 comprende un polipéptido NH de *Leishmania*, un polipéptido SMT de *Leishmania* y un polipéptido A2 de *Leishmania*. En algunas partes de la descripción, el polipéptido de fusión comprende un polipéptido NH de *Leishmania*, un polipéptido SMT de *Leishmania* y un polipéptido H2BN de *Leishmania*. En algunas partes de la descripción, el polipéptido de fusión comprende un polipéptido NH de *Leishmania*, un polipéptido SMT de *Leishmania* y un polipéptido p21 de *Leishmania*. En algunas partes de la descripción, el polipéptido de fusión comprende un polipéptido mtHSP70
55 de *Leishmania*, un polipéptido H2BN de *Leishmania*, un polipéptido NH de *Leishmania* y un polipéptido SMT de *Leishmania*. En algunas partes de la descripción, el polipéptido de fusión comprende un polipéptido H2BN de *Leishmania*, un polipéptido p21 de *Leishmania*, un polipéptido NH de *Leishmania* y un polipéptido SMT de *Leishmania*. En algunas realizaciones, el polipéptido de fusión comprende un polipéptido NH de *Leishmania*, un polipéptido SMT

de Leishmania, un polipéptido H2BN de Leishmania y CpB. En algunas partes de la descripción, el polipéptido de fusión comprende un polipéptido NH de Leishmania, un polipéptido SMT de Leishmania y un polipéptido LeIF de Leishmania.

5 En otro aspecto, la descripción proporciona un polipéptido de fusión que comprende un polipéptido SMT de Leishmania y un polipéptido de Leishmania seleccionado del grupo que consiste en un polipéptido mtHSP70, un polipéptido CpB, un polipéptido H2BN, un polipéptido A2 y un polipéptido p21. En algunas realizaciones, el polipéptido de fusión comprende un polipéptido SMT de Leishmania, un polipéptido CpB de Leishmania y un polipéptido p21 de Leishmania. En algunas partes de la descripción, el polipéptido de fusión comprende un polipéptido SMT de Leishmania, un polipéptido mtHSP70 de Leishmania y un polipéptido H2BN de Leishmania. En algunas partes de la descripción, el polipéptido de fusión comprende un polipéptido SMT de Leishmania, un polipéptido mtHSP70 de Leishmania y un polipéptido p21 de Leishmania.

15 En algunas de las realizaciones de los polipéptidos descritos en la presente memoria, el polipéptido NH es de una *L. infantum*, *L. donovani*, *L. major*, *L. mexicana* o *L. braziliensis*. En algunas realizaciones, el polipéptido SMT, el polipéptido CpB o el polipéptido H2BN es de una *L. infantum*, *L. donovani*, una *L. major*, una *L. mexicana* o una *L. braziliensis*. En algunas realizaciones, el polipéptido de fusión comprende secuencias de al menos dos, al menos tres o al menos cuatro cepas diferentes de Leishmania.

En algunas partes de la descripción, el polipéptido mtHSP90 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 27, 28, 29 o 30 o una secuencia que tiene al menos un 90% (p. ej., un 91%, 92%, 93%, 94 %, 95%, 96%, 97%, 98% o 99%) de identidad con la SEQ ID NO: 27, 28, 29 o 30.

20 En algunas realizaciones, el polipéptido CpB comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 31 o una secuencia que tiene al menos un 90% (p. ej., un 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99%) de identidad con la SEQ ID NO: 31.

25 En algunas realizaciones, el polipéptido H2BN comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 32 o una secuencia que tiene al menos un 90% (p. ej., un 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99%) de identidad con la SEQ ID NO: 32.

En algunas partes de la descripción, el polipéptido A2 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 33 o 37, o una secuencia que tiene al menos un 90% (p. ej., un 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99%) de identidad con la SEQ ID NO: 33 o 37.

30 En algunas partes de la descripción, el polipéptido p21 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 34 o una secuencia que tiene al menos un 90% (p. ej., un 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99%) de identidad con la SEQ ID NO: 34.

En algunas partes de la descripción, el polipéptido LeIF comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 42 o una secuencia que tiene al menos un 90% (p. ej., un 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99%) de identidad con la SEQ ID N°: 42.

35 En algunas realizaciones, el polipéptido NH comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 35 o una secuencia que tiene al menos un 90% (p. ej., un 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99%) de identidad con la SEQ ID NO: 35.

40 En algunas realizaciones, el polipéptido SMT comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 36 o una secuencia que tiene al menos un 90% (p. ej., un 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99%) de identidad con la SEQ ID NO: 36.

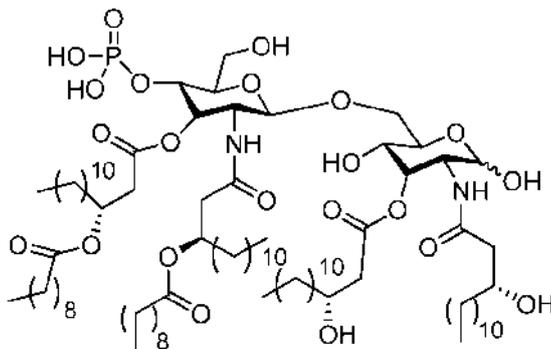
En otro aspecto, la descripción proporciona un polipéptido de fusión que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 39, 41, 43 o 44 o una secuencia que tenga al menos un 90% (p. ej., un 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99%) de identidad con la SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 39, 41, 43 o 44.

45 En otro aspecto, la descripción proporciona un polinucleótido aislado que codifica los polipéptidos descritos en la presente memoria, por ejemplo, que codifica un polipéptido de fusión que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 39, 41, 43 o 44 o una secuencia que tenga al menos un 90% (p. ej., un 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99%) de identidad con la SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 39, 41, 43 o 44. En algunas realizaciones, el polinucleótido comprende una secuencia de la SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 38 o 40 o una secuencia que tiene al menos un 90% (p. ej., un 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99%) de identidad con la SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 38 o 40.

55 En otro aspecto, la invención proporciona una composición que comprende un polipéptido de fusión como se describe en la presente memoria y/o un polinucleótido que codifica un polipéptido como se describe en la presente memoria, en combinación con al menos un inmunoestimulante. Se conocen muchos inmunoestimulantes y se pueden usar en

las composiciones de la presente memoria, cuyos ejemplos ilustrativos incluyen, pero no están limitados a, un oligonucleótido que contiene CpG, un lípido A sintético, MPLTM, 3D-MPLTM, saponinas, miméticos de saponina, AGPs, agonistas del receptor semejante a Toll, o una combinación de los mismos. Otros inmunostimulantes ilustrativos comprenden, por ejemplo, un agonista de α TLR4, un agonista de TLR7/8 y/o un agonista de TLR9. Otros inmunostimulantes comprenden, por ejemplo, imiquimod, gardiquimod y/o resiquimod.

En algunas realizaciones, el inmunostimulante tiene la fórmula:



En otro aspecto, la invención proporciona una composición para usar en un método para estimular una respuesta inmune frente a *Leishmania* en un mamífero, que comprende administrar a un mamífero que lo necesite una composición como se describe en la presente memoria.

En otro aspecto, la invención proporciona un método para detectar la infección por *Leishmania* en una muestra biológica, que comprende: (a) poner en contacto una muestra biológica con un polipéptido de fusión como se describe en la presente memoria; y (b) detectar en la muestra biológica la presencia de anticuerpos que se unen al polipéptido de fusión, detectando así la infección por *Leishmania* en una muestra biológica. Cualquier tipo de muestra biológica adecuado puede analizarse mediante el método, cuyos ejemplos ilustrativos pueden incluir, por ejemplo, sueros, sangre y saliva.

En ciertas realizaciones de los métodos de diagnóstico descritos, el polipéptido está unido a un soporte sólido. Por consiguiente, la presente descripción proporciona además reactivos de diagnóstico que comprenden un polipéptido como se describe en la presente memoria, inmovilizado sobre un soporte sólido.

En otro aspecto, la invención proporciona un kit de diagnóstico para detectar la infección por *Leishmania* en una muestra biológica, en donde el kit comprende un polipéptido como se describe en la presente memoria y un reactivo de detección. Se entenderá que el kit puede emplear un polipéptido de la invención en cualquiera de una variedad de formatos de ensayo conocidos en la técnica, que incluyen, por ejemplo, un ensayo de tira de ensayo de flujo lateral, un ensayo de plataforma de doble vía (DPP) y un ensayo ELISA. Estos kits y composiciones de la invención pueden ofrecer información valiosa para el diagnóstico en el punto de atención. Además, los kits y las composiciones también pueden usarse ventajosamente como kits de ensayo de cura para monitorizar el estado de la infección en un individuo infectado a lo largo del tiempo y/o en respuesta al tratamiento.

Debe entenderse que una, algunas o todas las propiedades de las diversas realizaciones descritas en el presente documento pueden combinarse para formar otras realizaciones de la presente invención. Estos y otros aspectos de la presente invención serán evidentes con referencia a la siguiente descripción detallada y dibujos adjuntos.

Breve descripción de los dibujos

La **Figura 1** muestra el análisis de citometría de flujo de cultivos de células de bazo de ratones inmunizados con 821S o disolución salina y reestimulados in vitro con disolución salina o 821S para el porcentaje de células que secretan IFN- γ , IL-2 o TNF. Las células T CD4 que producen múltiples (dos o más) citoquinas se denominan multifuncionales.

La **Figura 2** muestra inmunogenicidad tal como se mide por secreción de IFN- γ y de cultivos de células de bazo de ratones inmunizados con una mezcla de los polipéptidos individuales de la fusión 21SC (p21, SMT, y CPB). Los datos en los paneles A-F representan cultivos de células de bazo de ratones inmunizados con la mezcla (p21 + SMT + CpB), los polipéptidos individuales o disolución salina como control negativo y el polipéptido de fusión NS como control positivo, como se indica en el eje horizontal y luego se reestiman in vitro (una respuesta de recuerdo) con el antígeno indicado y la secreción de IFN- γ se mide por ELISA: A) Reestimulación con medio; B) Reestimulación con ConA; C) Polipéptido de fusión NS (fusión de NH y SMT); D) Reestimulación con p21; E) Reestimulación con SMT (S) y; F) Reestimulación con CpB (C).

La **Figura 3** muestra el análisis por PCR de la carga parasitaria en los hígados de ratones BALB/c inmunizados con

disolución salina, polipéptido de fusión NS, polipéptido de fusión NSC, CpB (C), NH (N) y SMT (S) y pulsados con promastigotes de *L. donovanni*.

5 La **Figura 4** muestra la inmunogenicidad medida por la secreción de IFN- γ de cultivos de células de bazo de ratones inmunizados con polipéptido de fusión NSC (NH, SMT y CpB). Los datos en los paneles A-F representan cultivos de células de bazo de ratones inmunizados con el polipéptido de fusión NSC, los polipéptidos individuales o disolución salina como control negativo y el polipéptido de fusión NS como control positivo como se indica en el eje horizontal y luego se reestiman in vitro (una respuesta de recuerdo) con el antígeno indicado y la secreción de IFN- γ se mide por ELISA: **A)** Reestimulación con medio; **B)** Reestimulación con ConA; **C)** Polipéptido de fusión NSC (fusión de NH, SMT y CpB); **D)** Reestimulación con NS; **E)** Reestimulación con SMT (S); **F)** Reestimulación con NH (N) y; **G)** Datos de compilación en A-F para cultivos de células de bazo de reestimulación con el polipéptido inmunizante concordante.

10 La **Figura 5** muestra el análisis de citometría de flujo de cultivos de células de bazo de ratones inmunizados con NS, NSC, CpB, NH o SMT y reestimulados in vitro con **A)** NH, **B)** SMT, **C)** CpB o **D)** NSC para determinar el porcentaje de células que secretan IFN - γ , IL-2, o TNF. Las células T CD4 que producen múltiples citoquinas se denominan multifuncionales.

15 La **Figura 6** muestra la inmunogenicidad medida por la secreción de IFN- γ de los cultivos de células de bazo de ratones inmunizados con **A)** el péptido NH, **B)** el polipéptido de fusión NS (fusión de NH y SMT) o **C)** el polipéptido de fusión NSC (fusión de NH, SMT y CpB) y reestimulados in vitro (una respuesta de recuerdo) con disolución salina (control negativo) o los antígenos indicados que incluyen: los péptidos individuales de las fusiones (NH, SMT, CMP), el polipéptido de fusión NS o el polipéptido de fusión NSC. La cuantificación de la secreción de IFN- γ se midió mediante ELISA. La **Figura 6D** muestra que los animales inmunizados con los polipéptidos de fusión demostraron mayores reducciones en la carga parasitaria cuando se inmunizaron con los polipéptidos de fusión (NS o NSC) en comparación con los polipéptidos individuales de las fusiones (NH, SMT o CpB).

20 La **Figura 7** muestra el análisis por PCR de la carga parasitaria en los hígados de ratones BALB/c inmunizados con disolución salina, polipéptidos individuales o los polipéptidos de fusión de la invención. El panel A muestra la carga parasitaria en los hígados de ratones inmunizados con disolución salina, el polipéptido P21 (21), el polipéptido mthHSP70 (8E), el polipéptido H2b (H) o el polipéptido de fusión NS y pulsados con promastigotes de *L. donovanni*. El panel B muestra la carga parasitaria en los hígados de ratones inmunizados con disolución salina, los polipéptidos de fusión NS, NSC, HNS, 21NS, 8NS, 821NS, 8HNS o H21NS pulsados con promastigotes de *L. donovanni*.

Breve descripción de los identificadores de secuencia

30 La SEQ ID NO: 1 es una secuencia de ácido nucleico que codifica el polipéptido de fusión NSC de la SEQ ID NO: 2.
La SEQ ID NO: 2 es una secuencia de aminoácidos para un polipéptido de fusión NSC.
La SEQ ID NO: 3 es una secuencia de ácido nucleico que codifica el polipéptido de fusión NSA de la SEQ ID NO: 4.
La SEQ ID NO: 4 es una secuencia de aminoácidos para un polipéptido de fusión NSA.
La SEQ ID NO: 5 es una secuencia de ácido nucleico que codifica el polipéptido de fusión NSAfl de la SEQ ID NO: 6.
35 La SEQ ID NO: 6 es una secuencia de aminoácidos para un polipéptido de fusión NSAfl.
La SEQ ID NO: 7 es una secuencia de ácido nucleico que codifica el polipéptido de fusión HNSA de la SEQ ID NO: 8.
La SEQ ID NO: 8 es una secuencia de aminoácidos para un polipéptido de fusión HNSA
La SEQ ID NO: 9 es una secuencia de ácido nucleico que codifica el polipéptido de fusión 8NSA de la SEQ ID NO: 10.
La SEQ ID NO: 10 es una secuencia de aminoácidos para un polipéptido de fusión 8NSA.
40 La SEQ ID NO: 11 es una secuencia de ácido nucleico que codifica el polipéptido de fusión 21NSA de la SEQ ID NO: 12.
La SEQ ID NO: 12 es una secuencia de aminoácidos para un polipéptido de fusión 21NSA.
La SEQ ID NO: 13 es una secuencia de ácido nucleico que codifica el polipéptido de fusión 821NS de la SEQ ID NO: 14.
La SEQ ID NO: 14 es una secuencia de aminoácidos para un polipéptido de fusión 821NS.
La SEQ ID NO: 15 es una secuencia de ácido nucleico que codifica el polipéptido de fusión HNS de la SEQ ID NO: 16.
45 La SEQ ID NO: 16 es una secuencia de aminoácidos para un polipéptido de fusión HNS.
La SEQ ID NO: 17 es una secuencia de ácido nucleico que codifica el polipéptido de fusión 8NS de la SEQ ID NO: 18.
La SEQ ID NO: 18 es una secuencia de aminoácidos para un polipéptido de fusión 8NS.

ES 2 728 865 T3

- La SEQ ID NO: 19 es una secuencia de ácido nucleico que codifica el polipéptido de fusión 21NS de la SEQ ID NO: 20.
- La SEQ ID NO: 20 es una secuencia de aminoácidos para un polipéptido de fusión 21NS.
- La SEQ ID NO: 21 es una secuencia de ácido nucleico que codifica el polipéptido de fusión 21SC de la SEQ ID NO: 22.
- La SEQ ID NO: 22 es una secuencia de aminoácidos para un polipéptido de fusión 21SC.
- 5 La SEQ ID NO: 23 es una secuencia de ácido nucleico que codifica el polipéptido de fusión 821S de la SEQ ID NO: 24.
- La SEQ ID NO: 24 es una secuencia de aminoácidos para un polipéptido de fusión 821S.
- La SEQ ID NO: 25 es una secuencia de ácido nucleico que codifica el polipéptido de fusión 8HS de la SEQ ID NO: 26.
- La SEQ ID NO: 26 es una secuencia de aminoácidos para el polipéptido de fusión 8HS.
- 10 La SEQ ID NO: 27 es una secuencia de aminoácidos de un fragmento carboxi terminal del supuesto polipéptido HSP70 mitocondrial (designado 8E u 8 en la presente memoria) de *Leishmania infantum* o *donovani*. El fragmento carboxi terminal 8E comprende los aminoácidos 509 a 660 del supuesto polipéptido HSP70 mitocondrial.
- La SEQ ID NO: 28 es una secuencia de aminoácidos de un fragmento carboxi terminal del supuesto polipéptido HSP70 mitocondrial (designado 8E u 8 en la presente memoria) de *Leishmania major*.
- 15 La SEQ ID NO: 29 es una secuencia de aminoácidos de un fragmento carboxi terminal del supuesto polipéptido HSP70 mitocondrial (designado 8E u 8 en la presente memoria) de *Leishmania Mexicana*.
- La SEQ ID NO: 30 es una secuencia de aminoácidos de un fragmento carboxi terminal del supuesto polipéptido HSP70 mitocondrial (designado 8E u 8 en la presente memoria) de *Leishmania braziliensis*.
- 20 La SEQ ID NO: 31 es una secuencia de aminoácidos de un fragmento carboxi terminal del polipéptido de cisteína polipeptidasa B (designado CpB, CPB o C en la presente memoria) de *Leishmania infantum*. El fragmento CpB comprende los aminoácidos 154 a 443 del polipéptido de cisteína polipeptidasa B.
- La SEQ ID NO: 32 es una secuencia de aminoácidos de un fragmento amino terminal del polipéptido de histona H2BN (designado como H2BN, h2Bn o H en la presente memoria) de *Leishmania infantum*. El fragmento amino terminal H2BN comprende los aminoácidos 1 a 46 del polipéptido de histona H2BN.
- 25 La SEQ ID NO: 33 es una secuencia de aminoácidos de un polipéptido A2 maduro (designado como A en la presente memoria) de *Leishmania donovani*. El polipéptido A2 maduro comprende los aminoácidos 23 a 236 del polipéptido A2.
- La SEQ ID NO: 34 es una secuencia de aminoácidos de un polipéptido de antígeno p21 de longitud completa (designado p21 o 21 en la presente memoria) de *Leishmania infantum*. El polipéptido 21 comprende los aminoácidos 1 a 191 del antígeno p21.
- 30 La SEQ ID NO: 35 es una secuencia de aminoácidos de un polipéptido de nucleósido hidrolasa no específico de longitud completa (designado NH o H en la presente memoria) de *Leishmania infantum/donovani*. El polipéptido de longitud completa comprende el aminoácido 1 a 314 del polipéptido de nucleósido hidrolasa no específico.
- 35 La SEQ ID NO: 36 es una secuencia de aminoácidos de un polipéptido de esteroil 24-c-metiltransferasa de longitud completa que carece de la Metionina N terminal (codón de iniciación) (designado SMT o S en la presente memoria) de *Leishmania infantum*. El polipéptido de longitud completa menos la metionina N terminal comprende los aminoácidos 2 a 353 del polipéptido esteroil 24-c-metil-transferasa de longitud completa.
- La SEQ ID NO: 37 es una secuencia de aminoácidos de un polipéptido A2 de longitud completa (designado Afl en la presente memoria) de *Leishmania donovani*. El polipéptido Afl comprende los aminoácidos 1 a 236 del polipéptido A2.
- La SEQ ID NO: 38 es una secuencia de ácido nucleico que codifica el polipéptido de fusión 8HNS de la SEQ ID NO: 39.
- La SEQ ID NO: 39 es una secuencia de aminoácidos para un polipéptido de fusión 8HNS.
- 40 La SEQ ID NO: 40 es una secuencia de ácido nucleico que codifica el polipéptido de fusión H21NS de la SEQ ID NO: 41.
- La SEQ ID NO: 41 es una secuencia de aminoácidos para un polipéptido de fusión H21NS.
- La SEQ ID NO: 42 es una secuencia de aminoácidos de un supuesto polipéptido del factor de iniciación eucariótico 4a (designado Leif o L en la presente memoria) de *Leishmania major*. El polipéptido Leif comprende los aminoácidos 1 a 226 del supuesto polipéptido del factor de iniciación eucariótico 4a.
- 45 La SEQ ID NO: 43 es una secuencia de aminoácidos del polipéptido de fusión NSL.

La SEQ ID NO: 44 es una secuencia de aminoácidos para el polipéptido de fusión HNSC.

Descripción detallada

La práctica de la presente invención empleará, a no ser que se indique otra cosa, técnicas convencionales de biología molecular, ADN recombinante y química, que están dentro de los conocimientos de la técnica. Dichas técnicas se explican completamente en la bibliografía. Véase, por ejemplo, Molecular Cloning A Laboratory Manual, 2ª ed., Sambrook et al., Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press: (1989); DNA Cloning, volúmenes I y II (DN Glover ed., 1985); Oligonucleotide Synthesis (MJ Gait ed., 1984); Mullis et al., Patente de EE.UU. No: 4.683.195; Nucleic Acid Hybridization (BD Hames y SJ Higgins eds. 1984); B. Perbal, A Practical Guide To Molecular Cloning (1984); el tratado, Methods In Enzymology (Academic Press, Inc., NY); y en Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1989).

Como se señaló anteriormente, la presente invención, que se expone en las reivindicaciones adjuntas, se dirige generalmente a composiciones y métodos para prevenir, tratar y detectar leishmaniasis. Las composiciones de la invención incluyen, por ejemplo, polipéptidos que incluyen polipéptidos de fusión que comprenden varias partes inmunogénicas de proteínas de Leishmania, en donde las partes y variantes preferiblemente retienen sustancialmente las mismas propiedades inmunogénicas o similares que una proteína de Leishmania de longitud completa correspondiente. Las estrategias de inmunización que usan composiciones de la invención se pueden aplicar a la protección in vivo frente a, por ejemplo, *L. infantum*, *L. donovani* y *L. major*, que son agentes causales de VL en seres humanos y perros. La presente invención también contempla, en otras realizaciones, el uso de polipéptidos que incluyen polipéptidos de fusión descritos en la presente memoria en aplicaciones de diagnóstico, que incluyen, pero no se limitan a, serodiagnóstico y ensayos de sangre completa en pacientes y perros, preferiblemente en un formato susceptible de proporcionar resultados diagnósticos rápidos en el punto de atención, como un ensayo de flujo lateral o un ensayo de plataforma de doble vía.

Polipéptidos de Leishmania y usos de los mismos

En un aspecto general, la presente descripción proporciona polipéptidos de Leishmania aislados, como se describe en la presente memoria, incluyendo polipéptidos de fusión y composiciones que contienen los mismos.

La descripción proporciona un polipéptido de fusión que comprende un polipéptido de nucleótido hidrolasa (NH) no específico de Leishmania o una variante del mismo, un polipéptido de esterol 24-c-metiltransferasa (SMT) de Leishmania o una variante del mismo, y un polipéptido de Leishmania seleccionado del grupo que consiste en un supuesto polipéptido HSP70 mitocondrial (mtHSP70), un polipéptido de cisteína polipeptidasa B (CpB), un polipéptido de histona H2BN (H2BN), un polipéptido A2, un polipéptido de antígeno p21 (p21) y un polipéptido de factor de iniciación eucariótico putativo 4a (LeIF) o una variante de estos polipéptidos.

La descripción proporciona un polipéptido de fusión que comprende un polipéptido SMT de Leishmania o una variante del mismo, y un polipéptido de Leishmania seleccionado del grupo que consiste en un polipéptido mtHSP70, un polipéptido CpB, un polipéptido H2BN, un polipéptido A2 y un polipéptido p21 o una variante de estos polipéptidos.

Los polipéptidos y polipéptidos de fusión descritos en la presente memoria pueden generar una respuesta inmune o una respuesta inmune efectiva frente a Leishmania. Los polipéptidos y los polipéptidos de fusión pueden tener una o más de las siguientes características: 1) una reducción en la carga parasitaria en huéspedes inmunizados después de un pulso experimental con una infección por el parásito Leishmania ya sea por inoculación directa de promastigotes o modelos de infección natural tales como las picaduras de moscas de arena infectadas; 2) secreción de IFN y en cultivos de células de bazo in vitro de ratones inmunizados con los polipéptidos individuales o polipéptidos de fusión de la invención después de la incubación con el polipéptido de fusión concordante o polipéptidos individuales del polipéptido de fusión; 3) secreción de IFN γ in vitro en cultivos de células de bazo de ratones inmunizados con los polipéptidos individuales o polipéptidos de fusión de la invención después de la incubación con parásito en bruto; 4) generación de células Th1 multifuncionales específicas de antígeno, por ejemplo, células T CD4 que producen múltiples citoquinas indicativas de un fenotipo Th1 tales como IFN γ , TNF e IL-2 o IFN γ y TNF; y o 5) mejora o aumento del reconocimiento inmune de uno o más polipéptidos individuales, cuando se presentan en el contexto de un polipéptido de fusión, medido, por ejemplo, por la secreción de citoquinas tales como γ IFN, o la titulación de la presencia de anticuerpos o respuestas celulares al polipéptido. Los métodos para ensayar las respuestas inmunes son conocidos en la técnica y se describen con detalle en el Ejemplo 2.

Tal y como se usa en la presente memoria, el término "polipéptido" o "proteína" engloba cadenas de aminoácidos de cualquier longitud, incluyendo proteínas de longitud completa, en donde los residuos de aminoácidos están unidos por enlaces covalentes. Un polipéptido que comprende una parte inmunogénica de un polipéptido o proteína de Leishmania puede consistir únicamente en una parte inmunogénica, puede contener dos o más partes inmunogénicas y/o puede contener secuencias adicionales. Las secuencias adicionales pueden derivar de un polipéptido o proteína de Leishmania nativo o pueden ser heterólogas, y dichas secuencias heterólogas pueden (pero no necesariamente) ser inmunogénicas.

Diferentes polipéptidos de Leishmania en los polipéptidos de fusión pueden disponerse en el polipéptido de fusión en cualquier orden. Por ejemplo, cualquier polipéptido particular del polipéptido de fusión puede estar localizado hacia el

extremo C-terminal del polipéptido de fusión o el extremo N-terminal del polipéptido o en el centro del polipéptido de fusión (es decir, localizado entre al menos otros dos polipéptidos en el polipéptido de fusión). Diferentes polipéptidos de Leishmania pueden estar unidos por una secuencia enlazadora de cualquier longitud.

5 Un "polipéptido aislado" es uno que se elimina de su entorno original. Por ejemplo, una proteína natural se aísla si se separa de algunos o todos los materiales coexistentes en el sistema natural. Preferiblemente, dichos polipéptidos son al menos aproximadamente 90% puros, más preferiblemente al menos aproximadamente 95% puros y lo más preferiblemente al menos aproximadamente 99% puros. Un experto en la técnica apreciará que los fragmentos de polipéptidos antigénicos también podrían obtenerse a partir de los ya disponibles en la técnica. Los polipéptidos de la invención, los fragmentos antigénicos/inmunogénicos de los mismos y otras variantes pueden prepararse usando técnicas recombinantes y/o sintéticas convencionales.

El polipéptido de Leishmania usado en un polipéptido de fusión de la presente invención puede ser polipéptidos de longitud completa, de longitud sustancialmente completa, o variantes de los mismos como se describe en la presente memoria. Alternativamente, un polipéptido de fusión o una composición de la invención puede comprender o consistir en partes o fragmentos inmunogénicos de un polipéptido de Leishmania de longitud completa, o variantes del mismo.

15 Una parte inmunogénica de un polipéptido de Leishmania es una parte que es capaz de incitar una respuesta inmune (es decir, celular y/o humoral) en un paciente infectado por Leishmania actualmente o previamente (tal como un ser humano o un mamífero (p. ej., un perro)) y/o en cultivos de células de ganglios linfáticos o células mononucleares de sangre periférica (PBMC) aisladas de individuos infectados por Leishmania actualmente o previamente. Las células en las que se incita una respuesta pueden comprender una mezcla de tipos de células o pueden contener células de componentes aislados (incluyendo, pero no limitado a, células T, células NK, macrófagos, monocitos y/o células B).
20 Las partes inmunogénicas de un polipéptido de fusión de la invención son capaces de inducir la proliferación de células T y/o una respuesta de citoquinas de tipo Th1 predominantemente (p. ej., la producción de IL-2, IFN- γ , y/o TNF- α por células T y/o células NK, y/o la producción de IL-12 por monocitos, macrófagos y/o células B). Las partes inmunogénicas de los antígenos descritos en la presente memoria pueden identificarse generalmente usando técnicas conocidas por los expertos en la técnica, incluyendo los métodos representativos resumidos en Paul, *Fundamental Immunology*, 5^a ed., Lippincott Williams & Wilkins, 2003 y las referencias citadas en este documento. Dichas técnicas incluyen el cribado de polipéptidos de fusión para determinar su capacidad de reaccionar con anticuerpos específicos de antígenos, antisueros y/o líneas de células T o clones. Tal y como se usa en la presente memoria, los antisueros y los anticuerpos son "específicos de antígeno" si se unen específicamente a un antígeno (es decir, reaccionan con la proteína en un inmunoensayo y no reaccionan de manera detectable con proteínas no relacionadas). Dichos antisueros y anticuerpos pueden prepararse como se describe en la presente memoria y usando técnicas bien conocidas.

Las partes inmunogénicas de una Leishmania pueden ser esencialmente de cualquier longitud; siempre que retengan una o más de las regiones inmunogénicas que son responsables o contribuyen a la protección in vivo proporcionada frente a la leishmaniasis por uno o más polipéptidos de fusión de la invención, como se describe en la presente memoria. La capacidad de una parte inmunogénica de reaccionar con antisueros específicos de antígeno puede mejorarse o no cambiarse, en relación con la proteína nativa, o puede disminuir en menos del 50%, y preferiblemente menos del 20%, en relación con la proteína nativa. Las partes ilustrativas generalmente tendrán una longitud de al menos 10, 15, 25, 50, 150, 200, 250, 300 o 350 aminoácidos, o más, hasta e incluyendo el polipéptido de Leishmania de longitud completa.

Un polipéptido de Leishmania descrito en la presente memoria incluye un polipéptido mtHSP70, un polipéptido CpB, un polipéptido H2BN, un polipéptido A2, un polipéptido p21, un polipéptido LeiF, un polipéptido NH y un polipéptido SMT. En algunas realizaciones, el polipéptido o proteína de Leishmania es de una cepa de *L. infantum*, *L. donovani*, *L. major*, *L. mexicana* o *L. braziliensis*. En algunas realizaciones, el polipéptido de fusión comprende secuencias de al menos dos, al menos tres, al menos cuatro cepas de Leishmania diferentes. En algunas realizaciones, estos polipéptidos de Leishmania (incluyendo las partes inmunogénicas) incluyen cualquier variante natural.

En una realización particular, las partes inmunogénicas de un polipéptido de Leishmania son aquellas que, cuando se usan en combinación, son capaces de proporcionar protección frente a, por ejemplo, en un ensayo in vivo como se describe en la presente memoria, o el diagnóstico serológico de especies de Leishmania tales como *L. donovani*, *L. major* y/o *L. infantum*, que se cree que son agentes causantes de LV en seres humanos y perros. Además, los polipéptidos (incluyendo los polipéptidos de fusión) de la invención también pueden ser útiles para bloquear la transmisión del agente causante de LV de perros a seres humanos, p. ej., reduciendo o eliminando el número de parásitos en la sangre y la piel de los perros infectados.

Como reconocería el experto en la técnica, una composición polipeptídica de la invención también puede comprender uno o más polipéptidos que son inmunológicamente reactivos con células T y/o anticuerpos generados frente a un polipéptido de la invención, particularmente un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos descrita en la presente memoria, o frente a un fragmento inmunogénico o variante del mismo. En una realización específica, el polipéptido es un polipéptido de fusión, como se describe en la presente memoria.

Como se señaló, en diversas realizaciones de la presente invención, los polipéptidos de fusión generalmente

comprenden al menos una parte o variante inmunogénica de los polipéptidos de Leishmania descritos en la presente memoria. En algunos casos, se identificarán las partes inmunogénicas preferidas que tengan un nivel de actividad inmunogénica mayor que la del polipéptido de longitud completa correspondiente, p. ej., que tengan una actividad inmunogénica mayor de aproximadamente el 100% o el 150% o más. En particular, la inmunogenicidad del polipéptido de fusión de longitud completa tendrá una inmunogenicidad aditiva, o mayor que la aportada por cada una de las partes antigénicas/inmunogénicas contenidas en el mismo.

En otro aspecto, los polipéptidos de fusión de la presente invención pueden contener múltiples copias de fragmentos de polipéptidos, repeticiones de fragmentos de polipéptidos, o fragmentos de polipéptidos multiméricos, incluyendo fragmentos antigénicos/inmunogénicos, tales como polipéptidos de Leishmania que comprenden al menos aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más fragmentos contiguos de un polipéptido de Leishmania, en cualquier orden, e incluyendo todas las longitudes de una composición polipeptídica expuesta en la presente memoria, o aquellas codificadas por una secuencia de polinucleótidos expuesta en la presente memoria.

En algunas partes de la descripción, una parte inmunogénica de un polipéptido mtHSP70 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 27, 28, 29 o 30, o una secuencia que tiene al menos el 85% de identidad (p. ej., al menos el 90% o al menos el 95%) con la SEQ ID NO: 27, 28, 29 o 30. En algunas realizaciones, una parte inmunogénica de un polipéptido CpB comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 31, o una secuencia que tiene al menos el 90% o al menos el 95% de la SEQ ID NO: 31. En algunas realizaciones, la parte inmunogénica de un H2BN comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 32, o una secuencia que tiene al menos el 90% o al menos el 95% de la SEQ ID NO: 32. En algunas partes de la descripción, un polipéptido A2 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 33 o 37, o una secuencia que tiene al menos el 85% de identidad (p. ej., al menos el 90% o al menos el 95%) con la SEQ ID NO: 33 o 37. En algunas partes de la descripción, un polipéptido p21 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 34, o una secuencia que tiene al menos el 85% de identidad (p. ej., al menos el 90% o al menos el 95%) con la SE ID NO: 34. En algunas partes de la descripción, un polipéptido LeIF comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 42, o una secuencia que tiene al menos el 85% de identidad (p. ej., al menos el 90% o al menos el 95%) con la SEQ ID NO: 42. En algunas realizaciones, un polipéptido NH comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 35, o una secuencia que tiene al menos el 90% o al menos el 95% de la SEQ ID NO: 35. En algunas realizaciones, el polipéptido NH comprende las secuencias polipeptídicas NH (p. ej., una parte inmunogénica de la SEQ ID NO: 1, 3 o 5 en la Pub. de Solic. de Pat. de EE. UU. No. 2012/0114688 o una secuencia que tiene al menos un 90% o al menos un 95% de identidad con el mismo) como se describe en la Pub. de Solic. de Pat. de EE. UU. No. 2012/0114688. En algunas realizaciones, un polipéptido SMT comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 36 o una secuencia que tiene al menos el 90% o al menos el 95% de la SEQ ID NO: 36. En algunas realizaciones, el polipéptido de SMT comprende una secuencia de SMT descrita en las Pub. de Solic. de Pat. de EE.UU. Nos. 2009/0041798 y 2012/0114688 (p. ej., la SEQ ID NO: 7, 9 u 11 en US 2012/0114688 o una secuencia que tiene al menos un 90% o al menos un 95% de identidad con la misma).

En algunas realizaciones, el polipéptido de fusión comprende, consiste en, o consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 2, o 44 o una secuencia que tiene al menos un 90%, al menos un 95% o al menos un 98% de identidad con la misma.

Los polipéptidos de fusión descritos en la presente memoria pueden contener un enlazador amino terminal opcional que comprende un codón de inicio de metionina y seis aminoácidos de histidina (etiqueta His) codificados por los polinucleótidos 5'-ATGCATCAC CATCAC CATCAC3' (SEQ ID NO: 45) inmediatamente en 5' respecto a la metionina de inicio codificada por un codón ATG del polipéptido de fusión. Para los polipéptidos de fusión en donde el primer polipéptido es el extremo carboxi del supuesto polipéptido mtHSP70 (8 u 8E), el polinucleótido de fusión etiquetado con his no comprende un codón ATG en 3' antes del primer polinucleótido que codifica 8E.

En otro aspecto más, la presente invención proporciona polipéptidos de fusión que comprenden una o más variantes del polipéptido de Leishmania (incluyendo partes inmunogénicas) descritas en la presente memoria. Las variantes de polipéptidos generalmente englobadas generalmente por la presente descripción típicamente exhibirán al menos aproximadamente el 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% o más de identidad (determinada como se describe a continuación), a lo largo de su longitud, con una secuencia polipeptídica mostrada en la presente memoria.

En otras realizaciones relacionadas, una "variante" de polipéptido incluye polipéptidos que difieren de una proteína nativa en una o más sustituciones, deleciones, adiciones y/o inserciones, de manera que la inmunogenicidad deseada del polipéptido variante no disminuye sustancialmente con respecto a un nativo polipéptido.

Por ejemplo, ciertas variantes de la invención incluyen polipéptidos de la invención que se han modificado para reemplazar uno o más residuos de cisteína con residuos alternativos. Dichos polipéptidos se denominan en lo sucesivo polipéptidos modificados en cisteína o polipéptidos de fusión modificados en cisteína. Preferiblemente, los polipéptidos modificados retienen sustancialmente las mismas propiedades inmunogénicas o similares que los polipéptidos no modificados correspondientes. En una realización más específica, los residuos de cisteína se reemplazan con residuos de serina debido a la similitud en la disposición espacial de sus respectivas cadenas laterales. Sin embargo, será evidente para un experto en la técnica que cualquier aminoácido que sea incapaz de formar enlaces disulfuro intercadena o intracadena puede usarse como un reemplazo para la cisteína. Cuando todos o sustancialmente todos

los residuos de cisteína en un polipéptido o polipéptido de fusión de esta invención se reemplazan, la variante resultante modificada en cisteína puede ser menos propensa a la agregación y, por lo tanto, más fácil de purificar, más homogénea y/o obtenible con mayores rendimientos después de la purificación.

- 5 En una parte de la descripción, la capacidad de una variante para reaccionar con antisueros específicos de antígeno puede mejorarse o no cambiarse, en relación con la proteína nativa, o puede disminuirse en menos del 50%, y preferiblemente en menos del 20%, en relación con un polipéptido nativo o de control correspondiente. En partes particulares de la descripción, una variante de un polipéptido de *Leishmania* es una capaz de proporcionar protección, por ejemplo, en un ensayo in vivo como se describe en la presente memoria, frente a una especie de *Leishmania* tal como *L. donovani*, *L. infantum* y/o *L. major*.
- 10 En partes particulares de la descripción, un polipéptido de fusión de la presente invención comprende al menos 1, al menos 2, al menos 3, al menos 4, al menos 5, al menos 6, al menos 7, al menos 8, al menos 9, o al menos 10 o más sustituciones, deleciones, adiciones y/o inserciones dentro de un polipéptido de *Leishmania*, donde el polipéptido de fusión es capaz de proporcionar protección frente a, por ejemplo, en un ensayo in vivo como se describe en la presente memoria, especies de *Leishmania* tales como *L. donovani*, *L. major* y/o *L. infantum*.
- 15 En partes relacionadas de la descripción, un polipéptido de fusión de la presente invención comprende al menos 1, al menos 2, al menos 3, al menos 4, al menos 5, al menos 6, al menos 7, al menos 8, al menos 9, o al menos 10 o más sustituciones, deleciones, adiciones y/o inserciones dentro de un polipéptido de *Leishmania*, donde el polipéptido de fusión es capaz de serodiagnóstico de especies de *Leishmania* tales como *L. donovani*, *L. major* y/o *L. infantum*.
- 20 En muchos casos, una variante contendrá sustituciones conservativas. Una "sustitución conservativa" es una en la que un aminoácido se sustituye por otro aminoácido que tiene propiedades similares, de manera tal que un experto en la técnica de la química de péptidos esperaría que la estructura secundaria y la naturaleza hidropática del polipéptido se mantuvieran sustancialmente inalteradas. Como se describió anteriormente, se pueden hacer modificaciones en la estructura de los polinucleótidos y polipéptidos de la presente invención y aún así obtener una molécula funcional que codifique un polipéptido variante o derivado con características deseables, p. ej., con características inmunogénicas. Cuando se desea alterar la secuencia de aminoácidos de un polipéptido para crear un equivalente, o incluso una a variante o parte inmunogénica mejorada de un polipéptido de la invención, un experto en la técnica cambiará típicamente uno o más de los codones de la secuencia codificadora de ADN según la Tabla 1.
- 25 Por ejemplo, ciertos aminoácidos pueden ser sustituidos por otros aminoácidos en una estructura proteica sin pérdida apreciable de capacidad de unión interactiva con estructuras tales como, por ejemplo, regiones de unión a antígeno de anticuerpos o sitios de unión en moléculas de sustrato. Dado que la capacidad interactiva y la naturaleza de una proteína son las que definen la actividad funcional biológica de esa proteína, se pueden realizar ciertas sustituciones en la secuencia de aminoácidos en una secuencia de proteína y, por supuesto, su secuencia codificadora de ADN subyacente, y sin embargo obtener una proteína con propiedades similares. Por lo tanto, se contempla que pueden realizarse diversos cambios en las secuencias peptídicas de las composiciones descritas, o secuencias de ADN correspondientes que codifican dichos péptidos sin pérdida apreciable de su utilidad o actividad biológica.
- 30
- 35

Tabla 1

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

Treonina	Thr	T	ACA	ACC	ACG	ACU
Valina	Val	V	GUA	GUC	GUG	GUU
Triptófano	Trp	W	UGG			
Tirosina	Tyr	Y	UAC	UAU		

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

Se sabe en la técnica que ciertos aminoácidos pueden sustituirse por otros aminoácidos que tienen un índice o puntuación hidropático similar y aún así pueden dar lugar a una proteína con actividad biológica similar, es decir, aún así obtener una proteína biológica funcionalmente equivalente. Al hacer dichos cambios, se prefiere la sustitución de aminoácidos cuyos índices hidropáticos están dentro de ± 2 , se prefieren particularmente aquellos dentro de ± 1 , y se prefieren aún más particularmente aquellos dentro de $\pm 0,5$. También se entiende en la técnica que la sustitución de aminoácidos similares se puede hacer de manera efectiva sobre la base de la hidrofiliidad.

Como se detalla en la Patente de EE.UU. 4.554.101, los siguientes valores de hidrofiliidad se han asignado a los residuos 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); metionina (-1,3); valina (-1,5); leucina (-1,8); isoleucina (-1,8); tirosina (-2,3); fenilalanina (-2,5); triptófano (-3,4). Se entiende que un aminoácido puede sustituirse por otro que tenga un valor de hidrofiliidad similar y aún así obtener una proteína biológicamente equivalente y, en particular, una proteína inmunológicamente equivalente. En dichos cambios, se prefiere la sustitución de aminoácidos cuyos valores de hidrofiliidad están dentro de ± 2 , se prefieren particularmente aquellos dentro de ± 1 , y se prefieren aún más particularmente aquellos dentro de $\pm 0,5$.

Como se describió anteriormente, las sustituciones de aminoácidos se basan generalmente, por lo tanto, en la similitud relativa de los sustituyentes de la cadena lateral del aminoácido, por ejemplo, su hidrofobicidad, hidrofiliidad, carga, tamaño y similares. Las sustituciones ejemplares que toman en consideración varias de las características anteriores son bien conocidas por los expertos en la técnica e incluyen: arginina y lisina; glutamato y aspartato; serina y treonina; glutamina y asparagina; y valina, leucina e isoleucina.

Las sustituciones de aminoácidos pueden realizarse adicionalmente sobre la base de la similitud en polaridad, carga, solubilidad, hidrofobicidad, hidrofiliidad y/o la naturaleza anfipática de los residuos. Por ejemplo, los aminoácidos cargados negativamente incluyen ácido aspártico y ácido glutámico; los aminoácidos cargados positivamente incluyen lisina y arginina; y los aminoácidos con grupos de cabeza polar sin carga que tienen valores de hidrofiliidad similares incluyen leucina, isoleucina y valina; glicina y alanina; asparagina y glutamina; y serina, treonina, fenilalanina y tirosina. Otros grupos de aminoácidos que pueden representar cambios conservativos incluyen: (1) ala, pro, gly, glu, asp, gln, asn, ser, thr; (2) cys, ser, tyr, thr; (3) val, ile, leu, met, ala, phe; (4) lys, arg, his; y (5) phe, tyr, trp, his. Una variante también, o alternativamente, puede contener cambios no conservativos. En una realización preferida, los polipéptidos variantes difieren de una secuencia nativa por sustitución, eliminación o adición de cinco aminoácidos o menos. Las variantes también (o alternativamente) pueden modificarse, por ejemplo, por la delección o adición de aminoácidos que tienen una influencia mínima en la inmunogenicidad, la estructura secundaria y la naturaleza hidropática del polipéptido.

Como se señaló anteriormente, los polipéptidos pueden comprender una secuencia señal (o líder) en el extremo N-terminal de la proteína, que dirige la transferencia de la proteína de forma co-traducciona o post-traducciona. Estas secuencias pueden eliminarse en los polipéptidos que se producen. El polipéptido también puede conjugarse con un enlazador u otra secuencia para facilitar la síntesis, purificación o identificación del polipéptido (p. ej., etiqueta de polihistidina (6XHis), GST, MBP, TAP/TAG, epítipo FLAG, epítipo MYC, epítipo V5, epítipo de VSV-G, etc.), o para potenciar la unión del polipéptido a un soporte sólido. Por ejemplo, un polipéptido puede conjugarse con una región Fc de inmunoglobulina.

Cuando se comparan secuencias de polinucleótidos o polipéptidos, se dice que dos secuencias son "idénticas" si la secuencia de nucleótidos o aminoácidos en las dos secuencias es la misma cuando se alinean para obtener la máxima correspondencia, como se describe a continuación. Las comparaciones entre dos secuencias se realizan típicamente comparando las secuencias en una ventana de comparación para identificar y comparar regiones locales de similitud de secuencia. Una "ventana de comparación", tal y como se usa en la presente memoria, se refiere a un segmento de al menos aproximadamente 20 posiciones contiguas, generalmente de 30 a aproximadamente 75, de 40 a aproximadamente 50, en las que se puede comparar una secuencia con una secuencia de referencia del mismo

número de posiciones contiguas después de que las dos secuencias se alinean de manera óptima.

La alineación de secuencias para la comparación se puede realizar usando, por ejemplo, el programa Megalign en el paquete de software de bioinformática Lasergene (DNASTAR, Inc., Madison, WI), usando los parámetros predeterminados. Este programa incorpora varios esquemas de alineación descritos en las siguientes referencias: Dayhoff, MO. (1978) A model of evolutionary change in proteins - Matrices for detecting distant relationships. En Dayhoff, MO (ed.) Atlas of Protein Sequence and Structure, National Biomedical Research Foundation, Washington DC vol. 5, supl. 3, p. 345-358; Hein J. (1990) Unified Approach to Alignment and Phylogenesis p. 626-645 Methods in Enzymology vol. 183, Academic Press, Inc., San Diego, CA; Higgins, DG y Sharp, PM (1989) CABIOS 5: 151-153; Myers, EW y Müller W. (1988) CABIOS 4: 11-17; Robinson, ED. (1971) Comb. Theor 11: 105; Santou, N. Nes, M. (1987) MoL Biol. Evol. 4: 406-425; Sneath, PHA y Sokal, RR. (1973) Numerical Taxonomy - the Principles and Practice of Numerical Taxonomy, Freeman Press, San Francisco, CA; Wilbur, WJ y Lipman, DJ. (1983) Proc. Natl Acad., Sci. USA 80: 726-730.

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

Un ejemplo de algoritmos que son adecuados para determinar el porcentaje de identidad de secuencia y la similitud de secuencia son los algoritmos BLAST y BLAST 2.0, que se describen en Altschul et al. (1977) Nucl. Acidos Res. 25: 3389-3402 y Altschul et al. (1990) J. Mol. Biol. 215: 403-410, respectivamente. BLAST y BLAST 2.0 se pueden usar, por ejemplo, con los parámetros descritos en la presente memoria, para determinar el porcentaje de identidad de secuencia para los polinucleótidos y polipéptidos de la invención. El software para realizar los análisis de BLAST está disponible públicamente a través del National Center for Biotechnology Information. En un ejemplo ilustrativo, las puntuaciones acumulativas se pueden calcular usando, para secuencias de nucleótidos, los parámetros M (puntuación de recompensa para un par de residuos coincidentes; siempre > 0) y N (puntuación de penalización para residuos no coincidentes; siempre < 0). Para las secuencias de aminoácidos, se puede usar una matriz de puntuación para calcular la puntuación acumulativa. La extensión de los aciertos de palabra en cada dirección se detiene cuando la puntuación de alineación acumulada cae en la cantidad X desde su valor máximo alcanzado; la puntuación acumulativa llega a cero o por debajo, debido a la acumulación de una o más alineaciones de residuos con puntuación negativa; o se llega al final de cualquiera de las secuencias. Los parámetros del algoritmo BLAST W, T y X determinan la sensibilidad y la velocidad de la alineación. El programa BLASTN (para secuencias de nucleótidos) usa como valor predeterminado una longitud de palabra (W) de 11, y una expectativa (E) de 10, y la matriz de puntuación BLOSUM62 (véase Henikoff y Henikoff (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 10915) alineaciones, (B) de 50, expectativa (E) de 10, M = 5, N = -4 y una comparación de ambas cadenas.

Preferiblemente, el "porcentaje de identidad de secuencia" se determina comparando dos secuencias alineadas óptimamente en una ventana de comparación de al menos 20 posiciones, en donde la parte de la secuencia polinucleotídica o polipeptídica en la ventana de comparación puede comprender adiciones o deleciones (es decir, huecos) del 20 por ciento o menos, generalmente del 5 al 15 por ciento, o del 10 al 12 por ciento, en comparación con las secuencias de referencia (que no comprenden adiciones o deleciones) para una alineación óptima de las dos secuencias. El porcentaje se calcula determinando el número de posiciones en las que se producen las bases de ácido nucleico o residuos de aminoácidos idénticos en ambas secuencias para obtener el número de posiciones coincidentes, dividiendo el número de posiciones coincidentes por el número total de posiciones en la secuencia de referencia (es decir, el tamaño de la ventana) y multiplicando los resultados por 100 para rendir el porcentaje de identidad de secuencia.

Por lo tanto, como se señaló anteriormente, la presente descripción engloba secuencias de polinucleótidos y polipéptidos que tienen una identidad sustancial con las secuencias descritas en la presente memoria, por ejemplo, aquellas que comprenden al menos el 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% o más de identidad de secuencia en comparación con una secuencia de polinucleótidos o polipéptidos de esta invención (p. ej., como se muestra en las SEQ ID NOs: 1-44) usando los métodos descritos en la presente memoria, (p. ej., análisis BLAST usando parámetros estándar, como se describe a continuación). Un experto en esta técnica reconocerá que estos valores pueden ajustarse de manera apropiada para determinar la identidad correspondiente de proteínas codificadas por dos secuencias de nucleótidos teniendo en cuenta la degeneración de los codones, la similitud de aminoácidos, la posición del marco de lectura y similares. Además, los expertos en la técnica entenderán que los polipéptidos de fusión de las presentes partes de la descripción, pueden comprender al menos 2, al menos 3, o al menos 4 o más partes antigénicas/inmunogénicas o fragmentos de un polipéptido que comprenden al menos el 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% o más, de identidad de secuencia con un polipéptido de *Leishmania* que es capaz de proporcionar protección frente a, por ejemplo en un ensayo in vivo como se describe en la presente memoria, o serodiagnóstico de especies de *Leishmania* tales como *L. donovani*, *L. major* y/o *L. infantum*.

En otro aspecto de las partes de la descripción, se proporcionan polipéptidos de fusión que comprenden al menos una parte inmunogénica de un polipéptido y además comprenden una pareja de fusión heteróloga, así como polinucleótidos

que codifican dichos polipéptidos de fusión. Por ejemplo, en una parte de la descripción, un polipéptido de fusión comprende una o más partes o fragmentos inmunogénicos de un polipéptido de *Leishmania* y una o más secuencias inmunogénicas de *Leishmania* adicionales, que se unen a través de un enlace peptídico en una única cadena de aminoácidos.

5 En otra parte de la descripción, un polipéptido de fusión puede comprender múltiples partes antigénicas o inmunogénicas de *Leishmania*. En algunas partes de la descripción, una parte inmunogénica es una parte de un antígeno que reacciona con muestras de sangre de individuos infectados con *Leishmania* (es decir, un epítipo está unido específicamente por uno o más anticuerpos y/o células T presentes en dichas muestras de sangre). Las partes inmunogénicas en un polipéptido de fusión pueden unirse covalentemente, ya sea directamente o mediante un
10 enlazador de aminoácidos. Los polipéptidos que forman la proteína de fusión están típicamente unidos entre el extremo C y el extremo N, aunque también pueden estar unidos entre el extremo C y el extremo C, el extremo N y el extremo N o el extremo N y el extremo C. Las partes inmunogénicas en el polipéptido de fusión pueden disponerse en cualquier orden.

En ciertas partes de la descripción, un polipéptido de fusión puede comprender además al menos un compañero de fusión heterólogo que tiene una secuencia que ayuda a proporcionar epítopos T auxiliares (un compañero de fusión inmunológico), preferiblemente epítopos T auxiliares reconocidos por seres humanos, o que ayudan a expresar la proteína (un potenciador de la expresión) con rendimientos más altos que la proteína recombinante nativa. Ciertas parejas de fusión preferidas incluyen parejas de fusión tanto inmunológicas como potenciadoras de la expresión. Se pueden seleccionar otras parejas de fusión para aumentar la solubilidad de la proteína o para permitir que la proteína se dirija a los compartimentos intracelulares deseados. Las parejas de fusión adicionales incluyen etiquetas de afinidad, tales como V5, 6XHIS, MYC, FLAG y GST, que facilitan la purificación de la proteína. Un experto en la técnica entenderá que esas secuencias no relacionadas pueden, pero no es necesario, estar presentes en un polipéptido de fusión usado según la presente descripción. Dentro de una parte particular de la descripción, un compañero de fusión inmunológico comprende una secuencia derivada de la proteína D, una proteína de superficie de la bacteria gram-negativa *Haemophilus influenzae* B (documento WO 91/18926). Por ejemplo, un derivado de proteína D comprende aproximadamente el primer tercio de la proteína (p. ej., los primeros 100-110 aminoácidos N-terminales), y un derivado de proteína D puede estar lipidado. Dentro de ciertas partes de la descripción, los primeros 109 residuos de un compañero de fusión de lipoproteína D se incluyen en el extremo N para proporcionar al polipéptido epítopos de células T exógenos adicionales y para aumentar el nivel de expresión en *E. coli* (funcionando así como un potenciador de la expresión). La cola lipídica asegura una presentación óptima del antígeno a las células presentadoras de antígeno. Otras parejas de fusión ilustrativas incluyen la proteína no estructural del virus *influenzae*, NS1 (hemaglutinina). Típicamente, se usan los 81 aminoácidos N-terminales, aunque también se pueden usar diferentes fragmentos que incluyen epítopos de T auxiliares.

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

45 Las secuencias de fusión pueden unirse directamente (es decir, sin aminoácidos intermedios) o pueden unirse mediante una secuencia enlazadora (p. ej., Gly-Cys-Gly) que no disminuye significativamente las propiedades inmunogénicas de los polipéptidos componentes. Los polipéptidos que forman la proteína de fusión están típicamente unidos entre el extremo C y el extremo N, aunque también pueden unirse entre el extremo C y el extremo C, entre el extremo N y el extremo N o entre el extremo N y el extremo C. Los polipéptidos de la proteína de fusión pueden estar en cualquier orden. Los polipéptidos de fusión o las proteínas de fusión también pueden incluir variantes modificadas de manera conservativa, variantes polimórficas, alelos, mutantes, subsecuencias, homólogos interespecies y fragmentos inmunogénicos de los antígenos que forman la proteína de fusión.

Los polipéptidos de fusión pueden prepararse generalmente usando técnicas estándar, que incluyen tecnología recombinante, conjugación química y similares. Por ejemplo, las secuencias de ADN que codifican los componentes polipeptídicos de una fusión se pueden ensamblar por separado y ligarse en un vector de expresión apropiado. El extremo 3' de la secuencia de ADN que codifica un componente polipeptídico se liga, con o sin un enlazador peptídico, al extremo 5' de una secuencia de ADN que codifica el segundo componente polipeptídico de modo que los marcos de lectura de las secuencias estén en marco. Esto permite la traducción en un único polipéptido de fusión que retiene o, en algunos casos, excede la actividad biológica de los polipéptidos componentes.

60 Se puede emplear una secuencia enlazadora peptídica para separar los componentes de fusión por una distancia suficiente como para asegurar que cada polipéptido se pliegue en sus estructuras secundarias y/o terciarias deseadas.

Dicha secuencia enlazadora peptídica puede incorporarse en el polipéptido de fusión usando técnicas estándar bien conocidas en la técnica. Las secuencias enlazadoras peptídicas adecuadas pueden elegirse, por ejemplo, sobre la base de uno o más de los siguientes factores: (1) su capacidad para adoptar una conformación extendida flexible; (2) su incapacidad para adoptar una estructura secundaria que podría interactuar con los epítomos funcionales en el primer y segundo polipéptidos; y (3) la ausencia de residuos hidrófobos o cargados que podrían reaccionar con los epítomos funcionales del polipéptido. Ciertas secuencias enlazadoras peptídicas preferidas contienen residuos de Gly, Asn y Ser. Otros aminoácidos casi neutros, como Thr y Ala, también se pueden usar en la secuencia enlazadora. Las secuencias de aminoácidos que pueden emplearse de manera útil como enlazadores incluyen las descritas en Maratea et al., Gene 40: 39-46, 1985; Murphy et al., Proc. Natl Acad Sci. USA 83: 8258-8262, 1986; Patente de EE.UU. No. 4.935.233 y Patente de EE.UU. No. 4.751.180. La secuencia enlazadora generalmente puede tener una longitud de 1 a aproximadamente 50 aminoácidos. No se requieren secuencias enlazadoras cuando el primer y segundo polipéptidos tienen regiones de aminoácidos N-terminales no esenciales que pueden usarse para separar los dominios funcionales y evitar la interferencia estérica.

Las secuencias de ADN ligadas están unidas operativamente a elementos reguladores de la transcripción o traducción adecuados. Los elementos reguladores responsables de la expresión del ADN están ubicados solo en 5' de la secuencia de ADN que codifica los primeros polipéptidos. De manera similar, los codones de parada requeridos para finalizar la traducción y las señales de terminación de la transcripción solo están presentes en 3' de la secuencia de ADN que codifica el segundo polipéptido.

Además de la expresión del polipéptido de fusión recombinante, pueden generarse polipéptidos de *Leishmania*, sus partes inmunogénicas, sus variantes y sus fusiones por medios sintéticos o recombinantes. Los polipéptidos sintéticos que tienen menos de aproximadamente 100 aminoácidos, y generalmente menos de aproximadamente 50 aminoácidos, pueden generarse usando técnicas bien conocidas por los expertos en la técnica. Por ejemplo, dichos polipéptidos pueden sintetizarse usando cualquiera de las técnicas de fase sólida disponibles comercialmente, tales como el método de síntesis en fase sólida de Merrifield, donde los aminoácidos se añaden secuencialmente a una cadena de aminoácidos en crecimiento (Merrifield, J. Am. Chem. Soc. 85: 2149-2146, 1963). El equipo para la síntesis automatizada de polipéptidos está disponible comercialmente de proveedores tales como Perkin Elmer/Applied BioSystems Division, Foster City, CA, y puede operarse según las instrucciones del fabricante. Así, por ejemplo, los antígenos de *Leishmania*, o partes de los mismos, pueden sintetizarse mediante este método.

Los polipéptidos recombinantes que contienen partes y/o variantes de un polipéptido de *Leishmania* nativo pueden prepararse fácilmente a partir de una secuencia de ADN que codifica el antígeno, usando técnicas bien conocidas y establecidas. En realizaciones particulares, un polipéptido de fusión que comprende antígenos de *Leishmania* puede prepararse fácilmente a partir de una secuencia de ADN que codifica los antígenos fusionados clonados. Por ejemplo, los sobrenadantes de sistemas huésped/vector adecuados que secretan proteínas recombinantes en medios de cultivo pueden concentrarse primero usando un filtro disponible comercialmente. Después de la concentración, el concentrado se puede aplicar a una matriz de purificación adecuada, tal como una matriz de afinidad, una matriz de cromatografía de exclusión por tamaño o una resina de intercambio iónico.

Alternativamente, se puede emplear cualquiera de una variedad de vectores de expresión conocidos por los expertos en la técnica para expresar polipéptidos recombinantes de esta invención. La expresión se puede lograr en cualquier célula huésped apropiada que haya sido transformada o transfectada con un vector de expresión que contenga un polinucleótido que codifique un polipéptido recombinante. Preferiblemente, las células huésped son *E. coli*, levadura, una línea celular de insecto (tal como *Spodoptera* o *Trichoplusia*) o una línea celular de mamífero, incluyendo (pero no limitado a) CHO, COS, HEK-293T y NS-1. Las secuencias de ADN expresadas de esta manera pueden codificar proteínas naturales y proteínas de fusión que comprenden antígenos de *Leishmania*, tales como los descritos en la presente memoria, partes de los mismos y repeticiones u otras variantes de dichas proteínas. Los polipéptidos de fusión expresados de esta invención se aíslan generalmente en una forma sustancialmente pura. Preferiblemente, los polipéptidos de fusión se aíslan con una pureza de al menos el 80% en peso, más preferiblemente, con una pureza de al menos el 95% en peso, y lo más preferiblemente con una pureza de al menos el 99% en peso. En general, dicha purificación se puede lograr usando, por ejemplo, las técnicas estándar de fraccionamiento con sulfato de amonio, electroforesis SDS-PAGE y cromatografía de afinidad.

Los polipéptidos de *Leishmania* y los polinucleótidos de la descripción pueden prepararse o aislarse usando cualquiera de una variedad de procedimientos y usando cualquiera de una variedad de especies de *Leishmania* que incluyen, entre otras, *L. donovani*, *L. chagasi*, *L. infantum*, *L. major*, *L. amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. panamensis*, *L. mexicana*, *L. tropics* y *L. guyanensis*. Dichas especies están disponibles, por ejemplo, en la American Type Culture Collection (ATCC), Rockville, MD.

Independientemente del método de preparación, los polipéptidos o polipéptidos de fusión producidos como se describe anteriormente son preferiblemente inmunogénicos. En ciertas partes de la descripción, por ejemplo, los polipéptidos (o partes inmunogénicas de los mismos) son capaces de incitar una respuesta inmune en cultivos de células de ganglios linfáticos y/o células mononucleares de sangre periférica (PBMC) aisladas de individuos infectados con *Leishmania* actualmente o previamente. Más específicamente, en ciertas partes de la descripción, los antígenos y las partes inmunogénicas de los mismos, tienen la capacidad de inducir la proliferación de células T y/o provocar una respuesta de citoquinas de tipo Th1 predominantemente (p. ej., producción de IL-2, IFN- γ , y/o TNF- α por las células T

y/o células NK; y/o la producción de IL-12 por monocitos, macrófagos y/o células B) en células aisladas de individuos infectados por Leishmania actualmente o previamente. Un individuo infectado con Leishmania puede padecer una forma de leishmaniasis (tal como subclínica, cutánea, mucosa o visceral activa) o puede ser asintomática. Dichos individuos pueden identificarse usando métodos conocidos por los expertos en la técnica. Las personas con leishmaniasis pueden identificarse según los hallazgos clínicos asociados con, por ejemplo, al menos uno de los siguientes: aislamiento del parásito de las lesiones, un ensayo cutáneo positivo con lisado de Leishmania o un ensayo de diagnóstico serológico positivo. Los individuos asintomáticos son individuos infectados que no presentan signos ni síntomas de la enfermedad. Dichos individuos pueden identificarse, por ejemplo, sobre la base de un ensayo serológico positivo y/o un ensayo cutáneo con lisado de Leishmania.

El término "PBMC", que se refiere a una preparación de células nucleadas que consiste principalmente en linfocitos y monocitos que están presentes en la sangre periférica, engloba ambas mezclas de células y preparaciones de uno o más tipos de células purificadas. Las PBMC pueden aislarse mediante métodos conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, las PBMC pueden aislarse por centrifugación de densidad a través de, por ejemplo, Ficoll™ (Winthrop Laboratories, Nueva York). Los cultivos de ganglios linfáticos generalmente se pueden preparar inmunizando ratones BALB/c (p. ej., en la almohadilla de la pata trasera) con promastigotes de Leishmania emulsionados en adyuvante completo de Freund. Los ganglios linfáticos drenantes pueden escindirse después de la inmunización y las células T pueden purificarse en una columna anti-Ig de ratón para eliminar las células B, seguido de un paso a través de una columna Sephadex G10 para eliminar los macrófagos. De manera similar, las células de los ganglios linfáticos se pueden aislar de un ser humano después de la biopsia o la extirpación quirúrgica de un ganglio linfático.

La capacidad de un polipéptido de fusión de la invención para inducir una respuesta en PBMC o cultivos de células de ganglios linfáticos puede evaluarse, por ejemplo, poniendo en contacto las células con el polipéptido y midiendo una respuesta adecuada. En general, la cantidad de polipéptido que es suficiente para la evaluación de aproximadamente 2×10^5 células varía de aproximadamente 10 ng a aproximadamente 100 ng o 100 ng a aproximadamente 50 μg , y preferiblemente es de aproximadamente 1 μg , a 10 μg . La incubación del polipéptido (p. ej., un polipéptido de fusión) con células se realiza típicamente a 37 °C durante aproximadamente 1-3 días. Después de la incubación con el polipéptido, las células se ensayan para determinar una respuesta apropiada. Si la respuesta es una respuesta proliferativa, se puede emplear cualquiera de una variedad de técnicas bien conocidas por los expertos en la técnica. Por ejemplo, las células pueden exponerse a un pulso de timidina radiactiva y se puede medir la incorporación del marcador en el ADN celular. En general, se considera que un polipéptido que produce al menos un aumento de tres veces en la proliferación por encima del fondo (es decir, la proliferación observada para células cultivadas sin polipéptido) es capaz de inducir la proliferación.

Alternativamente, la respuesta a medir puede ser la secreción de una o más citoquinas (como el interferón- γ (IFN- γ), la interleuquina-4 (IL-4), la interleuquina-12 (p70 y/o p40), la interleuquina 2 (IL-2) y/o el factor de necrosis tumoral α (TNF- α) o el cambio en el nivel de ARNm que codifica una o más citoquinas específicas. Por ejemplo, la secreción de interferón- γ , interleuquina-2, factor de necrosis tumoral- α y/o interleuquina-12 es indicativa de una respuesta Th1, que contribuye al efecto protector frente a Leishmania. Los ensayos para cualquiera de las citoquinas anteriores pueden realizarse generalmente usando métodos conocidos por los expertos en la técnica, tales como un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA). Los anticuerpos adecuados para uso en dichos ensayos pueden obtenerse de una variedad de fuentes tales como Chemicon, Temucula, CA y PharMingen, San Diego, CA, y generalmente pueden usarse según las instrucciones del fabricante. El nivel de ARNm que codifica una o más citoquinas específicas se puede evaluar, por ejemplo, mediante amplificación por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). En general, un polipéptido que es capaz de inducir, en una preparación de aproximadamente $1-3 \times 10^5$ células, la producción de 30 pg/ml de IL-12, IL-4, IFN- γ , TNF- α o IL-12 p40, o 10 pg/mL de IL-12 p70, se considera capaz de estimular la producción de una citoquina.

Composiciones de polinucleótidos

Como se expone en las reivindicaciones, la presente invención también proporciona polinucleótidos aislados, particularmente aquellos que codifican las combinaciones de polipéptidos y/o polipéptidos de fusión de la invención, así como composiciones que comprenden dichos polinucleótidos. Tal y como se usa en la presente memoria, los términos "ADN" y "polinucleótido" y "ácido nucleico" se refieren a una molécula de ADN que se ha aislado sin el ADN genómico total de una especie particular. Por lo tanto, un segmento de ADN que codifica un polipéptido se refiere a un segmento de ADN que contiene una o más secuencias codificadoras pero que se aísla sustancialmente, o se purifica, del ADN genómico total de la especie de la que se obtiene el segmento de ADN. Dentro de los términos "segmento de ADN" y "polinucleótido" se incluyen segmentos de ADN y fragmentos más pequeños de dichos segmentos, y también vectores recombinantes, que incluyen, por ejemplo, plásmidos, cósmidos, fagémidos, fagos, virus y similares.

Como entenderán los expertos en la técnica, las secuencias de polinucleótidos de esta invención pueden incluir secuencias extra-genómicas y codificadas por plásmidos y segmentos de genes modificados por ingeniería genética más pequeños que expresan, o pueden adaptarse para expresar, proteínas, polipéptidos de fusión, péptidos y similares. Dichos segmentos pueden aislarse de manera natural, recombinante o modificarse sintéticamente por la mano del hombre.

5 Como reconocerán los expertos en la materia, los polinucleótidos pueden ser monocatenarios (codificadores o antisentido) o bicatenarios, y pueden ser moléculas de ADN (genómicas, ADNc o sintéticas) o ARN. Cualquier polinucleótido puede modificarse adicionalmente para aumentar la estabilidad in vivo. Las posibles modificaciones incluyen, pero no están limitadas a, la adición de secuencias flanqueantes en los extremos 5' y/o 3'; el uso de fosforotioato o 2' O-metilo en lugar de enlaces de fosfodiesterasa en el esqueleto; y/o la inclusión de bases no tradicionales tales como inosina, queosina y wibutosina, así como acetil, metil, tio y otras formas modificadas de adenina, citidina, guanina, timina y uridina. Las secuencias codificadoras o no codificadoras adicionales pueden, pero no es necesario, estar presentes en un polinucleótido de la presente invención, y un polinucleótido puede, pero no es necesario, unirse a otras moléculas y/o materiales de soporte.

10 Los polinucleótidos pueden comprender una secuencia nativa (es decir, una secuencia endógena que codifica un antígeno de Leishmania o una parte del mismo) o pueden comprender una variante, o un equivalente funcional biológico o antigénico de dicha secuencia. En realizaciones particulares, los polinucleótidos pueden codificar dos o más partes antigénicas/inmunogénicas, fragmentos o variantes derivadas de los antígenos de Leishmania descritos en la presente memoria. En algunas realizaciones, los polinucleótidos de la presente invención comprenden una
15 secuencia que codifica cualquiera de las partes inmunogénicas descritas en la presente memoria. En algunas partes de la descripción, el polinucleótido comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 38 o 40. Por supuesto, también se pueden emplear partes de estas secuencias y secuencias variantes que comparten identidad con estas secuencias (p. ej., aquellas que tienen al menos aproximadamente el 80%, 85%, 90%, 95% o 98% de las mismas).

20 Las variantes de polinucleótidos pueden contener una o más sustituciones, adiciones, deleciones y/o inserciones, como se describe adicionalmente a continuación, preferiblemente de modo que la inmunogenicidad del polipéptido codificado no disminuya, en relación con la proteína nativa. El efecto sobre la inmunogenicidad del polipéptido codificado puede evaluarse generalmente como se describe en la presente memoria.

25 Por ejemplo, en ciertas partes de la descripción, las variantes de la invención incluyen polinucleótidos modificados en cisteína en los que los codones que codifican la cisteína se reemplazan por codones que codifican otros aminoácidos que no son capaces de formar enlaces disulfuro intracadena o intercadena. En partes más específicas de la descripción, algunos o todos los codones de reemplazo codifican serina debido a la similitud espacial de la cadena lateral de la serina con la cadena lateral de la cisteína en el polipéptido resultante. En otra parte específica de la descripción, algunos o todos los codones de reemplazo codifican alanina. Los métodos ilustrativos para reemplazar la cisteína y otros codones dentro de un polinucleótido son bien conocidos (p. ej., Patente de EE.UU. No. 4.816.566 y
30 Proc Natl Acad Sci 97 (15): 8530, 2000).

El término "variantes" también engloba genes homólogos de origen xenogénico.

35 En partes adicionales de la descripción, los polinucleótidos aislados de la presente descripción comprenden varias longitudes de cadenas contiguas de secuencias idénticas o complementarios a la secuencia que codifica los polipéptidos de Leishmania, tales como las secuencias descritas en la presente memoria. Por ejemplo, esta descripción proporciona polinucleótidos que comprenden al menos aproximadamente 15, 20, 30, 40, 50, 75, 100, 150, 200, 300, 400, 500 o 1.000 o más nucleótidos contiguos de dos o más de las secuencias descritas en la presente memoria, así como todas las longitudes intermedias entre ellos. Se entenderá fácilmente que "longitudes intermedias", en este contexto, significa cualquier longitud entre los valores citados, tales como 16, 17, 18, 19, etc.; 21, 22, 23, etc.;
40 30, 31, 32, etc.; 50, 51, 52, 53, etc.; 100, 101, 102, 103, etc.; 150, 151, 152, 153, etc.; incluyendo todos los números enteros de 200-500; 500-1,000, y similares.

45 Los polinucleótidos de la presente invención, o fragmentos de los mismos, independientemente de la longitud de la secuencia codificadora en sí, pueden combinarse con otras secuencias de ADN, tales como promotores, señales de poliadenilación, sitios de enzimas de restricción adicionales, sitios de clonación múltiple, otros segmentos codificadores y similares, de modo que su longitud total puede variar considerablemente. Por lo tanto, se contempla que se puede emplear un fragmento de polinucleótido de casi cualquier longitud; con la longitud total preferiblemente limitada por la facilidad de preparación y uso en el protocolo de ADN recombinante deseado.

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

Los polinucleótidos de Leishmania y sus fusiones pueden prepararse, manipularse y/o expresarse usando cualquiera

de una variedad de técnicas bien establecidas conocidas y disponibles en la técnica. En realizaciones particulares, las fusiones comprenden dos o más secuencias de polinucleótidos que codifican polipéptidos de *Leishmania*.

Por ejemplo, pueden usarse secuencias de polinucleótidos o fragmentos de las mismas que codifican polipéptidos de la invención, o proteínas de fusión o equivalentes funcionales de las mismas en moléculas de ADN recombinante para dirigir la expresión de un polipéptido en células huésped apropiadas. Debido a la degeneración inherente del código genético, pueden producirse otras secuencias de ADN que codifican sustancialmente la misma o una secuencia de aminoácidos funcionalmente equivalente y estas secuencias pueden usarse para clonar y expresar un polipéptido dado de la presente invención.

Como entenderán los expertos en la técnica, puede ser ventajoso en algunos casos producir secuencias de nucleótidos que codifiquen polipéptidos de fusión que posean codones que no se producen de forma natural. Por ejemplo, los codones preferidos por un huésped procariótico o eucariótico particular pueden seleccionarse para aumentar la velocidad de expresión de la proteína o para producir un transcrito de ARN recombinante que tiene propiedades deseables, tales como una semivida que es más larga que la de un transcrito generado a partir de una secuencia de origen natural.

Además, las secuencias de polinucleótidos de la presente invención pueden diseñarse usando métodos generalmente conocidos en la técnica para alterar las secuencias codificadoras de polipéptidos de fusión por una variedad de razones, que incluyen, pero no están limitadas a, alteraciones que modifican la clonación, el procesamiento, la expresión y/o la inmunogenicidad del producto génico.

Para expresar un polipéptido de fusión deseado que comprende dos o más fragmentos antigénicos/inmunogénicos o partes de polipéptidos de *Leishmania*, se puede insertar una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido de fusión, o un equivalente funcional, en un vector de expresión apropiado, es decir, un vector que contenga los elementos necesarios para la transcripción y traducción de la secuencia codificadora insertada. Los métodos que son bien conocidos por los expertos en la técnica se pueden usar para construir vectores de expresión que contienen secuencias que codifican un polipéptido de interés y elementos de control de la transcripción y la traducción apropiados. Estos métodos incluyen técnicas de ADN recombinante *in vitro*, técnicas sintéticas y recombinación genética *in vivo*. Dichas técnicas se describen en Sambrook et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* (2001), y Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology* (enero de 2008, edición actualizada).

Se conoce una variedad de sistemas de vector de expresión/huésped y pueden utilizarse para contener y expresar secuencias de polinucleótidos. Estos incluyen, pero no están limitados a, microorganismos tales como bacterias transformadas con bacteriófagos recombinantes, plásmidos o vectores de expresión de ADN de cósmidos; levadura (tal como *Saccharomyces* o *Pichia*) transformada con vectores de expresión de levadura; sistemas de células de insectos infectados con vectores de expresión de virus (p. ej., baculovirus); sistemas de células vegetales transformados con vectores de expresión de virus (p. ej., virus del mosaico de la coliflor, CaMV; virus del mosaico del tabaco, TMV) o con vectores de expresión bacterianos (p. ej., plásmidos Ti o pBR322); o sistemas de células animales.

Los "elementos de control" o las "secuencias reguladoras" presentes en un vector de expresión son aquellas regiones no traducidas del vector - potenciadores, promotores, regiones no traducidas 5' y 3' - que interactúan con las proteínas celulares del huésped para llevar a cabo la transcripción y traducción. Dichos elementos pueden variar en su potencia y especificidad. Dependiendo del sistema de vector y huésped utilizado, se puede usar cualquier número de elementos de transcripción y traducción adecuados, incluidos los promotores constitutivos e inducibles. Por ejemplo, cuando se clona en sistemas bacterianos, se pueden usar promotores inducibles como el promotor lacZ híbrido del fagémido PBLUESCRIPT (Stratagene, La Jolla, California) o el plásmido PSPORTI (Gibco BRL, Gaithersburg, Md.) y similares. En sistemas celulares de mamíferos, generalmente se prefieren los promotores de genes de mamíferos o de virus de mamíferos. Si es necesario generar una línea celular que contenga múltiples copias de la secuencia que codifica un polipéptido, los vectores basados en SV40 o EBV pueden usarse ventajosamente con un marcador seleccionable apropiado.

En sistemas bacterianos, se pueden seleccionar varios vectores de expresión dependiendo del uso destinado para el polipéptido expresado. Por ejemplo, cuando se necesitan grandes cantidades, se pueden usar vectores que dirigen la expresión de alto nivel de proteínas de fusión que se purifican fácilmente. Dichos vectores incluyen, pero no están limitados a, los vectores multifuncionales de clonación y expresión de *E. coli*, tales como PBLUESCRIPT (Stratagene), en los que la secuencia que codifica el polipéptido de interés puede unirse al vector en marco con secuencias para la Met del extremo amino y los 7 residuos posteriores de B-galactosidasa para que se produzca una proteína híbrida; vectores pIN (Van Heeke y Schuster, *J. Biol. Chem.* 264: 5503-5509 (1989)); y similares. Los vectores pGEX (Promega, Madison, WI) también se pueden usar para expresar polipéptidos extraños como proteínas de fusión con glutatión S-transferasa (GST). En general, dichas proteínas de fusión son solubles y pueden purificarse fácilmente a partir de células lisadas por adsorción a lechos de glutatión-agarosa seguido de elución en presencia de glutatión libre. Las proteínas preparadas en dichos sistemas pueden diseñarse para incluir sitios de escisión de proteasa de heparina, trombina o factor XA, de modo que el polipéptido de interés clonado pueda liberarse del resto GST a voluntad.

En la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, se pueden usar varios vectores que contienen promotores constitutivos o inducibles, tales como el factor alfa, la alcohol oxidasa y la PGH. Para revisiones, véase Ausubel et al. (*supra*) y Grant

et al., *Methods Enzymol.* 153: 516-544 (1987).

En los casos en que se usan vectores de expresión de plantas, la expresión de secuencias que codifican polipéptidos puede estar dirigida por cualquiera de varios promotores. Por ejemplo, los promotores virales tales como los promotores 35S y 19S de CaMV se pueden usar solos o en combinación con la secuencia líder omega de TMV (Takamatsu, *EMBO J.* 6: 307-311 (1987)). Alternativamente, se pueden usar promotores de plantas tales como la subunidad pequeña de RUBISCO o promotores de choque térmico (Coruzzi et *EMBO J.* 3: 1671-1680 (1984); Broglie et al., *Science* 224: 838-843 (1984); y Winter et al., *Results Probl. Cell Differ.* 17: 85-105 (1991)). Estas construcciones pueden introducirse en células vegetales mediante transformación directa de ADN o transfección mediada por patógenos. Dichas técnicas se describen en varias revisiones disponibles generalmente (véase, por ejemplo, Hobbs en McGraw Hill, *Yearbook of Science and Technology*, p. 191-196 (1992)).

También se puede usar un sistema de insectos para expresar un polipéptido de interés. Por ejemplo, en uno de dichos sistemas, el virus de la polihedrosis nuclear de *Autographa californica* (AcNPV) se usa como un vector para expresar genes extraños en células de *Spodoptera frugiperda* o en larvas de *Trichoplusia*. Las secuencias que codifican el polipéptido pueden clonarse en una región no esencial del virus, tal como el gen de la polihedrina, y colocarse bajo el control del promotor de la polihedrina. La inserción exitosa de la secuencia que codifica el polipéptido hará que el gen de la polihedrina sea inactivo y produzca un virus recombinante que carezca de proteína de la cubierta. Los virus recombinantes se pueden usar entonces para infectar, por ejemplo, células de *S. frugiperda* o larvas de *Trichoplusia* en las que se puede expresar el polipéptido de interés (Engelhard et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 3224-3227 (1994)).

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

También se pueden usar señales de iniciación específicas para lograr una traducción más eficiente de las secuencias que codifican un polipéptido de fusión de interés. Dichas señales incluyen el codón de inicio ATG y las secuencias adyacentes. En los casos en los que las secuencias que codifican el polipéptido, su codón de inicio y las secuencias en 5' se insertan en el vector de expresión apropiado, pueden no ser necesarias señales de control de la transcripción o de la traducción adicionales. Sin embargo, en los casos en los que solo se inserta la secuencia codificadora, o una parte de la misma, se deben proporcionar señales de control de la traducción exógenas que incluyan el codón de inicio ATG. Además, el codón de inicio debe estar en el marco de lectura correcto para garantizar la traducción de todo el inserto. Los elementos de traducción exógenos y los codones de inicio pueden ser de diversos orígenes, tanto naturales como sintéticos. La eficacia de la expresión puede potenciarse mediante la inclusión de potenciadores que sean apropiados para el sistema celular particular que se usa, tales como los descritos en la bibliografía (Scharf. Et al., *Results Probl. Cell Differ.* 20: 125-162 (1994)).

Además, se puede elegir una cepa de células huésped por su capacidad para modular la expresión de las secuencias insertadas o para procesar la proteína de fusión expresada de la manera deseada. Dichas modificaciones del polipéptido incluyen, pero no están limitadas a, acetilación, carboxilación, glicosilación, fosforilación, lipidación y acilación. El procesamiento posterior a la traducción que escinde una forma "prepro" de la proteína también se puede usar para facilitar la inserción, plegamiento y/o función correctos. Se pueden elegir diferentes células huésped, tales como CHO, HeLa, MDCK, HEK293 y W138, que tienen una maquinaria celular específica y mecanismos característicos para dichas actividades posteriores a la traducción, para garantizar la modificación y procesamiento correctos de la proteína extraña.

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

Se puede usar cualquier número de sistemas de selección para recuperar las líneas celulares transformadas. Estos incluyen, pero no están limitados a, los genes de la timidina quinasa del virus del herpes simple (Wigler et al., *Cell* 11: 223-232 (1977)) y adenina fosforribosiltransferasa (Lowy et al., *Cell* 22: 817-823 (1990)) que pueden emplearse en células tk- o aprt-, respectivamente. Además, la resistencia a los antimetabolitos, antibióticos o herbicidas se puede usar como base para la selección; por ejemplo, dhfr que confiere resistencia al metotrexato (Wigler et al., *Proc. Natl.*

- Acad. Sci. USA 77: 3567-70 (1980)); npt, que confiere resistencia a los aminoglicósidos, neomicina y G-418 (Colbere-Garapin et al., J. Mol. Biol. 150: 1-14 (1981)); y als o pat, que confieren resistencia al clorsulfurón y la fosfotricina acetiltransferasa, respectivamente (Murry, supra). Se han descrito genes seleccionables adicionales, por ejemplo, trpB, que permite que las células utilicen indol en lugar de triptófano, o hisD, que permite que las células utilicen histinol en lugar de histidina (Hartman y Mulligan, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 8047-51 (1988)). El uso de marcadores visibles ha ganado popularidad con marcadores tales como las antocianinas, la B-glucuronidasa y su sustrato GUS, y la luciferasa y su sustrato luciferina, usados ampliamente no solo para identificar transformantes, sino también para cuantificar la cantidad de expresión de proteínas transitoria o estable. atribuible a un sistema de vector específico (Rhodes et al., Methods Mol Biol. 55: 121-131 (1995)).
- 5
- 10 En la técnica se conocen diversos protocolos para detectar y medir la expresión de productos codificados por polinucleótidos, que usan anticuerpos policlonales o monoclonales específicos para el producto. Los ejemplos incluyen el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA), el radioinmunoensayo (RIA) y la separación de células activada por fluorescencia (FACS). Estos y otros ensayos se describen, entre otros lugares, en Hampton et al., Serological Methods, a Laboratory Manual (1990) y Maddox et al., J. Exp. Medicina. 158: 1211-1216 (1983).
- 15 Los expertos en la técnica conocen una amplia variedad de marcadores y técnicas de conjugación y se pueden usar en varios ensayos de ácidos nucleicos y aminoácidos. Los medios para producir sondas de hibridación o de PCR marcadas para detectar secuencias relacionadas con polinucleótidos incluyen marcaje de oligos, traslación de muecas, marcaje final o amplificación por PCR usando un nucleótido marcado. Alternativamente, las secuencias, o cualquiera de sus partes, pueden clonarse en un vector para la producción de una sonda de ARNm. Dichos vectores son conocidos en la técnica, están disponibles comercialmente y pueden usarse para sintetizar sondas de ARN in vitro mediante la adición de una ARN polimerasa apropiada tal como T7, T3 o SP6 y nucleótidos marcados. Estos procedimientos pueden llevarse a cabo usando una variedad de kits disponibles comercialmente. Las moléculas o marcadores informadores adecuados, que pueden usarse, incluyen radionúclidos, enzimas, agentes fluorescentes, quimioluminiscentes o cromogénicos, así como sustratos, cofactores, inhibidores, partículas magnéticas y similares.
- 20
- 25 Las células huésped transformadas con una secuencia de polinucleótidos de interés pueden cultivarse en condiciones adecuadas para la expresión y recuperación de la proteína del cultivo celular. La proteína producida por una célula recombinante puede secretarse o estar contenida intracelularmente dependiendo de la secuencia y/o del vector usado. Como entenderán los expertos en la técnica, los vectores de expresión que contienen polinucleótidos de la invención pueden diseñarse para contener secuencias señal que dirigen la secreción del polipéptido codificado a través de una membrana celular procarionota o eucariota. Se pueden usar otras construcciones recombinantes para unir secuencias que codifican un polipéptido de interés a la secuencia de nucleótidos que codifica un dominio polipeptídico que facilitará la purificación de proteínas solubles. Además de los métodos de producción recombinante, los polipéptidos de fusión de la invención, y los fragmentos de los mismos, pueden producirse mediante síntesis de péptidos directa usando técnicas en fase sólida (Merrifield, J. Am. Chem. Soc. 85: 2149-2154 (1963)). La síntesis de proteínas se puede realizar utilizando técnicas manuales o por automatización. La síntesis automatizada se puede lograr, por ejemplo, usando el sintetizador de péptidos Applied Biosystems 431A (Perkin Elmer). Alternativamente, varios fragmentos, por ejemplo, fragmentos inmunogénicos de polipéptidos de Leishmania, pueden sintetizarse químicamente por separado y combinarse usando métodos químicos para producir la molécula de longitud completa.
- 30
- 35

Composiciones farmacéuticas y de vacunas

- 40 En ciertos aspectos, los polipéptidos, polinucleótidos, porciones, variantes, polipéptidos de fusión, etc., como se describen en la presente memoria, se incorporan en composiciones farmacéuticas o vacunas. Las composiciones farmacéuticas generalmente comprenden uno o más polipéptidos, polinucleótidos, partes, variantes, polipéptidos de fusión, etc., como se describe en la presente memoria, en combinación con un vehículo fisiológicamente aceptable. Las vacunas, también denominadas composiciones inmunogénicas, generalmente comprenden uno o más de los polipéptidos, polinucleótidos, partes, variantes, proteínas de fusión, etc., como se describe en la presente memoria, en combinación con un inmunoestimulante, tal como un adyuvante. En realizaciones particulares, las composiciones farmacéuticas comprenden polipéptidos de fusión que contienen antígenos de Leishmania (o partes o variantes de los mismos) que son capaces de proporcionar protección frente a, por ejemplo, en un ensayo in vivo como se describe en la presente memoria, especies de Leishmania tales como *L. donovani*, *L. major* y/o *L. infantum*.
- 45
- 50 Un inmunoestimulante puede ser cualquier sustancia que aumenta o potencia una respuesta inmune (mediada por anticuerpos y/o células) frente a un antígeno exógeno. Los ejemplos de inmunoestimulantes incluyen adyuvantes, microesferas biodegradables (p. ej., galactida poliláctica) y liposomas (en los que se incorpora el compuesto; véase, p. ej., Fullerton, Pat. de EE.UU. No. 4.235.877). La preparación de la vacuna se describe generalmente en, por ejemplo, Powell y Newman, eds., Vaccine Design (la estrategia de la subunidad y adyuvante) (1995).
- 55 Se puede emplear cualquiera de una variedad de inmunoestimulantes en las vacunas de esta invención. Por ejemplo, se puede incluir un adyuvante. Muchos adyuvantes contienen una sustancia diseñada para proteger el antígeno del catabolismo rápido, tal como hidróxido de aluminio o aceite mineral, y un estimulador de respuestas inmunitarias, tal como el lípido A (natural o sintético), Bordatella pertussis o Mycobacterium o proteínas derivadas de especies de Mycobacterium. Los adyuvantes adecuados están disponibles comercialmente tales como, por ejemplo, adyuvante incompleto y adyuvante completo de Freund (Difco Laboratories, Detroit, Michigan); Adyuvante 65 de Merck (Merck
- 60

and Company, Inc., Rahway, NJ); AS-2 y sus derivados (GlaxoSmithKline Beecham, Filadelfia, Pa.); CWS, TDM, LelF, sales de aluminio tales como gel de hidróxido de aluminio (alumbre) o fosfato de aluminio; sales de calcio, hierro o cinc; una suspensión insoluble de tirosina acilada; azúcares acilados; polisacáridos derivatizados catiónicamente o aniónicamente; polifosfatenos; microesferas biodegradables; monofosforil lípido A y quit A. cas citoquinas, tales como GM-CSF o interleuquina-2, 7 o 12, también pueden usarse como adyuvantes.

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

Los receptores semejantes a Toll (TLR) incluyen receptores transmembrana de la superficie celular del sistema inmune innato que confieren capacidad de reconocimiento de fase temprana a las células huésped para una variedad de estructuras moleculares microbianas conservadas, tales como las que pueden estar presentes en o sobre un gran número de patógenos infecciosos. (p. ej., Armant et al., 2002 *Genome Biol.* 3 (8): reviews3011.1-3011.6; Fearon et al., 1996 *Science* 272: 50; Medzhitov et al., 1997 *Curr. Opin. Immunol.* 9: 4; Lustre 2002 *Curr. Opin. Immunol.* 14: 129; Lien et al. 2003 *Nat. Immunol.* 4: 1162; Medzhitov, 2001 *Nat. Rev. Immunol.* 1: 135; Takeda et al., 2003 *Ann Rev Immunol.* 21: 335; Takeda et al. 2005 *inf. Immunol.* 17: 1; Kaisho et al., 2004 *Microbes Infect.* 6: 1388; Datta et al., 2003 *J. Immunol.* 170: 4102).

La inducción de la transducción de señal mediada por TLR para potenciar el inicio de respuestas inmunes a través del sistema inmune innato puede efectuarse por agonistas de TLR, que se acoplan a TLR de la superficie celular o TLR citoplásmico. Por ejemplo, el lipopolisacárido (LPS) puede ser un agonista de TLR a través de TLR2 o TLR4 (Tsan et al., 2004 *J. Leuk. Biol.* 76: 514; Tsan et al., 2004 *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 286: C739; Lin et al., 2005 *Shock* 24: 206); poli(inosina-citidina) (poliI:C) puede ser un agonista de TLR a través de TLR3 (Salem et al., 2006 *Vaccine* 24: 5119); secuencias CpG (oligodesoxinucleótidos que contienen citosina-guanosina no metilada o restos de dinucleótidos "CpG", p. ej., CpG 7909, Cooper et al., *AIDS* 2005: 1973; CpG 10101 Bayes et al. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 27: 193; Vollmer et al. *Expert Opinion on Biological Therapy* 5: 673; Vollmer et al., 2004, *Antimicrob. Agents Chemother.* 48: 2314; Deng et al., 2004 *J. Immunol.* 173: 5148) pueden ser agonistas de TLR a través de TLR9 (Andaloussi et al., 2006 *Glia* 54: 526; Chen et al., 2006 *J. Immunol.* 177: 2373); los peptidoglicanos pueden ser agonistas de TLR2 y/o TLR6 (Soboll et al., 2006 *Biol. Reprod.* 75: 131; Nakao et al., 2005 *J. Immunol.* 174: 1566); 3M003 (hidrato de 4-amino-2-(etoximetil)-a,a-dimetil-617,8,9-tetrahidro-1H-imidazo [4,5-c] quinolina-1-etanol, peso molecular: 318 Da de 3M Pharmaceuticals, St. Paul, MN, que también es una fuente de los compuestos relacionados 3M001 y 3M002; Gorden et al., 2005 *J. Immunol.* 174: 1259) puede ser un agonista de TLR7 (Johansen 2005 *Clin. Exp. Allerg.* 35: 1591) y/o un agonista de TLR8 (Johansen 2005); la flagelina puede ser un agonista de TLR5 (Feuillet et al., 2006 *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 103: 12487); y los antígenos de la hepatitis C pueden actuar como agonistas de TLR a través de TLR7 y/o TLR9 (Lee et al., 2006 *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 103: 1828; Horsmans et al., 2005 *Hepatology* 42: 724). Se conocen otros agonistas de TLR (p. ej., Schirmbeck et al., 2003 *J. Immunol.* 171: 5198) y se pueden usar según algunas de las realizaciones descritas actualmente.

Por ejemplo, y como antecedente (véase, p. ej., la Patente de EE. UU. No. 6.544.518), los oligonucleótidos inmunoestimulantes que contienen dinucleótidos CpG no metilados ("CpG") se conocen como adyuvantes cuando se administran por vía sistémica y mucosa (documento WO 96/02555, EP 468520, Davis et al., *J. Immunol.* 1998. 160 (2): 870-876; McCluskie y Davis, *J. Immunol.*, 1998, 161 (9): 4463-6). CpG es una abreviatura de los restos de dinucleótidos de citosina-guanosina presentes en el ADN. El papel central del resto CG en la inmunoestimulación fue explicado por Krieg, *Nature* 374, p. 546 1995. El análisis detallado ha mostrado que el resto CG debe estar en un cierto contexto de secuencia, y que dichas secuencias son comunes en el ADN bacteriano, pero son raras en el ADN de vertebrados. La secuencia inmunoestimulante suele ser: purina, purina, C, G, pirimidina, pirimidina; en donde el resto de dinucleótido CG no está metilado, pero se sabe que otras secuencias CpG no metiladas son inmunoestimulantes y se pueden usar en ciertas realizaciones de la presente invención. Cuando se formula CpG en vacunas, se puede administrar en disolución libre junto con el antígeno libre (WO 96/02555; McCluskie y Davis, supra) o conjugarse covalentemente con un antígeno (Publicación PCT No. WO 98/16247), o formularse con un vehículo tal como hidróxido de aluminio (p. ej., Davis et al. supra, Brazolot-Millan et al., *Proc. Natl Acad. Sci., USA*, 1998, 95 (26), 15553-8).

Otros oligonucleótidos ilustrativos para uso en composiciones de la presente invención a menudo contendrán dos o más restos CpG de dinucleótidos separados por al menos tres, más preferiblemente al menos seis o más nucleótidos. Los oligonucleótidos de la presente invención son típicamente desoxinucleótidos. En una realización, el internucleótido en el oligonucleótido es fosforoditioato, o más preferiblemente un enlace fosforotioato, aunque el fosfodiéster y otros enlaces internucleótido están dentro del alcance de la invención, incluyendo oligonucleótidos con enlaces internucleótidos mixtos. Los métodos para producir oligonucleótidos de fosforotioato o fosforoditioato se describen en las Pat. de EE.UU. Nos. 5.666.153, 5.278.302 y WO95/26204.

Otros ejemplos de oligonucleótidos tienen secuencias que se describen en las siguientes publicaciones; para ciertas realizaciones descritas en la presente memoria, las secuencias contienen preferiblemente enlaces internucleotídicos

modificados con fosforotioato:

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

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

10 Los oligonucleótidos CpG alternativos pueden comprender variantes de las secuencias preferidas descritas en las publicaciones citadas anteriormente que difieren en que tienen en ellas sustituciones, inserciones, deleciones y/o adiciones de secuencias de nucleótidos intrascendentes. Los oligonucleótidos CpG utilizados en ciertas realizaciones de la presente invención pueden sintetizarse mediante cualquier método conocido en la técnica (p. ej., EP 468520). Convenientemente, dichos oligonucleótidos pueden sintetizarse utilizando un sintetizador automatizado. Los oligonucleótidos son típicamente desoxinucleótidos. En una realización preferida, el enlace internucleótido en el oligonucleótido es un fosforoditioato, o más preferiblemente un enlace fosforotioato, aunque los fosfodiésteres también están dentro del alcance de las realizaciones contemplados actualmente. También se contemplan oligonucleótidos que comprenden diferentes enlaces internucleótidos, p. ej., fopodiésteres fosforotioato mixtos. También se pueden usar otros enlaces internucleótidos que estabilizan el oligonucleótido.

15 En ciertas realizaciones más específicas, el agonista de TLR se selecciona de lipopolisacárido, péptidoglicano, polil:C, CpG, 3M003, flagelina, homólogo de Leishmania de factor de elongación e inicio del ribosoma eucariota 4a (LelF) y al menos un antígeno de hepatitis C.

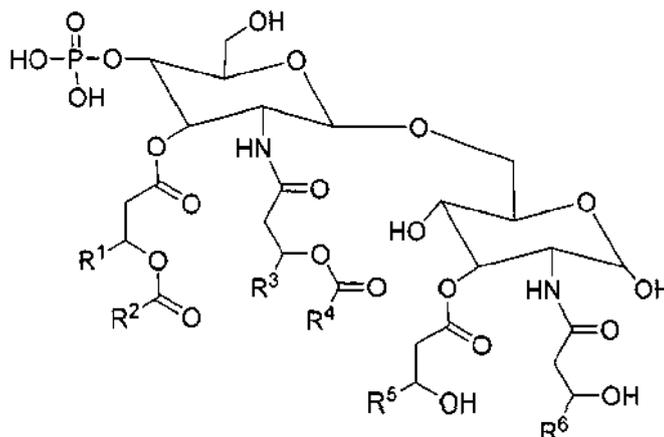
20 Otros adyuvantes más incluyen imiquimod, gardiquimod y resiquimod (todos disponibles en Invivogen), y compuestos relacionados, que se sabe que actúan como agonistas de TLR7/8. Un compendio de adyuvantes que puede ser útil en vacunas es proporcionado por Vogel et al., Pharm Biotechnol 6: 141 (1995).

25 Las composiciones de la invención también pueden emplear sistemas adyuvantes diseñados para inducir una respuesta inmune predominantemente del tipo Th1. Los altos niveles de citoquinas de tipo Th1 (p. ej., IFN- γ , TNF- α , IL-2 e IL-12) tienden a favorecer la inducción de respuestas inmunes mediadas por células frente a un antígeno administrado. En contraste, los altos niveles de citoquinas de tipo Th2 (p. ej., IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10) tienden a favorecer la inducción de respuestas inmunes humorales. Después de la aplicación de una vacuna como se proporciona en la presente memoria, un paciente soportará una respuesta inmune que incluye respuestas de tipo Th1 y Th2. Dentro de una realización preferida, en la que una respuesta es predominantemente del tipo Th1, el nivel de citoquinas del tipo Th1 aumentará en mayor medida que el nivel de las citoquinas del tipo Th2. Los niveles de estas citoquinas pueden evaluarse fácilmente usando ensayos estándar. Para una revisión de las familias de citoquinas, véase Mossman y Coffman, Ann. Rev. Immunol. 7: 145-173 (1989).

35 Ciertos adyuvantes para uso en la incitación de una respuesta predominantemente de tipo Th1 incluyen, por ejemplo, una combinación de monofosforil lípido A, preferiblemente monofosforil lípido A 3-de-O-acilado (3D-MPLTM), junto con una sal de aluminio (Pat. de EE.UU. Nos. 4.436.727; 4.877.611; 4.866.034; y 4.912.094). Los oligonucleótidos que contienen CpG (en los que el dinucleótido CpG no está metilado) también inducen una respuesta predominantemente Th1. Dichos oligonucleótidos son bien conocidos y se describen, por ejemplo, en los documentos WO 96/02555, WO 99/33488 y en las Pat. de EE.UU. Nos. 6.008.200 y 5.856.462. Las secuencias de ADN inmunoestimulantes también se describen, por ejemplo, por Sato et al., Science 273: 352 (1996). Otro adyuvante ilustrativo comprende una saponina, tal como Quil A, o derivados de la misma, que incluyen QS21 y QS7 (Aquila Biopharmaceuticals Inc., Framingham, MA); Escina; Digitonina; o saponinas de Gypsophila o Chenopodium quinoa. Otras formulaciones ilustrativas incluyen más de una saponina en las combinaciones de adyuvantes de la presente invención, por ejemplo, combinaciones de al menos dos de los siguientes grupos que comprenden QS21, QS7, Quil A, O-escina o digitonina.

45 En una realización particular, el sistema adyuvante incluye la combinación de un monofosforil lípido A y un derivado de saponina, tal como la combinación de adyuvante QS21 y 3D-MPLTM, como se describe en el documento WO 94/00153, o una composición menos reactogénica donde el QS21 es extinguido con colesterol, como se describe en el documento WO 96/33739. Otras formulaciones comprenden una emulsión de aceite en agua y tocoferol. Otra formulación de adyuvante que emplea QS21, adyuvante 3D-MPLTM y tocoferol en una emulsión de aceite en agua se describe en el documento WO 95/17210.

50 En ciertas realizaciones preferidas, el adyuvante usado en la presente invención es un adyuvante de glucopiranosil lípido A (GLA), como se describe en la Publicación de Solicitud de Patente de EE.UU. No. 20080131466. En una realización, el adyuvante GLA usado en el contexto de la presente invención tiene la siguiente estructura:



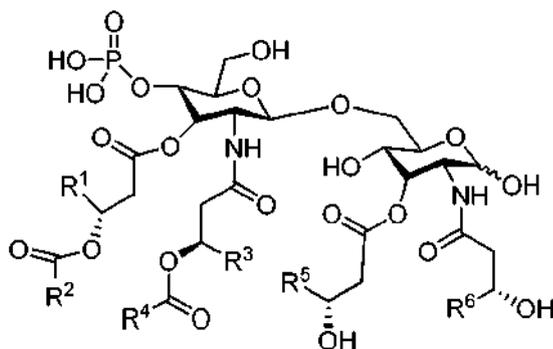
donde: R¹, R³, R⁵ y R⁶ son alquilo C₁₁-C₂₀; y R² y R⁴ son alquilo C₉-C₂₀.

En una parte más específica de la descripción, el GLA tiene la fórmula expuesta anteriormente en la que R¹, R³, R⁵ y R⁶ son alquilo C₁₁₋₁₄; y R² y R⁴ son alquilo C₁₂₋₁₅.

- 5 En una parte más específica de la descripción, el GLA tiene la fórmula expuesta anteriormente en la que R¹, R³, R⁵ y R⁶ son alquilo C₁₁; y R² y R⁴ son alquilo C₁₃.

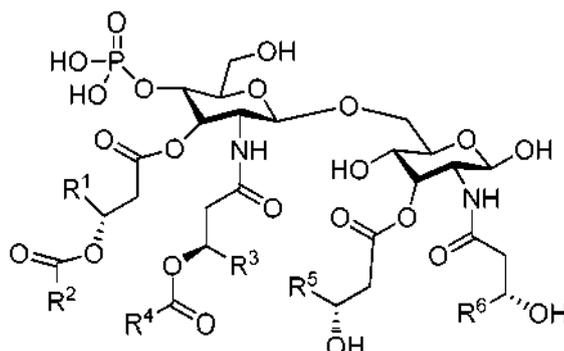
En una parte más específica de la descripción, el GLA tiene la fórmula expuesta anteriormente en la que R¹, R³, R⁵ y R⁶ son alquilo C₁₁; y R² y R⁴ son alquilo C₉.

- 10 En ciertas partes de la descripción, el adyuvante es un adyuvante GLA (p. ej., sintético) que tiene la siguiente estructura:



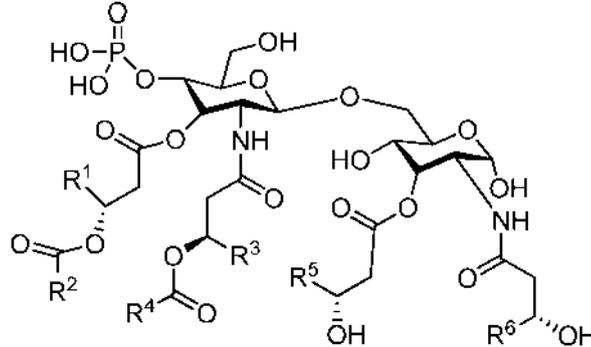
En ciertas realizaciones de la estructura de GLA anterior, R¹, R³, R⁵ y R⁶ son alquilo C₁₁-C₂₀; y R² y R⁴ son alquilo C₉-C₂₀. En ciertas realizaciones, R¹, R³, R⁵ y R⁶ son alquilo C₁₁; y R² y R⁴ son alquilo C₉.

En ciertas partes de la descripción, el adyuvante es un adyuvante GLA sintético que tiene la siguiente estructura:



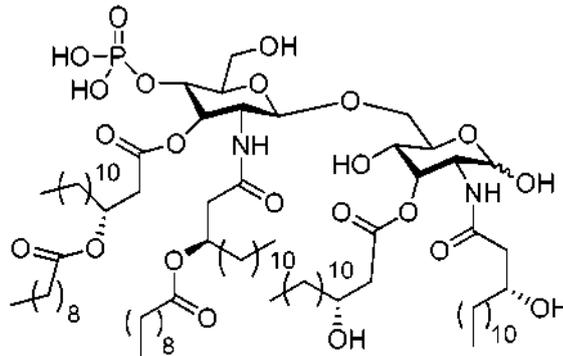
En ciertas realizaciones de la estructura de GLA anterior, R¹, R³, R⁵ y R⁶ son alquilo C₁₁-C₂₀; y R² y R⁴ son alquilo C₉-C₂₀. En ciertas realizaciones, R¹, R³, R⁵ y R⁶ son alquilo C₁₁; y R² y R⁴ son alquilo C₉.

En ciertas partes de la descripción, el adyuvante es un adyuvante GLA sintético que tiene la siguiente estructura:

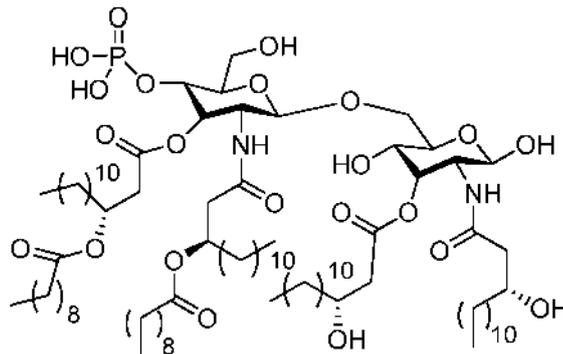


- 5 En ciertas realizaciones de la estructura de GLA anterior, R¹, R³, R⁵ y R⁶ son alquilo C₁₁-C₂₀; y R² y R⁴ son alquilo C₉-C₂₀. En ciertas realizaciones, R¹, R³, R⁵ y R⁶ son alquilo C₁₁; y R² y R⁴ son alquilo C₉.

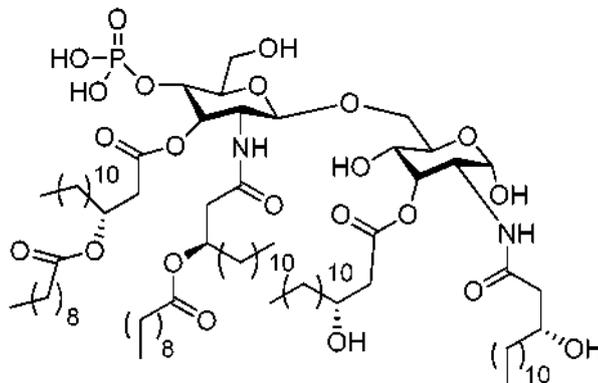
En ciertas partes de la descripción, el adyuvante es un adyuvante GLA sintético que tiene la siguiente estructura:



En ciertas partes de la descripción, el adyuvante es un adyuvante GLA sintético que tiene la siguiente estructura:



En ciertas partes de la descripción, el adyuvante es un adyuvante GLA sintético que tiene la siguiente estructura:



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

- 5 Otros adyuvantes ilustrativos incluyen Montanide ISA 720 (Seppic, Francia), SAF (Chiron, California, Estados Unidos), ISCOMS (CSL), MF-59 (Chiron), la serie de adyuvantes SBAS (p. ej., SBAS-2, AS2', AS2, "SBAS-4, o SBAS6, disponible en SmithKline Beecham, Rixensart, Bélgica), Detox, RC-529 (Corixa, Hamilton, Mont.) y otros aminoalquil glicosaminida 4-fosfatos (AGP), tales como los descritos en la solicitud de patente pendiente de EE.UU. con Nos. de Serie 08/ 853.826 y 09/074.720, y adyuvantes de éter polioxielileno tales como los descritos en el documento WO 99/52549A1.

La vacuna y las composiciones farmacéuticas de la invención pueden formularse usando cualquiera de una variedad de procedimientos bien conocidos. En ciertas partes de la descripción, la vacuna o las composiciones farmacéuticas se preparan como emulsiones estables (p. ej., emulsiones de aceite en agua) o como disoluciones acuosas.

- 15 Las composiciones de la descripción también, o alternativamente, pueden comprender células T específicas para polipéptidos de fusión que comprenden partes inmunogénicas/antigénicas o fragmentos de antígenos de Leishmania o variantes de los mismos, descritos en la presente memoria. Dichas células pueden prepararse generalmente in vitro o ex vivo, usando procedimientos estándar. Por ejemplo, las células T pueden aislarse de la médula ósea, la sangre periférica o una fracción de la médula ósea o la sangre periférica de un paciente. Alternativamente, las células T pueden derivar de seres humanos relacionados o no relacionados, mamíferos no humanos, líneas o cultivos celulares.

- 20 Las células T pueden estimularse con un polipéptido de fusión que comprende polipéptidos de Leishmania o partes inmunogénicas o variantes de los mismos, polinucleótido que codifica dicho polipéptido de fusión y/o una célula presentadora de antígeno (APC) que expresa dicho polipéptido de fusión. Dicha estimulación se realiza en condiciones y durante un tiempo suficiente como para permitir la generación de células T que son específicas para el polipéptido. En ciertas realizaciones, el polipéptido o polinucleótido está presente en un vehículo de administración, tal como una microesfera, para facilitar la generación de células T específicas.

- 30 Se considera que las células T son específicas para un polipéptido de fusión de la invención si las células T proliferan específicamente, segregan citoquinas o destruyen células diana recubiertas con el polipéptido de fusión o que expresan un gen que codifica el polipéptido de fusión. La especificidad de las células T puede evaluarse usando cualquiera de una variedad de técnicas estándar. Por ejemplo, en un ensayo de liberación de cromo o ensayo de proliferación, un índice de estimulación de un incremento de más de dos veces en la lisis y/o la proliferación, en comparación con los controles negativos, indica la especificidad de las células T. Dichos ensayos pueden realizarse, por ejemplo, como se describe en Chen et al., Cancer Res. 54: 1065-1070 (1994)). Alternativamente, la detección de la proliferación de las células T puede conseguirse mediante una variedad de técnicas conocidas. Por ejemplo, la proliferación de las células T puede detectarse midiendo una mayor tasa de síntesis de ADN (p. ej., marcando con pulsos cultivos de células T con timidina tritiada y midiendo la cantidad de timidina tritiada incorporada en el ADN). El contacto con un polipéptido de la invención (10ng/ml-1001,1g/ml, preferiblemente 20ng/ml-251,1g/ml) durante 3-7 días debería producir al menos un aumento de dos veces en la proliferación de las células T. El contacto como se describió anteriormente durante 2-3 horas debería producir la activación de las células T, según se mide con ensayos estándar de citoquinas en los que un aumento de dos veces en el nivel de liberación de citoquinas (p. ej., TNF o IFN-γ) es indicativo de activación de las células T (véase Coligan et al., Current Protocols in Immunology, vol. 1 (1998)). Las células T que se han activado en respuesta a un polipéptido, polinucleótido o APC que expresa el polipéptido pueden ser CD4+ y/o CD8+. Las células T específicas de proteína pueden expandirse usando técnicas estándar. En realizaciones preferidas, las células T derivan de un paciente, un donante relacionado o un donante no relacionado, y se administran al paciente después de la estimulación y expansión.

- 45 En las composiciones de la invención, la formulación de excipientes farmacéuticamente aceptables y disoluciones de vehículo es bien conocida para los expertos en la técnica, como lo es el desarrollo de regímenes de dosificación y

tratamiento adecuados para usar las composiciones particulares descritas en la presente memoria, en una variedad de regímenes de tratamiento, incluyendo, p. ej., la administración y formulación oral, parenteral, intravenosa, intranasal, intradérmica, subcutánea e intramuscular.

5 En ciertas aplicaciones, las composiciones descritas en la presente memoria pueden administrarse mediante administración oral a un sujeto. Como tales, estas composiciones pueden formularse con un diluyente inerte o con un vehículo comestible asimilable, o pueden incluirse en una cápsula de gelatina de cubierta dura o blanda, o pueden comprimirse en comprimidos, o pueden incorporarse directamente con el alimento de la dieta.

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

15 Las formas farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen disoluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de disoluciones o dispersiones inyectables estériles (Pat. de EE.UU. No. 5.466.468). En todos los casos, la forma debe ser estéril y debe ser fluida en la medida en que exista una fácil jeringabilidad. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y debe conservarse frente a la acción contaminante de microorganismos, tales como bacterias y hongos. El vehículo puede ser un disolvente o
20 medio de dispersión que contenga, por ejemplo, agua, etanol, polioliol (p. ej., glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido, y similares), mezclas adecuadas de los mismos y/o aceites vegetales. La fluidez adecuada se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento, tal como la lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de la dispersión y mediante el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de los microorganismos puede facilitarse mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares o cloruro de sodio. La absorción prolongada de las composiciones inyectables se puede lograr mediante el uso en las composiciones de agentes que retrasan la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

30 Para la administración parenteral en una disolución acuosa, por ejemplo, la disolución debe estar adecuadamente tamponada si es necesario y el diluyente líquido debe hacerse en primer lugar isotónico con suficiente disolución salina o glucosa. Estas disoluciones acuosas particulares son especialmente adecuadas para la administración intravenosa, intramuscular, subcutánea e intraperitoneal. A este respecto, un medio acuoso estéril que puede emplearse será conocido por los expertos en la técnica a la luz de la presente descripción. Por ejemplo, una dosificación puede disolverse en 1 ml de disolución isotónica de NaCl y añadirse a 1.000 ml de líquido de hipodermocclisis o inyectarse en el lugar propuesto para la infusión (véase, p. ej., Remington's Pharmaceutical Sciences, 15ª edición, p. 1035-1038 y 1570-1580). Se producirá necesariamente alguna variación en la dosificación dependiendo de la afección del sujeto que se está tratando. La persona responsable de la administración, en cualquier caso, determinará la dosis apropiada para el sujeto individual. Además, para la administración a seres humanos, las preparaciones deben cumplir con los estándares de esterilidad, pirogenicidad y seguridad general y pureza que exigen los estándares de la Oficina de
40 Biológicos de la FDA.

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

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

60 Tal y como se usa en la presente memoria, "vehículo" incluye todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, vehículos, recubrimientos, diluyentes, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y que

retrasan la de absorción, tampones, disoluciones de vehículos, suspensiones, coloides y similares. El uso de dichos medios y agentes para sustancias activas farmacéuticas es bien conocido por los expertos en la técnica. Excepto en la medida en que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con el ingrediente activo, se contempla su uso en las composiciones terapéuticas. También se pueden incorporar ingredientes activos suplementarios en las composiciones.

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

En ciertas partes de la descripción, las composiciones de la presente invención pueden administrarse mediante pulverizaciones intranasales, inhalación y/u otros vehículos de administración de aerosol. Los métodos para administrar genes, polinucleótidos y composiciones peptídicas directamente a los pulmones a través de aerosoles nasales en aerosol se han descrito, p. ej., en la Pat. de EE.UU. No. 5.756.353 y en la Pat. de EE.UU. No. 5.804.212. Del mismo modo, la administración de fármacos que usa resinas de micropartículas intranasales (Takenaga et al., 1998) y compuestos de lisofosfatidilglicerol (Pat. de EE.UU. No. 5.725.871) también son bien conocidos en las técnicas farmacéuticas. Asimismo, la administración transmucosal del fármaco en la forma de una matriz de soporte de politetrafluoroetileno se describe en la Pat. de EE.UU. No. 5.780.045.

En ciertas realizaciones, la administración puede producirse mediante el uso de liposomas, nanocápsulas, micropartículas, microesferas, partículas lipídicas, vesículas y similares, para la introducción de composiciones que comprenden un polipéptido de fusión como se describe en la presente memoria en células huésped adecuadas. En particular, las composiciones de la presente invención pueden formularse para administración encapsuladas en una partícula lipídica, un liposoma, una vesícula, una nanoesfera, una nanopartícula o similares. La formulación y el uso de dichos vehículos de administración pueden llevarse a cabo usando técnicas conocidas y convencionales.

Una composición farmacéutica o inmunogénica puede, alternativamente, contener un inmunoestimulante y una molécula de ADN que codifica uno o más de los polipéptidos o polipéptidos de fusión como se describió anteriormente, de modo que se genere in situ un polipéptido deseado. En dichas composiciones, el ADN que codifica la proteína de fusión puede estar presente en cualquiera de una variedad de sistemas de administración conocidos por los expertos en la técnica, incluidos los sistemas de expresión de ácido nucleico, sistemas de expresión de bacterias y virales. Los sistemas de expresión de ácido nucleico apropiados contienen las secuencias de ADN necesarias para la expresión en el paciente (tales como un promotor adecuado y una señal de terminación). Los sistemas de administración bacterianos implican la administración de una bacteria (tal como *Bacillus-Calmette-Guerrin*) que expresa una parte inmunogénica del polipéptido en su superficie celular. En una realización particular, el ADN puede introducirse usando un sistema de expresión viral (p. ej., virus vaccinia u otro virus pox, retrovirus o adenovirus), que puede implicar el uso de un virus no patógeno (defectuoso), competente para la replicación. Las técnicas para incorporar ADN en dichos sistemas de expresión son bien conocidas por los expertos en la técnica. El ADN también puede estar "desnudo", como se describe, por ejemplo, en Ulmer et al., *Science* 259: 1745-1749 (1993) y revisado por Cohen, *Science* 259: 1691-1692 (1993). La captación de ADN desnudo puede aumentarse recubriendo el ADN sobre perlas biodegradables, que se transportan de manera eficiente en las células.

Las composiciones farmacéuticas y vacunas de la invención se pueden usar, en ciertas realizaciones, para inducir inmunidad protectora frente a especies de *Leishmania* tales como *L. donovani*, *L. major* y/o *L. infantum* en un paciente, tal como un ser humano o un perro, para prevenir la leishmaniasis o disminuir su gravedad. Las composiciones y vacunas también se pueden usar para estimular una respuesta inmune, que puede ser celular y/o humoral, en un paciente, para tratar a un individuo ya infectado. En una realización, para pacientes infectados con *Leishmania*, las respuestas inmunitarias generadas incluyen una respuesta inmunitaria Th1 preferencial (es decir, una respuesta caracterizada por la producción de las citoquinas interleuquina-1, interleuquina-2, interleuquina-12 y/o interferón- γ , así como factor de necrosis tumoral- α). En otra realización, para pacientes no infectados, la respuesta inmune implica la producción de interleuquina-12 y/o interleuquina-2, o la estimulación de las células T gamma delta. En cualquiera de las categorías de pacientes, la respuesta estimulada puede incluir la producción de IL-12. Dichas respuestas también pueden incitarse en muestras biológicas de PBMC o componentes de las mismas derivadas de individuos infectados o no infectados con *Leishmania*. Como se indicó anteriormente, los ensayos para cualquiera de las citoquinas anteriores, así como otras citoquinas conocidas, pueden realizarse generalmente usando métodos conocidos por los expertos en la técnica, tales como un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA).

Las dosis apropiadas y los métodos de administración de polipéptidos de fusión para estos fines pueden determinarse fácilmente por un experto en la técnica usando los conocimientos disponibles en la técnica y/o técnicas de rutina. Las rutas y la frecuencia de la administración, así como la dosificación, para los aspectos anteriores de la presente invención pueden variar de un individuo a otro y pueden ser paralelos a los que se usan actualmente en la inmunización frente a otras infecciones, incluidas las infecciones por protozoos, virales y bacterianas. Por ejemplo, en una realización, se administran entre 1 y 12 dosis de composición que tiene un polipéptido de fusión, que comprende polipéptidos de *Leishmania* o partes inmunogénicas/antigénicas, fragmentos o variantes de los mismos, durante un

período de 1 año. Las vacunas de refuerzo pueden administrarse periódicamente a partir de entonces según sea necesario o deseado. Por supuesto, los protocolos alternativos pueden ser apropiados para pacientes individuales. En una realización particular, una dosis adecuada es una cantidad de polipéptido de fusión o ADN que codifica dicho péptido que, cuando se administra como se describe anteriormente, es capaz de incitar una respuesta inmune en un paciente inmunizado suficiente como para proteger al paciente de la leishmaniasis causada por especies de *Leishmania* tales como *L. donovani*, *L. major* y/o *L. infantum* durante al menos 1-2 años. En general, la cantidad de polipéptido de fusión presente en una dosis (o producida in situ por el ADN en una dosis) varía de aproximadamente 100 ng a aproximadamente 1 mg por kg de huésped, típicamente de aproximadamente 101,1 g a aproximadamente 100 ug. Los tamaños de dosis adecuados variarán con el tamaño del paciente, pero típicamente variarán entre aproximadamente 0,1 ml y aproximadamente 5 ml.

Composiciones, métodos y kits de diagnóstico

Como se muestra en las reivindicaciones, esta invención proporciona compuestos y métodos para detectar leishmaniasis en individuos y en muestras de sangre. En realizaciones particulares, el individuo es un mamífero. En realizaciones más particulares, el mamífero es un ser humano o canino.

Por ejemplo, los polipéptidos de fusión y los polinucleótidos de la presente invención se pueden usar como reactivos de diagnóstico efectivos para detectar y/o monitorizar la infección por *Leishmania* en un paciente. Por ejemplo, las composiciones, polipéptidos de fusión y polinucleótidos de la invención se pueden usar en ensayos in vitro e in vivo para detectar anticuerpos humorales o inmunidad mediada por células frente a *Leishmania* para el diagnóstico de infección, la monitorización de la progresión de la enfermedad o la evaluación del ensayo de cura. En realizaciones particulares, los polipéptidos de fusión y los polinucleótidos son reactivos de diagnóstico útiles para el diagnóstico serológico y el análisis de sangre total en pacientes que tienen leishmaniasis causada por especies de *Leishmania* tales como *L. donovani*, *L. major* y/o *L. infantum*.

En un aspecto, los métodos y kits de diagnóstico emplean preferiblemente un polipéptido o polipéptido de fusión como se describe en la presente memoria. En una realización más particular, un polipéptido de fusión ilustrativo comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 2, o 44. En otra parte de la descripción, los métodos y kits de diagnóstico emplean preferiblemente un polipéptido de fusión que comprende al menos 1, al menos 2, al menos 3 o al menos 4 partes o fragmentos inmunogénicos/antigénicos de polipéptidos de *Leishmania*, variantes o similares, opcionalmente en combinación con uno o más otros antígenos de *Leishmania* o secuencias no de *Leishmania*, como se describe en la presente memoria o se puede obtener en la técnica.

Los antígenos o polipéptidos se pueden usar esencialmente en cualquier formato de ensayo deseado, p. ej., como antígenos individuales analizados por separado, como múltiples antígenos ensayados simultáneamente (p. ej., un polipéptido de fusión), como antígenos inmovilizados en un soporte sólido tal como una matriz, o similares.

En una realización, se proporcionan kits de diagnóstico para detectar infección por *Leishmania* en una muestra biológica, que comprenden (a) un polipéptido o un polipéptido de fusión descrito en la presente memoria o variantes del mismo como se describe en la presente memoria, y (b) un reactivo de detección.

En otra parte de la descripción, se proporcionan kits de diagnóstico para detectar la infección por *Leishmania* en una muestra biológica, que comprenden (a) anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que son específicos para un polipéptido o polipéptidos de fusión descritos en la presente memoria o variantes del mismo como se describe en la presente memoria, y (b) un reactivo de detección.

En otra realización, se proporcionan métodos para detectar la presencia de infección por *Leishmania* en una muestra biológica, que comprenden (a) poner en contacto una muestra biológica con un polipéptido de fusión descrito en la presente memoria o con variantes del mismo descritas en la presente memoria; y (b) detectar en la muestra biológica la presencia de anticuerpos que se unen al polipéptido de fusión.

En otra parte de la descripción, se proporcionan métodos para detectar la presencia de infección por *Leishmania* en una muestra biológica, que comprenden (a) poner en contacto una muestra biológica con al menos 2 anticuerpos monoclonales que se unen a un polipéptido o un polipéptido descrito en la presente memoria o variantes del mismo descritas en la presente memoria; y (b) detectar en la muestra biológica la presencia de proteínas de *Leishmania* que se unen al anticuerpo monoclonal.

Un experto en la técnica reconocerá que los métodos y kits descritos en la presente memoria se pueden usar para detectar todos los tipos de leishmaniasis, dependiendo de la combinación particular de partes inmunogénicas de antígenos de *Leishmania* presentes en el polipéptido de fusión.

Existe una variedad de formatos de ensayo conocidos por los expertos en la técnica para usar un polipéptido de fusión para detectar anticuerpos en una muestra. Véase, p. ej., Harlow y Lane, *Antibodies. A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988. En una realización, el ensayo implica el uso de un polipéptido de fusión inmovilizado en un soporte sólido para unirse y eliminar el anticuerpo de la muestra. El anticuerpo unido puede detectarse entonces usando un reactivo de detección que se une al complejo anticuerpo/péptido y que contiene un grupo informador detectable. Los reactivos de detección adecuados son bien conocidos e incluyen, por ejemplo, anticuerpos que se

unen al complejo anticuerpo/polipéptido y polipéptido libre marcado con un grupo informador (p. ej., en un ensayo semicompetitivo). Los grupos informadores adecuados también son bien conocidos e incluyen, por ejemplo, marcadores fluorescentes, marcadores enzimáticos, radioisótopos, marcadores quimioluminiscentes, marcadores electroquimioluminiscentes, marcadores bioluminiscentes, polímeros, partículas poliméricas, partículas metálicas, haptenos y tintes. Alternativamente, puede utilizarse un ensayo competitivo, en el que un anticuerpo que se une a un polipéptido de fusión de la presente invención se marca con un grupo informador y se permite que se una al polipéptido de fusión inmovilizado después de la incubación del polipéptido de fusión con la muestra. El grado en el que los componentes de la muestra inhiben la unión del anticuerpo marcado al polipéptido de fusión es indicativo de la reactividad de la muestra con el polipéptido de fusión inmovilizado.

El soporte sólido puede ser cualquier material conocido por los expertos en la técnica al que se puede unir el polipéptido de fusión. Por ejemplo, el soporte puede ser un pocillo de ensayo en una placa de microtitulación o una membrana de nitrocelulosa u otra membrana adecuada. Alternativamente, el soporte puede ser un lecho o disco, tal como un material de vidrio, fibra de vidrio, látex o plástico tal como poliestireno o cloruro de polivinilo. El soporte también puede ser una partícula magnética o un sensor de fibra óptica, tales como los descritos, por ejemplo, en la Pat. de EE.UU. No. 5.359.681.

El polipéptido de fusión puede unirse al soporte sólido usando una variedad de técnicas conocidas por los expertos en la técnica, que se describen ampliamente en la bibliografía de patentes y científica. En el contexto de la presente invención, el término "unido" se refiere tanto a la asociación no covalente, como la adsorción, como a la unión covalente (que puede ser un enlace directo entre el antígeno y los grupos funcionales en el soporte o puede ser un enlace mediante un agente de reticulación). Se prefiere la unión por adsorción a un pocillo en una placa de microtitulación o a una membrana. En dichos casos, la adsorción se puede lograr poniendo en contacto el polipéptido, en un tampón adecuado, con el soporte sólido durante un período de tiempo adecuado. El tiempo de contacto varía con la temperatura, pero generalmente se encuentra entre aproximadamente 1 hora y 1 día. En general, la puesta en contacto de un pocillo de una placa de microtitulación de plástico (tal como poliestireno o cloruro de polivinilo) con una cantidad de polipéptido de fusión que varía de aproximadamente 10 ng a aproximadamente 1 pg, y preferiblemente aproximadamente 100 ng, es suficiente para unir una cantidad adecuada de antígeno. La nitrocelulosa se unirá aproximadamente a 100 pg de proteína por 3 cm.

La unión covalente del polipéptido de fusión a un soporte sólido generalmente se puede lograr haciendo reaccionar primero el soporte con un reactivo bifuncional que reaccionará tanto con el soporte como con un grupo funcional, tal como un grupo hidroxilo o amino, en el polipéptido de fusión. Por ejemplo, el polipéptido de fusión se puede unir a un soporte que tiene un recubrimiento de polímero apropiado usando benzoquinona o por condensación de un grupo aldehído en el soporte con una amina y un hidrógeno activo en el polipéptido (véase, p. ej., Pierce Immunotechnology Catalog and Handbook (1991) en A12-A13).

En ciertas realizaciones, el ensayo es un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA). Este ensayo se puede realizar poniendo primero en contacto un polipéptido de fusión de la presente invención que se ha inmovilizado en un soporte sólido, comúnmente el pocillo de una placa de microtitulación, con la muestra, de modo que se permite a los anticuerpos frente a los antígenos de Leishmania del polipéptido de fusión en la muestra unirse al polipéptido de fusión inmovilizado. La muestra no unida se retira entonces del polipéptido de fusión inmovilizado y se añade un reactivo de detección capaz de unirse al complejo inmovilizado de anticuerpo-polipéptido. La cantidad de reactivo de detección que permanece unida al soporte sólido se determina entonces usando un método apropiado para el reactivo de detección específico.

Una vez que el polipéptido de fusión se inmoviliza en el soporte, los sitios de unión a proteínas remanentes en el soporte generalmente se bloquean. Se puede emplear cualquier agente bloqueante adecuado conocido por los expertos en la técnica, tal como albúmina de suero bovino (BSA) o Tween 20™ (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO). El polipéptido inmovilizado se incuba entonces con la muestra, y se deja que el anticuerpo (si está presente en la muestra) se una al antígeno. La muestra puede diluirse con un diluyente adecuado, tal como disolución salina tamponada con fosfato (PBS) antes de la incubación. En general, un tiempo de contacto apropiado (es decir, tiempo de incubación) es ese período de tiempo que es suficiente para permitir la detección de la presencia de anticuerpo en una muestra infectada con Leishmania. Preferiblemente, el tiempo de contacto es suficiente como para alcanzar un nivel de unión que es al menos el 95% del alcanzado en equilibrio entre el anticuerpo unido y el no unido. Los expertos en la técnica reconocerán que el tiempo necesario para alcanzar el equilibrio se puede determinar fácilmente ensayando el nivel de unión que se produce durante un período de tiempo. A temperatura ambiente, generalmente es suficiente un tiempo de incubación de unos 30 minutos.

La muestra no unida se puede eliminar entonces lavando el soporte sólido con un tampón apropiado, tal como PBS que contiene Tween 20™ al 0,1%. El reactivo de detección se puede añadir entonces al soporte sólido. Un reactivo de detección apropiado es cualquier compuesto que se une al complejo de anticuerpo-polipéptido inmovilizado y que puede detectarse por cualquiera de una variedad de medios conocidos por los expertos en la técnica. Preferiblemente, el reactivo de detección contiene un agente de unión (tal como, por ejemplo, Proteína A, Proteína G, inmunoglobulina, lectina o antígeno libre) conjugado con un grupo informador. Los grupos informadores preferidos incluyen enzimas (tales como peroxidasa de rábano), sustratos, cofactores, inhibidores, colorantes, radionúclidos, grupos luminiscentes, grupos fluorescentes, oro coloidal y biotina. La conjugación del agente de unión al grupo informador se puede lograr

usando métodos estándar conocidos por los expertos en la técnica. Los agentes aglutinantes comunes también se pueden adquirir conjugados a una variedad de grupos informadores de muchas fuentes (p. ej., Zymed Laboratories, San Francisco, California y Pierce, Rockford, IL).

5 El reactivo de detección se incuba entonces con el complejo anticuerpo polipéptido inmovilizado durante un tiempo suficiente como para detectar el anticuerpo unido. Por lo general, se puede determinar una cantidad de tiempo apropiada a partir de las instrucciones del fabricante o mediante el ensayo del nivel de unión que se produce durante un período de tiempo. El reactivo de detección no unido se elimina entonces y el reactivo de detección unido se detecta usando el grupo informador. El método empleado para detectar el grupo informador depende de la naturaleza del grupo informador. Para grupos radiactivos, el recuento de centelleo o los métodos autorradiográficos son generalmente apropiados. Se pueden usar métodos espectroscópicos para detectar colorantes, grupos luminiscentes y grupos fluorescentes. La biotina se puede detectar usando avidina, acoplada a un grupo informador diferente (comúnmente un grupo radioactivo o fluorescente o una enzima). Los grupos informadores enzimáticos generalmente pueden detectarse mediante la adición de sustrato (generalmente durante un período específico de tiempo), seguido de un análisis espectroscópico u otro de los productos de reacción.

15 Para determinar la presencia o ausencia de anticuerpos anti-Leishmania en la muestra, la señal detectada del grupo informador que permanece unido al soporte sólido generalmente se compara con una señal que corresponde a un valor de corte predeterminado. En una realización, el valor de corte es preferiblemente la señal media promediada obtenida cuando el polipéptido inmovilizado se incuba con muestras de un paciente no infectado. En general, una muestra que genera una señal que está tres desviaciones estándar por encima del valor de corte predeterminado se considera positiva (es decir, reactiva con el polipéptido). Alternativamente, el valor de corte se determina usando una Curva de Operación del Receptor, según el método de Sackett et al., *Clinical Epidemiology: A Basic Science for Clinical Medicine*, p. 106-7 (Little Brown y Co., 1985). En resumen, el valor de corte puede determinarse a partir de una gráfica de pares de tasas de verdaderos positivos (es decir, sensibilidad) y tasas de falsos positivos (100% de especificidad) que corresponden a cada valor de corte posible para el resultado del ensayo de diagnóstico. El valor de corte en la gráfica que está más cerca de la esquina izquierda superior (es decir, el valor que encierra el área más grande) es el valor de corte más preciso, y una muestra que genera una señal que es más alta que el valor de corte determinado por este método puede considerarse positiva. Alternativamente, el valor de corte puede desplazarse hacia la izquierda a lo largo de la gráfica, para minimizar la tasa de falsos positivos, o hacia la derecha, para minimizar la tasa de falsos negativos.

20 En otras partes de la descripción, se realiza un ensayo en un formato de ensayo de flujo continuo, en donde el antígeno se inmoviliza en una membrana tal como nitrocelulosa. En el ensayo de flujo continuo, los anticuerpos en la muestra se unen al polipéptido inmovilizado cuando la muestra pasa a través de la membrana. Un reactivo de detección (p. ej., proteína A-oro coloidal) se une entonces al complejo anticuerpo-polipéptido a medida que la disolución que contiene el reactivo de detección fluye a través de la membrana. La detección del reactivo de detección unido puede realizarse entonces como se describió anteriormente.

25 En otras partes de la descripción, se realiza un ensayo en un formato de ensayo de tira, también conocido como formato de flujo lateral. Aquí, un extremo de la membrana a la que está unido el polipéptido se sumerge en una disolución que contiene la muestra. La muestra migra a lo largo de la membrana a través de una región que contiene reactivo de detección y al área del polipéptido de fusión inmovilizado. La concentración del reactivo de detección en el polipéptido de fusión indica la presencia de anticuerpos de Leishmania en la muestra. Normalmente, la concentración de reactivo de detección en ese sitio genera un patrón, tal como una línea, que se puede leer visualmente. La ausencia de dicho patrón indica un resultado negativo. En general, la cantidad de polipéptido de fusión inmovilizado en la membrana se selecciona para generar un patrón visualmente discernible cuando la muestra biológica contiene un nivel de anticuerpos que sería suficiente para generar una señal positiva en un ELISA, como se discutió anteriormente. Preferiblemente, la cantidad de polipéptido de fusión inmovilizado en la membrana varía de aproximadamente 25 ng a aproximadamente 1 µg, y más preferiblemente de aproximadamente 50 ng a aproximadamente 500 ng. Dichos ensayos se pueden realizar típicamente con una cantidad muy pequeña (p. ej., una gota) de suero o sangre del paciente. Los ensayos de flujo lateral pueden funcionar como ensayos competitivos o en sándwich.

30 En aún otras partes de la descripción, un polipéptido de fusión de la invención se adapta para su uso en un ensayo de plataforma de doble vía (DPP). Dichos ensayos se describen, por ejemplo, en la Patente de EE.UU. No. 7.189.522.

Por supuesto, existen otros numerosos protocolos de ensayo que son adecuados para uso con los polipéptidos de fusión de la presente invención. Se entenderá que las descripciones anteriores pretenden ser únicamente ejemplares.

35 Los ensayos discutidos anteriormente se pueden usar, en ciertos aspectos de la invención, para detectar específicamente la leishmaniasis visceral. En este aspecto, los anticuerpos en la muestra pueden detectarse usando un polipéptido de fusión de la presente invención, p. ej., que comprende una secuencia de aminoácidos de fragmentos antigénicos/inmunogénicos o epítopos de antígenos de Leishmania. Preferiblemente, los antígenos de Leishmania se inmovilizan por adsorción a un soporte sólido tal como un pocillo de una placa de microtitulación o una membrana, como se describió anteriormente, en cantidades aproximadamente similares, de manera que la cantidad total de polipéptido de fusión en contacto con el soporte varía de aproximadamente 10 ng a aproximadamente 100 µg. El resto

de las etapas en el ensayo generalmente se puede realizar como se describió anteriormente. Será fácilmente evidente para los expertos en la técnica que, al combinar los polipéptidos descritos en la presente memoria con otros polipéptidos que pueden detectar leishmaniasis cutánea y mucosal, los polipéptidos descritos en la presente memoria pueden usarse en métodos que detectan todos los tipos de leishmaniasis.

5 En otro aspecto de esta descripción, se pueden usar polipéptidos de fusión inmovilizados para purificar anticuerpos que se unen a los mismos. Dichos anticuerpos se pueden preparar mediante cualquiera de una variedad de técnicas conocidas por los expertos en la técnica. Véase, p. ej., Harlow y Land, *Antibodies. A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988. En una de dichas técnicas, un inmunógeno que comprende un polipéptido de fusión de la presente invención se inyecta inicialmente en cualquiera de una amplia variedad de mamíferos (p. ej., ratones, ratas, conejos, ovejas y cabras). En esta etapa, el polipéptido puede servir como el inmunógeno sin modificación. Alternativamente, particularmente para polipéptidos relativamente cortos, se puede incitar una respuesta inmune superior si el polipéptido se une a una proteína portadora, como la albúmina de suero bovino o la hemocianina de lapa. El inmunógeno se inyecta en el huésped animal, preferiblemente según un programa predeterminado que incorpora una o más inmunizaciones de refuerzo, y los animales se sangran periódicamente. Los anticuerpos policlonales específicos para el polipéptido pueden purificarse entonces a partir de dichos antisueros, por ejemplo, mediante cromatografía de afinidad usando el polipéptido acoplado a un soporte sólido adecuado.

Los anticuerpos monoclonales específicos para el polipéptido de fusión antigénico de interés se pueden preparar, por ejemplo, usando la técnica de Kohler y Milstein, *Eur. J. Immunol.* 6: 511-519, 1976, y sus mejoras. Brevemente, estos métodos implican la preparación de líneas celulares inmortales capaces de producir anticuerpos que tienen la especificidad deseada (es decir, reactividad con el polipéptido de interés). Dichas líneas celulares se pueden producir, por ejemplo, a partir de células de bazo obtenidas de un animal inmunizado como se describió anteriormente. Las células del bazo se immortalizan entonces, por ejemplo, mediante fusión con una pareja de fusión de células de mieloma, preferiblemente una que es singénica con el animal inmunizado. Se puede emplear una variedad de técnicas de fusión. Por ejemplo, las células de bazo y las células de mieloma se pueden combinar con un detergente no iónico durante unos minutos y luego se siembran en placas a baja densidad en un medio selectivo que apoya el crecimiento de células híbridas, pero no de células de mieloma. Una técnica de selección preferida usa la selección de HAT (hipoxantina, aminopterina, timidina). Después de un tiempo suficiente, generalmente de aproximadamente 1 a 2 semanas, se observan colonias de híbridos. Las colonias individuales se seleccionan y se ensayan para determinar la actividad de unión frente al polipéptido. Se prefieren los hibridomas que tienen alta reactividad y especificidad.

Los anticuerpos monoclonales se pueden aislar de los sobrenadantes de colonias de hibridomas en crecimiento. En este proceso, se pueden emplear diversas técnicas para mejorar el rendimiento, tal como la inyección de la línea celular de hibridoma en la cavidad peritoneal de un huésped vertebrado adecuado, tal como un ratón. Los anticuerpos monoclonales se pueden recoger entonces del líquido ascítico o de la sangre. Los contaminantes pueden eliminarse de los anticuerpos mediante técnicas convencionales, como cromatografía, filtración en gel, precipitación y extracción. Se pueden usar uno o más polipéptidos en el proceso de purificación, por ejemplo, en una etapa de cromatografía de afinidad.

Los anticuerpos monoespecíficos que se unen a un polipéptido de fusión que comprende dos o más partes inmunogénicas de antígenos de *Leishmania* se pueden usar, por ejemplo, para detectar la infección por *Leishmania* en una muestra biológica usando uno de una variedad de inmunoensayos, que pueden ser directos o competitivos. Brevemente, en un formato de ensayo directo, un anticuerpo monoespecífico puede inmovilizarse en un soporte sólido (como se describió anteriormente) y ponerse en contacto con la muestra a ensayar. Después de la retirada de la muestra no unida, se puede añadir un segundo anticuerpo monoespecífico, que se ha marcado con un grupo informador, y se puede usar para detectar el antígeno unido. En un ensayo competitivo ejemplar, la muestra se puede combinar con el anticuerpo monoclonal o policlonal, que se ha marcado con un grupo informador adecuado. La mezcla de muestra y anticuerpo puede combinarse entonces con un antígeno polipeptídico inmovilizado en un soporte sólido adecuado. Se permite que el anticuerpo que no se haya unido a un antígeno en la muestra se una al antígeno inmovilizado y se retira el resto de la muestra y el anticuerpo. El nivel de anticuerpo unido al soporte sólido está inversamente relacionado con el nivel de antígeno en la muestra. Por lo tanto, un nivel más bajo de anticuerpo unido al soporte sólido indica la presencia de *Leishmania* en la muestra. Otros formatos para el uso de anticuerpos monoespecíficos para detectar *Leishmania* en una muestra serán evidentes para los expertos en la técnica, y los formatos anteriores se proporcionan únicamente con fines ejemplares.

Tal y como se usa en esta memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una" y "el/la" incluyen los referentes plurales, a no ser que el contenido indique claramente otra cosa. Así, por ejemplo, la referencia a "un polipéptido" incluye opcionalmente dos o más polipéptidos, y similares.

Se entiende que el aspecto y las realizaciones de la invención descrita en la presente memoria incluyen "que comprende", "que consiste en" y "que consiste esencialmente en" aspectos y realizaciones.

Las diversas realizaciones descritas anteriormente se pueden combinar para proporcionar realizaciones adicionales. Todas las patentes de EE. UU., las publicaciones de solicitudes de patentes de EE. UU., las solicitudes de patentes de EE. UU., las patentes extranjeras, las solicitudes de patentes extranjeras y las publicaciones no de patentes a las que se hace referencia en esta memoria descriptiva y/o se enumeran en la Hoja de Datos de la Solicitud.

Ejemplos

Ejemplo 1: Construcción de polipéptidos de fusión de la invención

Polipéptido de fusión NSC. El polipéptido de fusión referido como NSC se generó por el enlace en tándem de los marcos de lectura abiertos de Leishmania de polinucleótidos que codifican los polipéptidos para la nucleósido hidrolasa no específica de longitud completa (NH, Nh o N), la esterol 24-c-metiltransferasa de longitud completa (SMT o S), y un fragmento carboxi-terminal del polipéptido de cisteína polipeptidasa B (CPB, CpB o C). NSC tiene una secuencia de 2.868 nucleótidos como se muestra en la SEQ ID NO: 1 que comprende los nucleótidos 1 a 942 que codifican los aminoácidos 1 a 314 del polipéptido NH de *Leishmania infantum* y/o *L donovani*, los polinucleótidos 943 a 1998 que codifican los aminoácidos 2 a 353 del polipéptido SMT de *Leishmania infantum*, y los nucleótidos 1999 a 2868 que codifican los aminoácidos 154 a 443 del extremo carboxi del polipéptido CPB de *Leishmania infantum*. NSC tiene una secuencia polipeptídica mostrada en la SEQ ID NO: 2 que comprende los aminoácidos 1 a 314 del polipéptido NH, H de longitud completa de *Leishmania infantum/donovani*, los aminoácidos 2 a 353 del polipéptido SMT de *Leishmania infantum* de longitud completa, y los aminoácidos 154 a 443 del extremo carboxi del polipéptido CPB de *Leishmania infantum*. El polipéptido de fusión de 956 aminoácidos con una masa predicha de 105.106 Daltons se expresó en *E. coli* y se purificó por cromatografía en columna.

Polipéptido de fusión NSA. El polipéptido de fusión referido como NSA se generó por el enlace en tándem de los marcos de lectura abiertos de Leishmania de los polinucleótidos que codifican los polipéptidos, la nucleósido hidrolasa no específica de longitud completa (NH, Nh o H), la esterol 24-c-metiltransferasa de longitud completa (SMT o S), y el polipéptido A2 maduro (A2 o A). NSA tiene una secuencia de 2.640 nucleótidos como se muestra en la SEQ ID NO: 3 que comprende los polinucleótidos 1-942 que codifican los aminoácidos 1 a 314 del polipéptido NH de *Leishmania infantum* o *L donovani*, los polinucleótidos 943 a 1998 que codifican los aminoácidos 2 a 353 del polipéptido SMT de *Leishmania infantum*, y los nucleótidos 1999 a 2640 que codifican los aminoácidos 23 a 236 del polipéptido A2 maduro de *Leishmania donovani*. NSA tiene una secuencia polipeptídica mostrada en la SEQ ID NO: 2 que comprende los aminoácidos 1 a 314 del polipéptido NH de longitud completa de *Leishmania infantum* o *L donovani*, los aminoácidos 2 a 353 del polipéptido SMT de *Leishmania infantum* de longitud completa y los aminoácidos 23-236 del polipéptido A2 maduro de *Leishmania donovani*. El polipéptido de fusión de 880 aminoácidos con una masa predicha de 93.729 Daltons se expresó en *E. coli* y se purificó por cromatografía en columna.

Polipéptido de fusión NSAfI. El polipéptido de fusión referido como NSAfI se generó por el enlace en tándem de los marcos de lectura abiertos de Leishmania de polinucleótidos que codifican los polipéptidos para la nucleósido hidrolasa no específica de longitud completa (NH, Nh o H), esterol 24-c-metiltransferasa de longitud completa (SMT o S), y el polipéptido A2 de longitud completa (A2fI o AfI). NSAfI tiene una secuencia de 2.703 nucleótidos como se muestra en la SEQ ID NO: 5 que comprende los polinucleótidos 1-942 que codifican los aminoácidos 1 a 314 del polipéptido NH de *Leishmania infantum* o *L donovani*, los polinucleótidos 943 a 1998 que codifican los aminoácidos 2 a 353 del polipéptido SMT de *Leishmania infantum*, y los nucleótidos 1999 a 2778 que codifican los aminoácidos 1 a 236 del polipéptido A2 de longitud completa de *Leishmania donovani*. NSAfI tiene una secuencia polipeptídica mostrada en la SEQ ID NO: 6 que comprende los aminoácidos 1 a 314 del polipéptido NH, H de longitud completa de *Leishmania infantum* o *L donovani*, los aminoácidos 2 a 353 del polipéptido SMT de *Leishmania infantum* de longitud completa, y los aminoácidos 1-236 del polipéptido A2 de longitud completa de *Leishmania donovani*. El polipéptido de fusión de 926 aminoácidos con una masa predicha de 95.928 Daltons kDa se expresó en *E. coli* y se purificó por cromatografía en columna.

Polipéptido de fusión HNSA. El polipéptido de fusión referido como HNSA se generó por el enlace en tándem del marco de lectura abierto de polinucleótidos que codifican el fragmento amino-terminal del polipéptido de la histona H2BN (H2BN, h2Bn o H), la nucleósido hidrolasa no específica de longitud completa (NH, N, o H), la esterol 24-c-metiltransferasa de longitud completa (SMT) y el polipéptido A2 maduro (A2 o A). HNSA tiene una secuencia de 2.778 nucleótidos como se muestra en la SEQ ID NO: 7 que comprende los polinucleótidos 1 a 138 que codifican los aminoácidos 1 a 46 del extremo amino del polipéptido de la histona H2BN de *L infantum*, los polinucleótidos 139 a 1080 que codifican los aminoácidos 1 a 314 del polipéptido NH de *Leishmania infantum* o *L donovani*, los polinucleótidos 1081 a 2136 que codifican los aminoácidos 2 a 353 del polipéptido SMT de *Leishmania infantum*, y los nucleótidos 2137 a 2778 que codifican los aminoácidos 23-236 del polipéptido A2 maduro (A2 se refiere como maduro porque la secuencia carece de la secuencia señal del polipéptido de longitud completa) de *Leishmania donovani*. HNSA tiene una secuencia polipeptídica mostrada en la SEQ ID NO: 8 que comprende los aminoácidos 1 a 46 del extremo amino del polipéptido de histona H2BN, los aminoácidos 1 a 314 del polipéptido NH de longitud completa de *Leishmania infantum* o *L donovani*, los aminoácidos 2 a 353 del polipéptido SMT de *Leishmania infantum* de longitud completa, y los aminoácidos 23-236 del polipéptido A2 maduro de *Leishmania donovani*. El polipéptido de fusión de 926 aminoácidos con una masa predicha de 98.942 Daltons se expresó en *E. coli* y se purificó por cromatografía en columna.

Polipéptido de fusión 8NSA. El polipéptido de fusión referido como 8NSA fue generado por el enlace en tándem de un marco de lectura abierto de polinucleótidos que codifican un codón de inicio de Met (ATG) añadido al extremo 5' de un fragmento del extremo carboxi del supuesto polipéptido mitocondrial HSP70 (8E u 8), dos marcos de lectura abiertos de Leishmania que codifican los polipéptidos, nucleósido hidrolasa no específica (NH, H) y esterol 24-c-metiltransferasa (SMT), y el marco de lectura abierto para el polipéptido A2, A maduro (A2, A). 8NSA tiene una

secuencia polinucleotídica 3.099 como se muestra en la SEQ ID NO: 9 que comprende los polinucleótidos 1 a 459 que codifican los aminoácidos 509 a 660 del extremo carboxi del supuesto polipéptido mitocondrial HSP70 (8E u 8) de *L infantum*, los polinucleótidos 460 a 1401 que codifican los aminoácidos 1 a 314 del polipéptido NH, H de *Leishmania infantum/donovani*, los polinucleótidos 1402 a 2457 que codifican los aminoácidos 2 a 353 del polipéptido SMT de *Leishmania infantum*, y los nucleótidos 2458 a 3099 que codifican los aminoácidos 23 a 236 del polipéptido A2, A maduro (el A2, A se refiere como maduro porque la secuencia carece de la secuencia señal del polipéptido de longitud completa) de *Leishmania donovani*. 8NSA tiene una secuencia polipeptídica mostrada en la SEQ ID NO: 10 que comprende los aminoácidos 509 a 660 del extremo carboxi del supuesto polipéptido HSP70 mitocondrial (8E u 8) de *L infantum*, los aminoácidos 1 a 314 del polipéptido NH, H de longitud completa de *Leishmania infantum/donovani*, los aminoácidos 2 a 353 del polipéptido SMT de *Leishmania infantum* de longitud completa, y los aminoácidos 23-236 del polipéptido A2, A maduro de *Leishmania donovani*. El polipéptido de fusión de 1033 aminoácidos con una masa predicha de 110.948 Daltons se expresó en *E. coli* y se purificó por cromatografía en columna.

Polipéptido de fusión 21NSA. El polipéptido de fusión referido como 21NSA se generó por el enlace en tándem de tres marcos de lectura abiertos de *Leishmania* que codifican los polipéptidos antígeno p21, nucleósido hidrolasa no específica (NH, H) y esterol 24-c-metiltransferasa (SMT), y el marco de lectura abierto para el polipéptido A2, A maduro (A2, A). 21NSA tiene una secuencia de 3.213 nucleótidos como se muestra en la SEQ ID NO: 11 que comprende los polinucleótidos 1 a 573 que codifican los aminoácidos 1 a 191 del antígeno p21 de *Leishmania infantum*, los polinucleótidos 574 a 1515 que codifican los aminoácidos 1 a 314 del polipéptido NH de *Leishmania infantum/donovani*, los polinucleótidos 1516 a 2571 que codifican los aminoácidos 2 a 353 del polipéptido SMT de *Leishmania infantum*, y los nucleótidos 2572 a 3213 que codifican los aminoácidos 23-236 del polipéptido A2, A maduro de *Leishmania donovani*. NSA tiene una secuencia polipeptídica mostrada en la SEQ ID NO: 12 que comprende los aminoácidos 1 a 191 del antígeno p21 de *Leishmania infantum*, los aminoácidos 1 a 314 del polipéptido NH, H de longitud completa de *Leishmania infantum/donovani*, los aminoácidos 2 a 353 del polipéptido SMT de *Leishmania infantum* de longitud completa, y los aminoácidos 23-236 del polipéptido A2, A maduro de *Leishmania donovani*. El polipéptido de fusión de 1071 aminoácidos con una masa predicha de 115.082 Daltons se expresó en *E. coli* y se purificó por cromatografía en columna.

Polipéptido de fusión 821NS. El polipéptido de fusión referido como 821NS se generó por el enlace en tándem de un marco de lectura abierto de polinucleótidos que codifican un codón de iniciación de metionina (ATG) añadido al extremo 5' de un fragmento del extremo carboxi del supuesto polipéptido mitocondrial HSP70 (8E u 8), el marco de lectura abierto que codifica el antígeno p21 y dos marcos de lectura abiertos de *Leishmania* que codifican los polipéptidos, nucleósido hidrolasa no específica (NH, H) y esterol 24-c-metiltransferasa (SMT). 821NS tiene una secuencia polinucleotídica 3.030 como se muestra en la SEQ ID NO: 13 que comprende los polinucleótidos 1 a 459 que codifican los aminoácidos 509 a 660 del extremo carboxi del supuesto polipéptido mitocondrial HSP70 (8E u 8) de *L infantum*, los polinucleótidos 460 a 1032 que codifican los aminoácidos 1 a 191 del antígeno p21 de *Leishmania infantum*, los nucleótidos 1033 a 1974 que codifican los aminoácidos 1 a 314 del polipéptido NH, H de *Leishmania infantum/donovani*, los polinucleótidos 1975 a 3030 que codifican los aminoácidos 2 a 353 del polipéptido SMT de *Leishmania infantum*. 821NS tiene una secuencia polipeptídica mostrada en la SEQ ID NO: 14 que comprende los aminoácidos 509 a 660 del extremo carboxi del supuesto polipéptido HSP70 mitocondrial (8E u 8) de *L infantum*, los aminoácidos 1 a 191 del polipéptido del antígeno p21 de *Leishmania donovani*, los aminoácidos 1 a 314 del NH del polipéptido NH, H de longitud completa de *Leishmania infantum/donovani*, los aminoácidos 2 a 353 del polipéptido SMT de *Leishmania infantum* de longitud completa. El polipéptido de fusión de 1.010 aminoácidos con una masa predicha de 112.565 Daltons se expresó en *E. coli* y se purificó por cromatografía en columna.

Polipéptido de fusión HNS. El polipéptido de fusión referido como HNS se generó mediante el enlace en tándem de un marco de lectura abierto para el extremo amino del polipéptido de histona H2BN (H) (H2BN (H)) y dos marcos de lectura abiertos de *Leishmania* que codifican los polipéptidos, nucleósido hidrolasa no específica (NH, H) y esterol 24-c-metiltransferasa (SMT). HNS tiene una secuencia de 2.136 nucleótidos como se muestra en la SEQ ID NO: 15 que comprende los polinucleótidos 1 a 138 que codifican los aminoácidos 1 a 46 del extremo amino del polipéptido de la histona H2BN (H) de *L infantum*, los polinucleótidos 139-1080 que codifican los aminoácidos 1 a 314 del polipéptido NH, H de *Leishmania infantum/donovani* y los polinucleótidos 1081 a 2136 que codifican los aminoácidos 2 a 353 del polipéptido SMT de *Leishmania infantum*. HNS tiene una secuencia polipeptídica mostrada en la SEQ ID NO: 16 que comprende los aminoácidos 1 a 46 del extremo amino del polipéptido de histona H2BN (H), los aminoácidos 1 a 314 del polipéptido NH, H de longitud completa de *Leishmania infantum/donovani* y los aminoácidos 2 a 353 del polipéptido SMT de *Leishmania infantum* de longitud completa. El polipéptido de fusión de 712 aminoácidos con una masa predicha de 79.205 Daltons se expresó en *E. coli* y se purificó por cromatografía en columna.

Polipéptido de fusión 8NS. El polipéptido de fusión referido como 8NS se generó por el enlace en tándem de un marco de lectura abierto de polinucleótidos que codifican un codón de iniciación de metionina (ATG) añadido al extremo 5' de un fragmento del extremo carboxi del supuesto polipéptido mitocondrial HSP70 (8E u 8) y dos marcos de lectura abiertos de *Leishmania* que codifican los polipéptidos, nucleósido hidrolasa no específica (NH, H) y esterol 24-c-metiltransferasa (SMT). 8NS tiene una secuencia de polinucleótidos de 2457 como se muestra en la SEQ ID NO: 17 que comprende los polinucleótidos 1 a 459 que codifican los aminoácidos 509 a 660 del extremo carboxi del supuesto polipéptido mitocondrial HSP70 (8E u 8) de *L infantum*, los polinucleótidos 460 a 1401 que codifican los aminoácidos 1 a 314 del polipéptido NH, H de *Leishmania infantum/donovani*, y los polinucleótidos 1042 a 2457 del polipéptido SMT de *Leishmania infantum*. 8NS tiene una secuencia polipeptídica mostrada en la SEQ ID NO: 18 que comprende los

aminoácidos 509 a 660 del extremo carboxi del supuesto polipéptido HSP70 mitocondrial (8E u 8) de *L. infantum*, los aminoácidos 1 a 314 del polipéptido NH, H de longitud completa de *Leishmania infantum/donovani*, y los aminoácidos 2 a 353 del polipéptido SMT de *Leishmania infantum* de longitud completa. El polipéptido de fusión de 819 aminoácidos con una masa predicha de 90.970 Daltons se expresó en *E. coli* y se purificó por cromatografía en columna.

5 Polipéptido de fusión 21NS. El polipéptido de fusión referido como 21NS se generó por el enlace en tándem de tres marcos de lectura abiertos de *Leishmania* que codifican los polipéptidos del antígeno p21, nucleósido hidrolasa no específica (NH, H) y esterol 24-c-metiltransferasa (SMT). 21NS tiene una secuencia de 2.571 nucleótidos como se muestra en la SEQ ID NO: 19 que comprende los polinucleótidos 1 a 573 que codifican los aminoácidos 1 a 191 del antígeno p21 de *Leishmania infantum*, los polinucleótidos 574 a 1515 que codifican los aminoácidos 1 a 314 del polipéptido NH, H de *Leishmania infantum/donovani* y los polinucleótidos 1516 a 2571 que codifican los aminoácidos 2 a 353 del polipéptido SMT de *Leishmania infantum*. 21NS tiene una secuencia polipeptídica mostrada en la SEQ ID NO: 20 que comprende los aminoácidos 1 a 191 del antígeno p21 de *Leishmania infantum*, los aminoácidos 1 a 314 del polipéptido NH, H de longitud completa de *Leishmania infantum/donovani* y los aminoácidos 2 a 353 del polipéptido SMT de *Leishmania infantum* de longitud completa. El polipéptido de fusión de 857 aminoácidos con una masa predicha de 94 KDa se expresó en *E. coli* y se purificó por cromatografía en columna.

10 Polipéptido de fusión 21SC. El polipéptido de fusión referido como 21SC se generó por el enlace en tándem de los marcos de lectura abiertos de *Leishmania* que codifican los polipéptidos antígeno p21, esterol 24-c-metiltransferasa (SMT), y un marco de lectura abierto que codifica un fragmento del polipéptido cisteína polipeptidasa B (CPB). 21SC tiene una secuencia de 2.499 nucleótidos como se muestra en la SEQ ID NO: 21 que comprende los polinucleótidos 1 a 573 que codifican los aminoácidos 1 a 191 del antígeno p21 de *Leishmania infantum*, los polinucleótidos 574 a 1629 que codifican los aminoácidos 2 a 353 del polipéptido SMT de *Leishmania infantum* y los nucleótidos 1630 a 2499 que codifican los aminoácidos 154 a 443 del extremo carboxi del polipéptido CPB de *Leishmania infantum*. 21SC tiene una secuencia polipeptídica mostrada en la SEQ ID NO: 22 que comprende los aminoácidos 1 a 191 del antígeno p21 de *Leishmania infantum*, los aminoácidos 2 a 353 del polipéptido SMT de *Leishmania infantum* de longitud completa, los aminoácidos 154 a 443 del extremo carboxi del polipéptido CPB de *Leishmania infantum*. El polipéptido de fusión de 833 aminoácidos con una masa predicha de 92.239 Daltons se expresó en *E. coli* y se purificó por cromatografía en columna.

20 Polipéptido de fusión 821S. El polipéptido de fusión referido como 821S fue polipeptiderado por el enlace en tándem de un marco de lectura abierto de polinucleótidos que codifican un codón de iniciación de metionina (ATG) añadido al extremo 5' de un fragmento del extremo carboxi del supuesto polipéptido mitocondrial HSP70 (8E u 8), el marco de lectura abierto que codifica el antígeno p21 y los marcos de lectura abiertos que codifican la esterol 24-c-metiltransferasa (SMT, S). 821S tiene una secuencia de polinucleótidos de 2.091 como se muestra en la SEQ ID NO: 23 que comprende los polinucleótidos 1 a 459 que codifican los aminoácidos 509 a 660 del extremo carboxi del supuesto polipéptido mitocondrial HSP70 (8E u 8) de *L. infantum*, los polinucleótidos 460 a 1032 que codifican los aminoácidos 1 a 191 del antígeno p21 de *Leishmania infantum*, y los polinucleótidos 1033 a 2091 que codifican los aminoácidos 2 a 353 del polipéptido SMT de *Leishmania infantum*. 821S tiene una secuencia polipeptídica mostrada en la SE ID NO: 24 que comprende los aminoácidos 509 a 660 del extremo carboxi del supuesto polipéptido HSP70 mitocondrial (8E u 8) de *L. infantum*, los aminoácidos 1 a 191 del polipéptido del antígeno p21 de *Leishmania donovani*, y los aminoácidos 2 a 353 del polipéptido SMT de *Leishmania infantum* de longitud completa. El polipéptido de fusión de 697 aminoácidos con una masa predicha de 78.510 Daltons se expresó en *E. coli* y se purificó por cromatografía en columna.

30 Polipéptido de fusión 8HS. El polipéptido de fusión referido como 8HS se generó por el enlace en tándem de un marco de lectura abierto de polinucleótidos que codifican un codón de inicio de metionina (ATG) añadido al extremo 5' de un fragmento del extremo carboxi del supuesto polipéptido mitocondrial HSP70 (8E u 8), un marco de lectura abierto para el extremo amino del polipéptido de histona H2BN (H) (H2BN (H)) y un marco de lectura abierto para la esterol 24-c-metiltransferasa (SMT). 8HS tiene una secuencia de 1.653 polinucleótidos como se muestra en la SEQ ID NO: 25 que comprende los polinucleótidos 1 a 459 que codifican los aminoácidos 509 a 660 del extremo carboxi del supuesto polipéptido mitocondrial HSP70 (8E u 8) de *Leishmania infantum*, los polinucleótidos 460 a 597 que codifican los aminoácidos 1 a 46 del extremo amino del polipéptido de histona H2BN (H) de *L. infantum*, y los polinucleótidos 598 a 1653 que codifican los aminoácidos 2 a 353 del polipéptido SMT de *Leishmania infantum*. 8HS tiene una secuencia polipeptídica mostrada en la SEQ ID NO: 26 que comprende los aminoácidos 509 a 660 del extremo carboxi del supuesto polipéptido HSP70 mitocondrial (8E u 8) de *L. infantum*, los aminoácidos 1 a 46 del extremo amino el polipéptido de histona H2BN (H) de *L. infantum*, y los aminoácidos 2 a 353 del polipéptido SMT de *Leishmania infantum* de longitud completa. El polipéptido de fusión de 550 aminoácidos con una masa predicha de 62.204 Daltons se expresó en *E. coli* y se purificó por cromatografía en columna.

45 8HNS El polipéptido de fusión referido como 8HNS se generó por el enlace en tándem de un marco de lectura abierto de polinucleótidos que codifican un codón de inicio de metionina (ATG) añadido al extremo 5' de un fragmento del extremo carboxi del supuesto polipéptido mitocondrial HSP70 (8E u 8)) el extremo amino del polipéptido de la histona H2BN (H) (H2BN (H)) y dos marcos de lectura abiertos de *Leishmania* que codifican los polipéptidos, nucleósido hidrolasa no específica (NH, H) y esterol 24-c-metiltransferasa (SMT). 8HNS tiene una secuencia de 2.591 nucleótidos como se muestra en la SEQ ID NO: 38 que comprende polinucleótidos que comprenden los polinucleótidos 1 a 459 que codifican los aminoácidos 509 a 660 del extremo carboxi del supuesto polipéptido HSP70 mitocondrial (8E u 8)

de *Leishmania infantum*, los polinucleótidos 460 a 697 que codifican los aminoácidos 1 a 46 del extremo amino del polipéptido de histona H2BN (H) de *L. infantum*, los polinucleótidos 698-1539 que codifican los aminoácidos 1 a 314 del polipéptido NH, (H) de *Leishmania infantum/donovani*, y los polinucleótidos 1540 a 2595 que codifican los aminoácidos 2 a 353 del polipéptido SMT de *Leishmania infantum*. 8HNS tiene una secuencia polipeptídica que comprende 863 aminoácidos mostrados en la SEQ ID NO: 39 que comprende los aminoácidos 509 a 660 del extremo carboxi del supuesto polipéptido HSP70 mitocondrial (8E u 8) de *L. infantum*, los aminoácidos 1 a 46 del extremo amino del polipéptido de histona H2BN (H), los aminoácidos 1 a 314 del polipéptido NH, H de longitud completa de *Leishmania infantum/donovani* y los aminoácidos 2 a 353 del polipéptido SMT de *Leishmania infantum* de longitud completa. El polipéptido de fusión de aminoácidos se expresó en *E. coli* y se purificó por cromatografía en columna.

5
10
15
20
H21NS. El polipéptido de fusión referido como H21NS se generó por el enlace en tándem de cuatro marcos de lectura abiertos de *Leishmania* que codifican los polipéptidos del extremo amino del polipéptido de la histona H2BN (H) (H2BN (H)), antígeno p21, nucleósido hidrolasa no específica (NH, H) y estero 24-c-metiltransferasa (SMT). H21NS tiene una secuencia de 2.617 nucleótidos como se muestra en la SEQ ID NO: 40 que comprende los polinucleótidos 1-46 que codifican los aminoácidos 1 a 46 del extremo amino del polipéptido de la histona H2BN (H) de *L. infantum* 47 a 622 que codifica los aminoácidos 1 a 191 del antígeno p21 de *Leishmania infantum*, los polinucleótidos 623 a 1664 que codifican los aminoácidos 1 a 314 del polipéptido NH, H de *Leishmania infantum/donovani*, y los polinucleótidos 1665 a 2617 que codifican los aminoácidos 2 a 353 del polipéptido SMT de *Leishmania infantum*. H21NS tiene una secuencia polipeptídica mostrada en la SEQ ID NO: 41 que comprende los aminoácidos 1 a 46 del extremo amino del polipéptido de la histona H2BN (H), los aminoácidos 1 a 191 del antígeno p21 de *Leishmania infantum*, los aminoácidos 1 a 314 del polipéptido NH, H de longitud completa de *Leishmania infantum/donovani*, y los aminoácidos 2 a 353 del polipéptido SMT de *Leishmania infantum* de longitud completa. El polipéptido de fusión de 902 aminoácidos se expresó en *E. coli* y se purificó por cromatografía en columna.

Ejemplo 2: Inmunogenicidad de polipéptidos y polipéptidos de fusión

25
30
Los polipéptidos y los polipéptidos de fusión de la invención se analizaron para determinar su capacidad para generar una respuesta inmune o conferir protección frente a una infección visceral de *Leishmania donovani* según los métodos descritos en la presente memoria. Los polipéptidos individuales y los polipéptidos de fusión de la invención se formularon para el propósito de estos ejemplos en emulsiones estables con el adyuvante TLR4, GLA. Los ratones recibieron un total de tres inmunizaciones con tres semanas de diferencia en una estrategia de cebado, de refuerzo, de refuerzo conocida en la técnica. Se presentan datos representativos para los polipéptidos de fusión 8NS, 821NS, 21SC y NSC, pero no pretenden ser limitativos de los polipéptidos de fusión de *Leishmania* de la invención.

Métodos para evaluar la inmunogenicidad de las fusiones de Leish.

35
40
45
Respuestas humorales: brevemente, se inmunizaron ratones BALB/C (10 ratones por grupo) con 5 µg de polipéptido de fusión recombinante, 5 µg de polipéptidos individuales de las fusiones o 5 µg de una mezcla de polipéptidos individuales de las fusiones formulados en 5 µg de una formulación adyuvante, en algunos ejemplos, emulsión estable aTLR4 (GLA-SE) en un volumen total de 100 µl. Los controles pueden incluir 5 µg de polipéptido de fusión recombinante, 5 µg de polipéptidos individuales de las fusiones, o 5 µg de una mezcla de polipéptidos individuales de las fusiones formuladas en una emulsión estable sin GLA (SE), disolución salina, GLA-SE o SE o en un volumen total de 100 µl. Todas las inmunizaciones se administraron en 100 µl por vía subcutánea en la base de la cola (Semana 0). Los ratones se inmunizaron dos veces más (para un total de tres inmunizaciones, cebado, refuerzo, refuerzo) a intervalos de 3 semanas con 5 µg adicionales de artículo de ensayo en un volumen total de 100 µl por vía subcutánea en la base de la cola (Semana 3 y la Semana 6). Dos semanas después de la tercera inmunización (Semana 8), los animales se sangran mediante la inserción de un tubo en el lecho capilar del ojo. El suero se prepara y se ensaya para determinar las respuestas de anticuerpos específicos de antígeno frente a la proteína de fusión, así como los componentes individuales de la proteína mediante ELISA. El suero de ratones inmunizados se titula para encontrar una titulación de punto final (último valor de densidad óptica (DO) mayor que un umbral determinado por sueros de ratones no inmunizados). La respuesta del anticuerpo específico del antígeno se analiza para determinar la IgG total frente al antígeno específico, y también los isotipos IgG2 e IgG1 para revelar cualquier sesgo inmunitario (por ejemplo, IFN y estimula las respuestas de IgG2a/c, mientras que IL-4/5 estimula las respuestas de IgG1).

50
55
60
Respuestas celulares: un mes (Semana 10) después de la inmunización final, se sacrificó una cohorte de animales y se recogieron sus bazo. Brevemente, los pocillos duplicados de 2×10^5 suspensiones de bazo de células individuales se incubaron con 10 µg/ml del antígeno polipeptídico apropiado para evaluar las respuestas de recuerdo específicas del antígeno. En algunos experimentos, los animales se inmunizaron con polipéptidos de fusión de la invención y los pocillos de réplica se estimularon con polipéptido de fusión, polipéptidos individuales de la fusión, mezclas de polipéptidos individuales de la fusión, o lisados completos o preparados irradiados de parásitos de *Leishmania*, o disolución salina como control. En algunos experimentos, los lisados de *Leishmania* se prepararon a partir de *L. donovani*, *L. infantum* o *L. major*. La respuesta inmune se evalúa determinando el tipo de célula particular que produce citoquinas mediante tinción intracelular de citoquinas después de 1 día (según lo determinado por citometría de flujo) y midiendo la secreción de citoquinas en el sobrenadante de cultivo después de 4 días (según lo determinado por ELISA de citoquinas según las instrucciones del fabricante (eBioScience)). La respuesta de protección anticipada para la leishmaniasis tanto cutánea como visceral (LC y LV, respectivamente) es un perfil $T_{auxiliar1}$, caracterizado por la secreción de una o más citoquinas, incluyendo, pero no limitado a, la producción de IFN γ , TNF e IL-2 a partir de células

T CD4 en respuesta al antígeno específico (ya sea el polipéptido de fusión, los polipéptidos individuales de la fusión, o parásitos de *Leishmania* irradiados completos o lisados de parásitos de *Leishmania*). Los datos se presentan como porcentaje de células T CD4+ positivas para citoquinas que secretan la citoquina o citoquinas indicadas (es decir, IFN γ y IL-2, TNF α , como ejemplos). La frecuencia de las células efectoras multifuncionales (células T que secretan más de una citoquina en respuesta a la estimulación con el antígeno de recuerdo) se ha correlacionado previamente con la protección frente a la infección por *Leishmania*.

Estudios profilácticos: los polipéptidos de fusión también se evaluaron para determinar su capacidad de protección frente a la leishmaniasis visceral (LV) usando el modelo de ratón Balb/c. Brevemente, los ratones se inmunizaron por vía subcutánea 3 veces a intervalos de 3 semanas (cebado/refuerzo/refuerzo) con polipéptidos individuales de las fusiones, mezclas de polipéptidos individuales de los polipéptidos de fusión, polipéptidos de fusión, parásitos de *Leishmania* irradiados, o GLA-SE o disolución salina sola como controles. Un mes después de la última inmunización, los ratones se pulsaron a través de inyección intracardiaca con hasta 5×10^6 promastigotes de *L. donovani*. Los hígados se recolectaron un mes después del pulso y las cargas parasitaria se determinaron mediante el ensayo de dilución limitante o la cuantificación por PCR en tiempo real mediante métodos conocidos en la técnica. Se presentan reducciones en la carga parasitaria después de la inmunización con polipéptidos de fusión, polipéptidos individuales de las fusiones, mezclas de polipéptidos individuales de las fusiones o disolución salina control o formulaciones adyuvantes.

Inmunogenicidad del polipéptido de fusión 8NS

Los ratones inmunizados con el polipéptido de fusión 8NS según los métodos de la invención, generaron una población de células T CD4 que produjo tanto IFN γ como TNF en respuesta a la reestimulación con 8NS, el polipéptido de fusión inmunizante, o un polipéptido de fusión que comprendía solo los polipéptidos S y N, NS, del polipéptido de fusión 8NS. Las células T CD4 que producen solo IFN γ o TNF en respuesta a la reestimulación con NS también se detectaron en estos ratones.

Inmunogenicidad de los polipéptidos de fusión 821NS y 821S

Los ratones inmunizados con 821NS generaron una población de células T CD4 multifuncional que produjo tanto IFN γ como TNF en respuesta a la reestimulación con NS. Los ratones inmunizados con 821S demostraron de manera similar una población de células T CD4 multifuncional (células T CD4 que secretan IFN γ , TNF, IL-2 o combinaciones de al menos 2 de estas citoquinas) en respuesta a la reestimulación con 821S (Figura 1).

Inmunogenicidad del polipéptido de fusión 21SC

Los ratones inmunizados con una mezcla de los polipéptidos individuales de la fusión, fusión 21SC, p21, SMT y CpB, tuvieron una menor carga parasitaria que los ratones control un mes después de la infección experimental con *L. donovani* con una media de $2,98 \times 10^6$ frente a una media de $7,57 \times 10^6$ para los ratones no inmunizados, según lo determinado por dilución limitante. Los ratones inmunizados con una mezcla de los polipéptidos individuales de la fusión 21SC, concretamente p21, SMT (S) y CpB (C), demostraron la secreción de IFN γ en respuesta a p21 (Figura 2D), SMT (Figura 2E) y CpB (Figura 2F), así como el control positivo, Con A (Figura 2B). La citometría de flujo identificó células T CD4 que producen IFN γ , de las cuales una proporción era multifuncional y también producía TNF. Indicativo de la inmunorreactividad de especies cruzadas, también se secretó IFN γ por cultivos de células de bazo de ratones inmunizados con una mezcla de los polipéptidos individuales de la fusión 21SC p21, SMT (S) y CpB (C), pero no de ratones de control negativo. en respuesta a la incubación con lisados de *L. major* y *L. brasiliensis*.

Inmunogenicidad del polipéptido de fusión NSC

Los ratones inmunizados con el polipéptido de fusión NSC tuvieron una carga parasitaria menor que los ratones control un mes después de la infección experimental con una media de $1,88 \times 10^6$ frente a una media de $3,60 \times 10^6$ para ratones no inmunizados, según lo determinado por PCR en tiempo real (Figura 3). La secreción de IFN γ específica de antígeno se midió 1 mes después de completar la inmunización incubando células de bazo con antígeno durante 4 días, recolección del sobrenadante del cultivo y entonces ELISA. Los ratones inmunizados con NSC demostraron la secreción de IFN γ en respuesta a N, S, C y NSC (Figura 4 A-G). El análisis por citometría de flujo del cultivo de células del bazo estimulado con el polipéptido de fusión, NSC o los polipéptidos individuales de la fusión (N, S o C) demuestra que la secreción específica de antígeno de IFN γ fue predominantemente por células T CD4, incluyendo células T CD4 multifuncionales que secretan IFN γ y TNF, y células T únicas positivas para IFN γ (Figura 5A-D). Indicativo de una amplia reactividad de especies cruzadas, también se secretó IFN γ por células obtenidas de ratones inmunizados con NS, pero no de ratones de control negativo, en respuesta a la incubación con lisados de *L. donovani*, *L. infantum*, *L. major*, *L. brasiliensis*, *L. mexicana* y *L. tropica* (datos no mostrados). Aunque también se secretó IL-5 en respuesta a estos estimulantes, los niveles fueron menores en comparación con los niveles de IFN γ medidos (datos no mostrados).

Potenciación o mejora de la respuesta inmune frente a un polipéptido individual cuando se presenta en el contexto de un polipéptido de fusión.

Los polipéptidos individuales y los polipéptidos de fusión de la invención se formularon para el propósito de estos ejemplos en emulsiones estables con el adyuvante TLR4, GLA. Los ratones Balb/C se inmunizaron por vía subcutánea

3 veces a intervalos de 3 semanas (cebado/refuerzo/refuerzo) con 5 µg de cualquiera de la Figura 6, Panel **A**) el polipéptido individual NH de las fusiones, o 5 µg de la Figura 6, Panel **B**) los polipéptidos de fusión NS o 5 µg de la Figura 6, Panel **C**), el polipéptido de fusión NSC formulado en 5 µg de GLA-SE en un volumen total de 100 µl. Un mes (Semana 10) después de la inmunización final, se sacrificaron los animales y se recogieron sus bazos. Los pocillos duplicados de 2×10^5 suspensiones de bazo de células individuales se incubaron con 10 µg/ml de los polipéptidos individuales de las fusiones (NH, SMT, CpB) o 10 µg/ml de los polipéptidos de fusión NS o NSC para evaluar las respuestas de recuerdo específicas del antígeno mediante la cuantificación de la secreción de γ IFN por ELISA. Los datos en la Figura 6, Panel A, muestran que las células de bazo de animales inmunizados con el polipéptido NH secretan γ IFN en respuesta a la reestimulación in vitro con el polipéptido NH, así como el NH presentado en el contexto de los polipéptidos de fusión NS o NSC de la invención. La Figura 6, Panel B, muestra que las células de bazo de animales inmunizados con el polipéptido de fusión NS secretan γ IFN en respuesta a la reestimulación in vitro con los polipéptidos individuales NH o SMT, así como las fusiones NS o NSC. La Figura 6, Panel C, muestra células de bazo de animales inmunizados con el polipéptido de fusión NSC secretan γ IFN en respuesta a la reestimulación in vitro con los polipéptidos individuales NH, SMT o CpB, así como las fusiones NS o NSC. Comparando la Figura 6, Paneles A-C, demuestra que la respuesta inmune frente al polipéptido NH se mejora o potencia cuando se presenta en el contexto de un polipéptido de fusión. Esta mejora o potenciación del reconocimiento de un polipéptido individual de una fusión se demuestra mejor comparando la secreción de γ IFN producida a partir de animales inmunizados con NS con aquellos inmunizados con NSC. En animales inmunizados con NS, la respuesta de recuerdo al polipéptido NH es aproximadamente la mitad de la respuesta a SMT (Figura 6, Panel B), sin embargo, los animales inmunizados con NSC (Figura 6, Panel C) (en los cuales se añade CpB a la fusión NS) la respuesta de recuerdo a los polipéptidos individuales NH, SMT o CpB no solo está mejorada sino que las respuestas de recuerdo son equivalentes cuando se estimulan con cualquiera de los polipéptidos individuales de la fusión o los polipéptidos de fusión NS y NSC.

Además, una cohorte de animales inmunizados como se describió anteriormente se evaluó para determinar la reducción en la carga parasitaria por pulso a través de inyección intravenosa con hasta 5×10^6 promastigotes de *L. donovani*. Los hígados se recogieron un mes después del pulso y las cargas parasitarias se determinaron mediante cuantificación por PCR en tiempo real mediante métodos conocidos en la técnica. Los datos en la Figura 6, Panel D, muestran que los animales inmunizados con los polipéptidos de fusión demostraron mayores reducciones en la carga parasitaria cuando se inmunizaron con los polipéptidos de fusión (NS o NSC) en comparación con los polipéptidos individuales de las fusiones (NH, SMT o CpB).

Capacidad de los polipéptidos de fusión de la invención para proporcionar protección frente a la leishmaniasis visceral (LV) en un modelo Balb/C mediante la evaluación de la reducción de la carga parasitaria en ratones inmunizados con el polipéptido de fusión y pulsados con promastigotes de *L. Donovani*.

Los polipéptidos de fusión también se evaluaron para determinar su capacidad de protección frente a la leishmaniasis visceral (LV) usando el modelo de ratón Balb/c. Brevemente, los ratones se inmunizaron por vía subcutánea 3 veces a intervalos de 3 semanas (cebado/refuerzo/refuerzo) con 5 µg de polipéptidos individuales de las fusiones, o 5 µg de polipéptidos de fusión formulados en 5 µg de GLA-SE en un volumen total de 100 µl o 100 µl de disolución salina sola como controles. Un mes después de la última inmunización, los ratones fueron pulsados mediante inyección intravenosa con hasta 5×10^6 de promastigotes de *L. donovani*. Los hígados se recolectaron un mes después del pulso y las cargas parasitarias se determinaron mediante cuantificación por PCR en tiempo real mediante métodos conocidos en la técnica. Se presentan reducciones en la carga parasitaria después de la inmunización con polipéptidos de fusión o los polipéptidos individuales de las fusiones o disolución salina control. Los datos presentados se normalizan al 100% para los animales no inmunizados e infectados. Los datos en la Figura 7A demuestran que la comparación de animales inmunizados con polipéptidos individuales de las invenciones P21 (designado P), 8E (designado E), H2b (designado H) y el polipéptido de fusión NS demuestra una reducción de la carga parasitaria en los hígados de animales infectados con la mayor protección producida por el polipéptido de fusión NS (una fusión de NH y SMT). Los datos en la Figura 7B demuestran la protección mejorada proporcionada por los polipéptidos de fusión de la invención mediante la adición de antígenos polipeptídicos adicionales a la fusión NS.

Como reconocería el experto en la técnica, estos y otros cambios pueden realizarse en las realizaciones de la invención a la luz de la descripción detallada anteriormente. En general, en las siguientes reivindicaciones, los términos usados no deben interpretarse para limitar las reivindicaciones a las realizaciones específicas descritas en la memoria descriptiva y las reivindicaciones, sino que deben interpretarse para incluir todas las posibles realizaciones junto con el alcance completo de los equivalentes a los cuales dichas reclamaciones tienen derecho.

Secuencias

NSC: NH₁₋₃₁₄ + SMT₂₋₃₅₃ + CPB₁₅₄₋₄₄₃

Nh (1... .942) + SMT (943... 1998) + CPB (1999...2868)

PM = 105.106 Daltons

N -	NH	SMT	CPB (154-443)	- C
-----	----	-----	---------------	-----

SEQ ID NO: 1 Polinucleótido que codifica el polipéptido de fusión NSC

ATGCCGCGCAAGATTATTCTCGATTGTGATCCCGGGATCGATGATGCCGTGGCCATCTTTCTCGCCCACGGCAA
 CCCGGAGGTCGAGCTGCTGGCCATTACGACGGTGGTGGGCAACCAGACCCTGGAGAAGGTGACCCGGAACGC
 GCGGCTGGTAGCTGACGTAGCCGGCATCGTTGGTGTGCCCGTCGCGGCTGTTGCACCAAGCCCCTCGTGCG
 5 CGGTGTGCGGAATGCCTCTCAGATTTCATGGCGAAACCGGCATGGGTAAACGTCTCTACCCACCAGAGTTCAAGA
 CAAAGTTGGACGGCCGTCATGCAGTGCAGCTGATCATCGACCTTATCATGTGCGACGAGCCGAAGACGATCAGC
 CTTGTGCCTACGGGTGGCCTGACGAACATTGCGATGGCTGTCCGTCTTGAGCCGCGCATCGTGGACCGTGTGA
 AGGAGGTGGTTCTGATGGGTGGCGGCTACCATACTGGTAATGCGTCCCCTGTAGCGGAGTTCAACGTCTTCGTC
 GACCCGGAGGCGCGCACATTGTGTTCAACGAGAGCTGGAACGTAACGATGGTGGGGCTGGACCTAACGCAC
 10 CAGGCACTCGCCACGCCGCGGTCCAGAAGCGAGTGAAGGAGGTGGGCACGAAGCCGGCTGCCTTCATGCTG
 CAGATTTTGGACTTTTACACGAAGGTGTACGAAAAGGAGCGCAACACGTACGCGACGGTGCACGATCCCTGCGC
 TGTGGCGTACGTGATTGACCCACCGTGTAGACGACGGAGTCCAGTGGCAGTGGCAGTCAATGGGGCA
 CTGACGACTGGGATGACGGTCGCGGACTTCCGCTACCCACGGCCAAAGCACTGCCACACGCAGGTGGCTGTGA
 AGCTGGACTTCGACAAGTTTTGGTGCCTCGTGATTGACGCACTCAAGCGCATCGGCGATCCTCAATCCGCCGGT
 15 GGCCGTGAGACCGCGCCGACGAACCTGATTGCTCGCCGCAACAAGGACGAGACAAACGGGGATGTCAGCGCC
 GCCGCCGACCGCTTCCGCGACCGCTTCGAGAAGGCAACCCTCGAGGAGCGCAAGGCCGCCACCACGACGATG
 GTCAACGAGTACTACGACCTGGTACGGACTTCTACGAGTACGGCTGGGGCCAGAACTTCCATTTCCGCGCCGC
 GGTAGCCCGGACGACACTTCTTCGAGTCCCTCGCGCGCCACGAGTACTTCTGGCCGCTCGCGCGCTTTCAT
 20 GTAGGGCGACCCAGATCGTGCAGCTGGCTGCGCGCTGCGCGCTCGCGCGCAACATGTTCCGCTCAAGG
 GCTGCAACGTCATCGGCGTCAACAACAACGATTACCAGATCAGCCGCGCTCGCCGTCATGACGCGCTCGCCGG
 TATGAGCTCCAAGATCGACTACGTCAAGACCGACTTCTGCAACATGAGCTTAGCCGACAACACCTTCGACGGCG
 CCTACGCCATCGAGGCCACCTGCCACGCAAAGGACAAGGTCAAGTGTATAGCGAGGTCTTCCGTGTCATCAA
 GCCCGGCACCTGCTTTGTCTGTACGAGTGGTGCATGACCGACAAGTACAACCCCAATGACGAGTACCACCGC
 25 ACAATCAAGCACCGCATCGAGCTGGGCGACGGCCTGCCGGAGATGGAGACGTGCAAACAGGTGATCGAGTACA
 TGAAGCAGGCCGGCTTCGTGGTGGAGGAGGCCATAGACGTCATCAGTCAGTTCGAGTCCAGCCCCATCAAGAG
 TATCCCGTGGTACCAGCCGCTGGTCCGCGACTATTCGTCCTGCAGGGCCTGCCTCTACCCCGATTGGCCGC
 ATCCTCACGAACGTCATGTGTCGCGTCTGGAGTTCTGTCGCGCTAGCTCCGAAGGGCACGTACAAGGCGACCG
 AGATTTTGGAGGAGGCTGCGGAAAGCCTGGTGGTGGGCGGTCAGCTCGGCATCTTCACGCCGTCTTCTACAT
 30 CCGCGCTCGCAAGCCGTCGAAGCAGGCTTCGGCGGTGCGCAACATCGAGTCGAGTGGGCCCGTGCCGGCCA
 CGGCTTGGTGAAGCCTGTGCGGAGCAGCAGCTGGTGAAGTGCATGACAAAGACAATGGCTGCAACGGCGGGCT
 GATGCTGCAGGCGTTCGAGTGGCTGCTGCGACACATGTACGGGATCGTGTTCACGGAGAAGAGCTACCCCTAC
 ACGTCCGGCAACGGTGTGTTGGCCGAGTGTGTAACAGCAGTAAACTCGTTCGCCGCGCAAAATCGACGGCT
 ACGTGTGATCCCAGCAACGAAACGGTTATGGCTGCGTGGCTTCGCGGAGAATGGCCCCATCGCGATTGCGGT
 35 CGAGCCAGTCTCTTTCATGTCTTACCAGAGCGGCGTGTGCTGACCTGCGCTGGCGATGCACTGAACACCGC
 GTGCTGCTCGTCCGGTACAACAAGACCGGTGGGGTTCGTAAGTGGTGTGCAAGAAGTGGGGTGGAGGACT
 GGGGCGAGAAGGGCTACGTGCGCGTGGTTCATGGGGTGAACGCGTGCCTGCTCAGTGAATACCCCGTGTCCG
 CGCATGTGCCGCGGAGTCTACCCCTGGCCCGGGCACGGAGAGCGAGGAGCGCGCCCCTAAACGGGTGACG
 GTGGAGCAGATGATGTGCACCGATATGTAAGTGCAGGGAGGGGTGCAAGAAGAGTCTTCTACCGCGAACGTGT
 40 GCTACAAGAACGGGGGAGGCGGCTCCTCTATGACGAAGTGGCGTCCGCGAGAAGGTGCTGATGTGCTCGTACTC
 GAACCCTCATTGCTTTGGTCTGGGCTGTGCCTCGAGACTCCTGATGGCAAGTGGCGCCGTAATCTTGGGCT
 CGATCATGAACACCTGCCAGTACCG

SEQ ID NO: 2 Secuencia de aminoácidos del polipéptido de fusión NSC

MPRKIILDCDPGIDDAVAIFLAHGNPEVELLAITWGNQTLKVTNRNARLVADVAGIVGVPVAAGCTKPLVRGVRNASQI
 HGETGMGNVSYPPFEFKLDRHAVQLIIDLIMSHEPKITILVPTGGLTNIAMAVRLEPRIVDRVKEWLMGGGYHTGN
 45 ASPVAEFNVFVDPEAAHIVFNESWNVMTMVLGLDLTHQALATPAVQKRVKEVGTKPAAFMLQILDFYTKVYEKERNYAT
 VHDPCAVAYVIDPTVMTTEQVPVDIELNGALTTGMTVADFRYPRPKHCHTQVAVKLDKDFWCLVIDALKRIGDPQSA
 GGRETAPTNLIRRRNKDETNQDVSAAADRFRDRFEKATLEERKAATTTMVNEYDLDVDFYEGIAIGQNFHFAPRYA
 GETFFESLARHEYFLAARGGFMEGDHIVDVGCGVGGPARNMVRRLTRCNVIGVNNNDYQISRARRHDALAGMSSKID
 50 YVKTDFCNMSLADNTFDGAYAIEATCHAKDKVKCYSEVFRVIKPGTCFVLYEIAICMTDKYNPNDEYHRTIKHRIELGD
 GLPEMETCKQVIEYMKQAGFWEEAIDVISQFESSPIKSIPIAIYQPLVGDYSSLQGLRSTPIGRILTVMCRVLEFVRLAP
 KGTYKATEILEEAESLWGGQLGIFTPSYIRARKPSKQASAVGNIESQWARAGHGLVSLSEQQLVSCDDKDNCGNG
 GLMLQAFEWLLRHMYGIVFTEKSYPTSGNGDVAECLNSSKLVPGAQIDGYVMIPSNETVMAAWLAENGPAAIIVDAS
 SFMSYQSGVLTSCAGDALNHGVLLVGYNKTGGVPYVWIKNSWGEDWGEKGYVRVVMGLNACLLSEYPVSAHVPRS
 LTPGPGTESEERAPKRVTVEQMMCTDMYCREGCKSLLTANVCYKNGGGGSSMTKCGPQKVLMSYSNPHCFGP
 55 GLCLETPDGK CAPYFLGSIMNTCQYT

NSA: NH₁₋₃₁₄ + SMT₂₋₃₅₃ + A2₂₃₋₂₃₆

Nh (1...942) + SMT (943...1998) + A2 (1999...2640)

PM = 93.729 Daltons

N	NH	SMT	A2	C
---	----	-----	----	---

SEQ ID NO: 3 Polinucleótido que codifica el polipéptido de fusión NSA

5 ATGCCGCGCAAGATTATTCTCGATTGTGATCCCAGGATCGATGATGCCGTGGCCATCTTTCTCGCCCACGGCAA
 CCGGAGGTCGAGCTGCTGGCCATTACGACGGTGGTGGGCAACCAGACCCTGGAGAAGGTGACCCGGAACGC
 GCGGCTGGTAGCTGACGTAGCCGGCATCGTTGGTGTGCCCGTCGCGGCTGGTTGCACCAAGCCCCTCGTGCG
 CGGTGTGCGGAATGCCTCTCAGATTCATGGCGAAACCGGCATGGGTAACGTCTCCTACCCACCAGAGTTCAAGA
 CAAAGTTGGACGGCCGTCATGCAGTGCAGCTGATCATCGACCTTATCATGTGCGACGAGCCGAAGACGATCACC
 CTTGTGCTACGGGTGGCCTGACGAACATTGCGATGGCTGTCCGTCTTGAGCCGCGCATCGTGGACCGTGTGA
 10 AGGAGGTGGTTCTGATGGGTGGCGGCTACCATACTGGTAATGCGTCCCCTGTAGCGGAGTTCAACGTCTTCGTC
 GACCCGAGGCGCGCACATTGTTC AACGAGAGCTGGAACGTAACGATGGTGGGGCTGGACCTAACGCAC
 CAGGCACTCGCCACGCCGCGGTCCAGAAGCGAGTGAAGGAGGTGGGCACGAAGCCGGCTGCCTTCATGCTG
 CAGATTTTGGACTTTTACACGAAGGTGTACGAAAAGGAGCGCAACACGTACGCGACGGTGCACGATCCCTGCGC
 TGTGGCGTACGTGATTGACCCACCGTATGACGACGGAGCAAGTGCCAGTGGACATCGAGCTCAATGGGGCA
 CTGACGACTGGGATGACGGTCGCGGACTTCCGCTACCCACGGCCAAAGCACTGCCACACGCAGGTGGCTGTGA
 15 AGCTGGACTTCGACAAGTTTTGGTGCCTCGTGATTGACGCACTCAAGCGCATCGGCGATCCTCAATCCGCCGGT
 GGCCGTGAGACCCGCGCGACGAACCTGATTGTCGCGCAACAAGGACGAGACAAACGGGGATGTCAGCGCC
 GCCCGCACCTGCTTTGCTCTGTACGAGTGGTGCATGACCCGCAACCTCGAAGGAGCGCAAGCCGACCTACCGATG
 GTCAACGAGTACTACGACCTGGTACGGACTTCTACGAGTACGGCTGGGGCCAGAACTTCCATTTTCGCGCCGC
 GCTACGCCGCGGAGACCTTCTTCGAGTCCCTCGCGCGCCACGAGTACTTCTGGCCGCTCGCGGCGGCTTCAT
 20 GGAGGGCGACCACATCGTCGACGTGGGCTGCGGCGTGGCGGTCCGGCGCGCAACATGGTTCGCCTCACGC
 GCTGCAACGTATCGGCGTCAACAACAACGATTACCAGATCAGCCGCGCTCGCCGTATGACGCGCTCGCCGG
 TATGAGCTCCAAGATCGACTACGTCAAGACCGACTTCTGCAACATGAGCTTAGCCGACAACACCTTCGACGGCG
 CCTACGCCATCGAGGCCACCTGCCACGCAAAGGACAAGTCAAGTGTATAGCGAGGTCTTCCGTGTATCAA
 GCCCGCACCTGCTTTGCTCTGTACGAGTGGTGCATGACCCGCAACCTCGAAGGAGCGCAAGCCGACCTACCGATG
 25 ACAATCAAGCACCGCATCGAGCTGGGCGACGGCCTGCCGGAGATGGAGACGTGCAAAACAGGTGATCGAGTACA
 TGAAGCAGGCCGGCTTCGTGGTGGAGGAGGCCATAGACGTCATCAGTCAGTTCGAGTCCAGCCCCATCAAGAG
 TATCCCGTGGTACCAGCCGCTGGTGGGCGACTATTGTCCTGCAGGGCCTGCGCTCTACCCCGATTGGCCGC
 ATCCTCACGAACGTATGTGTCGCGTGGTGGAGTTCGTGCGCCTAGCTCCGAAGGGCACGTACAAGGGCAGCG
 AGATTTTGGAGGAGGCTGCGGAAAGCCTGGTGGTGGGCGGTGAGTTCGCGCATCTTACGCCGTCTTCTACAT
 30 CCGCGCTCGCAAGCCGTC AAGCAGGCTAGCGCTCCGCTGAGCCGCACAAGGCGGCGCTTACGTCGGCCCC
 GCTGAGCGTTGGCCCCGAGAGCGTGGCCCCGCTGAGCGTTGGCCCCGAGGCGGTTGGCCCCGCTGAGCGTTG
 GCCCGCAGAGCGTCGCGCCGCTGAGCGTTGGCCCCGAGGCGGTTGGCCCCGCTGAGCGTTGGCCCCGAGAGC
 GTTGGCCCCGCTGAGCGTTGGCCCCGCTGAGCGTTGGCCCCGAGAGCGTTGGCCCCGCTGAGCGTTGGCCAGCCAG
 AGCGTCGCCCCGCTGAGCGTTGGTCCGAGAGCGTCGCCCCGCTGAGCGTTGGCCCCGAGGCGGTTGGCCC
 35 GCTGAGCGTTGGCCCCGAGAGCGTCGCCCCGCTGAGCGTTGGCCCCGAGGCGGTTGGCCCCGCTGAGCGTTG
 GCCCGCAGAGCGTTGGCCCCGCTGAGCGTTGGCCCCGAGAGCGTTGGCCCCGCTGAGCGTTGGCCAGCCAGAGC
 GTCGCCCCGCTGAGCGTTGGTCCGAGAGCGTCGCCCCGCTGAGCGTTGGCCCCGAGAGCGTCGCCCCGCT
 GAGCGTTGGCCCCGAGAGCGTCGCCCCGCTGAGCGTTGGTCCGAGAGCGTTGGCCCCGCTGAGCGTTGGCCC
 GCAGAGCGTTGACGTTAGCCCGGTGAGC

40 SEQ ID NO: 4 Secuencia de aminoácidos del polipéptido de fusión NSA

MPRKIILDCDPGIDDAVAIFLAHGNPEVELLAITWGNQTLKIVTRNARLVADVAGIVGVPVAAGCTKPLVVRGNASQI
 HGETGMGNVSYPPEFKTKLDGRHAVQLIIDLIMSHEPKTITLVPTGGLTNIAMAVRLEPRIVDRVKEWLMGGGYHTGN
 ASPVAEFNVFVDPEAAHIVFNESWNVTMVGDLTLHQALATPAVQKRVKEVGTKPAAFMLQILDFYTKVYEKERNTYAT
 45 VHDPCA VAYVIDPTVMTTEQVPVDIELNGALTTGMTVADFRYPRPKHCHTQVAVKLDKDFWCLVIDALKRIGDPQSA
GGRETAPTNLIRRRNKDETNQDVSAADRFRDRFEKATLEERKAATTTMVNEYDLVDFYEGIAIGQNFHFAPRYA
GETFFESLARHEYFLAARGGFMEGDHIVDVGCGVGGPARNMVRLTRCNVIGVNNNDYQISRARRHDALAGMSSKID
YVKTDFCNMSLADNTFDGAYAIEATCHAKDKVKCYSEVFRVIKPGTCFVLYEWCMTDKYNPNDEYHRTIKHRIELGDG
LPEMETCKQVIEYMKQAGFWEEAIDVISQFESSPIKSIPWYQPLVGDYSSLQGLRSTPIGRILTNVMCRVLEFVRLAPK
 50 GTYKATEILEEAAESLWGGQLGIFTPSFYIRARKPSKQASASAEPHKAAVDVGPLSVGPQSVGPLSVGPQAVGPLSVG
PQSVGPLSVGPQAVGPLSVGPQSVGPLSVGPLSVGPQSVGPLSVGSQSVGPLSVGPQSVGPLSVGPQAVGPLSVG
PQSVGPLSVGPQAVGPLSVGPQSVGPLSVGPQSVGPLSVGSQSVGPLSVGPQSVGPLSVGPQSVGPLSVGPQSVG
PLSVGPQSVGPLSVGPQSVDPVSPVS

NSAfi: NH₁₋₃₁₄ + SMT₂₋₃₅₃ + A2₁₋₂₃₆

Nh (1 ...942) + SMT (943...1998) + A2 (1999...2703)

55 PM = 95.928 Daltons

N	NH	SMT	A2fi	C
---	----	-----	------	---

SEQ ID NO: 5 Polinucleótido que codifica el polipéptido de fusión NSAfl

ATGCCGCGCAAGATTATTCTCGATTGTGATCCCGGGATCGATGATGCCGTGGCCATCTTTCTCGCCCACGGCAA
 CCCGGAGGTCGAGCTGCTGGCCATTACGACGGTGGTGGGCAACCAGACCCTGGAGAAGGTGACCCGGAACGC
 GCGGCTGGTAGCTGACGTAGCCGGCATCGTTGGTGTGCCCGTCGCGGCTGTTGCACCAAGCCCCTCGTGCG
 5 CGGTGTGCGGAATGCCTCTCAGATTTCATGGCGAAACCGGCATGGGTAAACGTCTCCTACCCACCAGAGTTCAAGA
 CAAAGTTGGACGGCCGTCATGCAGTGCAGCTGATCATCGACCTTATCATGTGCGACGAGCCGAAGACGATCAGC
 CTTGTGCTACGGGTGGCCTGACGAACATTGCGATGGCTGTCCGTCTTGAGCCGCGCATCGTGGACCGTGTGA
 AGGAGGTGGTTCTGATGGGTGGCGGCTACCATACTGGTAATGCGTCCCCTGTAGCGGAGTTCAACGTCTTCGTC
 GACCCGGAGGCGCGCACATTGTGTTCAACGAGAGCTGGAACGTAACGATGGTGGGGCTGGACCTAACGCAC
 10 CAGGCACTCGCCACGCCGCGGTCCAGAAGCGAGTGAAGGAGGTGGGCACGAAGCCGGCTGCCTTCATGCTG
 CAGATTTTGGACTTTTACACGAAGGTGTACGAAAAGGAGCGCAACACGTACGCGACGGTGCACGATCCCTCGCG
 TGTGCGTACGTGATTGACCCACCGTGTGACGACGAGGCAAGTGCAGTGGCAGTGGACGTCATCAATGGGGCA
 CTGACGACTGGGATGACGGTCGCGGACTTCCGCTACCCACGGCCAAAGCACTGCCACACGCAGGTGGCTGTGA
 AGCTGGACTTCGACAAGTTTTGGTGCCTCGTATTGACGCACTCAAGCGCATCGGCGATCCTCAATCCGCCGGT
 15 GGCCGTGAGACCGCGCCGACGAACCTGATTGCTCGCCGCAACAAGGACGAGACAAACGGGGATGTCAGCGCC
 GCCGCCGACCGCTTCCGCGACCGCTTCGAGAAGGCAACCCTCGAGGAGCGCAAGGCCGCCACCACGACGATG
 GTCAACGAGTACTACGACCTGGTACGGACTTCTACGAGTACGGCTGGGGCCAGAATTCCATTTCCGCGCCGC
 GCTACGCCGCGAGACCTTCTTCGAGTCCCTCGCGGCCACGAGTACTTCTGGCCGCTCGCGCGGGCTTCAT
 GGAGGCGACCCAGCATCGTGCAGCTGGCTGCGCGCTCGCGGCTCCGCGCGCGCAACATGGTTCCGCTCACGC
 20 GCTGCAACGTCATCGGCGTCAACAACAACGATTACCAGATCAGCCGCGCTCGCCGTCATGACGCGCTCGCCGG
 TATGAGCTCCAAGATCGACTACGTCAAGACCGACTTCTGCAACATGAGCTTAGCCGACAACACCTTCGACGGCG
 CCTACGCCATCGAGGCCACCTGCCACGCAAAGGACAAGGTCAAGTGTATAGCGAGGTCTTCCGTGTCATCAA
 GCCCGGCACCTGCTTTGTCTGTACGAGTGGTGCATGACCGACAAGTACAACCCCAATGACGAGTACCACCGC
 ACAATCAAGCACCGCATCGAGCTGGGCGACGGCCTGCCGGAGATGGAGACGTGCAAAACAGGTGATCGAGTACA
 25 TGAAGCAGGCCGGCTTCGTGGTGGAGGAGGCCATAGACGTCATCAGTCAGTTCGAGTCCAGCCCCATCAAGAG
 TATCCCGTGGTACCAGCCGCTGGTCCGCGACTATTCTGCTCCCTGCAGGGCCTGCGCTCACCCCGATTGGCCGC
 ATCCTCACGAACGTCATGTGTGCGGTCTGGAGTTCGTGCGCCTAGCTCCGAAGGGCACGTACAAGGGCAGCG
 AGATTTTGGAGGAGGCTGCGGAAAGCCTGGTGGTGGGCGGTCAGCTCGGCATCTTACGCCGTCTTCTACAT
 CCGCGCTCGCAAGCCGTCGAAGCAGGCTATGAAGATCCGCAGCGTGCCTCCGCTTGTGGTGTGCTGGTGTCC
 30 GTCGCGCGGCTGCTCGCACTCAGCGCCTCCGCTGAGCCGCACAAGGCCGGCCGTTGACGTCCGCCCGCTGAGC
 GTTGGCCCGCAGAGCGTCGGCCCGCTGAGCGTTGGCCCGCAGGCGGTTGGCCCGCTGAGCGTTGGCCCGCA
 GAGCGTCGGCCCGCTGAGCGTTGGCCCGCAGGCGGTTGGCCCGCTGAGCGTTGGCCCGCAGAGCGTTGGCC
 CAGCTGAGCGTTGGCCCGCTGAGCGTTGGCCCGCAGGCGGTTGGCCCGCTGAGCGTTGGCCCGCAGAGCGT
 35 GCCCGCTGAGCGTTGGTCCGCAAGAGCGTCCGCCCGCTGAGCGTTGGCCCGCAGGCGGTTGGCCCGCTGAGC
 GTTGGCCCGCAGAGCGTCGGCCCGCTGAGCGTTGGCCCGCAGGCGGTTGGCCCGCTGAGCGTTGGCCCGCA
 GAGCGTTGGCCCGCTGAGCGTTGGCCCGCAGAGCGTTGGCCCGCTGAGCGTTGGCAGCCAGAGCGTCCGCC
 GCTGAGCGTTGGTCCGCAAGAGCGTCCGCCCGCTGAGCGTTGGCCCGCAGAGCGTCCGCCCGCTGAGCGTTGG
 CCCGCAAGAGCGTCCGCCCGCTGAGCGTTGGTCCGCAAGAGCGTTGGCCCGCTGAGCGTTGGCCCGCAGAGCGT
 TGACGTTAGCCCGGTGAGC

40 SEQ ID NO: 6 Secuencia de aminoácidos del polipéptido de fusión NSAfl

MPRKIILDCDPGIDDAVAIFLAHGNPEVELLAITWGNQTLKVTNRNARLVADVAGIVGVPVAAGCTKPLVRGVRNASQI
 HGETGMGNVSYPPFEFKLDRHAVQLIIDLIMSHEPKTITLVPTGGLTNIAMAVRLEPRIVDRVKEWLMGGGYHTGN
 ASPVAEFNVFVDPEAAHIVFNESWNVTMVGDLTHQALATPAVQKR/KEVGTKPAAFMLQILDFYTKVYEKERNTYAT
 VHDPCAVAYVIDPTVMTTEQVPVDIELNGALTTGMTVADFRYPKPKHCHTQVAVKLDLDFDKFIAICLVIDALKRIGDPQSA
 45 GGRETAPTNLIRRRNKDETNGDVSAAADRFDRFEKATLEERKAATTTMVNEYDYLTVDFYEWGQNFHFAPRYA
GETFFESLARHEYFLAARGGFMEGDHIVDVCGVGGPARNMVRLTRCNVIGVNNNDYQISRARRHDLALAGMSSKID
YVKTDFCNMSLADNTFDGAYAIEATCHAKDKVKCYSEVFRVIKPGTCFVLYEIAICMTDKYNPNDEYHRTIKHRIELGD
GLPEMETCKQVIEYMKQAGFWEEAIDVISQFESSPIKSIPWYQPLVGDYSSLQGLRSTPIGRILTVMCRVLEFVRLAP
KGTYKATEILEEAESLWGGQLGIFTPSFYIRARKPSKQAMKIRSVRPLVVLLVSVAAVLALSASAEPHKAAVDVGP
 50 VGPQSVGPLSVGPQAVGPLSVGPQSVGPLSVGPQAVGPLSVGPQSVGPLSVGPLSVGPQSVGPLSVGSQSVGPLSV
VGPQSVGPLSVGPQAVGPLSVGPQSVGPLSVGPQAVGPLSVGPQSVGPLSVGQSVGPLSVGQSVGPLSVGPQSV
VGPLSVGPQSVGPLSVGPQSVGPLSVGPQSVGPLSVGPQSVGPLSVGQSVGPLSVGQSVGPLSVGQSVGPLSVG

HNSA: H2B₁₋₄₆ + NH₁₋₃₁₄ + SMT₂₋₃₅₃ + A2₂₃₋₂₃₆

H2BN (1...138) + NH (139...1080) + SMT (1081...2136) + A2 (2137...2778)

55 PM = 98.942 Daltons

N	H2Bn	NH	SMT	A2	C
---	------	----	-----	----	---

SEQ ID NO: 9 Polinucleótido que codifica el polipéptido de fusión 8NSA

ATGAAGGACAAGGCGACGGGCAAGACGCAGAACATCACGATCACGGCGAACGGCGGGCTGTCTGAAGGAGCAG
 ATCGAGCAGATGATCCGCGACTCGGAGCAGCAGCGGAGGCCGACCCTGTAAGCGCGAGCTTGTGGAGGTG
 CGCAACAACGCGGAGACGCAGCTGACAACGGCGGAGAGGCAGCTCGGCGAGTGAAGTACGTGAGCGATGCG
 5 GAGAAGGAGAACCTGAAGACGCTGGTGGCGGAGCTGCGCAAGGCGATGGAGAACCCTGCGGAAGGAT
 GACCTTGCAGGCTGCGACGGAAGCTGCAGAAAGGCTGTGATGGAGTGGCGCCGACAGAGTACCAGCAGGCT
 GCCGCGGCCAACTCCGGCAGCACCAGCAACTCCGGTGAAGCAGCAGCAGCAGCAGGGCCAAGGTGAGCAGCAG
 CAGCAGCAGAACAGCGAAGAGAAGAAGATGCCGCGCAAGATTATTCTCGATTGTGATCCCGGGATCGATGATGC
 10 CGTGCCATCTTCTCGCCACGGCAACCCTGAGGTCGAGCTGCTGGCCATTACGACGGTGGTGGGCAACCAG
 ACCCTGGAGAAGGTGACCCGGAACGCGCGGCTGGTAGCTGACGTAGCCGGCATCGTTGGTGTGCCCGTCGCG
 GCTGGTTGACCAAGCCCTCGTGGCGGTTGCGGAATCCCTCTCAGATTGATGCGGAAACCCTGATGCGGTA
 ACGTCTCCTAGACAGGTTCAAGACAAGTTGGACGGCCCTATGCAAGTGCAGTGCAGTGCAGTGCAGTGCAGT
 ATGTCGCACGAGCCGAAGACGATCACGCTTGTGCTACGGGTGGCCTGACGAACATTGCGATGGCTGTCCGTC
 15 TTGAGCCGCGCATCGTGGACCGTGTGAAGGAGGTGGTTCTGATGGGTGGCGGCTACCATACTGGTAATGCGTC
 CCCTGTAGCGGAGTTCAACGTCTTCTGTCGACCCGAGGCGGCGCACATTGTGTTCAACGAGAGCTGGAACGTA
 ACGATGGTGGGGCTGGACCTAACGCACCAGGCACTCGCCACGGCGGGTCCAGAAGCGAGTGAAGGAGGTG
 GGCACGAAGCCGGCTGCCTTCATGCTGCAGATTTTGGACTTTTACACGAAGGTGTACGAAAAGGAGCGCAACAC
 GTACGCGACGGTGCAGCATCCCTGCGCTGTGGCGTACGTGATTGACCCACCGTGTGACGACGCGGAGCAGTG
 20 CCAGTGGACATCGAGCTCAATGGGGACTGACGACTGGATGACGGTCCGCGGACTTCGCTACCCACGGCCAA
 AGCACTGCCACACGCAGGTGGCTGTGAAGCTGGACTTCGACAAGTTTTGGTGCCTCGTGATTGACGCACTCAAG
 CGCATCGGCGATCCTCAATCCGCGGTTGGCCGTGAGACCGCGCCGACGAACCTGATTGCTCGCCGCAACAAG
 GACGAGACAAACGGGGATGTCAGCGCCGCGCCGACCGCTTCCGCGACCGCTTCGAGAAGGCAACCCTCGAG
 GAGCGCAAGGCCGCCACCACGACGATGGTCAACGAGTACTACGACCTGGTGCAGGACTTCTACGAGTACGGCT
 25 GGGGCCAGAACTTCCATTTGCGCGCCGCGCTACGCCGGCGAGACCTTCTTCGAGTCCCTCGCGCGCCACGAGTA
 CTTCTGGCCGCTCGCGCGGCTTTCATGGAGGGCGACCATCGTGCAGCTGGGCTCGCGCGTGGCGGCTCC
 GCGCGCAACATGGTTGCGCTCACGCGCTGCAACGTATCGGCGTCAACAACAACGATTACCAGATCAGCCGC
 CCAGTCCCGTTCATGACGCGCTCGCCGATGAGCTCCAAGATCGACTACGTCAAGACCGACTTCTGCAACATGA
 GCTTAGCCGACAACACCTTCGACGGCGCCTACGCCATCGAGGCCACCTGCCACGCAAAGGACAAGGTCAAGTG
 30 CTATAGCGAGGTCTTCCGTGTCATCAAGCCCGGCACCTGCTTTGTCCTGTACGAGTGGTGCATGACCGACAAGT
 ACAACCCCAATGACGAGTACCACCGCACAAATCAAGCACCGCATCGAGCTGGGCGACGGCCTGCCGGAGATGGA
 GACGTGCAACAGGTGATCGAGTACATGAAGCAGGCCGGCTTTCGTGGTGGAGGAGGCCATAGACGTCATCAGT
 CAGTTCGAGTCCAGCCCCATCAAGAGTATCCCGTGGTACCAGCCGCTGGTGGCGGACTATTCGCTCCCTGCAGG
 GCCTGCGCTACCCCGATTGGCCGATCCTCACGAACGTATGTCGCGGTGCTGGAGTTCGTCGCGCTGAGC
 35 TCCGAAGGGCACGTACAAGGCGACGAGATTTTGGAGGAGCTGCGGAAAGCCTGGTGGTGGGCGTCAAGT
 CGGCATCTTACGCGCTCCTTCTACATCCGCGCTCGCAAGCCGTCGAAGCAGGCTAGCGCCTCCGCTGAGCCG
 CACAAGGCGGCCGTTGACGTGCGCCCGCTGAGCGTTGGCCCGCAGAGCGTGGCCCGCTGAGCGTTGGCCC
 GCAGGCGGTTGGCCCGCTGAGCGTTGGCCCGCAGAGCGTGGCCCGCTGAGCGTTGGCCCGCAGGCGGTTG
 GCCCGCTGAGCGTTGGCCCGCAGAGCGTTGGCCCGCTGAGCGTTGGCCCGCTGAGCGTTGGCCCGCAGAGC
 GTTGGCCCGCTGAGCGTTGGCAGCCAGAGCGTGGCCCGCTGAGCGTTGGTCCGAGAGCGTGGCCCGCTG
 40 AGCGTTGGCCCGCAGGCGGTTGGCCCGCTGAGCGTTGGCCCGCAGAGCGTGGCCCGCTGAGCGTTGGCCC
 GCAGGCGGTTGGCCCGCTGAGCGTTGGCCCGCAGAGCGTGGCCCGCTGAGCGTTGGCCCGCAGAGCGTGG
 GCCGCTGAGCGTTGGCAGCCAGAGCGTGGCCCGCTGAGCGTTGGTCCGAGAGCGTGGCCCGCTGAGC
 GTTGGCCCGCAGAGCGTGGCCCGCTGAGCGTTGGCCCGCAGAGCGTGGCCCGCTGAGCGTTGGTCCGCA
 GAGCGTTGGCCCGCTGAGCGTTGGCCCGCAGAGCGTTGACGTTAGCCCGGTGAGC

45 SEQ ID NO: 10 Secuencia de aminoácidos del polipéptido de fusión 8NSA

MKDKATGKTQNIITANGGLSKEQIEQMIRDSEQHAEADRVKRELVEVRNNAETQLTTAERQLGEWKYVSDAEKENV
KTLVAELRKAMENPNVAKDDLAAATDKLQKAVMECGRTEYQAAAAANSNSTNSGEQQQQQGGEQQQQQNSEE
KKMPRKIILDGDPGIDDAVAIFLAHGNPEVELLAITTVVGNQTLKVTNRNARLVADVAGIVGVPVAAGCTKPLVRGVRNA
SQIHGETGMGNVSYPPFEFKTKLDGRHAVQLIIDLIMSHEPKTITLVPTGGLTNIAMAVRLEPRIVDRVKEWLMGGGYHT
 50 GNASPVAEFNVFVDPEAAHIVFNESWNVMTVGLDLTHQALATPAVQKRVKEVGTKPAAFMLQILDFYTKVYEKERT
YATVHDPICAVAYVIDPTVMTTEQVPVDIELNGALTTGMTVADFRYPRPKHCHTQVAVKLDKFDKFWCLVIDALKRIGDP
QSAGGRETAPTNLIRRRNKDETNGDVSAADRFRDRFEKATLEERKAATTTMVNEYDDLVTDFEYEGIAIQNFHFAP
RYAGETFFESLARHEYFLAARGGFMEGDHIVDVGCGVGGPARNMVRLTRCNVIGVNNNDYQISRARRHDALAGMSS
KIDYVKTDFCNMSLADNTFDGAYAIEATCHAKDKVKCYSEVFRVIKPGTCFVLYEIAICMTDKYNPNDEYHRTIKHRIEL
 55 GDGLPEMETCKQVIEYMKQAGFVVEEIDVISQFESSPIKSIPIAIIYQPLVGDYSSLQGLRSTPIGRILTNVMCRVLEFVR
LAPKGTYKATEILEEAAESLWGGQLGIFTPSYIRARKPSKQASASAEPHKAADVGLPSVGPQSVGPLSVGPQAVGP
LSVGPQSVGPLSVGPQAVGPLSVGPQSVGPLSVGPLSVGPQSVGPLSVGSQSVGPLSVGPQSVGPLSVGPQAVGP
LSVGPQSVGPLSVGPQAVGPLSVGPQSVGPLSVGPLSVGPLSVGQSVGPLSVGPQSVGPLSVGPQSVGPLSVGP
 60 QSVGPLSVGPQSVGPLSVGPQSVVPLSVVS

21NSA: p21₁₋₁₉₁ + NH₁₋₃₁₄ + SMT₂₋₃₅₃ + A2₂₃₋₂₃₆

P21 (1...573) + NH (574...1515) + SMT (1516...2571) + A2 (2572...3213)

PM = 115.082 Daltons

N	p21	NH	SMT	A2	C
---	-----	----	-----	----	---

SEQ ID NO: 11 Polinucleótido que codifica el polipéptido de fusión 21NSA

5 ATGAGCATTATCAAGGAGGACGACGCCGTGGGCTGCTACATGACGGTGACCCTCGTGGACGACACCAAGGTGG
 AGGGTACCATCTTCACCTACAATCCCAAGGAAGGCATCATAGTACTTCTGTCCCTCCGCGACGATCAGACGAAC
 ATGAAGCTGATCCGCACTCCATACATCAAAGAGTTCAGTATTTACACGCTGAGGAGGGAACGCACCTGCCTCC
 GGCACTGGACTCCTTCAACGAGCTTCCGTCCATGCATGCCGGCCGACAAAGTCCATCTTCAAGCACGCCAGC
 ACGCAGCTCAAGAACGCCGAGGCGAACC CGAAAAGCACTTCAACTCTGTACAGACCGACACACCGATTGGCA
 CACTCGATGCGTACCTCAAGCTCCTGCGGCTATACCCCTTCATTGAGTGGAACAGCGACGAGGGTGTCCATCCAG
 10 GTCTCGGATACCGTCAATTGTCGTAGGGGACCCGACTGGCGGACGCCAAGGCGATGCTGGTAGACGGCGCC
 CCTGAGAAGGACAGACCGCTCGTAGACCGCCTGCAGGTTGCGCTCGGAAACGGCAAGAAGATGCCGCGCAAG
 ATTATTCTCGATTGTGATCCCGGGATCGATGATGCCGTGGCCATCTTTCTCGCCACGGCAACCCGGAGGTGCA
 GCTGCTGGCCATTACGACGGTGGTGGGCAACCAGACCCTGGAGAAGGTGACCCGGAACGCGCGGCTGGTAGC
 TGACGTAGCCCGCATCGTTGGTGTGCCCGTGGCGGCTGTTGCCACCAAGCCCTCGTGGCGGTTGTGCGGAA
 15 TGCCTCTCAGATTACGTGGCGAAACCGGCATGGTAACTGCTTCTACCCACAGAGTTCAAGCAAAAGTTGGACG
 GCCGTGCAGTGCAGCTGATCATCGACCTTATCATGTGCGACGAGCCGAAGACGATCACGCTTGTGCCTACG
 GGTGGCCTGACGAACATTGCGATGGCTGTCCGTCTTGAAGCCGCGCATCGTGGACCCTGTGAAGGAGGTGGTTC
 TGATGGGTGGCGGCTACCATACTGGTAATGCGTCCCCTGTAGCGGAGTTCAACGTCTTCGTCGACCCGGAGGC
 GGCGCACATTGTGTTCAACGAGAGCTGGAACGTAACGATGGTGGGGCTGGACCTAACGCACCAGGCACTCGCC
 20 ACGCCGGCGGTCAGAAAGCGAGTGAAGGAGGTGGGCACGAAGCCGGCTGCCTTCATGCTGCAGATTTTGGACT
 TTTACACGAAGGTGTACGAAAAGGAGCGCAACACGTCACGCGACGGTGCACGATCCCTGCGCTGTGGCGTACGT
 GATTGACCCACCGTGTGACGACGAGCAAGTGGCAGTGGACGACTCAATGGGGCTGACGACTGAGG
 ATGACGGTCGCGGACTTCCGCTACCCACGGCCAAAGCACTGCCACACGCGAGGTGGCTGTGAAGCTGGACTTCG
 ACAAGTTTTGGTGCCTCGTGATTGACGCACTCAAGCGCATCGGCGATCCTCAATCCGCGGTTGGCCGTGAGAC
 25 CGCGCCGACGAACCTGATTCGTCGCCGCAACAAGGACGAGACAAACGGGGATGTCAGCGCCGCCGCGACCG
 CTTCCGCGACCGCTTCGAGAAGGCAACCCTCGAGGAGCGCAAGGCCGCCACCACGACGATGGTCAACGAGTA
 CTACGACCTGGTGACGGACTTCTACGAGTACGGCTGGGGCCAGAACTTCCATTTCCGCGCCGCGCTACGCCGGC
 GAGACCTTTCAGTCCCTCGCGCGCCACGAGTACTTCTGGCCGCTCGCGCGCGGCTTCATGGAGGGCGAC
 ACATCGTCGACTGGGCTGCGCGCTCGGCGCTCGGCGCAACATGGTTCCGCTGACGCGCTGCAACGCTCA
 30 TCGGCGTCAACAACAACGATTACCAGATACGCCGCGCTCGCCGTCATGACGCGCTCGCCGGTATGAGCTCCAA
 GATCGACTACGTCAAGACCGACTTCTGCAACATGAGCTTAGCCGACAACACCTTCGACGGCGCCTACGCCATCG
 AGGCCACCTGCCACGCAAAGGACAAGGTCAAGTGCTATAGCGAGGTCTTCCGTGTCATCAAGCCCGGCACCTG
 CTTTGTCTGTACGAGTGGTGCATGACCGACAAGTACAACCCCAATGACGAGTACCACCGCACAAATCAAGCACC
 GCATCGAGCTGGGCGACGGCCTGCCGGAGATGGAGACGTGCAAACAGGTGATCGAGTACATGAAGCAGGCCG
 35 GCTTCGTGGTGGAGGAGGCCATAGACGTGCATCAGTCAAGTCCAGCCCCATCAAGAGTATCCCGTGGTA
 CCTAGCGTGGTGGGCGACTATTGCTCCCTCAGGGCCTGCGCTACCCCGATTGGCCGCGCATCTCACGAAC
 GTCATGTGTCGCGTGGAGTTCTGTGCGCCTAGTCCGAAGGCGACGTACAAGGCGCAGAGATTTTGGAGG
 AGGCTGCGGAAAGCCTGGTGGTGGGCGGTGAGCTCGGCATCTTACGCGCTCCTTCTACATCCGCGCTCGCAA
 GCCGTCCAAGCAGGCTAGCGCCTCCGCTGAGCCGCACAAGGCGGCCGTTGACGTCGGCCCGCTGAGCGTTGG
 40 CCCGACAGCGTCCGCCCCTGAGCGTTGGCCCGCAGGCGGTTGGCCCGCTGAGCGTTGGCCCGCAGAGCG
 TCGGCCCGCTGAGCGTTGGCCCGCAGGCGGTTGGCCCGCTGAGCGTTGGCCCGCAGAGCGTTGGCCCGCTGA
 GCGTTGGCCCGCTGAGCGTTGGCCCGCAGAGCGTTGGCCCGCTGAGCGTTGGCAGCCAGAGCGTCCGCCCCG
 CTGAGCGTTGGTCCGACAGCGTCCGCCCCTGAGCGTTGGCCCGCAGGCGGTTGGCCCGCTGAGCGTTGGC
 CCGACAGCGTCCGCCCCTGAGCGTTGGCCCGCAGGCGGTTGGCCCGCTGAGCGTTGGCCCGCAGAGCGT
 45 TGGCCCGCTGAGCGTTGGCCCGCAGAGCGTTGGCCCGCTGAGCGTTGGCAGCCAGAGCGTCCGCCCCGCTGAG
 CGTTGGTCCGACAGCGTCCGCCCCTGAGCGTTGGCCCGCAGAGCGTCCGCCCCTGAGCGTTGGCCCGCA
 GAGCGTCCGCCCCTGAGCGTTGGTCCGACAGCGTTGGCCCGCTGAGCGTTGGCCCGCAGAGCGTTGACGT
 TAGCCCGGTGAGC

SEQ ID NO: 12 Secuencia de aminoácidos del polipéptido de fusión 21NSA

50 MSIIKEDDAVGCYMTVTLVDDTKVEGTIFTYNPKEGIIVLLSLRDDQTNMKLIRTPYIKEFSISHAEEGTHLPPALDSFNEL
PSMHAGRDKSIFKHASTQLKNAEANREKHFNSVTTDTPATLDAYLKLRLYPFIEIaINSDEGVIQVSDTVIWGDPDWR
TPKAMLVDGAPEKDRPLVDRLQVALGNGKMPRKIILDCEPGIDDAVAIFLAHGNPEVELLAITWGNQTLKVTNRAR
LVADVAGIVGVPVAAGCTKPLVRGVRNASQIHGETGMGNVSYPEFVKTKLDGRHAVQLIIDLIMSHEPKTITLVPTGGL
TNIAMAVRLEPRIVDRKAVLVMGGYHTGNASPVAFNVFVPEAAHIVFNESWNVMTMVGDLTHQALATPAVQKR
 55 VKEVGTKPAAFMLQILDFYTKVYEKERNTYATVHDPCAVAYVIDPTVMTTEQVPVDIELNGALTTGMTVADFRYPRPK
HCHTQVAVKLDKDFIAICLVIDALKRIGDPQSAGGRETAPTNLIRRRNKDETNQDVSAAADRFRDRFEKATLEERKAA
TTTMVNEYDLDVDFYEGIAIGQNFHFAPRYAGETFFESLARHEYFLAARGGFMEGDHIVDVGCGVGGPARNMVR
TRCNVIGVNNNDYQISRARRHDALAGMSSKIDYVKTDFCNMSLADNTFDYGAYAIEATCHAKDKVKCYSEVFRVIKPGT
CFVLYEIAICMTDKYNPNDEYHRTIKHRIELGDGLPEMETCKQVIEYMKQAGFVVEEAIDVISQFESSPIKSIPWYQPLV
 60 GDYSSLQGLRSTPIGRILTVMCRVLEFVRLAPKGTYKATEILEEAAESLVVGGQLGIFTPSFYIRARKPSKQASASAEF
HKAADVGLSVGPQVGLSVGPQVGLSVGPQVGLSVGPQVGLSVGPQVGLSVGPQVGLSVGPQVGLSVGPQVGLSVGP
SVGSQSVGLSVGPQVGLSVGPQVGLSVGPQVGLSVGPQVGLSVGPQVGLSVGPQVGLSVGPQVGLSVGPQVGLSVGSQ

MVRLTRCNVIGVNNNDYQISRARRHDALAGMSSKIDYVKTDFCNMSLADNTFDGAYAIEATCHAKDKVKCYSEVFRVI
KPGTCFVLYEIAICMTDKYNPNDEYHRTIKHRIELGDGLPEMETCKQVIEYMKQAGFVVEEAIDVISQFESSPIKSIPIAIIY
QPLVGDYSSLQGLRSTPIGRILTNVMCRVLEFVRLAPKGTYKATEILEEAAESLVVGGQLQLPSFYIRARKPSKQA

HNS: H2B₁₋₄₆ + NH₁₋₃₁₄ + SMT₂₋₃₅₃

5 H2BN (1...138) + NH (139...1080) + SMT (1081...2136)

PM = 79.205 Daltons

N	H2Bn	NH	SMT	C
---	------	----	-----	---

SEQ ID NO: 15 Polinucleótido que codifica el polipéptido de fusión HNS

10 ATGGCCTCTTCTCGCTCTGCTCCCCGCAAGGCTTCCCACGCGCACAAAGTCGCACCGCAAGCCGAAGCGCTCGT
GGAACGTGTACGTGGGCCGCTCGCTGAAGGGAGCAAGGAGAGGGGGAGGCGCGCAGAGGGCGAGAGGGGAG
AGGGGAGAGGAGGGAGAGGAGGGAGAGGGGAGAGGGGAGAGGGGAGAGGGGAGAGGGGAGAGGGGAG
GATTGTGATCCCGGGATCGATGATGCCGTGGCCATCTTTCTCGCCCACGGCAACCCGGAGGTGCGAGCTGCTGG
CCATTACGACGGTGGTGGGCAACCAGACCCTGGAGAAGGTGACCCGGAACGCGCGGCTGGTAGCTGACGTAG
CCGGCATCGTTGGTGTGCCCGTCGCGGCTGGTTGCACCAAGCCCTCGTGCAGGCTGGTGGGAATGCCTCTCA
15 GATTCATGGCGAAACCGGCATGGGTACCTCTCTACCCACGAGTTCAAGACAAAGTTGACGGCCGTCATG
CAGTGCAGCTGATCATCGACCTTATCATGTGCGACGAGCCGAAGACGATCACGCTTGTGCTACGGGTGGCT
GACGAACATTGCGATGGCTGTCCGTCTTGAGCCGCGCATCGTGGACCGTGTGAAGGAGGTGGTTCTGATGGGT
GGCGGCTACCATACTGGTAATGCGTCCCCTGTAGCGGAGTTCAACGTCTTCGTCGACCCGGAGGCGGCGCACA
TTGTGTTCAACGAGAGCTGGAACGTAACGATGGTGGGGCTGGACCTAACGCACCAGGCACTCGCCACGCCGGC
20 GGTCCAGAAGCGAGTGAAGGAGGTGGGCACGAAGCCGGCTGCCTTCATGCTGCAGATTTTGGACTTTTACACG
AAGGTGTACGAAAAGGAGCGCAACACGTACGCGACGGTGCACGATCCCTGCGCTGTGGCGTACGTGATTGACC
CCACCGTGATGACGACGGAGCAAGTGCCAGTGGACATCGAGCTCAATGGGGCACTGACGACTGGGATGACGGT
CGCGGACTTCCGCTACCCACGGCCAAAGCACTGCCACACGCAGGTGGCTGTGAAGCTGGACTTCGACAAGTTT
TGGTGCCTCGTGATTGACGCACTCAAGCGCATCGCGGATCCTCAATCCGCCGGTGGCCGTGAGACCGCGCCGA
25 CGAACCTGATTGTCGCGCAACAAGGACGAGACAAACGGGGATGTCAGCGCCGCGCCGACCGCTTCCGCG
ACCGCTTCGAGAAGGCAACCCCTCGAGGAGCGCAAGGCCGCCACCACGACGATGGTCAACGAGTACTACGACCT
GGTGACGGACTTCTACGAGTACGGCTGGGGCCAGAATTCCATTTCCGCGCCGCGCTACGCCGCGGAGACCTTC
TTCGAGTCCCTCGCGCGCCACGAGTACTTCTGGCCGCTCGCGGGGCTTCATGGAGGGCGACCACATCGTCCG
ACGTGGGCTGCGCGCTCGCGGTCGCGGTCGCGCAACATGGTTCCGCTCACGCGCTGCAACGTCATCGCGCTCA
30 ACAACAACGATTACAGATCAGCCGCTCGCCGTATGAGCTCGCCGCTGATGAGCTCGCCGATGAGCTCCAAGATCGACTA
CGTCAAGACCGACTTCTGCAACATGAGCTTAGCCGACAACACCTTCGACGGCGCCTACGCCATCGAGGCCACC
TGCCACGCAAAGGACAAGGTCAAGTGCTATAGCGAGGTCTTCCGTGTCATCAAGCCCAGCACCTGCTTTGTCCT
GTACGAGTGGTGCATGACCGACAAGTACAACCCCAATGACGAGTACCACCGACAATCAAGCACCGCATCGAG
CTGGGCGACGGCTGCCGGAGATGGAGACGTGCAAACAGGTGATCGAGTACATGAAGCAGGCCGGCTTCGTG
35 GTGGAGGAGGCCATAGACGTCATCAGTCAAGTTCGAGTCCAGCCCCATCAAGAGTATCCCGTGGTACCAGCCGC
TGGTCGGCGACTATTCGTCCTGCAAGGCTCGGCTCTACCCGATTGGCCGCATCCTCACGAACGTCATGTG
TCGCGTGGAGTTCGTCGCTAGCTCCGAAGGGCACGTACAAGGCGACGGAGATTTTGGAGGAGGCTGC
GGAAAGCCTGGTGGGCGGTGAGCTCGGCATCTTACGCGCTCCTTACATCCGCGCTCGCAAGCCGCTCC
AAGCAGGCT

40 SEQ ID NO: 16 Secuencia de aminoácidos del polipéptido de fusión HNS

MASSRSAPRKASHAHKSHRKPKRISIAINVYVGRSLKAINAQMSMSHRTMPRKIILDGDPGIDDAVAIFLAHGNPEVELL
AITTVVGNQTLKVRNARLVADVAGIVGVPVAAGCTKPLVRGVRNASQIHGETGMGNVSYPPEFKTKLDGRHAVQLI
IDLIMSHEPKTITLVPTGGLTNIAMAVRLEPRIVDRVKEWLMGGGYHTGNASPVAFNVDPEAAHIVFNESIAINVTM
VGLDLTHQALATPAVQKRVKEVGTKPAAFMLQILDFYTKVYKERNYATVHDPCAVAYVIDPTVMTTEQVPVDIELN
45 GALTTGMTVADFRYPRPKHCHTQVAVKLDLDFKFIACLVIDALKRIGDPQSAGGREAPTNLIRRRKDETNQDVSAAAD
RFRDRFEKATLEERKAATTTMVNEYDDLVTDFEYEWGQNFHFAPRYAGETFFESLARHEYFLAARGGFMEGDHIV
DVGCGVGGPARNMVRLTRCNVIGVNNNDYQISRARRHDALAGMSSKIDYVKTDFCNMSLADNTFDGAYAIEATCHAK
DKVKCYSEVFRVIKPGTCFVLYEWCMTDKYNPNDEYHRTIKHRIELGDGLPEMETCKQVIEYMKQAGFVVEEAIDVISQ
50 FESSPIKSIPIWYQPLVGDYSSLQGLRSTPIGRILTNVMCRVLEFVRLAPKGTYKATEILEEAAESLVVGGQLGIFTPSFYI
RARKPSKQA

8NS: mtHSP70₅₀₉₋₆₆₀ + NH₁₋₃₁₄ + SMT₂₋₃₅₃

8E (1 ...459) + Nh (460 ...1401) + SMT (1402 ...2457)

PM = 90.970 daltons

N	8E	NH	SMT	C
---	----	----	-----	---

ES 2 728 865 T3

SEQ ID NO: 17 Polinucleótido que codifica el polipéptido de fusión 8NS

ATGAAGGACAAGGCGACGGGCAAGACGCAGAACATCACGATCACGGCGAACGGCGGGCTGTGCGAAGGAGCAG
 ATCGAGCAGATGATCCGCGACTCGGAGCAGCAGCAGCGGAGGCCGACCCTGGAAGCGCGAGCTTGTGGAGGTG
 5 CGCAACAACGCGGAGACGCAGCTGACAACGGCGGAGAGGCAGCTCGGCGAGTGAAGTACGTGAGCCGATGCG
 GAGAAGGAGAACGTGAAGACGCTGGTGGCGGAGCTGCGCAAGGCGATGGAGAACCCGAACGTGCGGAAGGAT
 GACCTTGC GGCTGCGACGGAAGCTGCAGAAAGGCTGTGATGGAGTGGCGCCGACAGAGTACCAGCAGGCT
 GCCGCGGCCAACTCCGGCAGCACCAGCAACTCCGGT GAGCAGCAGCAGCAGCAGGGCCAAGGTGAGCAGCAG
 CAGCAGCAGAACAGCGAAGAGAAGAAGATGCCGCGCAAGATTATTCTCGATTGTGATCCCGGGATCGATGATGC
 10 CGTGGCCATCTTCTCGCCACGGCAACCCGGAGGTCGAGCTGCTGGCCATTACGACGGTGGTGGGCAACCAG
 ACCCTGGAGAAGGTGACCCGGAACGCGCGGCTGGTAGCTGACGTAGCCGGCATCGTTGGTGTGCCCGTCGCG
 GCTGGTTGCACCAAGCCCTCGTGCGCGGTGTGCGGAATGCCTCTCAGATTTCATGGCGAAACCGGCATGGTA
 ACGTCTCCTACCCACAGGTTCAAGACAAAGTTGGACGGCCGTCATGCAGTGCAGATTCATGCGAAACCGGCATGGTA
 ATGTGCGACGAGCCGAAGACGATCACGCTTGTGCCTACGGGTGGCCTGACGAACATTGCGATGGCTGTCCGTC
 TTGAGCCGCGCATCGTGGACCGTGTGAAGGAGGTGGTTCTGATGGGTGGCGGCTACCATACTGGTAATGCGTC
 15 CCCTGTAGCGGAGTTCAACGTCTTCGTCGACCCGGAGGCGGCGCACATTGTGTTCAACGAGAGCTGGAACGTA
 ACGATGGTGGGGCTGGACCTAACGCACCAGGCACCTCGCCACGCCGGCGGTCCAGAAGCGAGTGAAGGAGGTG
 GGCACGAAGCCGGCTGCCTTCATGCTGCAGATTTTGGACTTTTACACGAAGGTGTACGAAAAGGAGCGCAACAC
 GTACGCGACGGTGCACGATCCCTGCGCTGTGGCGTACGTGATTGACCCACCGTGTGACGACGGAGCAAGTG
 CCAGTGGACATCGAGCTCAATGGGGCACTGACGACTGGGATGACGGTGCAGGTCGCGGACTTCCGCTACCCACGGCAA
 20 AGCACTGCCACACGCAGGTGGCTGTGAAGCTGGACTTCGACAAGTTTTGGTGCCTCGTGATTGACGCACTCAAG
 CGCATCGCGCATCCTCAATCCGCCGGTGGCCGTGAGACCGCGCCGACGAACCTGATTTCGTCGCCGCAACAAG
 GACGAGACAAACGGGGATGTCAGCGCCGCCGCCGACCGCTTCCGCGACCGCTTCGAGAAGGCAACCCCTCGAG
 GAGCGCAAGGCCGCCACCACGACGATGGTCAACGAGTACTACGACCTGGT GACGGACTTCTACGAGTACGGCT
 GGGGCCAGAACTTCCATTTGCGCGCCGCGCTACGCCGGCGAGACCTTCTTCGAGTCCCTCGCGCGCCACGAGTA
 25 CTTCTGGCCGCTCGCGCGGCTTTCATGGAGGGCGACCACATCGTCGACGTGGGCTCGCGCGTCCGCGGTC
 GCGCGCAACATGGTTCGCTCACGCGCTGCAACGTATCGGCGTCAACAACAACGATTACCAGATCAGCCGC
 GCTCGCCGTGATGACGCGCTCGCCGGTATGAGCTCCAAGATCGACTACGTCAAGACCGACTTCTGCAACATGA
 GCTTAGCCGACAACACCTTCGACGGCGCCTACGCCATCGAGGCCACCTGCCACGCAAAGGACAAGGTCAAGTG
 CTATAGCGAGGTCTCCGTGTCATCAAGCCCGGCACCTGCTTTGTCCTGTACGAGTGGTGCATGACCGACAAGT
 30 ACAACCCCAATGACGAGTACCACCGCACAAATCAAGCACCGCATCGAGCTGGGCGACGGCCTGCCGGAGATGGA
 GACGTGCAACAGGTGATCGAGTACATGAAGCAGGCCGGCTTCGTGGTGGAGGAGGCCATAGACGTCATCAGT
 CAGTTCGAGTCCAGCCCCATCAAGAGTATCCCGTGGTACCAGCCGCTGGTGGCGACTATTCGTCCCTGCAGG
 GCCTGCGCTACCCCGATTGGCCGATCCTCACGAACGTATGTCGCGTGTGGAGTTCGTGCGCCTAGC
 TCCGAAGGCGACTACAAGGCGACGAGATTTTGGAGGAGCTGCGGAAAGCCTGGTGGTGGGCGGTGAGCT
 35 CGGCATCTTACGCGCTCCTTCTACATCCGCGCTCGCAAGCCGTCGAAGCAGGCT

SEQ ID NO: 18 Secuencia de aminoácidos del polipéptido de fusión 8NS

MKDKATGKTQNITANGLSKEQIEQMIRDSEQHAEADRVKRELVEVRNNAETQLTTAERQLGEWKYVSDAEKENV
 KTLVAELRKAMENPNVAKDDLAAATDKLQKAVMECGRTEYQAAAAANSNSTNSGEQQQQGQGEQQQQNSEE
 40 KKMPRKIILDCDPGIDDAVAIFLAHGNPEVELLAITTVGNQTLKVTNRNARLVADVAGIVGVPVAAGCTKPLVRGVRNA
 SQIHGETGMGNVSYPPFKTKLDGRHAVQLIIDLIMSHEPKTITLVPTGGLNMIAMAVRLEPRIVDRVKEWLMGGGYHT
 GNASPVAEFNVFVDPEAAHIVFNESIAINVTMVGLDLTHQALATPAVQKRKVEVGTKPAAFMLQILDFYTKVYEKERN
 YATVHDPICAVAYVIDPTVMTEQVPVDIELNGALTTGMTVADFRYPRPKHCHTQVAVKLDKFIACLVIDALKRIGDP
 QSAGGRETAPTNLIRRRNKDETNGDVSAAADRFRDRFEKATLEERKAATTTMVNEYDDLVTDFEYEGWGNFHFAP
 45 RYAGETFFESLARHEYFLAARGGFMEGDHIVDVCGVGGPARNMVRLTRCNVIGVNNNDYQISRARRHDALAGMSS
 KIDYVKTDFCNMSLADNTFDGAYAIEATCHAKDKVKCYSEVFRVIKPGTCFVLYEWCMTDKYNPNDEYHRTIKHRIEL
 GDGLPEMETCKQVIEYMKQAGFVVEEAIDVISQFESSPIKSIPWYQPLVGDYSSLQGLRSTPIGRILTNVMCRVLEFVR
 LAPKGYKATEILEEAAESLWGGQLGIFTPSYIRARKPSKQA

21NS: p21₁₋₁₉₁ + NH₁₋₃₁₄ + SMT₂₋₃₅₃

P21 (1...573) + NH (574...1515) + SMT (1516...2571)

50 PM = 95.346 daltons

N-	p21	NH	SMT	-C
----	-----	----	-----	----

SEQ ID NO: 19 Polinucleótido que codifica el polipéptido de fusión 21NS

ATGAGCATTATCAAGGAGGACGACGCCGTGGGCTGCTACATGACGGTACCCTCGTGGACGACACCAAGGTGG
 55 AGGGTACCATCTTACCTACAATCCCAAGGAAGGCATCATAGTACTTCTGTCCCTCCGCGACGATCAGACGAAC
 ATGAAGCTGATCCGCACTCCATACATCAAAGAGTTCAGTATTTACACGCTGAGGAGGGAACGCACCTGCCTCC
 GGCCTGGACTCCTTCAACGAGCTTCCGTCCATGCATGCCGCGCGACAAGTCCATCTTCAAGCAGCCAGC
 ACGCAGCTCAAGAACGCCGAGGCGAACC GCGAAAAGCACTTCAACTCTGTACGACCGACACACCGATTGCCA
 CACTCGATGCGTACCTCAAGCTCCTGCGGCTATACCCCTTCAATTGAGTGGAAACAGCGACGAGGGTGTATCCAG

5 GTCTCGGATACCGTCATTGTCGTAGGGGACCCCGACTGGCGGACGCCAAGGCGATGCTGGTAGACGGCGCC
 CCTGAGAAGGACAGACCGCTCGTAGACCGCCTGCAGGTTGCGCTCGGAAACGGCAAGAAGATGCCCGCGCAA
 ATTATTCTCGATTGTGATCCCGGGATCGATGATGCCGTGGCCATCTTTCTCGCCACGGCAACCCGGAGGTGCA
 GCTGCTGGCCATTACGACGGTGGTGGGCAACCAGACCCTGGAGAAGGTGACCCGGAAACGCGCGGCTGGTAGC
 10 TGACGTAGCCGGCATCGTTGGTGTGCCCGTCCGCGGCTGGTTGCACCAAGCCCCTCGTGCGCGGTGTGCGGAA
 TGCCCTCTCAGATTTCATGGCGAAACCCGGCATGGGTAACGTCTCCTACCCACCAGAGTTCAAGACAAAGTTGGACG
 GCCGTCATGCAGTGCAGCTGATCATCGACCTTATCATGTGCGCACGAGCCGAAGACGATCACGCTTGTGCCTACG
 GGTGGCCTGACGAACATTGCGATGGCTGTCCGTCTTGACCCGCGCATCGTGGACCGTGTGAAGGAGGTGGTTC
 TGATGGGTGGCGGCTACCATACTGGTAATGCGTCCCCTGTAGCGGAGTTCAACGTCTTCGTCGACCCGGAGGC
 15 GGCGCACATTGTGTTCAACGAGAGCTGGAACGTAACGATGGTGGGGCTGGACCTAACGCACCAGGCACTCGCC
 ACGCCGGCGGTCCAGAAGCGAGTGAAGGAGGTGGGCACGAAGCCGGCTGCCTTCATGCTGCAGATTTTGGACT
 TTTACACGAAGGTGTACGAAAAGGAGCGCAACACGTACGCGACGGTGCACGATCCCTGCGCTGTGGCGTACGT
 GATTGACCCACCGTGTACGACGAGGAGCAAGTGCAGTGGACATCGAGCTCAATGGGGCACTGACGACTGGG
 ATGCGCTCGCGACTTCCGCTACCCACGGCCAAAGCACTGCCACACGCGAGGTGGCTGTGAAGCTGGACTTCG
 20 ACAAGTTTTGGTGCCTCGTGATTGACGCACTCAAGCGCATCGGCGATCCTCAATCCGCGGTGGCCGTGAGAC
 CGCGCCGACGAACCTGATTCGTCGCCGCAACAAGGACGAGACAAACGGGGATGTCAGCGCCGCCGCCGACCG
 CTTCCGCGACCGCTTCGAGAAGGCAACCCTCGAGGAGCGCAAGGCCGCCACCACGACGATGGTCAACGAGTA
 CTACGACCTGGTGACGACTTCTACGAGTACGGCTGGGGCCAGAACTTCCATTTCCGCGCCGCGCTACGCCGGC
 GAGACCTTCTTCGAGTCCCTCGCGCGCCACGAGTACTTCTGGCCGCTCGCGGCGGCTTCATGGAGGGCGACC
 25 ACATCGTCGACGTGGGCTCGCGCGTCCGCGGTCCGCGCGCAACATGGTTCGCTCACGCGCTGCAACGTC
 TCGCGTCAACAACAACGATTACCAGTACGCCGCGCTCGCCGTCATGACGCGCTCGCCGGTATGAGCTCAA
 GATCGACTACGTCAAGACCGACTTCTGCAACATGAGCTTAGCCGACAACACCTTCGACGCGCGCTACGCCATCG
 AGGCCACCTGCCACGCAAGGACAAGGTCAAGTGCTATAGCGAGGTCTTCCGTGTCATCAAGCCCGGCACCTG
 CTTTGTCTGTACGAGTGGTGCATGACCGACAAGTACAACCCCAATGACGAGTACCACCGCACAAATCAAGCACC
 30 GCATCGAGCTGGGCGACGGCCTGCCGGAGATGGAGACGTGCAACAGGTGATCGAGTACATGAAGCAGGCCG
 GCTTCGTGGTGGAGGAGGCCATAGACGTCATCAGTCAGTTCGAGTCCAGCCCCATCAAGAGTATCCCGTGGTA
 CCAGCCGCTGGTCCGCGACTATTCGTCCCTGCAGGGCCTGCGCTTACCCCGATTGGCCGCATCCTCACGAAC
 GTCATGTGTGCGCTGCTGGAGTTCGTGCGCCTAGCTCCGAAGGGCACGTACAAGGCCGACGGAGATTTTGGAGG
 AGGCTGCGGAAAGCCTGTGGTGGGCGGTGAGCTCGGCATCTTCACGCCGTCTTCTACATCCGCGCTCGCAA
 GCCGTCCAAGCAGGCT

SEQ ID NO: 20 Secuencia de aminoácidos del polipéptido de fusión 21NS

35 MSIIKEDDAVGCYMTVTLVDDTKVEGTIFTYNPKEGIIVLLSLRDDQTNMKLIRTPYIKEFSISHAEEGTHLPPALDSFNEL
 PSMHAGRDKSIFKHASTQLKNAEANREKHFNSVTTDTPIATLDAYLKLRLYPFIEWNSDEGVIQVSDTVIWDPDWR
 TPKAMLVDGAPEKDRPLVDRQLVALGNGKMPRKIILDCDPGIDDAVAIFLAHGNPEVELLAITWGNQTLKVTNRAR
 LVADVAGIVGVPVAAGCTKPLVRGVRNASQIHGETGMGNVSYPPFEKTKLDGRHAVQLIIDLIMSHEPKITLVTGGL
 40 TNIAMAVRLEPRIVDRVKEVFLMGGGYHTGNASPAEFNVFVDPAAAHIVFNESIAINVTMVGDLDLTHQALATPAVQKR
 VKEVGTKPAAFMLQILDIFYTKVYEKERNYATVHDPCAVAYVIDPTVMTEQVPVDIELNGALTTGMTVADFRYPRPK
 HCHTQVAVKLDLDFKFIACLVIDALKRIGDPQSAGGRETAPTNLIRRRNKDETNQDVSAAADRFRDRFEKATLEERKAA
 TTTMVNEYDYLVDIFYEYWGQNFHAPRYAGTFEFLARHEYFLAARGGFMEGDHIVDVGCVGGPARNMVRLL
 45 TRCNVIGVNNNDYQISRARRHDALAGMSSKIDYVKTDFCNMSLADNTFDGAYAIEATCHAKDKVKCYSEVFRVIKPGT
 CFVLYEWCMTDKYNPNDEYHRTIKHRIELGDGLPEMETCKQVIEYMKQAGFVVEEAIDVISQFESSPIKSIPWYQPLVG
 DYSSLQGLRSTPIGRILTNVMCRVLEFVRLAPKGYKATEILEEAAESLVVGGQLGIFTPSFYIRARKPSKQA

21SC: p21₁₋₁₉₁ + SMT₂₋₃₅₃ + CPB₁₅₄₋₄₄₃

P21 (1...573) + SMT (574...1629) + CPB (1630...2499)

45 PM = 92.239 daltons

N-	p21	SMT	CPB (154-443)	-C
----	-----	-----	---------------	----

SEQ ID NO: 21 Polinucleótido que codifica el polipéptido de fusión 21SC

50 ATGAGCATTATCAAGGAGGACGACGCCGTGGGCTGCTACATGACGGTGACCCCTCGTGGACGACACCAAGGTGG
 AGGGTACCATCTTCACCTACAATCCCAAGGAAGGCATCATAGTACTTCTGTCCCTCCGCGACGATCAGACGAAC
 ATGAAGCTGATCCGCACTCCATACATCAAAGAGTTTCAGTATTTTACACGCTGAGGAGGGAACGCAACCTGCCCTCC
 GGCCTGACTGCTTCAACGAGCTTCCGTCCATGCATGCCGCGCGACAAGTCCATCTTCAAGCAGCCGAC
 55 ACGCAGCTCAAGAACGCCGAGGCGAACCAGCAAAAGCACTTCAACTCTGTACGACCCGACACACCGATTGCCA
 CACTCGATGCGTACCTCAAGCTCCTGCGGCTATACCCCTTCATTGAGTGGAACAGCGACGAGGGTGTCCATCCAG
 GTCTCGGATACCGTCATTGTCGTAGGGGACCCCGACTGGCGGACGCCAAGGCGATGCTGGTAGACGGCGCC
 CCTGAGAAGGACAGACCGCTCGTAGACCGCCTGCAGGTTGCGCTCGGAAACGGCAAGAAGTCCGCCGGTGGC
 CGTGAGACCGCGCCGACGAACCTGATTCGTCGCCGCAACAAGGACGAGACAAACGGGGATGTCAGCGCCGCC
 GCCGACCGCTTCCGCGACCGCTTCGAGAAGGCAACCCTCGAGGAGCGCAAGGCCGCCACCACGACGATGGTC

AACGAGTACTACGACCTGGTGACGGACTTCTACGAGTACGGCTGGGGCCAGAACTTCCATTCGCGCCGCGCT
 ACGCCGGCGAGACCTTCTTCGAGTCCCTCGCGCGCCACGAGTACTTCTGGCCGCTCGCGGCGGCTTCATGGA
 GGGCGACCACATCGTTCGACGTGGGCTGCGGCGTCCGGCGGCAACATGGTTTCGCTCACGCGCTG
 CAACGTCATCGGCGTCAACAACAACGATTACCAGATCAGCCGCGCTCGCCGTCATGACGCGCTCGCCGGTATG
 5 AGCTCCAAGATCGACTACGTCAAGACCGACTTCTGCAACATGAGCTTAGCCGACAACACCTTCGACGGCGCCTA
 CGCCATCGAGGCCACCTGCCACGCAAAGGACAAGTCAAGTGTATAGCGAGGTCTTCCGTGTCATCAAGCCC
 GGCACCTGCTTTGTCCTGTACGAGTGGTGCATGACCGACAAGTACAACCCCAATGACGAGTACCACCCGACAAT
 CAAGCACCGCATCGAGCTGGGCGACGGCCTGCCGGAGATGGAGACGTGCAAAACAGGTGATCGAGTACATGAA
 GCAGGCCGGCTTCGTGGTGGAGGAGGCCATAGACGTACATCAGTCAAGTTCGAGTCCAGCCCCATCAAGAGTATC
 10 CCGTGGTACCAGCCGCTGGTCCGGCAGTATTTCGTCCCTGCAGGGCCTGCGCTCTACCCCGATTGGCCGCATCC
 TCACGAACGTCATGTGTCGCGTGGTGGAGTTCGTGCGCCTAGCTCCGAAGGGCACGTACAAGGGCAGCGGAGAT
 TTTGGAGGAGGCTGCGGAAAGCCTGGTGGTGGGCGGTGAGCTCGGCATCTTCACGCCGTCTTCTACATCCGC
 GCTCGCAAGCCGTCCAAGCAGGCTTCGGCGGTGCGCAACATCGAATCGCAGTGGGCCCGTGGCCGCCACGGC
 TTGGTGAAGCTCGGAGCAGTGGTGGTGCATGACAAAGACAATGGTGCACCGCGGGTGCAGGCTGATGC
 15 TGCAGGCGTTCGAGTGGCTGCTGCGACACATGTACGGGATCGTGTTCACGGAGAAGAGTACCCCTACAGTTC
 CGGCAACGGTGTGTTGGCCGAGTGTGAAACAGCAGTAACTCGTTCGGCGCGCAAAATCGACGGCTACGTG
 ATGATCCCAGCAACGAAACGGTTATGGCTGCGTGGCTTGCAGGAGAATGGCCCATCGCGATTGCGGTGACG
 CCAGCTCCTTCATGCTTACCAGAGCGGCGTGTGACAGCTGCGCTGGCGATGCACTGAACCACGGCGTGTGCT
 GCTCGTCCGGTACAACAAGACCGGTGGGGTTCGCTACTGGGTGATCAAGAACTCGTGGGGTGAGGACTGGGG
 20 CGAGAAGGGCTACGTGCGCGTGGTCAATGGGGTGAACGCGTGCCTGCTCAGTGAATACCCCGTGTCCGCGCAT
 GTGCCGCGGAGTCTCACCCCTGGCCCGGACGGAGCGAGGAGCGCGCCCTAAACGGGTGACGGTGA
 GCAGATGATGTCACCGATATGTACTGCAGGGAGGGTGAAGAAGAGTCTTCTCACCCGCAACGTGTGCTAC
 AAGAACGGGGAGGCGGCTCCTCTATGACGAAAGTGCAGTCCGCGAGAAGGTGCTGATGTGCTCGTACTCGAACC
 CTCATTGCTTTGGTCTGGGCTGTGCCTCGAGACTCCTGATGGCAAGTGCAGCGCCGACTTCTTGGGCTCGATC
 25 ATGAACACCTGCCAGTACACG

SEQ ID NO: 22 Secuencia de aminoácidos del polipéptido de fusión 21SC

MSIIKEDDAVGCYMTVTLVDDTKVEGTIFTYNPKEGIIVLLSRDDQTNMKLIRTPYIKEFSISHAEETHLPPALDSFNEL
 PSMHAGRDKSIFKHASTQLKNAEANREKHFNSVTTDTPIATLDAYLKLRLYPFIEWNSDEGVIQVSDTVIWDGPDWR
 TPKAMLVDGAPEKDRPLVDRQLQVALGNGKKSAGGRETAPTNLIRRRNKDETNGDVSAADRFRDRFEKATLEERKA
 30 ATTTMVNEYDDLVTDFEYEGIAIGQNFHAPRYAGTFFESLARHEYFLAARGGFMEGDHIVDVCGVGGPARNMVR
 LTRCNVIGNNNNDYQISRARRHDALAGMSSKIDYVKTDFCNMSLADNTFDGAYAIEATCHAKDKVKCYSEVFRVIKPG
 TCFVLYEIAICMTDKYNPNDHEYHRTIKHRIELGDGLPEMETCKQVIEYMKQAGFVVEEAIDVISQFESSPIKSIPIAIYQPLV
 GDYSSLQGLRSTPIGRILTVMCRVLEFVRLAPKGTYKATEILEEAAESLWGGQLGIFTPSFYIRARKPSKQASAVGNIE
 SQWARAGHGLVSLSEQQLVSCDDKDNCGNGLMLQAFEWLLRHMVGIVFTEKSYPYTSGNGDVAECLNSSKLVPG
 35 AQIDGYVMIPSNETVMAAWLAENGPAAVDASSFMSYQSGVLTSCAGDALNHGVLLVGYNKTGGVVPYVWIKNSWGE
 DWGEKGYVRVVMGLNACLSEYPVSAHVPRSLTPGPGTESEERAPKRVTVEQMMCTDMYCREGCKKSLLTANVCY
 KNGGGGSSMTKCGPQKVLMSYSNPHCFGPGLCLETDPDGKCAPYFLGSIMNTCQYT

821S: mtHSP70₅₀₉₋₆₆₀ + p21₁₋₁₉₁ + SMT₂₋₃₅₃

8E (1...459) + p21 (460...1032) + SMT (10333...2091)

40 PM = 78.510 daltons

N	8E	p21	SMT	C
---	----	-----	-----	---

SEQ ID NO: 23 Polinucleótido que codifica el polipéptido de fusión 821S

ATGAAGGACAAGGGCGACGGGCAAGACGCAGAACATCACGATCACGGCGAACGGCGGGCTGTGCAAGGAGCAG
 45 ATCGAGCAGATGATCCGCGACTCGGAGCAGCACGCGGAGGCCGACCCGCTGAAGCGCGAGCTTGTGGAGGTG
 CGCAACAACGCGGAGACGCAGCTGACAACGGCGGAGAGGCCAGCTCGGCGAGTGGAAAGTACGTGAGCGATGCG
 GAGAAGGAGAACGTGAAGACGCTGGTGGCGGAGCTGCGCAAGGCGATGGAGAACCCGAACGTCGCGAAGGAT
 GACCTTTCGCGCTGCGACGGACAAGCTGCAGAAGGCTGTGATGGAGTGGGCCGACAGAGTACCAGCAGGCT
 GCCGCGGCCAACTCCGCGACGACCAGCAACTCCGGTGGAGCAGCAGCAGCAGGCGCAAGGTGAGCAGCAG
 50 CAGCAGCAGAACAGCGAAGAGAAGAAGATGAGCATTATCAAGGAGGACGACGCCGTGGGCTGCTACATGACGG
 TGACCCTCGTGGACGACACCAAGGTGGAGGGTACCATCTTACCTACAATCCCAAGGAAGGCATCATAGTACTT
 CTGTCCCTCCGCGACATCAGACGAACATGAAGCTGATCCGCACTCCATACATCAAAGAGTTTCAGTATTTACAC
 GCTGAGGAGGGAACGCACCTGCCTCCGGCACTGGACTCCTCAACGAGCTTCCGTCCATGCATGCCGGCCGCG
 ACAAGTCCATCTTCAAGCACGCCAGCACGCTCAAGAACGCCGAGGCGAACCCGCGAAAAGCACTTCAACTCT
 55 GTCACGACCGACACACCGATTGCCACTCGATGCGTACCTCAAGCTCCTGCGGCTATACCCCTTATTGAGTG
 GAACAGCGACGAGGGTGCATCCAGGTCTCGGATACCGTCAATTGTCGTAGGGGACCCCGACTGGCGGACGCC
 CAAGGCGATGCTGGTAGACGGCGCCCTGAGAAGGACAGACCGCTCGTAGACCGCTGCAGGTTGCGCTCGG
 AAACGGCAAGAAGATGTCCGCCGGTGGCCGTGAGACCGCGCCGACGAACCTGATTGCTCGCCGCAACAAGGA

CGAGACAAACGGGGATGTCAGCGCCGCCGCCGACCGCTTCCGCGACCGCTTCGAGAAGGCAACCCTCGAGGA
 GCGCAAGGCCGCCACCACGACGATGGTCAACGAGTACTACGACCTGGTGACGGACTTCTACGAGTACGGCTGG
 GGCCAGAACTTCCATTTCCGCGCCGCGCTACGCCGGCAGACCTTCTTCGAGTCCCTCGCGGCCACGAGTACT
 TCCTGGCCGCTCGCGCCGCTTTCATGGAGGGCGACCATCGTCGACGTGGGCTGCGGCGTTCGGCGGTCCG
 5 GCGCGCAACATGGTTCGCTCACGCGCTGCAACGTTCATCGGCGTCAACAACAACGATTACCAGATCAGCCGCG
 CTCGCGCTCATGACGCGCTCGCCGGTATGAGTCCAAGATCGACTACGTCAAGACCGACTTCTGCAACATGAGC
 TTAGCCGACAACACCTTCGACGGCGCCTACGCCATCGAGGCCACCTGCCACGCAAAGGACAAGGTCAAGTGCT
 ATAGCGAGGTCTTCCGTGTCATCAAGCCCGGCACCTGCTTTGTCTGTACGAGTGGTGCATGACCGACAAGTAC
 AACCCCAATGACGAGTACCACCGCACAAATCAAGCACCGCATCGAGCTGGGCGACGGCCTGCCGGAGATGGAGA
 10 CGTGCAAACAGGTGATCGAGTACATGAAGCAGGCCGGCTTCGTGGTGGAGGAGGCCATAGACGTTCATCAGTCA
 GTTCGAGTCCAGCCCATCAAGAGTATCCCGTGGTACCAGCCGCTGGTTCGGCGACTATTCGTCCCTGCAGGGC
 CTGCGCTCTACCCCGATTGGCCGCATCCTCACGAACGTTCATGTGTCGCGTGTGGAGTTCGTGCGCCTAGCTC
 CGAAGGGCACGTACAAGGCGACGGAGATTTTGGAGGAGGCTGCGGAAAGCCTGGTGGTGGGCGGTGAGCTCG
 GCATCTTCACGCCGTCTTCTACATCCGCG CTCGCAAGCCGTCCAAGCAGGCT

15 SEQ ID NO: 24 Secuencia de aminoácidos del polipéptido de fusión 821S

MKDKATGKTQNITANGLSKEQIEQMIRDSEQHAEDRVKRELVEVRNNAETQLTTAERQLGEWKYVSDAEKENV
 KTLVAELRKAMENPNVAKDDLAAATDKLQKAVMECGRTEYQAAAAANSNSTNSGEQQQQQGGGEQQQQNSEE
 KKMSIIKEDDAVGCYMTVTLVDDTKVEGTIFTYNPKEGIIVLLSLRDDQTNMKLIRTPYIKEFSISHAEEGTHLPPALDSF
 20 NELPSMHAGRDKSIFKHASTQLKNAEANREKHFNSVTTDTPIATLDAYLKLRLYPFIEIaINSDGVIQVSDTVIVVGD
DIAIRTPKAMLVDGAPEKDRPLVDRLQVALGNGKKMSAGGRETAPTNLIRRRNKDETNQDVSAAADRFRDRFEKATL
 EERKAATTTMVNEYDLDVDFYEWGQNFHAPRYAGETFFESLARHEYFLAARGGFMEGDHIVDVCGVGGPAR
 NMVRLTRCNVIGVNNNDYQISRARRHDALAGMSSKIDYVKTDFCNMSLADNTFDGAYAIEATCHAKDKVKCYSEVFR
 VIKPGTCFVLYEWCMTDKYNPNDEYHRTIKHRIELGDGLPEMETCKQVIEYMKQAGFWEEAIDVISQFESSPIKSIWY
 QPLVGDYSSLQGLRSTPIGRILTNVMCRVLEFVRLAPKGTYKATEILEEAAESLVVGGQLGIFTPSFYIRARKPSKQA

25 8HS: mtHSP70₅₀₉₋₆₆₀ + H2B₁₋₄₆ + SMT₂₋₃₅₃

8E (1 459) + H2Bn (460 597) + SMT (598 1653)

PM = 62.204 daltons

N	8E	H2Bn	SMT	C
---	----	------	-----	---

30 SEQ ID NO: 25 Polinucleótido que codifica el polipéptido de fusión 8HS

ATGAAGGACAAGGCGACGGGCAAGACGCAGAATCACGATCACGGCGAACGGCGGGCTGTGGAAGGAGCAG
 ATCGAGCAGATGATCCGCGACTCGGAGCAGCACGCGGAGGCCGACCGCGTGAAGCGCGAGCTTGTGGAGGTG
 CGCAACAACGCGGAGACGCAGCTGACAACGGCGGAGAGGCAGCTCGGCGAGTGGAAAGTACGTGAGCGATGCG
 GAGAAGGAGAACGTGAAGACGCTGGTGGCGGAGCTGCGCAAGGCGATGGAGAACC CGAACGTGCGGAAGGAT
 35 GACCTTTCGCGCTGCGACGGACAAGCTGCAGAAAGGCTGTGATGGAGTGGCGCCGCACAGAGTACCAGCAGGCT
 GCCGCGGCCAACTCCGGCAGCACCAGCAACTCCGGTGAGCAGCAGCAGCAGCAGGCGCAAGGTGAGCAGCAG
 CAGCAGCAGAACAGCGAAGAGAAGAAGTGGCTTCTTCGCTGCTCCTCCCGCAAGGCTTCCCACGCGCACA
 AGTCGCACCCGAAGCCGAAGCGCTCGTGAACGTGACGTGGCGCGCTCGCTGAAGGCGATCAACGCCCAGA
 TGTCGATGTGCGACCCGACGTCCGCGCGTGGCCGTGAGACCCGCGCCGACGAACTGATTGTCGCGCGCAACA
 40 AGGACGAGACAAACGGGGATGTCAGCGCCGCCGCCGACCGCTTCCGCGACCGCTTCGAGAAGGCAACCCTCG
 AGGAGCGCAAGGCCGCCACCACGACGATGGTCAACGAGTACTACGACCTGGTGACGGACTTCTACGAGTACGG
 CTGGGGCCAGAATTTCCATTTCCGCGCCGCGCTACGCCGGCAGACCTTCTTCGAGTCCCTCGCGGCCACGAG
 TACTTCTGGCCGCTCGCGGCGGCTTTCATGGAGGGCGACCATCGTCGACGTGGGCTGCGGCGTTCGGCGGT
 CCGGCGCGCAACATGGTTTCGCTCACGCGCTGCAACGTTCATCGGCGTCAACAACAACGATTACCAGATCAGCC
 45 GCGCTCGCCGTATGACGCGCTCGCCGGTATGAGCTCCAAGATCGACTACGTCAAGACCGACTTCTGCAACAT
 GAGCTTAGCCGACAACACCTTCGACGGCGCCTACGCCATCGAGGCCACCTGCCACGCAAAGGACAAGGTCAAG
 TGCTATAGCGAGGTCTTCCGTGTCATCAAGCCCGGCACCTGCTTTGTCTGTACGAGTGGTGCATGACCGACAA
 GTACAACCCCAATGACGAGTACCACCGCACAAATCAAGCACCGCATCGAGCTGGGCGACGGCCTGCCGGAGATG
 GAGACGTGCAAACAGGTGATCGAGTACATGAAGCAGGCCGGCTTCGTGGTGGAGGAGGCCATAGACGTTCATCA
 50 GTCAGTTTCGAGTCCAGCCCATCAAGAGTATCCCGTGGTACCAGCCGCTGGTTCGGCGACTATTCGTCCCTGCA
 GGGCCTGCGCTCTACCCCGATTGGCCGCATCCTCACGAACGTTCATGTGTCGCGTGTGGAGTTTCGTGCGCCTA
 GCTCCGAAGGGCACGTACAAGGCGACGGAGATTTTGGAGGAGGCTGCGGAAAGCCTGGTGGTGGGCGGTGAG
 CTCGGCATCTTCACGCCGTCTTCTACATCCGCGCTCGCAAGCCGTCCAAGCAGGCT

SEQ ID NO: 26 Secuencia de aminoácidos que codifica el polipéptido de fusión 8HS

55 MKDKATGKTQNITANGLSKEQIEQMIRDSEQHAEDRVKRELVEVRNNAETQLTTAERQLGEWKYVSDAEKENV
 KTLVAELRKAMENPNVAKDDLAAATDKLQKAVMECGRTEYQAAAAANSNSTNSGEQQQQQGGGEQQQQNSEE
 KKMASSRSAPRKASHAHKSHRKPKRSLaINVYVGRSLKAINAQMSMSHRTSAGGRETAPTNLIRRRNKDETNQDVS

AADRFRDRFEKATLEERKAATTTMVNEYDYLVTDFYEGIAIGQNFHFAPRYAGETFFESLARHEYFLAARGGFMEGD
 HIVDVGCGVGGPARNMVRLTRCNVIGVNNNDYQISRARRHDALAGMSSKIDYVKTDFCNMSLADNTFDGAYAIEATC
 HAKDKVKCYSEVFRVIKPGTCFVLYEWCMTDKYNPNDEYHRTIKHRIELGDGLPEMETCKQVIEYMKQAGFVVEEAI
 VISQFESSPIKSIPWYQPLVGDYSSLQGLRSTPIGRILTVMCRVLEFVRLAPKGTYKATEILEEAAESLVVGGQLGIFTP
 SFYIRARKPSKQ

5

SEC ID NO: 27 Secuencia de aminoácidos del polipéptido 8E de *Leishmania infantum* o *donovani*

KDKATGKTQINITITANGGLSKEQIEQMIRDSEQHAEADRVKRELVEVRNNAETQLTTAERQLGEWKYVSDAEKENVKT
 LVAELRKAMENPNVAKDDLAAATDKLQKAVMECGRTEYQAAAAANSNSTNSGEQQQQQSQGEQQQQQNSEEK

SEQ ID NO: 28 Secuencia de aminoácidos del polipéptido 8E de *Leishmania major*

KDKATGKTQINITITANGGLSKEQIEQMIRDSEQHAEADRVKRELVEVRNNAETQLTTAERQLGEWKYVSDAEKENVKT
 LVAELRKAMENPNVAKDDLAAATDKLQKAVMECGRTEYQAAAAANSNSTNSGEQQQQQSQGEQQQQQNSEEK

10

SEQ ID NO: 29 Secuencia de aminoácidos del polipéptido 8E de *Leishmania mexicana*

KDKATGKTQINITITANGGLSKEQIEQMIRDSEQHAEADRVKRELVEVRNNAETQLTTAERQLSEWKYVSDAEKENVRT
 LVAELRKAMENPNVAKDDLSAATDKLQKAVMECGRTEYQAAAAANSNSTNSGEQQQQQSQGEQQQQQQQ
 QQAEER

15

SEQ ID NO: 30 Secuencia de aminoácidos del polipéptido 8E de *Leishmania braziliensis*

KDKATGKTQINITITAHGGLSKEQIEQMVRDSEQHAEADRVKRELVEARNNAETQLTTAERQLGEWKYVSDAEKENVK
 THVAELRKAMENPNVAKDDLAAATDKLQKAVMECGRTEYQAAAAANSSTNSNSTNSGEQQQQQSQGDQQQQQSSE
 KN

20

SEQ ID NO: 31 Secuencia de aminoácidos de un fragmento del extremo carboxi del polipéptido de cisteína
 polipeptidasa B (CPB) de *Leishmania infantum*

SAVGNIESQWARAGHGLVSLSEQQLVSCDDKNGCNGGLMLQAFEWLLRHMYGIVFTEKSYPTSGNGDVAECLN
 SSKLVPGAQIDGYVMIPSNETVMAAWLAENGPIAIVDASSFMSYQSGVLTSCAGDALNHGVLLVGYNKTGGVPYVVI
 KNSWGEDWGEKGYVRVVMGLNACLSEYPVSAHVPRSLTPGPGTESEERAPKRVTVEQMMCTDMYCREGCKKSL
 LTANVCYKNGGGSSMTKCGPQKVLMSYSNPFCFGPGLCLETPDGKCAPYFLGSIMNTCQYT

25

SEQ ID NO: 32 Secuencia de aminoácidos de un fragmento del extremo amino del polipéptido de la histona H2BN
 (H2BN) de *Leishmania infantum*

MASSRSAPRKASHAHKSHRKPKRSWNVYVGRSLKAINAQMSMSHRT

SEQ ID NO: 33 Secuencia de aminoácidos de un polipéptido A2 maduro (A) de *Leishmania donovani*

SASAEPHKAADVGVPLSVGPQSVGPLSVGPQAVGPLSVGPQSVGPLSVGPQAVGPLSVGPQSVGPLSVGPQSVG
 QSVGPLSVGSQSVGPLSVGPQSVGPLSVGPQAVGPLSVGPQSVGPLSVGPQAVGPLSVGPQSVGPLSVGPQSVG
 LSVGSQSVGPLSVGPQSVGPLSVGPQSVGPLSVGPQSVGPLSVGPQSVGPLSVGPQSVG

30

SEQ ID NO: 34 Secuencia de aminoácidos de un polipéptido de antígeno p21 de longitud completa (p21) de
Leishmania infantum

SIKEDDAVGCYMTVTLVDDTKVEGTIFTYNPKEGIIVLLSLRDDQTNMKLIRTPYIKEFSISHAEEGTHLPPALDSFNELP
 SMHAGRDKSIFKHASTQLKNAEANREKHFNSVTTDTPIATLDAYLKLRLYPFIEWNSDEGVIQVSDTVIVVGD
 PKAMLVDGAPEKDRPLVDRLQVALGNGKK

35

SEQ ID NO: 35 Secuencia de aminoácidos de un polipéptido de nucleósido hidrolasa no específico (NH) de longitud
 completa de *Leishmania infantum* o *donovani*

MPRKIILDCDPGIDDAVAIFLAHGNPEVELLAITWGNQTLKTRNARLVADVAGVGPVAAAGCTKPLVGRVNRASQI
 HGETGMGNVSYPPEFKTKLDGRHAVQLIIDLIMSHEPKTITLVPTGGLTNIAMAVRLEPRIVDRVKEWLMGGGYHTGN
 ASPVAEFNVFVDPEAAHIVFNESWNVMTMVGDLTHQALATPAVQKRVKEVGTKPAAFMLQILDFYTKVYEKERNTYAT
 VHDPCAVAYVIDPTVMTTEQVPVDIELNGALTTGMTVADFRYPRPKHCHTQVAVKLDKFDKFWCLVIDALKRIGDPQ

40

SEQ ID NO: 36 Secuencia de aminoácidos de un polipéptido de esteroil 24-c-metiltransferasa (SMT) de longitud
 completa de *Leishmania infantum*

45

SAGGRETAPTNLIRRRNKDETNGDVSAAADRFRDRFEKATLEERKAATTTMVNEYDYLVTDFYEGWGNFHFAPR
 YAGETFFESLARHEYFLAARGGFMEGDHIVDVGCGVGGPARNMVRLTRCNVIGVNNNDYQISRARRHDALAGMSSKI
 DYVKTDFCNMSLADNTFDGAYAIEATCHAKDKVKCYSEVFRVIKPGTCFVLYEWCMTDKYNPNDEYHRTIKHRIELGD
 GLPEMETCKQVIEYMKQAGFVVEEAIQVISQFESSPIKSIPWYQPLVGDYSSLQGLRSTPIGRILTVMCRVLEFVRLAP
 KGTYKATEILEEAAESLVVGGQLGIFTPSFYIRARKPSKQA

50

CCGCACTCCATACATCAAAGAGTTTCAGTATTTACACGCTGAGGAGGGAACGCACCTGCCTCCGGCACTGGACT
 CCTTCAACGAGCTTCCGTCCATGCATGCCGGCCGCGACAAGTCCATCTTCAAGCACGCCAGCACGCAGCTCAA
 GAACGCCGAGGCGAACCCGCGAAAAGCACTTCAACTCTGTACAGCCGACACACCGATTGCCACACTCGATGCG
 TACCTCAAGCTCCTGCGGCTATACCCCTTCATTGAGTGGAAACAGCGACGAGGGTGTCCAGGTCTCGGATAC
 5 CGTCATTGTCGTAGGGGACCCGACTGGCGGACGCCAAAGCGATGCTGGTAGACGGCGCCCTGAGAAGGA
 CAGACCGCTCGTAGACCCGCTGCAGGTTGCGCTCGGAAACGGCAAGAAGATGCCGCGCAAGATTATTCTCGAT
 TGTGATCCCGGGATCGATGCCGTGGCCATCTTTCTCGCCACGGCAACCCGGAGGTCGAGCTGCTGGCCA
 TTACGACGGTGGTGGCAACCAGACCCTGGAGAAGGTGACCCGGAACGCGCGGCTGGTAGCTGACGTAGCCG
 GCATCGTTGGTGTGCCCGTCCGCGGCTGGTTGCACCAAGCCCCTCGTGCAGCGGTGTGCGGAATGCCTCTCAGAT
 10 TCATGGCGAAACCGGCATGGGTAACGTCTCCTACCCACCAGAGTTC AAGACAAAGTTGGACGGCCGTCATGCA
 GTGCAGCTGATCATCGACCTTATCATGTGCGACGAGCCGAAGACGATCACGCTTGTGCCTACGGGTGGCCTGA
 CGAACATTGCGATGGCTGTCCGTCTTGAGCCGCGCATCGTGGACCGTGTGAAGGAGGTGGTTCTGATGGGTGG
 CGGCTACCATACTGGTAATGCGTCCCCTGTAGCGGAGTTCAACGTCTTCGTCGACCCGGAGGCGGCGCACATT
 GTGTTCAACGAGGGAACGTAACGATGGTGGGCTGGACCTAACGCACCAGGCTGCCACCCGCGGCGGCGGCG
 15 GTCCAGAGCGAGTGAAGGAGGTGGGCGACGAAGCCGCTGCCCTTCATGCTGCAGATTTTGGACTTTTACCGA
 AAGGTGTACGAAAAGGAGCGCAACACGTACGCGACGGTGCACGATCCCTGCGCTGTGGCGTACGTGATTGACCC
 CACCGTGTGACGACGGAGCAAGTGCCAGTGGACATCGAGCTCAATGGGGCACTGACGACTGGGATGACGGTC
 GCGGACTTCCGCTACCCACGGCCAAAGCACTGCCACACGCAGGTGGCTGTGAAGCTGGACTTCGACAAGTTTT
 GGTGCCTCGTGATTGACGCACTCAAGCGCATCGGCGATCCTCAATCCGCCGGTGGCCGTGAGACCCGCGCCGA
 20 CGAACCTGATTGTCGCGCAACAAGGACGAGACAACCGGGATGTCAGCGCCGCGCCGCGCCGCTTCCGCG
 ACCGCTTCGAGAAGGCAACCCCTCGAGGAGCGCAAGGCCGCCACCACGACGATGGTCAACGAGTACTACGACT
 GGTGACGGACTTACGAGTACGGCTGGGGCCAGAACTTCCATTTGCGCGCCGCTACGCCGCGGAGACCTTC
 TTCGAGTCCCTCGCGCGCCACGAGTACTTCTGGCCGCTCGCGGCGGCTTCATGGAGGGCGACCACATCGTCCG
 ACGTGGGCTGCGGCGTCCGCGGTCCGGCGCGCAACATGGTTGCGCTCACGCGCTGCAACGTATCGGCGTCA
 25 ACAACAACGATTACAGATCAGCCGCGCTCGCCGTGATGACGCGCTCGCCGATGAGCTCCAAGATCGACTA
 CGTCAAGACCGACTTCTGCAACATGAGCTTAGCCGACAACACCTTCGACGGCGCCTACGCCATCGAGGCCACC
 TGCCACGCAAAGGACAAGGTCAAGTGTATAGCGAGGTCTTCCGTGTCATCAAGCCCGGCACCTGCTTTGCTC
 GTACGAGTGGTGCATGACCGACAAGTACAACCCCAATGACGAGTACCACCGACAATCAAGCACCCGATCGAG
 CTGGCGACGGCCTGCCGGAGATGGAGACGTGCAACAGGTGATCGAGTACATGAAGCAGGCGGCTTCGTG
 30 GTGGAGGAGGCCATAGACGTCATCAGTCAAGTTCGAGTCCAGCCCCATCAAGAGTATCCCGTGGTACCAGCCG
 TGGTCCGCGACTATTCGTCCTGCAGGGCCTGCGCTTACCCCGATTGGCCGATCCTCACGAACGTCATGTG
 TCGCGTGTGGAGTTCGTGCGCCTAGCTCCGAAGGGCACGTACAAGGCGACGGAGATTTTGGAGGAGGCTGC
 GGAAAGCCTGGTGGTGGGCGGTGAGCTCGGCATCTTACGCGCTCCTTACATCCGCGCTCGCAAGCCGCTCC
 AAGCAGGCT

35 SEQ ID NO: 41 Secuencia de aminoácidos del polipéptido de fusión H21NS

MASSRSAPRKASHAHKSHRKPKRSLAINVYVGRSLKAINAQMSMSHRTSIIKEDDAVGCYMTVTLVDDTKVEGTIFTYN
PKEGIIVLLSLRDDQTNMMLIRTPYIKEFSISHAEEGTHLPPALDSFNELPSMHAGRDKSIFKHASTQLKNAEANREKHF
NSVTITDPIATLDAYLKLRLYPFIEWNSDEGVIQVSDTVIVGDPDWRTPKAMLVDGAPEKDRPLVDRLQVALGNK
 40 KMPRKILDCDPGIDDAVAIFLAHGNPEVELLAITWGNQTLKVTNRNARLVADVAGIVGVPVAAGCTKPLVRGVRNAS
QIHGETGMGNVSYPPEFKTKLDGRHAVQLIIDLIMSHEPKTITLVPTGGLTNIAMAVRLEPRIVDRVKEWLMGGGYHTG
NASPVAEFNVFVDPEAAHIVFNESAINVMTMVGDLTHQALATPAVQKRVKEVGTKPAAFMLQILDFYTKVYEKERNY
ATVHDPCAVAYVIDPTVMTTEQVPVDIELNGALTTGMTVADFRYPRPKHCHTQVAVKLDKFDKFIACLVIDALKRIGDPQ
SAGGRETAPTNLIRRRNKDETNQDVSAADRFRDRFEKATLEERKAATTTMVNEYDLVTDIFYEYWGQNFHFAPR
 45 YAGETFFESLARHEYFLAARGGFMEGDHIVDVGCGVGGPARNMVRRLTRCNVIGVNNNDYQISRARRHDALAGMSSKI
DYVKTDFCNMSLADNTFDGAYAIEATCHAKDKVICYSEVFRVIKPGTCFVLYEWCMTDKYNPNDEYHRTIKHRIELGD
GLPEMETCKQVIEYMKQAGFWEEAIDVQSFVSSPIKSIWYQPLVGDYSSLQGLRSTPIGRILTVMCRVLEFVRLAP
KGTYKATEILEEAESLWGGQLGIFTPSYIRARKPSKQA

SEQ ID NO: 42 Secuencia de aminoácidos de un supuesto polipéptido del factor de inicio eucariótico 4a (Leif) de *Leishmania major*

50 MAQNDKIAPQDQDSFLDDQPGVRPIPSFDDMPLHQNLLRGIYSYGFEPSSIQQRRAIPFTRGGDIIAQAQSGTGKTG
AFSIGLLQRLDFRHNLIQGLVLSPTRELALQTAEVISRIGEFLSNSSKFCETFVGGTRVQDDLRLKQAGVIVAVGTPGRV
SDVIKRGALRTESLRVLVLEADEMELSQGFADQIYEIRFLPKDIQVALFSATMPPEEVLELTKKFMRD

La SEQ ID NO: 43 es una secuencia de aminoácidos del polipéptido de fusión NSL

NH₁₋₃₁₄ + SMT₂₋₃₅₃ + Leif₁₋₂₂₆

55 Nh (1...942) + SMT (943...1998) + Leif (1999...2224) números de nucleótidos

MPRKIILDCDPGIDDAVAIFLAHGNPEVELLAITWGNQTLKVTNRNARLVADVAGIVGVPVAAGCTKPLVRGVRNASQI
HGETGMGNVSYPPEFKTKLDGRHAVQLIIDLIMSHEPKTITLVPTGGLTNIAMAVRLEPRIVDRVKEWLMGGGYHTGN
ASPVAEFNVFVDPEAAHIVFNESWNVMTMVGDLTHQALATPAVQKRVKEVGTKPAAFMLQILDFYTKVYEKERNYAT
VHDPCAVAYVIDPTVMTTEQVPVDIELNGALTTGMTVADFRYPRPKHCHTQVAVKLDKFDKFIACLVIDALKRIGDPQSA

5 GGRETAPTNLIRRRNKDETNQDVSAAADRFRDRFEKATLEERKAATTTMVNEYDDLVTDFYEYGIAGQNFHFAPRYA
GETFFESLARHEYFLAARGGFMEGDHIVDVGCGVGGPARNMVRLTRCNVIGVNNNDYQISRARRHDALAGMSSKID
YVKTDFCNMSLADNTFDGAYAIEATCHAKDKVKCYSEVFRVIKPGTCFVLYEIAICMTDKYNPNDEYHRTIKHRIELGD
GLPEMETCKQVIEYMKQAGFVEEAIDVISQFESSPIKSIPIAIYQPLVGDYSSLQGLRSTPIGRILTNVMCRVLEFVRLAP
 KGTYKATEILEEAAESLVGGQLGIFTPSFYIRARKPSKQAMAQNDKIAPQDQDSFLDDQPGVRIPIPSFDDMPLHQNL
 RGIYSYGFLEKPSIIQRAIAPFTRGGDIIAQAQSGTGKTGAFSIGLLQRLDFRHNLIQGLVLSPTRELALQTAEVISRIGE
 FLSNSSKFCETFVGGTRVQDDLRLKLAGVIVAVGTPGRVSDVIKRGALRTESLRVLVLDEADEMLSQGFADQIYEIFRF
 LPKDIQVALFSATMPEEVLELTKKFMRD

La SEQ ID NO: 44 es una secuencia de aminoácidos para un polipéptido de fusión HNSC.

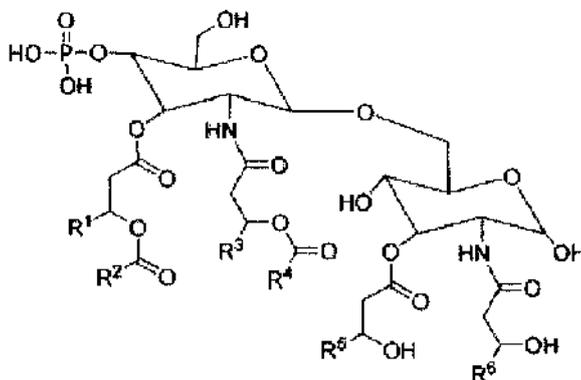
10 HNSC: H2BN₁₋₄₆ + NH₁₋₃₁₄ + SMT₂₋₃₅₃ + CPB₁₅₄₋₄₄₃

H2BN₁₋₁₃₈ (1...138) + Nh (139...1080) + SMT (1081...2136) + CPB (2137...3006) (número de secuencia de nucleótidos)

15 MASSRSAPRKASHAHKSHRKPKRSAINVYVGRSLKAINAQMSMSHRTPRKIILDCDPGIDDAVAIFLAHGNPEVELLAI
TTWGNQTLKVTNRNARLVADVAGIVGVPVAAGCTKPLVRGVRNASQIHGETGMGNVSYPPEFKTKLDGRHAVQLIIDL
 IMSHEPKTITLVPTGGLTNIAMAVRLEPRIVDRVKEVVLMMGGGYHTGNASPVAEFNVFVDPEAAHIVFNESWNVTMVG
 LDLTHQALATPAVQKRVKEVGTKPAAFMLQILDFYTKVYEKERNTYATVHDPCAVAYVIDPTVMTTEQVPVDIELNGAL
 TTGMTVADFRYPRPKHCHTQVAVKLDKDFKFIACLVIDALKRIGDPQSAGGRETAPTNLIRRRNKDETNQDVSAAADRFR
 RDRFEKATLEERKAATTTMVNEYDDLVTDFYEYGIAGQNFHFAPRYAGETFFESLARHEYFLAARGGFMEGDHIVDV
 20 GCGVGGPARNMVRLTRCNVIGVNNNDYQISRARRHDALAGMSSKIDYVKTDFCNMSLADNTFDGAYAIEATCHAKDK
VKCYSEVFRVIKPGTCFVLYEIAICMTDKYNPNDEYHRTIKHRIELGDGLPEMETCKQVIEYMKQAGFVVEEAIDVISQF
ESSPIKSIPWYQPLVGDYSSLQGLRSTPIGRILTNVMCRVLEFVRLAPKGYKATEILEEAAESLVGGQLGIFTPSFYIR
ARKPSKQASAVGNIESQWARAGHGLVSLSEQQLVSCDDKNGCNGGLMLQAFEWLLRHMYGIVFTEKSYPTSGN
 GDVAECLNSSLVPGAQIDGYVMIPSNETVMAAWLAENGPAAIIVDASSFMSYQSGVLTSCAGDALNHGVLLVGYNK
 TGGVPYVWIKNSWGEDWGEKGYVRVVMGLNACLLSEYPVSAHVPRSLTPGPGTESEERAPKRVTVQMMCTDMY
 25 CREGCKKSLLTANVCYKNGGGGSSMTKCGPQKVLMLCSYSNPHCFGPGLCLETDPGKCAPYFLGSIMNTCQYT

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido de fusión que comprende un polipéptido de nucleósido hidrolasa no específico (NH) de Leishmania, un polipéptido de esterol 24-c-metiltransferasa (SMT) de Leishmania y una parte inmunogénica de un polipéptido de cisteína polipeptidasa B (CpB) de Leishmania, en donde la parte inmunogénica del polipéptido CpB comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 31 o una secuencia que tiene al menos una identidad del 90% con la SEQ ID NO: 31.
2. El polipéptido de fusión de la reivindicación 1, en donde el polipéptido NH es de *L. infantum*, *L. donovani*, *L. major*, *L. mexicana* o *L. braziliensis*.
3. El polipéptido de fusión de la reivindicación 1 o 2, en donde el polipéptido SMT o el polipéptido CpB es de *L. infantum*, *L. donovani*, *L. major*, *L. mexicana* o *L. braziliensis*.
4. El polipéptido de fusión de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde:
el polipéptido NH comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 35 o una secuencia que tiene al menos una identidad del 90% con la SEQ ID NO: 35; y/o
el polipéptido SMT comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 36 o una secuencia que tiene al menos una identidad del 90% con la SEQ ID NO: 36.
5. El polipéptido de fusión de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el polipéptido de fusión comprende un polipéptido NH de Leishmania, un polipéptido SMT de Leishmania, un polipéptido H2BN de Leishmania y un polipéptido CpB.
6. El polipéptido de fusión de la reivindicación 5, en donde el polipéptido H2BN es de *L. infantum*, *L. donovani*, *L. major*, *L. mexicana* o *L. braziliensis*.
7. El polipéptido de fusión de la reivindicación 6, en donde el polipéptido H2BN comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 32 o una secuencia que tiene al menos una identidad del 90% con la SEQ ID NO: 32.
8. El polipéptido de fusión de la reivindicación 1, en donde el polipéptido de fusión comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 o 44 o una secuencia que tiene al menos un 90% de identidad con la SEQ ID NO: 2 o 44.
9. Un polinucleótido aislado que codifica el polipéptido de fusión de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8.
10. Una composición que comprende el polipéptido de fusión de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8 y un inmunoestimulante.
11. La composición de la reivindicación 10, en donde el inmunoestimulante se selecciona del grupo que consiste en un oligonucleótido que contiene CpG, un lípido A sintético, MPLTM, 3D-MPLTM, saponinas, miméticos de saponinas, AGP, agonistas del receptor semejante a Toll o una combinación de los mismos.
12. La composición de la reivindicación 10 u 11, en la que el inmunoestimulante tiene la fórmula:



en donde R¹, R³, R⁵ y R⁶ son alquilo C₁₁-C₂₀; y R² y R⁴ son alquilo C₉-C₂₀.

13. Una composición según una cualquiera de las reivindicaciones 10-12 para uso en un método para estimular una respuesta inmune frente a Leishmania en un mamífero.
14. Un método para detectar la infección por Leishmania en una muestra biológica, que comprende: (a) poner en contacto una muestra biológica con el polipéptido de fusión de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8; y (b) detectar en la muestra biológica la presencia de anticuerpos que se unen al polipéptido, detectando así la infección por

Leishmania en una muestra biológica.

- 5 15. Un kit de diagnóstico para detectar la infección por Leishmania en una muestra biológica que comprende (i) un polipéptido de fusión de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8; y (ii) un reactivo de detección, en donde opcionalmente el kit comprende un formato de ensayo seleccionado del grupo que consiste en un ensayo de tira de ensayo de flujo lateral, un ensayo de plataforma de doble vía y un ensayo ELISA.

Figura 1

Células T CD4 multifuncionales con recuerdo de 821S

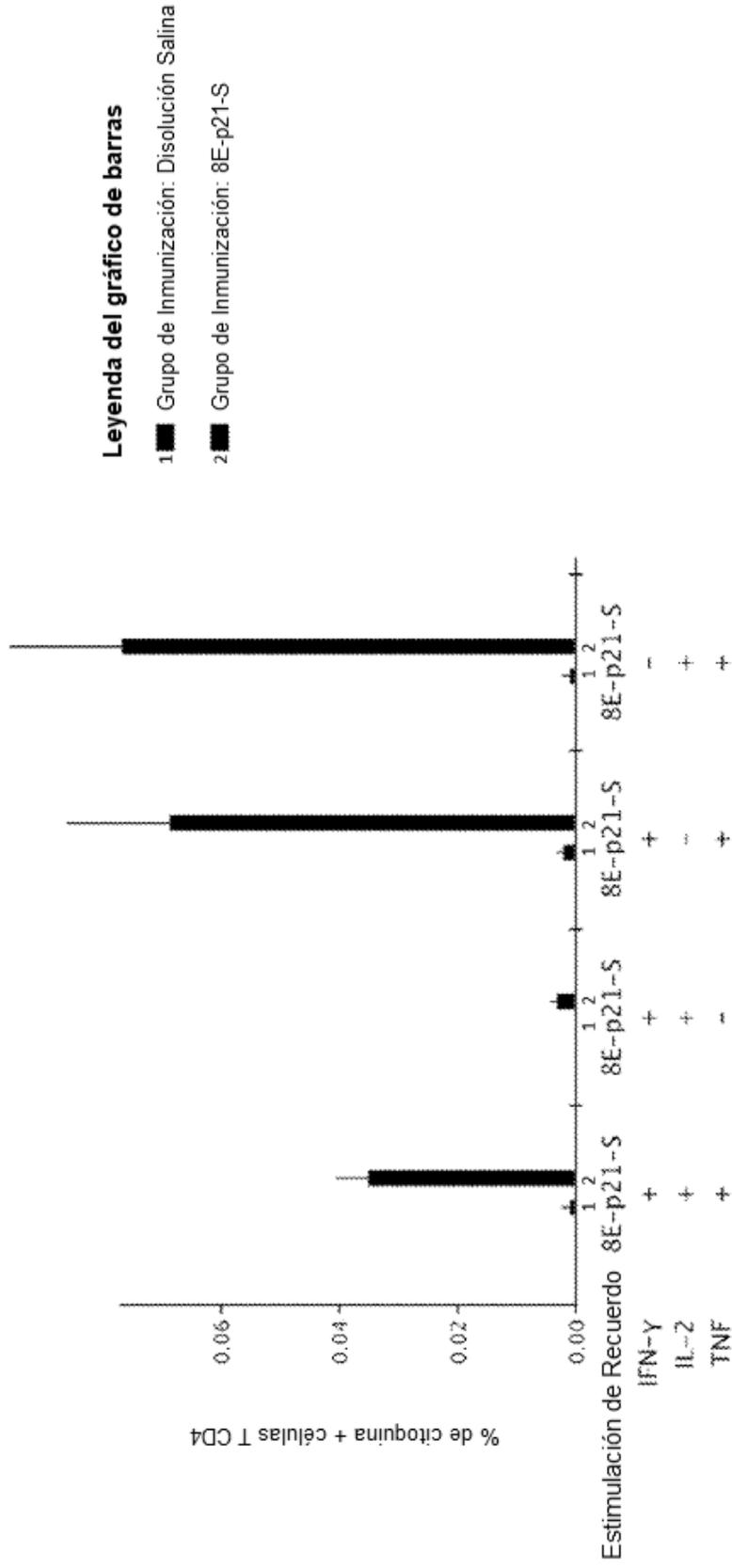


Figura 2 Respuestas de recuerdo de polipéptido de Leish para IFN- γ

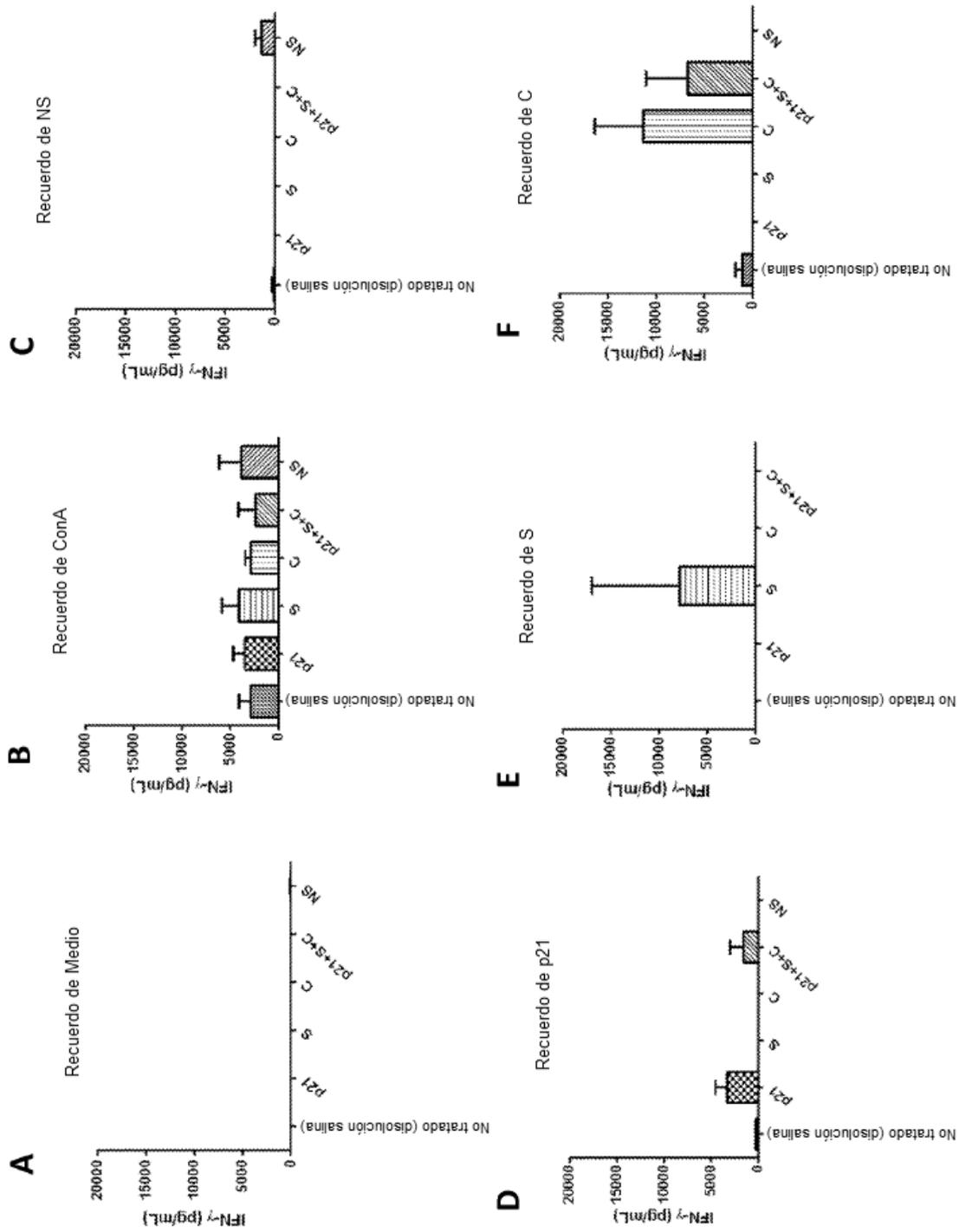


Figura 3

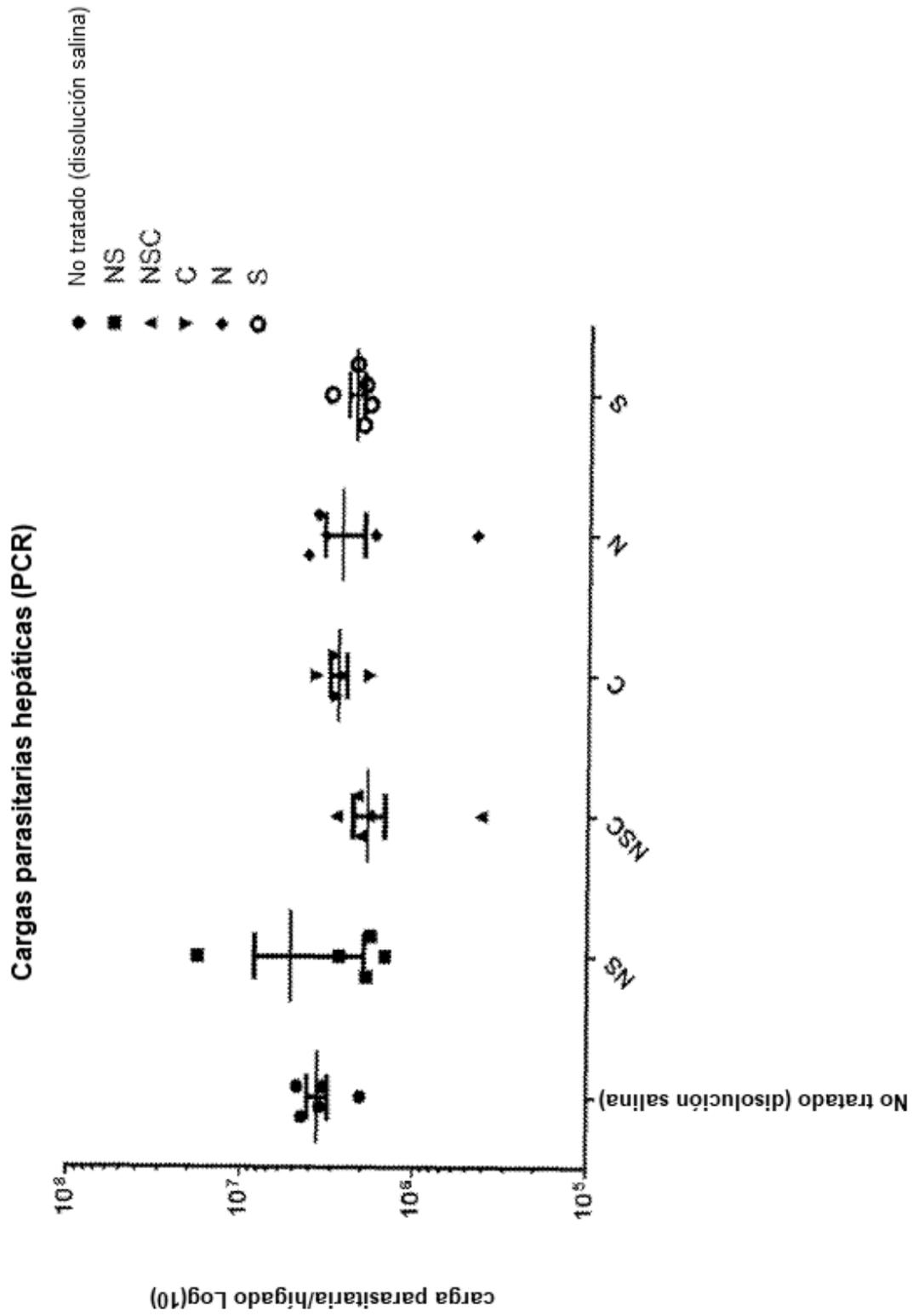


Figura 4 Respuestas de recuerdo de polipéptido de Leish para IFN- γ

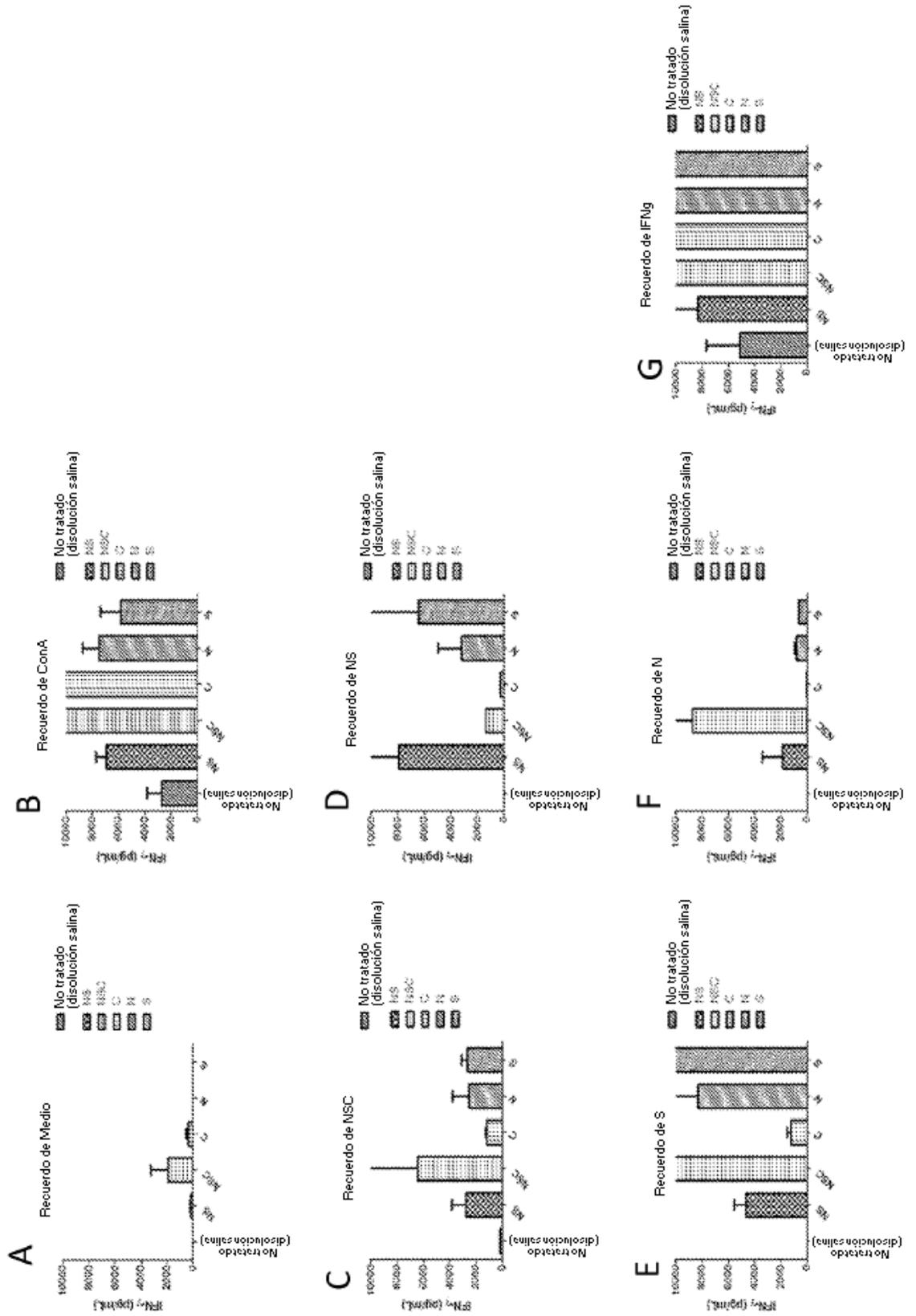


Figura 5

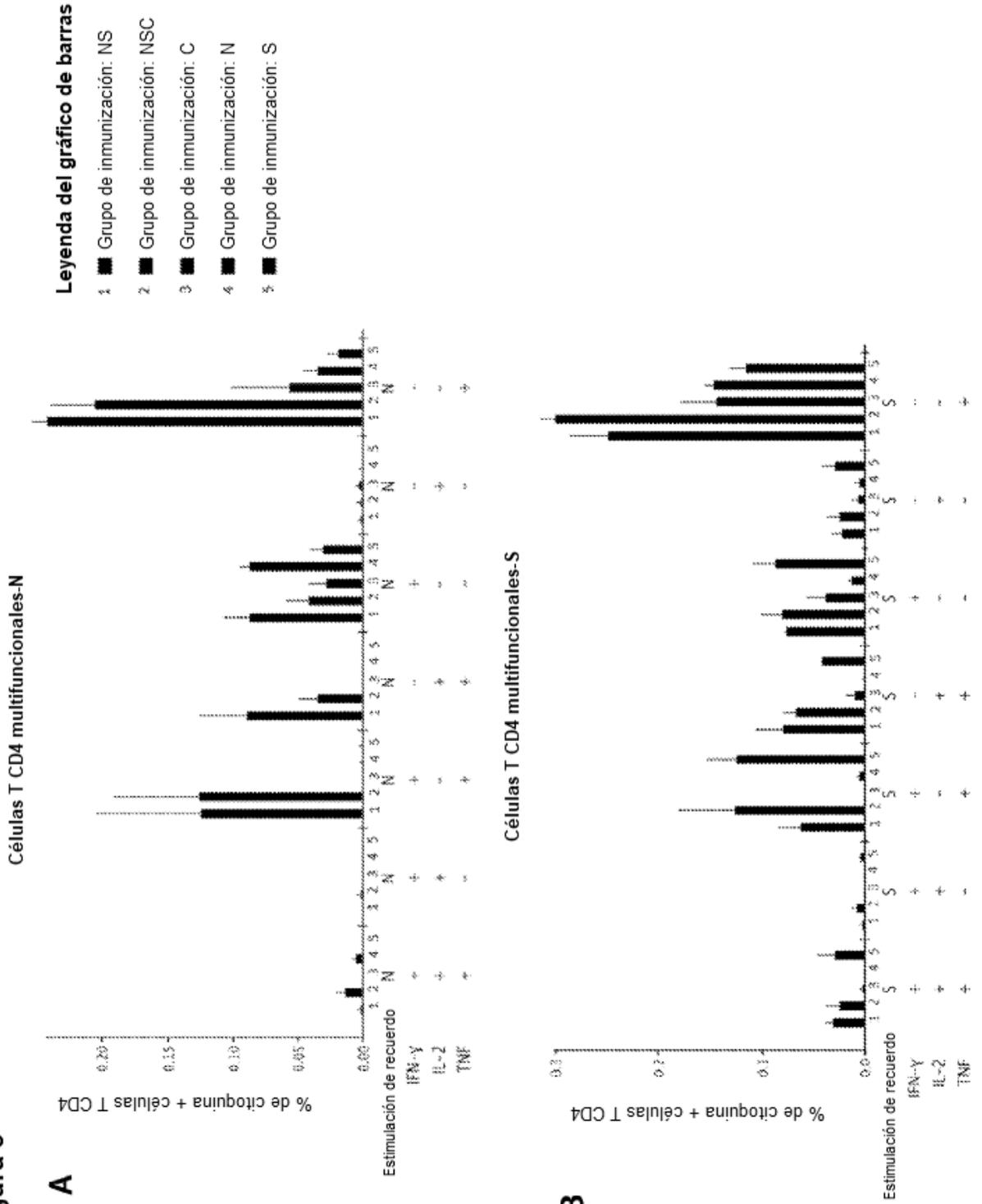
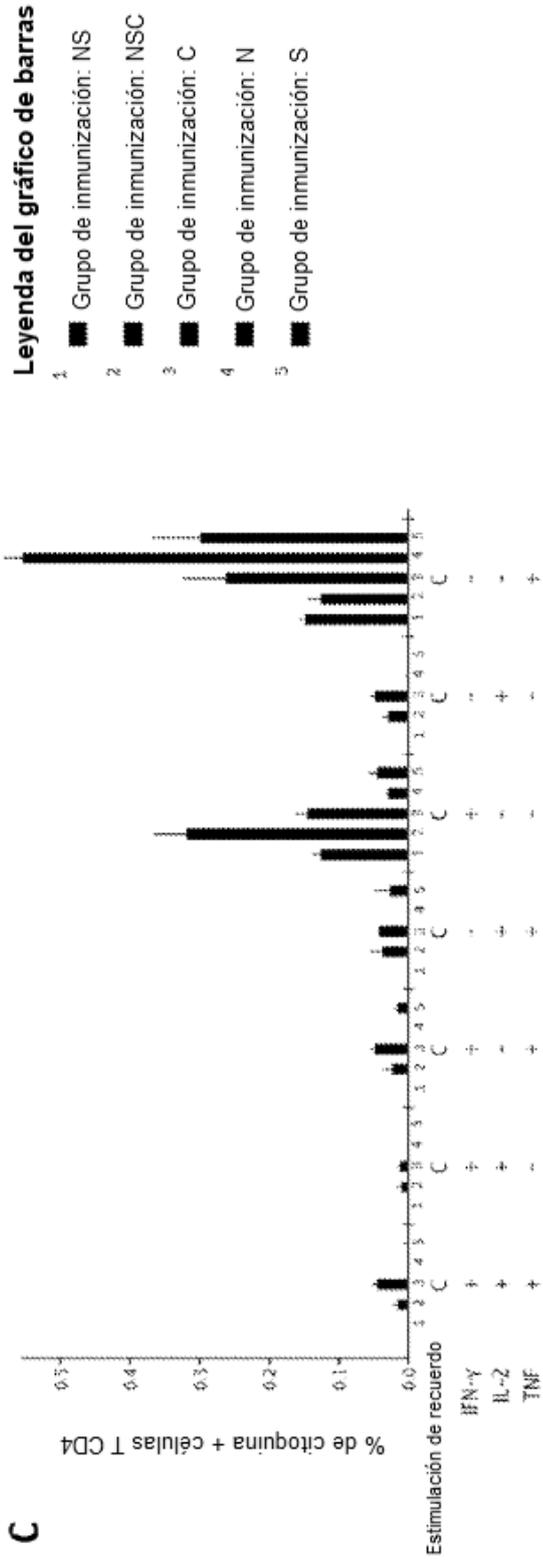


Figura 5

Células T CD4 multifuncionales-C



Células T CD4 multifuncionales-NSC

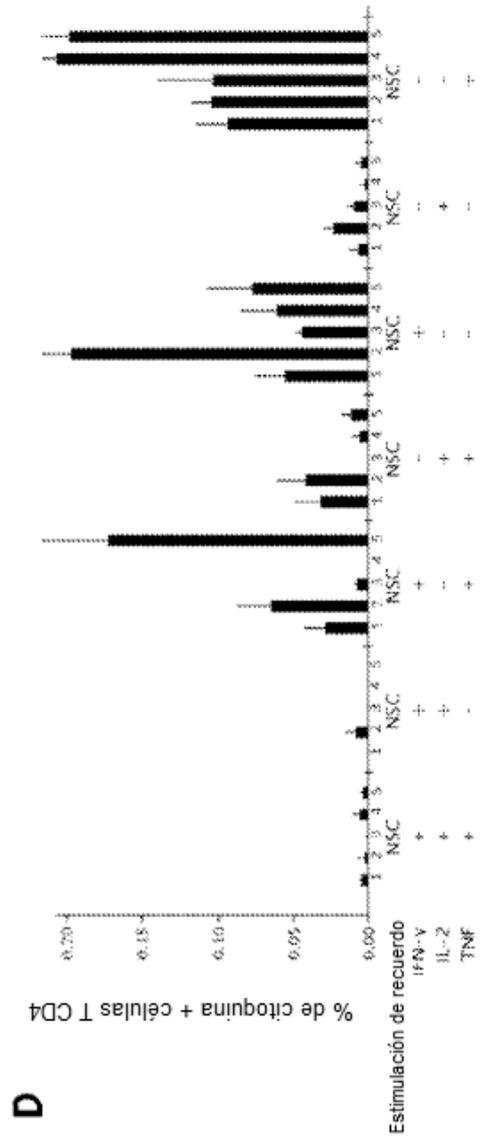


Figura 6

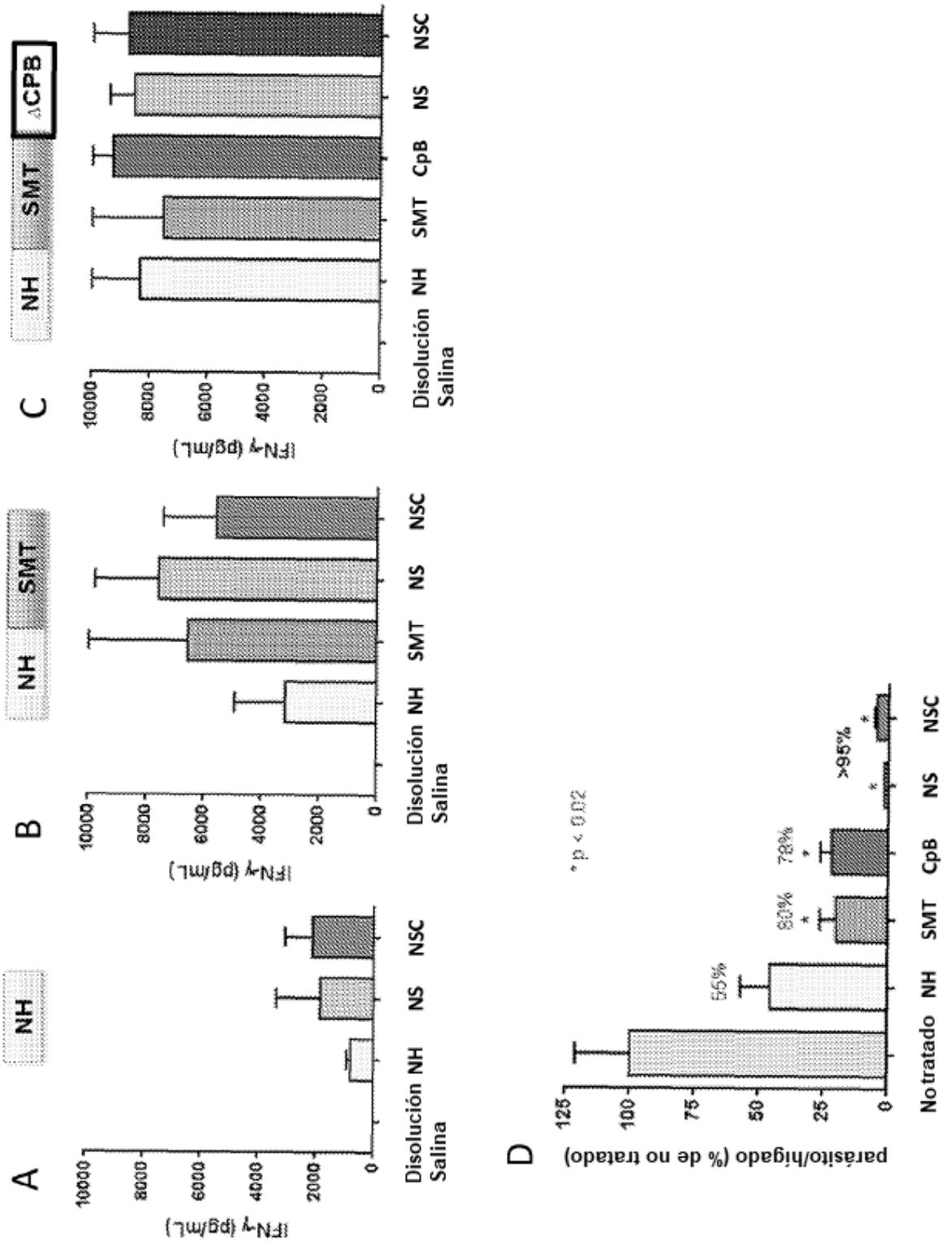


Figura 7

