



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 345 824**

(51) Int. Cl.:
C07K 14/44 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **04805492 .8**

(96) Fecha de presentación : **19.11.2004**

(97) Número de publicación de la solicitud: **1685156**

(97) Fecha de publicación de la solicitud: **02.08.2006**

(54) Título: **Nuevos medios para prevenir la *leishmaniasis*.**

(30) Prioridad: **19.11.2003 FR 03 13555**
25.06.2004 FR 04 07010

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
04.10.2010

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
04.10.2010

(73) Titular/es: **Institut de Recherche pour le
Développement (IRD)**
213, rue La Fayette
75480 Paris Cédex 10, FR

(72) Inventor/es: **Lemesre, Jean-Loup;**
Cavaleyra, Mireille;
Sereno, Denis y
Holzmuller, Philippe

(74) Agente: **Ruo, Alessandro**

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

Nuevos medios para prevenir la *leishmaniasis*.

La invención tiene por objeto nuevos medios para prevenir la *leishmaniasis* en animales y en el hombre.

Se dirige en particular a moléculas de ácidos nucleicos que codifican factores de virulencia o patogenicidad en *Leishmania* y a su uso para producir dichos factores con el fin de producir composiciones de vacunas contra las *leishmaniasis*.

Las *leishmaniasis* representan una de las 6 principales enfermedades parasitarias y, por este motivo, la Organización Mundial de la Salud (OMS) las considera como prioritarias. Las leishmanias existen en la forma promastigoto extracelular en el interior del tubo digestivo del insecto vector (el flebotoma), y en la forma amastigote intracelular en el mamífero huésped. Parece que varias moléculas, entre ellas los lipofosfogluanos (LPG) o una metaloproteasa llamada gp63, tienen una función importante en el poder infeccioso y la patogenicidad del parásito. Más recientemente, una familia de glicoproteínas llamadas antígenos de superficie de promastigotos, PSA (por sus siglas en inglés "*Promastigote Surface Antigens*"), ha despertado un nuevo interés. Estos PSA se caracterizan por la presencia de patrones repetidos ricos en leucina que pueden intervenir en las interacciones de tipo proteína/proteína y confieren una inmunidad protectora mediada por células de tipo Th 1 en el ratón. En organismos tales como bacterias o plantas, parece que los PSA estaban implicados en funciones como la adhesión celular, la resistencia a los patógenos y la transducción de señales.

Sin embargo, no se ha descrito ni sugerido ninguna función biológica en *Leishmania*.

Los autores de la invención han podido estudiar esta función gracias a la técnica que tienen para cultivar los promastigotos y amastigotes de *Leishmania* en condiciones exentas de suero y axénicas, en un medio completamente definido, es decir, cuyos constituyentes están todos identificados, y que es objeto de la patente FR 9305779 del 13 de mayo de 1993 a nombre de IRD (ex. ORSTOM). El dominio de este procedimiento les permite disponer de formas parasitarias desprovistas de contaminantes aportados hasta entonces por los medios de cultivo, y de determinantes antigénicos en forma altamente purificada.

En dicha patente FR de la solicitante, ya se ha descrito el aislamiento y la identificación de un PSA excretado/secretado (antígeno de excreción/secreción o AES de forma abreviada) de 38 kDa y de 45 kDa en el líquido sobrenadante del cultivo de *L. amazoniensis*.

Los autores de la invención ahora han aislado y clonado el ADNc que codifica esta proteína y han evaluado su función en la biología del parásito poniendo a punto una estrategia de transgénesis adicional. Estos trabajos han permitido poner de manifiesto la implicación de este PSA como factor de virulencia y/o de patogenicidad y elaborar construcciones que permiten sobreexpresar el gen de *Leishmania* que codifica este PSA, lo que permite desarrollar medios para obtener composiciones de vacunas contra las *leishmaniasis*.

Por lo tanto, la invención tiene como objetivo proporcionar secuencias de ácidos nucleicos capaces de codificar PSA de formas promastigotos y de formas amastigotes de *Leishmania*, que constituyen factores de virulencia y/o de patogenicidad.

Se dirige más en particular, a proporcionar vectores de sobreexpresión de estos PSA, así como a parásitos genéticamente modificados.

La invención se refiere además a los líquidos sobrenadantes de los medios de cultivo de los PSA obtenidos, así como a los PSA aislados, purificados, y al aprovechamiento de sus propiedades para elaborar composiciones de vacunas contra las *leishmaniasis*.

Las secuencias de ácidos nucleicos de la invención corresponden a los ácidos nucleicos aislados capaces de codificar un PSA de formas promastigotos y de formas amastigotes de *Leishmania*, respondiendo dichos ácidos nucleicos a una de las secuencias ID SEC N° 1, ID SEC N° 2, ID SEC N° 4, ID SEC N° 5 e ID SEC N° 11 y que codifican los PSA de las secuencias ID SEC N° 6, ID SEC N° 7, ID SEC N° 9, ID SEC N° 10 e ID SEC N° 12, respectivamente.

Las secuencias de ácidos nucleicos de la invención son más en especial, secuencias de clones de ADNc que pertenecen a una familia que responde a las características ilustradas en la figura 2 y que comprenden en particular, un sitio de restricción *SalI* y 2 sitios de restricción *HindIII*, con un codón de parada situado secuencia abajo del primer sitio *HindIII*.

La invención se dirige en particular a los clones de ADNc de dicha familia que constan de un sitio de restricción *EcoRV* y/o *PstI* entre los dos sitios *SalI* y *HindIII*, o de un lado y otro del sitio *SalI*.

La invención se dirige también a proteínas inmunógenas aisladas, caracterizadas porque presentan una secuencia que es codificada por los ácidos nucleicos definidos anteriormente. Se refiere en particular a las proteínas que responden a las secuencias ID SEC N° 6, ID SEC N° 7, ID SEC N° 9, ID SEC N° 10 o ID SEC N° 12.

ES 2 345 824 T3

Estas proteínas pertenecen a dicha familia de antígenos de superficie de promastigotos (PSA de forma abreviada) y tienen regiones características ilustradas en las figuras 3A y 3B. Estas proteínas pueden modificarse después de traducción mediante N-glicosilaciones, fosforilaciones y el anclaje de un GPI. Tienen un péptido señal hidrófobo en posición carboxi terminal.

Mediante la clonación direccional de las secuencias definidas anteriormente en un vector de expresión, los autores de la invención han obtenido construcciones que permiten expresarlas en posición homosentido.

La invención se dirige por lo tanto, a construcciones de ácidos nucleicos, caracterizadas porque constan de ácidos nucleicos aislados en posición homosentido, capaces de codificar una proteína inmunógena de formas promastigotos y de formas amastigotes de *Leishmania*, respondiendo dichas proteínas a una de las secuencias ID SEC N° 6, ID SEC N° 7, ID SEC N° 9, ID SEC N° 10 e ID SEC N° 12.

La invención se dirige en particular, a construcciones de ácidos nucleicos que constan de secuencias de clones de ADNc que pertenecen a una familia que responde a las características ilustradas en la figura 2, y que constan, en particular, de un sitio de restricción *SalI* y 2 sitios de restricción *HindIII*, con un codón de parada situado secuencia abajo del primer sitio *HindIII*.

Los clones de ADNc constan de un sitio de restricción *EcoRV* y/o *PstI* entre los dos sitios *SalI* y *HindIII*, o de un lado y otro del sitio *SalI*.

Las construcciones particularmente ventajosas comprenden como secuencias de ácidos nucleicos, una secuencia elegida de ID SEC N° 1, ID SEC N° 2, ID SEC N° 4, ID SEC N° 5 e ID SEC N° 11, codificando dichas secuencias respectivamente las proteínas de las secuencias ID SEC N° 6, ID SEC N° 7, ID SEC N° 9, ID SEC N° 10 e ID SEC N° 12.

Las construcciones preferidas constan de dichas secuencias de ácidos nucleicos en un plásmido de multiplicación rápida tal como pTex.

Se dirige igualmente a cepas de *Leishmania* transfectadas con dichas construcciones, que son las formas promastigotos o las formas amastigotes.

Las cepas transfectadas preferidas, teniendo en cuenta las aplicaciones de vacunas a las que se dirige, son las cepas de *L. infantum*.

De forma ventajosa, los PSA se producen en gran cantidad de forma constitutiva en los parásitos.

La invención se dirige también a un procedimiento de transfección de un parásito de *Leishmania*, caracterizado porque se introduce en el parásito de *Leishmania* un vector como se ha definido antes que consta de un marcador, se seleccionan los parásitos transfectados gracias a dicho marcador, se ponen en cultivo en medio axénico y exento de suero totalmente definido, y se recupera el líquido sobrenadante del cultivo que contiene las proteínas inmunógenas presentes en concentraciones del orden de 10 a 20 veces superiores a las producidas por la cepa madre de *Leishmania*.

La introducción del vector en el parásito se realiza, por ejemplo, por electroporación.

La inserción de estos ácidos nucleicos en los parásitos permite aumentar el poder infeccioso de estos últimos: su capacidad para sobrevivir en el macrófago infectado y de multiplicarse es hasta 5 veces mayor que la del parásito no transfectado con dichos ácidos nucleicos.

Dichos PSA se producen en gran cantidad en el líquido sobrenadante del medio de cultivo de los parásitos. La invención se dirige también, por lo tanto, a los líquidos sobrenadantes de los medios de cultivo de dichos parásitos genéticamente modificados, así como a los PSA aislados a partir de estos líquidos sobrenadantes y purificados.

La invención proporciona así, medios que tienen mucho interés por responder a la demanda industrial de disponer de cantidades importantes de proteínas que constituyen factores de virulencia/patogenicidad en los *Leishmanias*.

Gracias a su poder inmunógeno, estas proteínas permiten obtener, después de inmunización de animales de acuerdo con las técnicas clásicas, anticuerpos policlonales y producir anticuerpos monoclonales. La inmunización de ratones ha permitido así obtener anticuerpos anti-IgG2A, y la de perros los anticuerpos IgG2.

La invención se dirige por lo tanto también a dichos anticuerpos y al aprovechamiento de sus propiedades para elaborar a una escala exportable a la industria, composiciones de vacunas contras los *leishmanias* en el hombre o en animales.

Las aplicaciones de diagnóstico de estos anticuerpos también son parte de la invención.

ES 2 345 824 T3

Se darán otras características y ventajas de la invención en los siguientes ejemplos en los que se hará referencia a las figuras 1 a 8 que representan, respectivamente

la fig. 1 es el alineamiento en 3' de secuencias de nucleótidos de clones de ADNc según la invención;

la fig. 2 es un esquema resumen de las secuencias de nucleótidos de los clones de ADNc obtenidas después de selección inmunológica con anticuerpos monoclonales anti-AES de genotecas de expresión de formas promastigotos y de formas amastigotes de *L. amazonensis*. Los sitios de enzimas de restricción están indicados encima de cada secuencia;

la fig. 3A es la localización de diferentes regiones proteicas, caracterizadas por su composición particular de aminoácidos, presentes en la secuencia proteica deducida del ADNc del clon A3B, y la figura 3B es una representación esquemática de la secuencia proteica deducida del ADNc del clon A3B que codifica un PSA;

la fig. 4 son los análisis de transcritos por RT-PCR en las formas promastigotos (P) y amastigotes (A);

la fig. 5 es el nivel de producción de la proteína por transferencia Western, con ayuda de un anticuerpo anti-PSA;

la fig. 6 es el efecto de la sobreexpresión de un PSA de *L. amazonensis* en el poder infeccioso de los parásitos;

la fig. 7 son las secuencias de nucleótidos de ID SEC N° 1 a 5 y 11, respectivamente de los clones A3B, 2C1, 1A1, 2G1, W2, de promastigotos y amastigotes de *L. amazonensis* y IJ11 de promastigotos de *L. infantum*, y las correspondientes secuencias de aminoácidos codificadas ID SEC N° 6 a 10 y 12; y

la fig. 8 es el índice parasitario determinado en el transcurso de la infección *in vitro* de macrófagos caninos por una cepa salvaje o de clones seleccionados de promastigotos de *L. infantum* en diferentes tiempos de incubación.

1 - Caracterización molecular de los inmunógenos principales de AES de las formas promastigotos y amastigotes de *L. amazonensis*. (*Lma* abreviado)

Esta caracterización se ha llevado a cabo mediante selección de genotecas de expresión de ADNc de las formas promastigotos y formas amastigotes de *L. amazonensis* con ayuda de un anticuerpo monoclonal dirigido contra el inmunógeno principal de los AES.

- Caracterización de las genotecas de ADNc

Se han realizado dos genotecas de expresión de ADNc, respectivamente de las formas promastigotos y de las formas amastigotes de *L. amazonensis*. Las características de estas genotecas se presentan en la tabla I. Los parásitos de fase exponencial y estacionaria se han mezclado con el fin de tener acceso a diferentes transcritos que pueden ser expresados en el transcurso de diferentes etapas de su cultivo *in vitro*. Después se seleccionan 5×10^4 fagos por genoteca de forma inmunológica con anticuerpos monoclonales F5 diluidos hasta 1/500. La obtención de este anticuerpo es el objeto del ejemplo de la patente FR mencionada anteriormente.

TABLA I

Genoteca de ADNc Lma LES D4 + D7	Promastigotos	Amastigotes
Recogidos D4 + D7	$7,8 \cdot 10^9$	$7,8 \cdot 10^9$
Valoración después de empaquetamiento	350.000	500.000
Valoración después de amplificación	$8,32 \cdot 10^7$ ph/ μ l	$2,16 \cdot 10^8$ ph/ μ l
D4 + D7 = parásitos recogidos el 4º día, en fase exponencial, y el 7º día, en fase estacionaria de su crecimiento		

- Aislamiento y secuenciación de los clones reconocidos por el anticuerpo monoclonal F5

Se pusieron de manifiesto 13 clones positivos de la genoteca de promastigotos y 11 clones positivos de la genoteca de amastigotes. Todos estos clones se aislaron por selección secundaria y terciaria.

ES 2 345 824 T3

El ADN plasmídico del conjunto de los clones aislados se analizó después de diferentes digestiones enzimáticas y los ADNc que tenían insertos de mayor tamaño, por digestión *EcoRI/XhoI*, se retuvieron con el fin de eliminar los ADNc demasiado truncados en 5'. Como muestra la tabla II, los clones 1A1, 1B1, 2B3, 2C1, 2D1 y 2E1 de la genoteca de ADNc de promastigotos y los clones A3B, V4A, V5, W2 y W3 de la genoteca de amastigotes presentan los insertos de mayor tamaño.

El análisis de estos clones, determinando la presencia o no de los dos sitios de enzimas de restricción (*HindIII* y *Sall*) seleccionados previamente, ha mostrado que presentan una alta homología de sus secuencias de nucleótidos.

Por digestión doble, *HindIII/Sall*, se pusieron de manifiesto 3 clases de clones diferentes con un fragmento *HindIII/Sall* de un tamaño, respectivamente, inferior a 400 pb (clon 2G1), 500 pb (clones de tipo 2C1 y A3B) o de 600 pb (clones de tipo 1A1 o W2). Por lo tanto, 5 tipos de clones elegidos según las características particulares de su ADN (el tamaño del inserto y la localización de determinados sitios de enzimas de restricción) se representan en negrita en la tabla II.

TABLA II

Genoteca de ADN de promastigotos de Lma

Clones de ADNc	1A1	1B1	1C1	1D5	1F1	2A2	2B3	2C1	2D1	2E1	2F1	2G1	B3A
Tamaño de los insertos <i>EcoRI/XhoI</i> (kb)	2,5	2,5	2-2,2	0,5	2	2(>)	2,5	2,4	2,4	2,4	2	1,7-2	1,7
Mapa de restricción													
<i>Sall</i>	S	S	S	N	N	N	S	S	S	S	S	N	N
<i>HindIII</i>	1,1	1,1	1,1	/	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1
<i>HindIII/Sall</i> (pb)	600	600	500	N	N	N	600	500	500	500	N	<400	N
Expresión de proteína recombinante													
k(Da)	45	/	40	/	/	/	/	42,5	/	/	39	?	18

Genoteca de ADNc de amastigotes de Lma

Clones de ADNc	A3B	V1B	V2D	V3A	V4A	V5	W1A	W1C	W2	W3	W5
<i>EcoRI/XhoI</i>	2,3	2-2,2	2,2	?	2,3	2,3	2	2	2,3	2,2	1,7
Mapa de restricción											
<i>Sall</i>	S	S	S	N	S	S	N	N	S	S	N
<i>HindIII</i>	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1
<i>HindIII/Sall</i> (pb)	505	500	500	N	500	500	N	N	600	500<	N
Expresión de proteína recombinante											
(kDa)	42,5	/	36,5	/	36,5	43	/	/	45	/	/
S = Si, para sitio presente; N = No, para sitio ausente; / = realizado; ? = resultado no obtenido.											

ES 2 345 824 T3

La tabla II da también los resultados relativos a la capacidad de los clones para expresar una proteína recombinante. Se ha usado el IPTG como agente de inducción. Las muestras se han analizado por SDS-PAGE e inmunotransferencia en presencia del anticuerpo anti-AES de las formas promastigotos y/o de las formas amastigotes, previamente absorbidas en presencia de listado de *E. coli*. Se obtienen resultados equivalentes. Para los clones de interés se observa la expresión de diferentes proteínas recombinantes que van desde 42,5 kDa de peso molecular aparente (clon 2C1) hasta 43 kDa (clon A3B) o 45 kDa (1A1 y W2).

En el documento "Listas de secuencias" se describen los resultados de la secuenciación:

- de los 3 tipos de clones siguientes de la genoteca de promastigoto:

el clon de tipo 1A1 (ID SEC N° 3), que expresa una proteína de secuencia ID SEC N° 8 de mayor peso molecular. Los clones de tipo 1B1 y 2B3 son del mismo tipo que este clon;

el clon 2C1 (ID SEC N° 2), que expresa una proteína recombinante de peso molecular inferior a la del clon 1A1, que presenta una secuencia ID SEC N° 7.

el clon 2G1 (ID SEC N° 4), que tiene la particularidad de tener un fragmento pequeño *HindIII/SalI*, que expresa una proteína recombinante de peso molecular inferior al del clon 1A1, que presenta una secuencia ID SEC N° 9.

- de los 2 clones siguientes de la genoteca de amastigote:

los clones de tipo A3B (ID SEC N° 1), que expresan una proteína recombinante de aproximadamente 43 kDa, de secuencia ID SEC N° 6 y que tiene un fragmento *HindIII/SalI* de 500 pb, apareciendo idéntico el clon V5. Los clones V2D y V4A se consideran clones truncados del mismo tipo;

el clon W2 (ID SEC N° 5), que expresa una proteína recombinante de 45 kDa, de secuencia ID SEC N° 10 y que presenta un fragmento *HindIII/SalI* de 600 pb.

- Estudio de las 5 secuencias de ADNc

En la figura 1 se representa el alineamiento de las 5 secuencias de ADNc obtenidas, en las que las diferencias entre estos clones se deben solamente a la presencia de una secuencia truncada en 5' y/o la inserción de secuencias de aproximadamente 72 nucleótidos del lado 5'. Los clones presentan, por lo tanto, una (clones 2C1 y A3B) o tres (clones 1A1 y W2) inserciones. Excepto estas zonas de inserciones, los clones presentan homologías del orden de 99%, y se puede considerar que pertenecen a una familia de ADNc. Solo el clon A3B tiene el codón ATG de inicio, y los otros clones están truncados en 5'. Sin embargo, el ADNc de A3B no tiene la secuencia de 39 nt codificante del "líder de corte y empalme" encontrado en 5' en todos los ARNm de *Leishmania*.

Los ADNc de los clones A3B y 2C1 presentan una homología casi total y por lo tanto se consideran idénticos, correspondiendo el ADN del clon 2C1 a una parte truncada en 5' del ADNc del clon A3B.

El clon A3B, representativo de esta familia ha sido objeto de una secuenciación entera en los dos sentidos.

En la figura 2 se representan los sitios de las enzimas de restricción para cada uno de estos clones.

Las secuencias ID SEC N° 1 a 5, corresponden respectivamente a las de los ADNc de A3B, 2C1, 1A1, 2G1, W2.

- Análisis de diferentes secuencias proteicas deducidas

La traducción de las diferentes secuencias de ADNc en secuencias proteicas se ha realizado eligiendo el marco de lectura correspondiente al sugerido por la posición del codón de inicio en el plásmido pB-SK, cuya transcripción está bajo el control del promotor del gen *lacZ* sometido a inducción por IPTG.

La proteína A3B representa las regiones ilustradas en las figuras 3A y 3B. En el extremo NH₂ se identifica un péptido hidrófobo, que puede ser escindido, que se describe en la bibliografía como un péptido señal de la vía de secreción. Se encuentra después el dominio repetido rico en leucina, con un número de 6 repeticiones para el clon A3B. A una decena de aminoácidos del final de este dominio, se encuentra una región rica en prolina, treonina y serina, llamada en lo sucesivo región poli P/T/S. A esta región le sigue una región rica en cisteínas que puede estar implicada en puentes disulfuro. Finalmente, la secuencia proteica termina con un péptido señal hidrófobo.

Los ADNc de los clones A3B y 2C1 presentan una homología casi total y por lo tanto se consideran idénticos, correspondiendo el ADNc del clon 2C1 a una parte truncada en 5' del ADNc del clon A3B.

El clon A3B, representativo de esta familia, es objeto de una secuenciación entera en los dos sentidos.

En la figura 2 se representan los sitios de las enzimas de restricción para cada uno de estos clones, Nt = nucleótidos; ATG = codón de inicio, TAG = codón de parda.

El análisis en la base de datos PROSITE muestra que la proteína A3B tiene un sitio de N-glicosilación localizado al final de cada dominio repetido rico en leucina, y 12 sitios potenciales de fosforilaciones.

El análisis de la localización de esta proteína en el servidor PSORT predice una localización citoplasmática en un 92%, lo cual indica que la proteína es soluble. Esta proteína está probablemente anclada en la superficie por un Glicosil-Fosfatidil-Inositol o GPI. Por lo tanto, el péptido señal hidrófobo puede escindirse y permitir el anclaje del GPI a nivel de la asparagina (D).

El peso molecular teórico de la proteína del clon A3B difiere en aproximadamente 2,9 kDa con el de las proteínas 1A1 y W2, lo cual está de acuerdo con la diferencia de 2,5 kDa observada entre las proteínas recombinantes correspondientes. Esta diferencia se debe a la presencia de un número variable de repeticiones ricas en leucinas o LRR, presentando cada una, una composición particular de aminoácidos.

Los pesos moleculares aparentes y teóricos de los 4 tipos de PSA de la invención se reúnen en la siguiente tabla III.

TABLA III

Tipo de PSA	PM de la proteína recombinante	PM teórico (no truncado)	PM sin péptido señal (3,2 kDa)
4 LRR (2G1)	/	33,5 kDa	30,3 kDa
6 LRR (A3B)	42,5 kDa	38,5 kDa	35,3 kDa
7 LRR (1A1 y W2)	45 kDa	41,4 kDa	38,2 kDa

2 - Obtención de parásitos genéticamente modificados

La clonación direccional del gen LaPSA 38s en el vector de expresión pTex ha permitido obtener una construcción capaz de expresar el gen PSA en posición homosentido. Después, el plásmido pTex-LaPSA 38s en orientación homosentido y el vector pTex vacío se han electroporado en la cepa salvaje de *Leishmania infantum* Mon1 Clon 1, y después los parásitos se han seleccionado mediante geneticina.

El estudio se ha realizado en parásitos de la especie *L. infantum* salvajes (Sal), en los transfectados por pTex vacío (pTex) y los transfectados por pTex que contiene la secuencia de nucleótidos de interés (homosentido).

Caracterización molecular

El análisis del ADN total por transferencia Southern muestra que la construcción homosentido es estable y se ha amplificado en la cepa transformada. Los resultados se ilustran en la figura 4, que da los análisis de los transcritos por RT-PCR en las dos formas, promastigotos (P) y amastigotes (A). La figura 5 da el nivel de producción de la proteína por transferencia Western, con ayuda de un anticuerpo anti-PSA (figura 5A: proteínas constitutivas; figura 5B: proteínas excretadas/secretadas).

Caracterización fenotípica de los mutantes

La comparación de las cinéticas de crecimiento entre Ldi Salvaje, Ldi pTex y Ldi Homosentido, muestra que la sobreexpresión de LaPSA 38s no interfiere con el crecimiento de los parásitos. Sólo se observa una fase de latencia más larga para las cepas transformadas en relación con la cepa salvaje.

Se ha estudiado también la sensibilidad a la lisis por el complemento humano. Recientemente, se ha demostrado que el PSA de *L. amazoniensis* tenía la propiedad de inhibir la acción del complemento *in vitro*. Los promastigotos "homosentido" son más sensibles al complemento. Por lo tanto, el exceso de PSA en la superficie de los parásitos puede conllevar una escisión así como una formación de complejos más importantes generando una lisis aumentada.

Estudio del poder infeccioso de los parásitos

Para estudiar el efecto de la sobreexpresión de LaPSA 38s en el poder infeccioso de los parásitos, la primera aproximación ha consistido en poner en contacto los promastigotos de cepas transformadas con macrófagos de perro, que es el reservorio doméstico natural de la *leishmaniosis* visceral.

Las figuras 6A y 6B dan los resultados obtenidos, respectivamente, 2 h después del contacto con los promastigotos y 48 h después del contacto con los amastigotes en estas figuras, el índice parasitario correspondiente al % de macrófagos infectados por la cepa Homosentido x el número de parásitos por macrófago/% de macrófagos infectados por la cepa testigo (pTex) x el número de parásitos por macrófago.

Los promastigotos que sobreexpresan LaPSA 38s, presentan un poder infeccioso 2 veces más importante frente a los macrófagos de perro. Además, después de fagocitosis, los amastigotes expresan el transgén que tiene una capacidad de sobrevivir y multiplicarse en la vacuola parasitófora significativamente superior (2,5 a 5 veces) a la del testigo transfectado por el vector vacío.

2 - Caracterización molecular de los AES de promastigoto de L. infantum

La secuencia de nucleótidos del clon IJ11 de promastigotos de *L. infantum* se da en la figura 7 (ID SEC N° 11) así como la secuencia correspondiente de aminoácidos (ID SEC N° 12).

En la figura 8, se representa el índice parasitario determinado en el curso de la infección *in vitro* de macrófagos caninos por la cepa salvaje o los diferentes clones seleccionados de formas promastigotos de *L. infantum* (MHON/MA/67/ITMAP-263, clon 2) en diferentes tiempos de incubación. El examen de estos resultados muestra una unión de parásitos a los macrófagos después de 30 min, una penetración de parásitos después de 2 horas y la supervivencia y multiplicación de los amastigotes intracelulares a las 48 horas.

Referencias citadas en la descripción

Esta lista de referencias citadas por el solicitante es sólo para la comodidad del lector. Esto no forma parte del documento de Patente Europea. Aunque se ha tenido cuidado al recopilar las referencias, no pueden excluirse errores u omisiones y la EPO no asume ningún tipo de responsabilidad a este aspecto.

Documentos de patente en la descripción

- FR 9305779 [0005]

REIVINDICACIONES

1. Construcciones de ácidos nucleicos, **caracterizadas** porque constan de ácidos nucleicos aislados en posición homosenrido, capaces de codificar una proteína inmunógena de formas promastigotos o de formas amastigotes de *Leishmania*, respondiendo dichos ácidos nucleicos a una de las secuencias ID SEC N° 1, ID SEC N° 2, ID SEC N° 4, ID SEC N° 5 e ID SEC N° 11, comprendiendo dichas secuencias un sitio de restricción *EcoRV* entre los dos sitios *SalI* y *HindIII*, o a un lado y otro del sitio *SalI*.

2. Construcciones según la reivindicación 1, **caracterizadas** porque dichas secuencias de ácidos nucleicos se clonan en posición homosenrido en un plásmido, tal como pTex.

3. Construcciones según la reivindicación 1 ó 2, **caracterizadas** porque codifican una proteína inmunógena de formas promastigotos o de formas amastigotes de *Leishmania*, respondiendo estas proteínas a una de las secuencias ID SEC N° 6, ID SEC N° 7, SEQ ID N°9, ID SEC N° 10 e ID SEC N° 12.

4. Proteínas inmunógenas aisladas, **caracterizadas** porque presentan una secuencia elegida entre ID SEC N° 6, ID SEC N° 7, ID SEC N° 9, ID SEC N° 10 o ID SEC N° 12.

5. Cepas de *Leishmania* genéticamente modificadas, **caracterizadas** porque corresponden a formas amastigotes o promastigotos de *Leishmania* transfectadas con una construcción según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.

6. Cepas según la reivindicación 5, **caracterizadas** porque se trata de cepas de *L. infantum*.

7. Procedimiento de transfección de un parásito de *Leishmania*, **caracterizado** porque se introduce en el parásito de *Leishmania* una construcción según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que consta de un marcador, se seleccionan los parásitos transfectados gracias a dicho marcador, se ponen en cultivo en medio axénico y exento de suero totalmente definido, y se recupera el líquido sobrenadante del cultivo que contiene las proteínas inmunógenas presentes en concentraciones del orden de 10 a 20 veces superiores a la producida por la cepa madre de *Leishmania*.

[illegible]

FIGURA 1

Alineamiento de las diferentes secuencias de ADNc obtenidas

A3B	GTGCACGFAAGGACATGTATATATGTATGTATGTATGAGTATGTATATGTACGGTATATATAGGAATTGTGT
2C1	GTGCACTAAGGACATGTATATATGTATGTATGTATGAGTATGTATATATGICCGGTATATATAGGAATTGTGT
1A1	GTGCACTAAGGACATGTATATATGTATGTATGTATGAGTATGTATATATGACGGTATATATAGGAATTGTGT
2G1	GTGCACCTAAGGACATGTATATATGTATGTATGTATGAGTATGTATATATGACGGTATATATAGGAATTGTGT
W2	GTGCACGTAAGGACATGTATATATGTATGTATGTATGAGTATGTATATATGACGGTATATATAGGAATTGTGT
A3B	ATGTTGAGGTGTATGCAATGCGTGCGTATAATTAGTGTGTGCGAGCACGGGTGTGCGCCACGGTCTGCTGCCCGCTCC
2C1	ATGTTGAGGTGTATGCAATGCGTGCGTATAATTAGTGTGTGCGAGCACGGGTGTGCGCCACGGTCTGCTGCCCGCTCC
1A1	ATGTTGAGGTGTATGCAATGCGTGCGTATAATTAGTGTGTGCGAGCACGGGTGTGCGCCACGGTCTGCTGCCCGCTCC
2G1	ATGTTGAGGTGTATGCAATGCGTGCGTATAATTAGTGTGTGCGAGCACGGGTGTGCGCCACGGTCTGCTGCCCGCTCC
W2	ATGTTGAGGTGTATGCAATGCGTGCGTATAATTAGTGTGTGCGAGCACGGGTGTGCGCCACGGTCTGCTGCCCGCTCC
A3B	GCTGTGCGGTGTCACTGCTGTGGGCGCGGTGGCGGGTGGCGCGGGTGTGCGCGTGGCGCGCGCGCGCGCGCGCTCTCTGTG
2C1	GCTGTGCGGTGTCACTGCTGTGGGCGCGGTGGCGGGTGGCGCGGGTGTGCGCGTGGCGCGCGCGCGCGCGCGCTCTCTGTG
1A1	GCTGTGCGGTGTCACTGCTGTGGGCGCGGTGGCGGGTGGCGCGGGTGTGCGCGTGGCGCGCGCGCGCGCGCGCTCTCTGTG
2G1	GCTGTGCGGTGTCACTGCTGTGGGCGCGGTGGCGGGTGGCGCGGGTGTGCGCGTGGCGCGCGCGCGCGCGCGCTCTCTGTG
W2	GCTGTGCGGTGTCACTGCTGTGGGCGCGGTGGCGGGTGGCGCGGGTGTGCGCGTGGCGCGCGCGCGCGCGCGCTCTCTGTG
A3B	TTTCTCTATTCTCTGTTCCCTGTTGACCTCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
2C1	TTTCTCTATTCTCTGTTCCCTGTTGACCTCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
1A1	TTTCTCTATTCTCTGTTCCCTGTTGACCTCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
2G1	TTTCTCTATTCTCTGTTCCCTGTTGACCTCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
W2	TTTCTCTATTCTCTGTTCCCTGTTGACCTCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

FIGURA 1 (continuación)

Alineamiento en 3' de las secuencias de nucleótidos de los diferentes clones de ADNc

ID SEC Nº 1	A3B
ID SEC Nº 2	2C1
ID SEC Nº 3	1A1
ID SEC Nº 4	2G1
ID SEC Nº 5	W2

Figura 34: Alineamiento de las secuencias de nucleótidos de los diferentes clones aislados de las genotecas de ADNc de las formas promastigotos y las formas amastigotes de *L. amazoniensis*

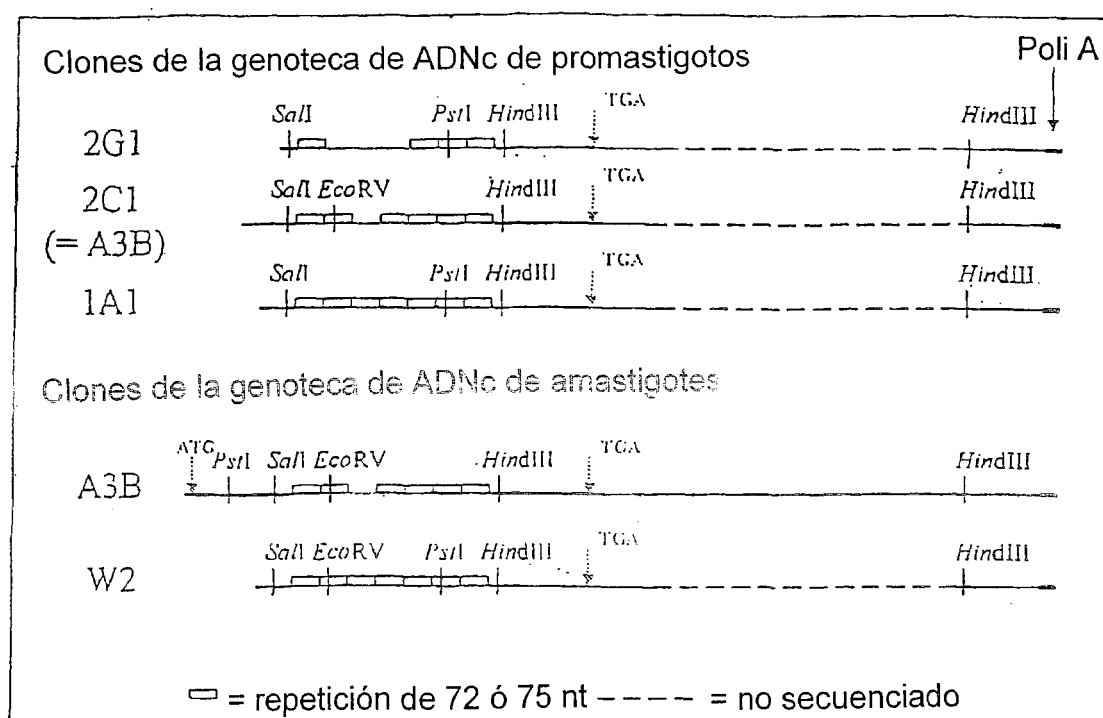


FIGURA 2

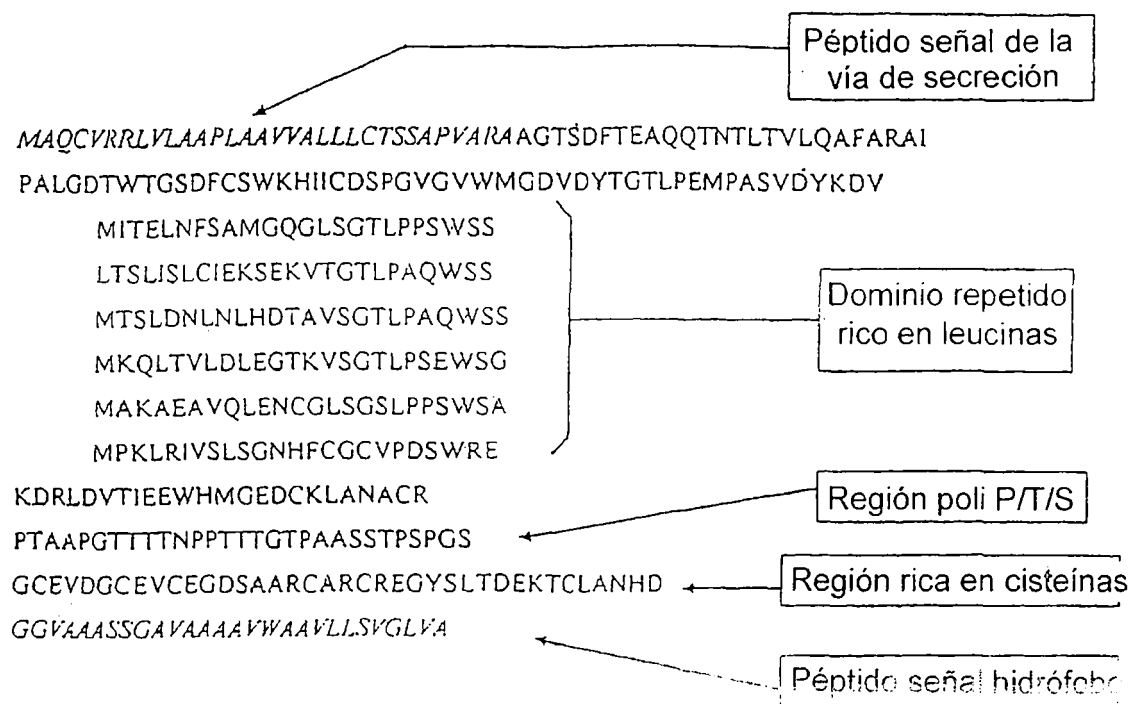


FIGURA 3A

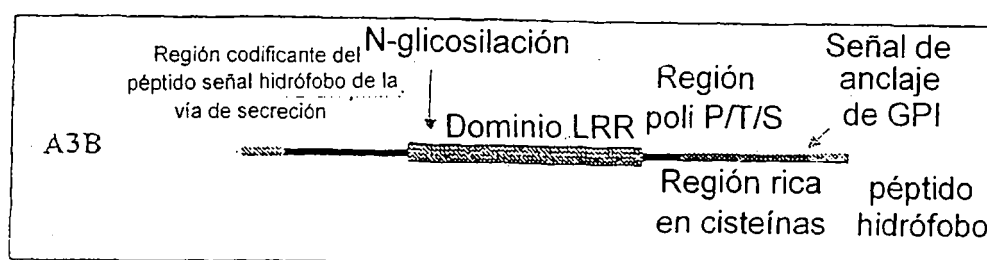


FIGURA 3B

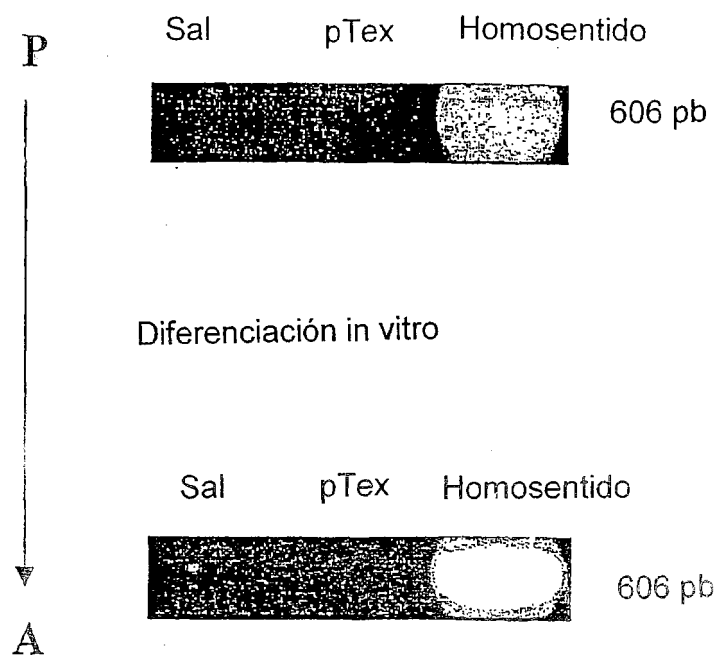
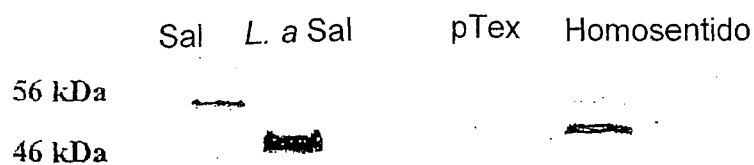


FIGURA 4

- Proteínas constitutivas



- Proteínas excretadas/secretadas (líquido sobrenadante de cultivo concentrado 200 veces)

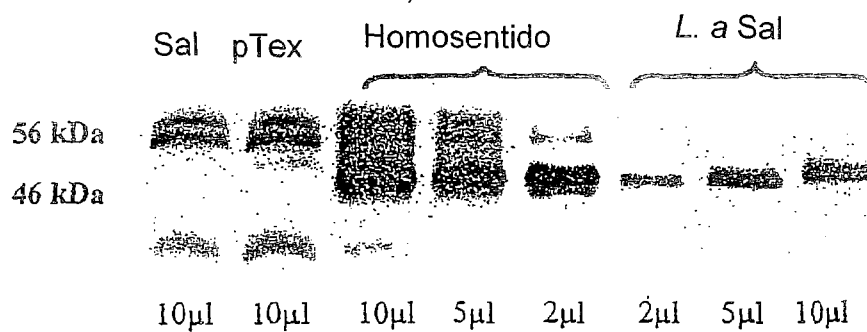


FIGURA 5

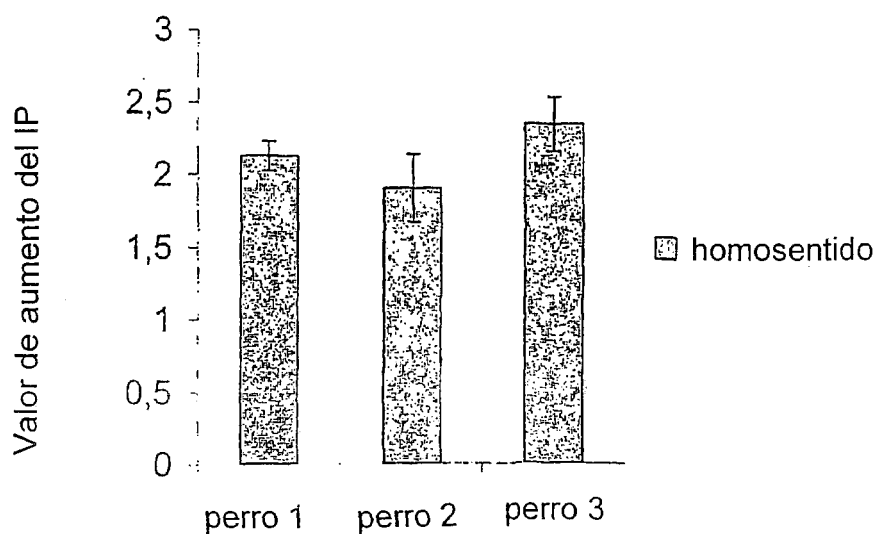


FIGURA 6A

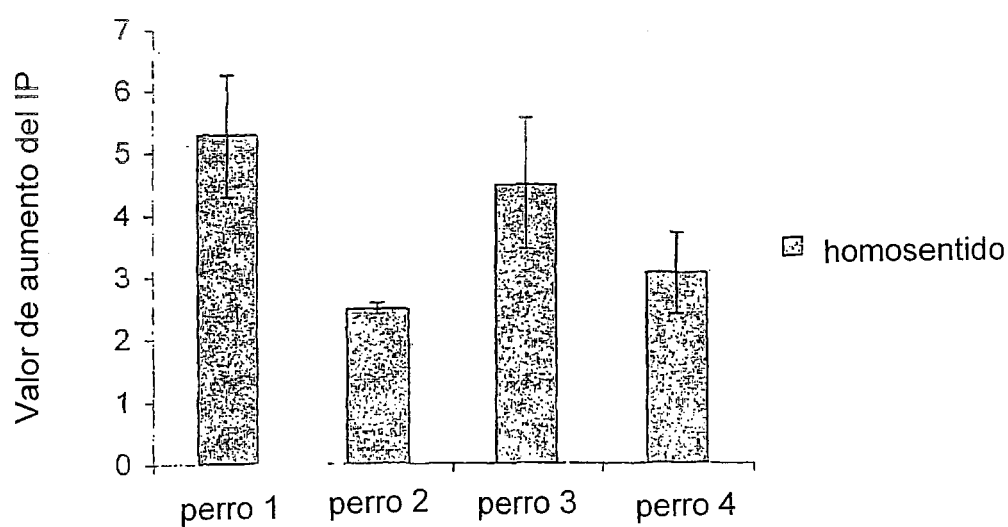


FIGURA 6B

IP = Índice parasitario. La variación del IP permite evaluar el poder infeccioso de la cepa de interés **Homosentido**, en función del porcentaje de macrófagos infectados y del número de parásitos por macrófago, en relación con una cepa testigo pTex

ID SEC N° 1 (Secuencia nucleica A3B)

GACCCCTGTTGCGAATGGCGCAGTGCGTGCGTGGTGGTGGTGGCGGCGCCCTCGCGGCTGTGG
 TGGCGCTGCTGCTGTGCACGAGCAGTGACCGGTGGCGGTGCTGCGGGGACGAGCGACTTCACTG
 AGGCGCAGCAGACGAACACGCTGACGGTGTGTCAGGCGTTTGGCGGTGCGATCCCTGCGCTTGGG
 GACACGTGGACGGGCAGCGACTTCTGCTCGTGGAAAGCACATCATCTGCGACTCGCCCGGCGTCCGG
 GTGTGGATGGGCGATGTGGATTATACCGGCACGCTGCCGGAGATGCCTGCGAGCGTCCGACTACAA
 GGACGTCAATGATCAGGAACCTGAACCTCAGCGCAATGGGCCAGGGGCTGAGCGGGACGCTGCCCG
 CCTCATGGAGCTCGCTGACGTCCTTGATATCACTGTGCATCGAAAAGTCTGAGAAGGTACCCGGCA
 CGGTCCCTGCCAGTGGAGCTCGATGACGTGCTGGACAACCTTAACCTGGACGACACGGCGGTCT
 CCGGCACGCTGCCGCGCAGTGGAGCTCGATGAAGCAGCTGACCGTTCTGGATCTGGAGGGGACTA
 AGGTGTCCGGCACGCTGCCGTCGAGTGGAGTGGGATGGCGAAGGCCGAGGGCGTGCAGCTGGAG
 AACTGCGGTCTGTCCGGAGTCTGCCCGCTCGTGGTCTGCGATGCCGAAGTGGCTATCGTCTCA
 TGAGCGGCAACCACTTCTGCGGGTGGCTGCCGACTCGTGGAGGGAGAAGGACCGCTCGATGTG
 ACCATCGAAGGAATGGCACATGGGCGAGGACTGCAAGCTTGCTAACCGCTGCCGCCGACTGCTGCT
 CCGGGAACGACACGACTAACCCGCCACCAACCGGACCGGACCGGACCGGACCGCTCTCTCTCT
 CCAGGGTCCGGGTGCGAGGTGGATGGGTGTGAGGTGTGCGAGGGGGACTCCGCTGCCGGTGGCG
 CAGGTGCCGTGAGGGCTACTCCGTGACGGACGAGAAGACGTGCTGGCGAACACGATGGCGCG
 TGGCGGCGCGCTGAGCGGAGCGGTGGCTGCCGCTGCTGTGTGGCGGCTGTGCTGTGAGCGTGG
 GGCTGGTGGCGTGAAGGTGCCGCGGGCCCTCTCTCTGTGGTGGCGCTGGTGGCTGGCGCG
 CCGCACGGCGTGGTGGCTGCCCTCTCTACCGCCACGAGCGGAGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGG
 CGCACGCGCACACGCGGTGGTGGATCGCGTGGCTTCCGCGGTGGTGGCGCTGGCAAGGATGGAC
 GGGCATGGCGAGGGGTGCATGGGTGGCGGTGCCAGCTCTGTGTGTCTCTCGGTGTGGCGAGCA
 GTGGCAACCGCGCGGATCGAATGTGGCGCGGGGGCGGTGTGTGGCTTGGACAGCGGATGGGG
 GCGCGCGCGCTCGCGGTGTGCCCTGCCGTCTGCTGTGTGGCGCGGAGGAGCGTACGGATGGCG
 TGTCCGGCCCTCTTGCACGGGGCTCGCTTGGCGTGTGTGTCTCGTGGTCTGTGCCGGTGTGCC
 TGGCGGGGTGAGAGCTGGCGGGGGCGTGGGTGGCGCGCGCGGACGCTCTCCGCTGGCTGAGGGCG
 GCTGCCCTGGCTCCGCGCACCGTCCGCTCTCTCTGACCGCCACTGCGCGCGCTTGTGGCTGTCT
 TGCTCTGTCTGCGCACTCTCTTATTTCCGTTTCATTGCGCTGTATTCTCTCTCCCAACCGCACT
 GCGGCCTCGTACCGCGGCGGTGGCGTGGCGAGGCGGTGATGTGCCGTTGTGCCCCCTTTTCA
 GCGCGCTGGGCGGATCGCCCTCTTGCCTCCCTCTCCCTCCCTCCCTCCCGCGGTCTGTCAATT
 GTATATCCGTGGACCTTATCTTCTGACTGCTCCGCGCTCTTCCGTAAGCTTGGTGGCGTGTGC
 CGCCCCCGGACGTACGCGCGCTGTGCTCGCATGCTCACGGTGGCTCCCGTGGCTGGGCGTGCA
 CGTAAGGACATGTATATATGTATGTATGTATATGATATGTATATATGTACGGTATATATAGGA
 ATTGTGTATGTTGAGGTGTATGCAATGTGCGTGGTATATTAGTGTGTGCGAGCACCGCGTGTGCG
 CACGCTCTGCTGCCCGCTCCGCTGTGCGTGTCACTCGCTGTGGGCGCGGTGGCGGGTGGCGCGG
 GTGGTGGCGTGGCGGGGCGGGGGCTCTCTGTGTTTCTCTATTCTCTGTTCCTGTGACCTCA
 AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

ID SEC N° 2 (Secuencia nucleica 2C1)

CGTGGACGGGCAGCGACTTCTGCTCGTGGAAAGCACATCATCTGCGACTCCCGGGCGTGGCGGTGT
 GGATGGGCGATGTGGATTATACCGGCACGCTGCCGGAGATGCCTGCGAGCGTCCGACTACAAAGGAG
 GTCATGATCAGGAACCTGAAGTGAAGCGCAATGGGCCAGGGGCTGAGCGGGACGCTGCCCGCTC
 ATGGAGCTGCTGACGTCTTGATATCACTGTGCATCGAAAAGTCTGAGAAGGTACCCGGCACGCT
 GCCTGCCAGTGGAGCTCGATGACGTGCTGGACAACCTTAACCTGCACGACACGCGCGTCTCCGG
 CAGCTGCTGCCAGTGGAGCTCGATGAAGCAGCTGACCGTTCTGGATCTGGAGGGGACTAAGGT
 GTCCGGCACGCTGCCGTCCGAGTGGAGTGGGATGGCGAAGGCGGAGGCCGTGCAGCTGGAGAACT
 GCGGTCTGTCCGGAGTCTGCCCGCTCGTGGTCTGCGATGCCGAAGCTGCGTATCGTCTCACTGA
 GCGGCAACCACTTCTGCCGGTGGTGGCGGACTCGTGGAGGGAGAAGGACCGCTCGATGTGACC
 ATCGAGGAATGGCACATGGGCGAGGACTGCAAGCTTGCTAACGCCTGCCGCCGACTGCTGCTCCG
 GGAACGACCACTAACCAGCCACCAACCGGCAACCGGACCGGAGCGCTCTCTCTCTCTCTCTCT
 GGGTGGGTGGGTGGGTGGGTGGGTGGGTGGGTGGGTGGGTGGGTGGGTGGGTGGGTGGGTGGGT
 GTGCCGTGAGGGGTACTCCCTGACGGACGAGAAGACGTGCGTGGCGAACCAAGATGGCGCGGTGG
 CGCGCGCTCGAGGGGAGCGGTGGCTGCCGCTGCTGTGTGGGCGGCTGTGCTGTGAGCGTGGGG
 TGTTGGCGTGAAGGTGGCGCGGGCCCTCTCTCTGTGGTGGCGCTGGTGGCTGCCCTGCCCGCG
 GCAAGGCGTGGTGGCTGCTCTCAACCGGACCGGGAGACCGACAGCCACAGGCGG
 ACGCGCACACGCGCTCGTGCATGCGGTGTGC

FIGURA 7

ID SEC N° 3 (Secuencia nucleica 1A1)

GGACGGGCGACGACTTCTGCTCGTGGAAAGCACATCATCTGCGACTCCCCCGGCGTCGGCGTGTGGA
 TGGGCGATGTGGATTATACCGGCACGCTGCCGGAGATGCCTGCGAGCGTCGACTACAAGGACGTC
 ATGATCATGGCACTGGACTTCGGCGCAATGGGCGAGGGACTGAGCGGGACGCTGCCCCCTCATGG
 AGCTCGCTGACGTCCTTGATGTCACTGTGGATCGAAAAGTCTGAGAAGGTCACCGGCACGCTGCCT
 ACCCAGTGGAGCTCGATGAAGCAGCTGACCTTCTGCATCTGAAGGGCACTAAGGTGTCCGGCAGG
 CTGCCGCCGAGTGGAGTGGGATGACGTGCTGGACGACCTTAACCTGCACGACACGGCGGTCTCC
 GGACGCTGCTGCCAGTGGAGCTCGATGAAGCAGCTGATCGATCTGGATCTGGAGGGCACTAA
 GGTGTCCGGCACGCTGCCGCCGAGTGGAGTGGGATGGCGAAGGCCGAGGCCCTGCAGCTGAAGT
 ACTGCGATCTGTCCGGGAGTCTGCCCCCTCGTGGTCTTCGATGCAGAAGCTGCGTATCGTCTCACT
 GAGCGGCAACCACTTCTGCCGGTGGCTGCCGACTCGTGGAGGGAGAAGGACCGCCTCGATGTGA
 CCATCGAGGAATGGCACATGGGCGAGGACTGCAAGCTTGCTAACGCTGCCGCCGACTGCTGCTC
 CGGGAACGACCAAGACTAACCGGCCGACCAACCGGCAACCCAGCAGCCTCTCTACTCCTTCTC
 CAGGGTCCGGGTGCGAGGTGGATGGGTGTGAGGTGTGCGAGGGGGACTCCGCTGCGCGGTGCGGC
 AGGTGCCGTGAGGGCTACTCCCTGAGGGACGAGAAGACGTGCCGTGGCGAACCACGATGGCGGCGT
 GCGGGCGGCGTGGAGCGGAGCGGTGGCTGCGGGTGTCTGTGGGGGGCTGTGCTGTTGAGCGTGG
 GGCTGGTGGCGTCAGGGTGGCGCGGCCCTCTTCTGTGGTGGCCCTGGTGGCTGCCCTCGGCC
 CCAGCACGGGCTCGTCGCTGCCCTCTCACCCCACCAAGCGGAAGGGGAGACCGACAGCCACACCG
 ACACGCGCAACGGCGCTCGTGCATCGCGTGTGCTTCCCGCTGTGGCGCCTGCGCGGATGCAAG
 GGCATGCGGAGGGCTGCAATGCGTGTGCGCTGCCAGCTCTGTGTGTCTCTCCGTGTGGCCAGCAG
 TCGGCACCCGCGCGATCGAATGTGCGCGCGGCGCGGTGTGTGCGCTGGAGACCGGATGGCGG
 GCCGCCCTGCGCGTGTGCCCTGCGGTCTGCTGTGGTGGCGCGGAGCGACGTACCGA

ID SEC N° 4 (Secuencia nucleica 2G1)

TCGGCGTGTGGATGGGCGATGTGGATTATACCGGCACGCTGCCGGAGATGCCTGCGAGCGTGGACT
 ACAAGGACGTCATGATCACGGAACCTGAACCTCGGCGCAATGGGCGAGGGACTGAGCGGGACGCTG
 CCCCCCTCATGGAGCTCGATGAAGCAGCTGATCGATCTGGATCTGGAGGGCACTAAGGTGTCCGGC
 ACGCTGCCGCCGAGTGGAGTGGGATGGCGAAGGCCGAGGCCCTGCAGCTGAAGTACTGCGATCT
 GTCCGGGAGTCTGCCCCCTCGTGGTCTTCGATGCAGAAGCTGCGTATCGTCTCACTGAGCGGCA
 CCACTTCTGCGGGTGGTGGCGACTCGTGGAGGGAGAAGGACCGCCTCGATGTGACCATCGAGG
 AATGGCACATGGGCGAGGACTGCAAGCTTGCTAACGCTGCCGCCGACTGCTGTCCGGGAACG
 ACCACGACTAACCGGCCACCAACCGGCAACCCAGCAGCCTCTCTACTCCTTCTCCAGGGTCC
 GGGTGGAGGTTGGATGGGTGTGAGGTGTGCGAGGGGGACTCCGCTGCGCGGTGCGCCAGGTGCGG
 TGAGGGCTACTCCCTGACGGACGAGAAGACGTGCCGTGGCGAACCACGATGGCGGCGTGGCGCGG
 CGTCAAGCGGAGCGGTGGCTGCGGCTGCTGTGTGGCGGCTGTGCTGTGAGCGTGGGGCTGGTGG
 CGTGAGGGTGCGGCGGGGCCCTCTTCTCTGTGGTGGCCCTGGTGGCTGCCCTCGCCCCCGGCACGG
 CGTCTGCTGCGCTCTCTCAACCCCAACCAACCGGAGCGGGGAGACCGACAGC
 CACACGCGCACGCGCACACGCGCTCGTGCATGCGGTGTGCTTCCGCCGTTGTGGCGCCTGCAAGG
 ATGCAAGGGCATGCGGAGGCGTGCATGCGTGTGCGGCTGCCAGCTCTGTGTGTCTCTCCGTGTGG
 CCAGCAGTCCGCAACCGCGCGGATCGAATGTGCGCGCGGCGGCGGTGTGTGCGCTTGGACAGCGG
 ATGCTGGCGCGCCGCCCTCGCGTGTGCTCGGTCTGCGTGTGCTGGCGCGCGGAGCGACGTACCGA
 GTGCGCTGTGCGCGGTTGGTGGCGGTGCGGCGGGCGGGGCTCCTCTGTGTTCTCTATTCTCTGT
 TCCCTGTTGACCTCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

FIGURA 7 continuación

ID SEC N° 5 (Secuencia nucleica W2)

CCGGCGTCGGCGTGTGGATGGGCGATGTGGATTATACCGGCACGCTGCCGGAGAT
 GCCTGCGAGCGTCGACTACAAGGACGTGATGATCACGGAACTGAACTTCAGCGC
 AATGGGCCAGGGGCTGAGCGGGACGCTGCCCCCTCATGGAGCTCGCTGACGTCC
 TTGATATCACTGTGCATCGAAAAGTCTGAGAAGGTCACCGGCACGCTGCCTGCC
 AGTGGAGCTCGATGACGTGCTGGACAACCTTAACCTGCACGACACGGCGGTCTC
 CGGCACGCTGCCGCCGAGTGGAGTGGGATGACGTGCTGGACGAECTTAACCTG
 CACGACACGGCGGTCTCCGGCACGCTGCCTGCCAGTGGAGCTCGATGAAGCAG
 CTGATCGATCTGGATCTGGAGGGCACTAAGGTGTCCGGCAGGCTGCCGCCCGAGT
 GGAGTGGGATGGCGAAGGCCGAGGCCCTGCAGCTGAAGTACTGCGATCTGTCCG
 GGAGTCTGCCCCCTCGTGGTCTTCGATGCAGAACTGCGTATCGTCTCACTGAG
 CGGCAACCACTTCTGCGGGTGGCTGCCCGAETCGTGGAGGGAGAAGGACCGCT
 CGATGTGACCATCGAGGAATGGCACATGGGCGAGGACTGCAAGCTTGCTAACGC
 CTGCCGCCGACTGCTGCTCCGGGAACGAECACGACTAAECGCCACCACCACC
 GGCACCCACGAGCCTCCTCTACTCCTTCTCCAGGGTGGGGGTGCGAGGTGG
 ATGGGTGTGAGGTGTGCGAGGGGGACTCCGCTGCGCGGTGCGCCACGTGCCGTG
 AGGGCTACTCCTGACGGACGAGAAGACGTGCCTGGCGAACCACGATGGCGGGCGT
 GGCGGCGGCGTCAAGCGGAGCGGTGGGTGCGGCTGCTGTGTGGGCGGCTGTGCT
 GTTGAGCGTGGGGCTGGTGGCGTGAGGGTGCCGCCGCCCTCTTCTCTGTGGTG
 CCCCTGGTGCTGCCCTCGCCCCAGCACGGGGTCTGTCGCTGCCCTCTCACGCCCA
 CCAGCCGAAGGGGAGACCGAECAGCCACAGGCACAGCGCACGGCGCCGTGGTGCA
 TCGCGTGTGCTTCCGCCGTGTGGCGCCTGCGCGGATGCACGGGCATGCGGAGG
 CGTGATGCGTGTGCGGTGCCAACTCTTGTGTGTCTCTCCGTGTGGCCAGCAGTC
 GGCACCC

FIGURA 7 continuación

ID SEC N° 11 (Secuencia nucleica IJ11 de Ldi)

GCGCTGCTGCCGCTGGCGCTGTTGTGTGTGTGCTGGGGCCGCGCCACGCA
 CACGCACGGTAGTGAGGGGGAGCCGACGACCGACGGGCGGAGCGGGC
 GGGCGGAGGGGGGGCGCTCCCGCCCGCTGGTCATGCTCTCTGTTTCGCTGG
 CCGGCCTCTCTACGCCGCTGGCGTGGGCGGAGCTCCGCGCTGCGTATCGC
 TCGCCCTCGCTGCCCTCCCTGCCCTCCTCATGTGCACTGCTCCCTCC
 CTCTCCCTCCCTCTACACTCCTCGCTGTCCCTCGGCCGACCTCCACGGA
 CACGCAGACGTGCGTGCGCATACACACCACCCCTCACCTCGCTGCTGCTG
 CTGTGACAGCTCTACGGACCCTGCCAGTCGCTGCGCCCCCGCCACCCGC
 CTCTGTCCCCCGCACGAGGGTACCTACGACGTGCCGGCCACCCCGCTCTG
 CCGATAAGCTGAGCTGGCGCTCACGCCCGAGCAATCCCCTCACGGATCT
 GCTGCCCGCGCCGCACTGCTCTTGACCTGGCTGCGAATGGCGCTGTGCGT
 GCGTCGGCTGGTGCTGGCGGGCAGCCCTCGCCGCTGTGGTGGCGCTGCTGC
 TGTGCACGAGCAGTGCGCCGGTGGCGCGTGTGCTGTGAAGGATGACTTC
 ACTGCTGCGCAGCGGACGAACACGCTGGCGGTGCTGGAGGCGTTTGGGCG
 TGCGATCCCTGAGCTTGGGAAGCTGTGGAAGGGCGACGACTTCTGC
 TTTTGGGAGTCGGTCGTGTGCGATGTGACCGAAGTGTACTTGTGGGAA
 ATCGGTGCGACGTATACCGGCACGCTGCCGGAGATGCCTGTGGACGTGCA
 CTACACGGCCGTGATGGTCAAGCACCTCGACTTTTCCCAAATGGGGCTGG
 GGCTGAGCGGAACGCTGCCGGACAGCTGGAGCAGGCTGCAGGGACTGACC
 TCACTTACGTTGTGCGGCTGCGGCGTGAGCGGTACGCTGCCCCCTCGTG
 GCGCTCGATGAAGTCTTTGGTGTGCTTGTGGATTGAGAGTTGTGAAAGTG
 TTACCGGCAAGCTGCCGCCTGAGTGGAGCTCGATGAAATCGCTGAGAGAT
 CTCCATCTGCATGGCGCGAAGGTTTCCGGCACGCTGCCGCCTGAGTGGAG
 CACGATGAAATCGCTGACCCCTTCTCGATCTGCAGGACACTCAGGTTACCG
 GCAGTCTGCCGCCTGAGTGGAGCTCAATGAAATCCATGACCATTCTCAGT
 CTGAATGGCGCGAAGGTTTCCGGCACGCTGCCACCCAGTGGAGCTCGAT
 GACATCGCTGAGCCTTCTCAGTCTGGAGGGTACTCAGCTCTCCGGCACGC
 TACCGCCCCAGTGGAGTGGGATGACATCGCTGGTCACGCTTTTCTGCA
 GGGTACTCAGGTCTCCGGCACTCTGCCGCCGAGTGGAGATCGATGTTGAA
 TGCCGAGTTCTTGCAGCTGGAGAACTGCGACCTGTCCGGCTGTTTGCCCCC
 CGAGTGGGCTGCGATGCCGAAGCTGCGTCATGTGGAACCTAAGGGCAACCA
 GTTCGCCGGGTGTGTGCCGGACTCGTGGGCTCAGAAGGCCGGTCTCGTTGT
 GGAAATCGAGGATAAGCACACGGGCAACAGCTGCATTGCTGGTGGGACTG
 CGCAACGACGACCACGACCACCTGAACCCACGTCCACTGCGAGCCCAAC
 AGCCACGCCTACCTCTGCCCCGAGACGGAGTGCGAGGTGGATGGGTGTGA
 GGTGTGCGATGGGGACTCCGCGGCGAGGTGCGCCAGGTGCCGTGAGGGCTA
 CTTCTGACGGACGAGAGGACGTGCCTGGTGTACCGCGATGGCGGCGTTGT
 GGCCGTGTGATCGGAGCGGCTGCTGCCGCTGTTGTGTGATGGCTGTGCT
 GCTGAGCGTGGGGCTGGCGGCGTGAGGATGCCGCTGCTGTGCGCGCGAGGC
 GGCGGCACCCGCTGCGTGGCACACGACTGCGTGCTTGCCTGCGAGCACCGCG
 CCCTGCATTGGCGTGCGTGTGCGCGTCTGTGTGTGATGGCTGCTGACGGT
 GCCTTTCGTCTGCTCTCGCTGCCCTCTGCCTCTCTCCGCGTGTGAATGCT
 GTGGGCTGTGTTTGGGGCTCTCGTGCGGCGCTGCTGTACGGCTGCTGCTTC
 TTCTCCACCCCTCCTCTCTCGCATGCCGGCGAGGGAGGGGTGGCACGTGCGC
 GTGTGCCGCTGCGCTTGCGAGTGCGTCTGTGTGTGGGCCTTCACCACGTGC

FIGURA 7 continuación

TACGGTCACGCCTTCTCGGCTGGCCACTCGCGGCGCTGAGGGCGGTGTGCC
 CTCCCCCTCGAGCGCCGTGCGACTCTCTCCGCGCGCCTGCGCGGGCTTCT
 TCGTGCGCTGTGCTCAGCCGTGCGCTCTCACCTCTTCCCTTTTCATTGCG
 TTGTCTTCTCTCTTCTCCCCCGCAETGCGGTCTCCCCTCCTCTGCCGTGC
 GGTGCGCAGGCGGGTGACTTGCCGTGCGTCTCCCCCTTTCGTGGAGCGCT
 GAGCCGATCCCCCTTCGGCCTCCCTCCTCCCTCCTCCCGTGGGTCCCTGTCT
 GTTGACATCGTCGGACCGTCTCTTCGTGTTGCCTCTCCGCACCTTCCGCA
 AATCTGCGCTCGCCTGTGCCGCTCTCGGACTTTATCCTTACTGTGATTGT
 ATTCTCACGGTGCGTCTCCGTGTGTGTGTGTGCCACGCACCGCTTCTTCCA
 TGTGTGTCCTTGCTTGCTCTCGTCTGCCCCCCCCCTCTGCCTCACACATT
 CCGTGCGTGTGTGCATCACCGTTGGGCGGCGACATCGGTGCCCGTCCCTGC
 CACCCTCTACTCCCTCATTCTCTTGCCACTTCGTGGGCGGTGCGTGCATGC
 ATGGATGTATATACACGCATAGAGGGGTGGGGACGCGGGGGATCCTCTAGA
 GTCGACCTGCAGGCATGCAAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCC
 TGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCACACAACATACGAGCCGGAAG
 CATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAAT
 TGCCTTGCGCTC

FIGURA 7 continuación

ES 2 345 824 T3

ID SEC N° 6 (Secuencia proteica A3B) (sentido directo) 372 aa
 MAQCVRRRLVLAAPLAAVVALLCTSSAPVARAAGTSDFTQAQQTNTLTVLQAFARAIPAL
 GDTWTGSDFCSWKHIIICDSPGVGVWMDVDYTGTLPEMPASVDYKDVMITELNFSAMGQG
 LSGTLPPSWSSLTSLISLCIEKSEKVTGTLPAQWSSMTSLDNLNLHDTAVSGTLPAQWSS
 MKQLTVLDLEGTKVSGTLPEWSGMAKAEAVQLENCGLSGSLPPSWSAMPKLRIVSLSGN
 HFCGCVPDWREKDRDLDTIEEWHMGEDCKLANACRPTAAPGTTTTNPPTTTGTTPAASST
 PSPGSGCEVDGCEVCEGDSAARCARCREGYSLTDEKTCLANHDGGVAAASSGAVAAAVW
 AAVLLSVGLVA*

ID SEC N° 7 (Secuencia proteica 2C1) (sentido directo) 287 aa
 MGDVDYTGTLPEMPASVDYKDVMITELNFSAMGQGLSGTLPPSWSSLTSLISLCIEKSEK
 VTGTLPAQWSSMTSLDNLNLHDTAVSGTLPAQWSSMKQLTVLDLEGTKVSGTLPEWSGM
 AKAEAVQLENCGLSGSLPPSWSAMPKLRIVSLSGNHFCGCVPDWREKDRDLDTIEEWHM
 GEDCKLANACRPTAAPGTTTTNPPTTTGTTPAASSTPSPGSGCEVDGCEVCEGDSAARCAR
 CREGYSLTDEKTCVANHDGGVAAASSGAVAAAVWAAVLLSVGLVA*

ID SEC N° 8 (Secuencia proteica 1A1) (sentido directo) 311 aa
 MGDVDYTGTLPEMPASVDYKDVIMALDFGAMGQGLSGTLPPSWSSLTSLMSLWIEKSEK
 VTGTLPTQWSSMKQLTLLHLKGTKVSGTLPEWSGMTSLDDLNLHDTAVSGTLPAQWSSM
 KQLIDLLEGTKVSGTLPEWSGMAKAEALQLKYCDLSGSLPPSWSSMKLRIVSLSGNH
 FCGCVPDWREKDRDLDTIEEWHMGEDCKLANACRPTAAPGTTTTNPPTTTGTTPAASSTP
 SPGSGCEVDGCEVCEGDSAARCARCREGYSLTDEKTCLANHDGGVAAASSGAVAAAVWAA
 AVLLSVGLVA*

ID SEC N° 9 (Secuencia proteica 2G1) (sentido directo) 238 aa
 MGDVDYTGTLPEMPASVDYKDVMITELNFGAMGQGLSGTLPPSWSSMKQLIDLLEGTKV
 SGTLPPEWSGMAKAEALQLKYCDLSGSLPPSWSSMKLRIVSLSGNHFCGCVPDWREKDR
 RLDVTIEEWHMGEDCKLANACRPTAAPGTTTTNPPTTTGTTPAASSTPSPGSGCEVDGCEV
 CEGDSAARCARCREGYSLTDEKTCLANHDGGVAAASSGAVAAAVWAAVLLSVGLVA*

ID SEC N° 10 (Secuencia proteica W2) (sentido directo) 271 aa
 MGDVDYTGTLPEMPASVDYKDVMITELNFSAMGQGLSGTLPPSWSSLTSLISLCIEKSEK
 VTGTLPAQWSSMTSLDNLNLHDTAVSGTLPEWSGMTSLDDLNLHDTAVSGTLPAQWSSM
 KQLIDLLEGTKVSGTLPEWSGMAKAEALQLKYCDLSGSLPPSWSSMKLRIVSLSGNH
 FCGCVPDWREKDRDLDTIEEWHMGEDCKLANACRPTAAPGTTTTNPPTTTGTTPAASSTP
 SPGSGCEVDGCEVCEGDSAARCARCREGYSLTDEKTCLANHDGGVAAASSGAVAAAVWAA
 AVLLSVGLVA*

ID SEC N° 12 (Secuencia proteica IJ11 de Ldi) (sentido directo) 464 aa
 MALCVRRRLVLAATLAAVVALLCTSSAPVARAAVKDDFTAAQRTNTLAVLEAFG
 RAIPELGKLWKGDGDFCFWESVVRCDRSLVGGKSVRRIPARCRRCLWTSTTRPSW
 SSTSTFPKWGWGAERCRTAGAGCRDWPHLRCAAAYAYRCPPRGARWSLWCR
 CGLRVVKVLPASCRLSGARWNRWEISICMARRFPARCRLSGARWNRWPFSICRTL
 RLPVAVCRLSGAQWNPWPFSVWMARRFPARCHPSGARWHRWAFSVWRVLSSPAR
 YRPSGSGMTSLVTLFQGTQVSGTLPPQWRSMLNAEFLQLENCDSLGLPPEWAA
 MPKLRHVELKGNQFAGCVPDSWAQKAGLVVEIEDKHTGNSCIAGADCATTTT
 EPTSTASPTATPTSAPETECEVDGCEVCDGDSAARCARCREGYFLTDERTCLVYRD
 GGVVAVSIGAAAAAVVCMVLLSVGLAA*

FIGURA 7 continuación

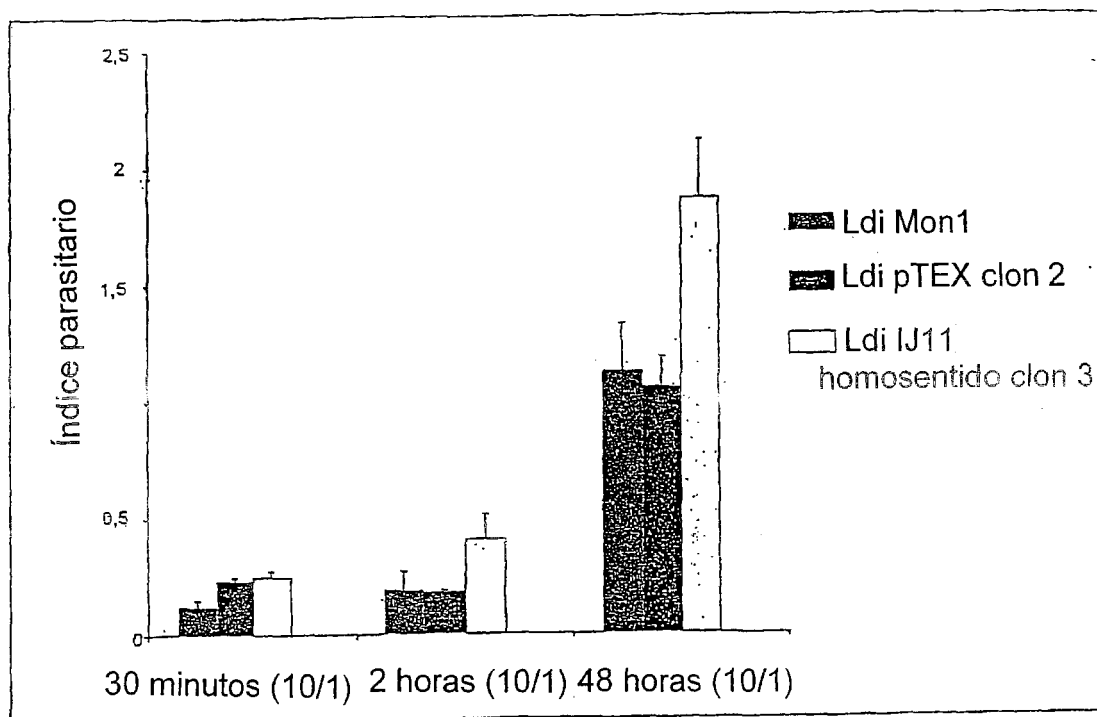


FIGURA 8