(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 391 562**

(51) Int. CI.:
C07K 14/44 (2006.01)
C12N 15/62 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Número de solicitud europea: **05025429 .1**
(96) Fecha de presentación: **05.04.2001**
(97) Número de publicación de la solicitud: **1681301**
(97) Fecha de publicación de la solicitud: **19.07.2006**

(54) Título: **Antígenos de leishmania para su uso en la terapia y el diagnóstico de la leishmaniasis**

(30) Prioridad:
14.04.2000 US 551974
05.05.2000 US 565501
14.08.2000 US 639206

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
27.11.2012

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
27.11.2012

(73) Titular/es:
CORIXA CORPORATION (100.0%)
CSC THE UNITED STATES CORPORATION 2711 CENTERVILLE ROAD
WILMINGTON, DE 19808, US

(72) Inventor/es:
REED, STEVEN;
CAMPOS-NETO, ANTONIO;
WEBB, JOHN, R.;
DILLON, DAVIN, C.;
SHEIKY, YASIR, A. W.;
BHATIA, AJAY;
COLER, RHEA, M. y
PROBST, PETER

(74) Agente/Representante:
DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

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

Antígenos de leishmania para su uso en la terapia y el diágnóstico de la leishmaniasis.

Campo Técnico

La presente invención se refiere en general a proteínas de fusión, composiciones y métodos para prevenir, tratar y detectar la *leishmaniasis*, y para estimular respuestas inmunitarias en pacientes. La invención se refiere más concretamente a proteínas de fusión que comprenden antígenos de *Leishmania*, porciones inmunogénicas o variantes de las mismas, y a vacunas y composiciones farmacéuticas que comprenden dichas proteínas de fusión. Las vacunas y composiciones farmacéuticas se pueden utilizar, por ejemplo, para la prevención y la terapia de la *leishmaniasis*, así como para la detección de la infección por *Leishmania*.

Antecedentes de la Invención

Los organismos de *Leishmania* son parásitos protozoicos intracelulares de macrófagos que causan una amplia gama de enfermedades clínicas en seres humanos y animales domésticos, principalmente perros. En algunas infecciones, el parásito puede permanecer en estado latente durante muchos años. En otros casos, el anfitrión puede desarrollar una de una variedad de formas de *leishmaniasis*. Por ejemplo, la enfermedad puede ser asintomática o puede manifestarse como *leishmaniasis* visceral subclínica, que se caracteriza por síntomas leves de malestar, diarrea y hepatomegalia intermitente. Los pacientes con enfermedad subclínica o asintomática usualmente tienen bajos títulos de anticuerpos, haciendo que la enfermedad sea difícil de detectar con las técnicas convencionales. Alternativamente, la *leishmaniasis* puede manifestarse como una enfermedad cutánea, que es un problema médico grave, pero es generalmente autolimitante, o como una enfermedad de la mucosa altamente destructiva, que no es auto-limitante. Finalmente, y de forma más grave, la enfermedad puede manifestarse como una infección visceral aguda que implica el bazo, el hígado y los ganglios linfáticos, que, si no se trata, generalmente es una enfermedad fatal. Los síntomas de la *leishmaniasis* visceral aguda incluyen hepatoesplenomegalia, fiebre, leucopenia, anemia e hipergammaglobulinemia.

La *leishmaniasis* es un grave problema en muchas partes del mundo, incluyendo Brasil, China, África Oriental, India y zonas de Oriente Medio. La enfermedad también es endémica en la región mediterránea, incluyendo el sur de Francia, Italia, Grecia, España, Portugal y Norte de África. El número de casos de *leishmaniasis* se ha incrementado espectacularmente en los últimos 20 años, y existen hoy en el mundo millones de casos de esta enfermedad. Alrededor de 2 millones de nuevos casos se diagnostican cada año, el 25% de los cuales son de *leishmaniasis* visceral. No hay, sin embargo, vacunas ni tratamientos eficaces disponibles en la actualidad.

El diagnóstico preciso de la *leishmaniasis* es frecuentemente difícil de lograr. Existen 20 especies de *Leishmania* que infectan a los seres humanos, incluyendo *L. donovani, L. chagasi, L. infantum, L. major, L. amazonensis, L. braziliensis, L. panamensis, L. mexicana, L. tropica,* y *L. guyanensis*, y no hay signos distintivos o síntomas que indiquen inequívocamente la presencia de infección por *Leishmania*. Se han utilizado métodos de detección de parásitos, pero estos métodos no son sensibles ni prácticos clínicamente. Las pruebas cutáneas actuales normalmente utilizan parásitos completos o lisados. Estas pruebas generalmente son insensibles, irreproducibles y propensas a la reacción cruzada con una variedad de otras enfermedades. Además, las preparaciones empleadas en tales pruebas son a menudo inestables. Por lo tanto, hay una necesidad de métodos mejorados para la detección de la infección por *Leishmania*.

Las vacunas experimentales actuales consistentes en organismos completos no han demostrado su eficacia en seres humanos. En consecuencia, sigue habiendo una necesidad en la técnica de vacunas para prevenir la leishmaniasis en seres humanos y en perros, y para la mejora de composiciones terapéuticas para el tratamiento de la leishmaniasis.

Compendio de la invención

La presente invención proporciona proteínas de fusión, composiciones y métodos para prevenir, tratar y detectar la *leishmaniasis*, así como para estimular respuestas inmunitarias en pacientes. En un aspecto, la presente invención proporciona una proteína de fusión que comprende (i) un polipéptido que comprende un antígeno de *Leishmania* que consiste en la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 2, una porción inmunogénica de dicho antígeno capaz de generar al menos 25% de la respuesta generada por dicho antígeno en un modelo de secreción de interferón gamma, interleuquina 2, factor de necrosis tumoral alfa o interleuquina 12 o una variante de dicho antígeno que tiene una identidad de al menos 90% con el SEQ ID NO: 2; y (ii) un polipéptido que comprende un antígeno de *Leishmania* que consiste en la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 24, una porción inmunogénica de dicho antígeno capaz de generar al menos 25% de la respuesta generada por dicho antígeno en un modelo de secreción de interferón gamma, interleuquina 2, factor de necrosis tumoral alfa o interleuquina 12 o una variante de dicho antígeno que tiene una identidad de al menos 90% con el SEQ ID NO: 24. También se proporcionan secuencias de ADN que codifican las proteínas de fusión anteriores, los vectores de expresión recombinantes que comprenden estas secuencias de ADN y las células anfitrionas transformadas o transfectadas con dichos vectores de expresión.

En ciertas realizaciones específicas, dichas proteínas de fusión comprenden un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en los SEQ ID NO: 95, 98, 99 y 101. Las proteínas de fusión pueden comprender adicionalmente un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 6 y/o del SEQ ID NO: 10.

En aspectos relacionados, la presente invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden una o más de las proteínas de fusión descritas en la presente memoria, o un polinucleótido que codifica dichas proteínas de fusión, y un portador fisiológicamente aceptable. También se proporcionan vacunas que comprenden una o más de dichas proteínas de fusión o polinucleótidos, junto con un inmunoestimulador. En realizaciones específicas de estos aspectos, el antígeno de *Leishmania* tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOS: 2, y 24.

En otro aspecto, la presente invención proporciona composiciones farmacéuticas para su uso en el método de detección de la infección por *Leishmania* en un paciente. El método comprende (a) poner en contacto células dérmicas del paciente con la composición farmacéutica, y (b) detectar una respuesta inmunitaria en la piel del paciente.

En otro aspecto, la presente invención proporciona composiciones farmacéuticas y vacunas como se ha descrito antes para su uso en métodos para inducir inmunidad protectora frente a la *leishmaniasis* en un paciente.

En un aspecto adicional, se proporcionan kits de diagnóstico para detectar la infección por *Leishmania* en un paciente. Los kits de diagnóstico comprenden: (a) una composición farmacéutica como se ha descrito anteriormente; y (b) un aparato suficiente para poner en contacto la composición farmacéutica con las células dérmicas de un paciente.

Se describen en la presente memoria los métodos para estimular una respuesta inmunitaria celular y/o humoral en un paciente, que comprenden administrar a un paciente una composición farmacéutica o una vacuna como se ha descrito anteriormente.

También se describen en la presente memoria los métodos para tratar a un paciente aquejado una enfermedad sensible a la estimulación por IL-12, que comprenden administrar a un paciente una composición farmacéutica o una vacuna como se ha descrito anteriormente.

Estos y otros aspectos de la presente invención serán evidentes mediante la referencia a la siguiente descripción detallada y los dibujos adjuntos.

Breve Descripción de los Dibujos

La Figura 1 muestra la estimulación de la proliferación de células T obtenidas de ratones BALB/c inmunizados frente *L. donovani* (representado por el índice de estimulación) por macrófagos infectados por *L. donovani* tras la incubación durante 24, 48 y 72 horas.

La Figura 2 ilustra perfiles de HPLC representativos de péptidos aislados de moléculas del MHC clase II de macrófagos P388D1. El panel A muestra péptidos aislados de macrófagos no infectados y el panel B muestra péptidos aislados de macrófagos infectados con L. donovani. Las flechas en el panel B indican picos de péptidos presentes únicamente en la preparación de macrófagos infectados.

La Figura 3 ilustra la expresión y purificación del antígeno de *Leishmania* Ldp23 como una proteína de fusión recombinante. El panel A muestra un gel SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie de E. coli lisada sin (calle 1) y con (calle 2) inducción con IPTG de la expresión de Ldp23. La flecha indica la proteína de fusión recombinante. El Panel B muestra la proteína de fusión después de la escisión de un gel de SDS-PAGE preparativa, electroelución, diálisis contra PBS y SDS-PAGE analítica.

La Figura 4 presenta un análisis de transferencia de Northern de ARN total preparado de *L. donovani, L. major, L. amazonensis* y *L. pifanoi* con un gen Ldp23 marcado con P^{32}. 1, 2 y 3 hacen referencia a ARN obtenido de promastigotas en la fase de crecimiento logarítmico, promastigotas en la fase de crecimiento estacionario y formas amastigotas, respectivamente.

La Figura 5 muestra un análisis de transferencia Western de antígenos de promastigotas de *L. donovani* incubados con suero de conejo pre-inmune (calle A) o con antisuero de conejo anti-Ldp23 (calle B).

La Figura 6 ilustra la expresión superficial de Ldp23 en promastigotas de *L. donovani* vivos. La línea punteada muestra la inmunofluorescencia indirecta realizada utilizando suero pre-inmune de ratón y la línea continua muestra el resultado obtenido con el antisuero anti-GST-Ldp23 de ratón. La intensidad de fluorescencia se analizó mediante FACScan.

La Figura 7 muestra la estimulación de la proliferación de células T específicas de *Leishmania* por Ldp23. Los resultados se presentan como número el relativo de células como una función de la intensidad de fluorescencia. Las células T (10^5/pocillo) se purificaron a partir de ganglios linfáticos de ratones BALB/c inmunizados en la almohadilla

plantar con promastigotas de L. donovani en CFA y se cultivaron con diversas concentraciones de Ldp23 recombinante purificado en presencia de $2x10^5$ células mononucleares del bazo BALB/c normales tratadas con mitomicina C. Se midió la proliferación de células T a las 27 horas de cultivo. Los valores se expresan como cpm y representan la media de incorporación de [^{3}H]-TdR de cultivos por triplicado.

La Figura 8 ilustra la producción de citoquinas inducida mediante Ldp23 por las células de ganglios linfáticos de ratones BALB/c. Los cultivos se incubaron con cantidades variables de Ldp23 o producto lisado de *Leishmania*, presentadas como µg/mL, y se analizaron mediante ELISA para determinar la producción de interferón-γ (panel A) o interleuquina-4 (panel B), ambos los cuales se muestran como ng/ml.

La Figura 9 muestra la amplificación por PCR de ARNm de citoquina aislado de PBMC de un paciente con *leishmaniasis* mucosa (Panel A) y *leishmaniasis* cutánea (panel B) antes y después de la estimulación con polipéptidos representativos de la presente invención. Las calles O y - indican el nivel de productos de PCR en el inicio del cultivo y después de 72 horas de cultivo, respectivamente, en ausencia de polipéptido añadido; las calles Lb, 83a y 83b indican el nivel de productos de PCR después de cultivo de PBMC con producto lisado de *L. braziliensis*, y antígenos Lbhsp83a y Lbhsp83b de *Leishmania*, respectivamente.

La Figura 10 presenta una comparación de los niveles de interferón-γ (panel A) y TNF-α (panel B) en los sobrenadantes de cultivos de 72 horas de PBMC de individuos infectados por *Leishmania* y de control en respuesta a la estimulación con producto lisado de parásitos o los polipéptidos indicados.

La Figura 11 ilustra los niveles de p40 de IL-10 (en pg/mL) en el sobrenadante de cultivos de PBMC de individuos infectados con *L. braziliensis* y controles no infectados 72 horas después de la estimulación con producto lisado de promastigota parásito (Lb), Lbhsp83a o Lbhsp83b.

La Figura 12 presenta las reactividades de los sueros de pacientes infectadas con *L. braziliensis* con polipéptidos representativos de la presente invención en una ELISA convencional. Los valores se expresan como absorbancia a 405 nm.

Las Figuras 13A y 13B ilustran el nivel de IL-4 e IFN-γ (en pg/mL) secretados estimulados en cultivos de ganglios linfáticos de ratón mediante la adición de polipéptidos representativos de la presente invención.

La Figura 14 muestra el nivel de IFN-γ (en pg/mL) secretado por PBMC humanas infectadas por *Leishmania* y no infectadas estimuladas por el antígeno M15 de *Leishmania*, en comparación con los niveles estimulados por producto lisado de *L. major* y L-Rack, un antígeno que no parece ser reconocido por seres humanos infectados por *Leishmania*.

La Figura 15 muestra el nivel de IFN-γ (en pg/mL) secretado por PBMC humanas infectadas y no infectadas estimuladas por antígenos de *Leishmania* solubles (antígenos S), en comparación con los niveles estimulados por producto lisado de *L. major* y L-Rack.

La Figura 16 ilustra la proliferación de cultivos de ganglios linfáticos murinos estimulados por la adición de polipéptidos representativos de la presente invención. Los valores se expresan como cpm.

La Figura 17 muestra la proliferación de PBMC humanas, preparadas a partir de individuos inmunes a *Leishmania* y no infectados, estimulados por M15, en comparación con la proliferación estimulada por producto lisado de L. mayor y L-Rack. Los valores se expresan como cpm.

La Figura 18 ilustra la proliferación de PBMC humanas, preparadas a partir de individuos infectados con *Leishmania* y no infectados, estimulados por antígenos de *Leishmania* solubles en comparación con la proliferación estimulada por el medio de cultivo, producto lisado de *L. major* y L-Rack. Los valores se expresan como cpm.

La Figura 19 presenta una comparación de una secuencia Lbhsp83 (SEQ ID NO: 6) con secuencias homólogas de *L. amazonensis* (Lahsp83) (SEQ ID NO: 16), *T. cruzi* (Tchsp83) (SEQ ID NO: 17) y humanas (Huhsp89) (SEQ ID NO: 18)

La Figura 20 ilustra la reactividad de sueros de conejo producidos contra antígenos solubles de *Leishmania* y producto lisado de promastigota de *Leishmania* (calle 1) y antígenos solubles de *Leishmania* (calle 2).

La Figura 21 muestra el ADNc y la secuencia pronosticada de aminoácidos para el antígeno Lmspla de *Leishmania*.

La Figura 22 muestra una transferencia Southern de ADN genómico de *L. major* digerido con un panel de enzimas de restricción (calles 1 a 7) y otras seis especies de *Leishmania* digeridas con PstI (calles 8 a 13) sondadas inserto de ADNc completo de Lmspla.

La Figura 23 muestra una transferencia Southern de ADN genómico de *L. major* digerido con un panel de enzimas de restricción, otras seis especies de *Leishmania* digeridas con PstI y los patógenos infecciosos *T. cruzi* y *T. brucei*, sondeados con el inserto de ADNc completo del antígeno de *Leishmania* MAPS-1A.

La Figura 24 ilustra la proliferación de PBMC aisladas de individuos no infectados, pacientes con *leishmaniasis* mucosal activa y pacientes después de la infección con kala-azar, estimuladas por MAPS-1A.

La Figura 25 ilustra la proliferación de cultivos de ganglios linfáticos murinos estimulados por MAPS-1A.

La Figura 26 ilustra la reactividad de MAPS-1A con sueros de pacientes humanos con *leishmaniasis*.

La Figura 27 ilustra la reactividad de MAPS-1A con sueros de ratones inmunizados contra y/o infectados con *leishmaniasis*.

La Figura 28 ilustra la eficacia de la inmunización con antígenos solubles de *Leishmania* o una mezcla de Ldp23, LbeiF4A y M15 más coadyuvante para conferir protección contra la infección (medida por la hinchazón de la almohadilla plantar) en un sistema modelo murino de *leishmaniasis*, en comparación con la administración de coadyuvante solo.

La Figura 29 ilustra la eficacia de la inmunización con MAPS-1A más coadyuvante para conferir protección contra la infección (medida por la hinchazón de la almohadilla plantar) en un sistema modelo murino de *leishmaniasis*, en comparación con la administración de coadyuvante solo.

La Figuras 30A y B ilustran la proliferación de cultivos de ganglios linfáticos murinos estimulados con cualquiera de LcgSP8, LcgSP10 o LcgSP3.

La Figura 31 ilustra la eficacia de la inmunización con antígenos solubles de *Leishmania*, MAPS-1A y M15 más coadyuvante, IL-12, para conferir protección contra la infección (medida por la hinchazón de la almohadilla plantar) en un sistema modelo murino de *leishmaniasis*, en comparación con la administración de coadyuvante IL-12.

La Figura 32 ilustra la eficacia de la inmunización con ADN de M15 y ADN de MAPS-1A para conferir protección contra la infección (medida por la hinchazón de la almohadilla plantar) en un sistema modelo murino de leishmaniasis, en comparación con ADN de control y solución salina.

La Figura 33 ilustra la eficacia de la inmunización con proteínas de fusión de *Leishmania* más IL-12 como coadyuvante, para conferir protección contra la infección en un sistema modelo murino de leishmaniasis.

La Figura 34 ilustra la eficacia de la inmunización con proteínas de fusión de *Leishmania* más coadyuvante MPL-SE, para conferir protección contra la infección en un sistema modelo murino de leishmaniasis.

Descripción Detallada de la Invención

Como se indicó anteriormente, la presente invención se refiere en general a proteínas de fusión, composiciones y métodos para prevenir, tratar y detectar la leishmaniasis, así como para estimular respuestas inmunitarias en pacientes.

En un primer aspecto la presente invención proporciona proteínas de fusión que comprenden (i) un polipéptido que comprende un antígeno de *Leishmania* que consiste en la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 2, una porción inmunogénica de dicho antígeno capaz de generar al menos 25% de la respuesta generada por dicho antígeno en un modelo de secreción de interferón gamma, interleuquina 2, factor de necrosis tumoral alfa o interleuquina 12, o una variante de dicho antígeno que tiene una identidad de al menos 90% con el SEQ ID NO: 2; y (ii) un polipéptido que comprende un antígeno de *Leishmania* que consiste en la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 24, una porción inmunogénica de dicho antígeno capaz de generar al menos 25% de la respuesta generada por dicho antígeno en un modelo de secreción de interferón gamma, interleuquina 2, factor de necrosis tumoral alfa o interleuquina 12, o una variante de dicho antígeno que tiene una identidad de al menos 90% con el SEQ ID NO: 24.

Opcionalmente, las porciones inmunogénicas de *Leishmania* pueden ser capaces de generar al menos 50% de la respuesta generada por el antígeno de Leishmania que consiste en el SEQ ID NO: 2 o el antígeno de *Leishmania* que consiste en el SEQ ID NO: 24 respectivamente en un modelo de secreción de interferón gamma, interleuquina 2, factor de necrosis tumoral alfa o interleuquina 12.

En una realización concreta, las proteínas de fusión de la presente invención comprenden una secuencia de polipéptidos que tiene una identidad de al menos 90% con la secuencia de aminoácidos codificada por el SEQ ID NO: 101. En una realización preferida las proteínas de fusión comprenden el polipéptido codificado por el SEQ ID NO: 101.

En una realización concreta, las proteínas de fusión de la presente invención comprenden una secuencia de polipéptidos que tiene una identidad de al menos 90% con la secuencia de aminoácidos codificada por el SEQ ID NO: 95. En una realización preferida las proteínas de fusión consisten en una secuencia de polipéptidos que tiene una identidad de al menos 90% con la secuencia de aminoácidos codificada por el SEQ ID NO: 95.

En una realización concreta, las proteínas de fusión de la presente invención comprenden una secuencia de polipéptidos que tiene una identidad de al menos 90% con la secuencia de aminoácidos codificada por el SEQ ID

NO: 96. En una realización preferida las proteínas de fusión consisten en una secuencia de polipéptidos que tiene una identidad de al menos 90% con la secuencia de aminoácidos codificada por el SEQ ID NO: 96.

En una realización concreta, las proteínas de fusión de la presente invención comprenden una secuencia de polipéptidos que tiene una identidad de al menos 90% con la secuencia de aminoácidos codificada por el SEQ ID NO: 97. En una realización preferida las proteínas de fusión consisten en una secuencia de polipéptidos que tiene una identidad de al menos 90% con la secuencia de aminoácidos codificada por el SEQ ID NO: 97.

En un aspecto adicional de la presente invención, las proteínas de fusión descritas anteriormente pueden comprender adicionalmente un polipéptido que comprende un antígeno de Leishmania que consiste en la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 6, una porción inmunogénica de dicho antígeno capaz de generar al menos 25% de la respuesta generada por dicho antígeno en un modelo de interferón alfa, interleuquina 2, factor de necrosis tumoral alfa o interleuquina 12, o una variante de dicho antígeno que tiene una identidad de al menos 90% con el SEQ ID NO: 6. Preferiblemente, la proteína de fusión comprende adicionalmente una porción inmunogénica de un antígeno de Leishmania que consiste en el SEQ ID NO: 6 capaz de lograr generar al menos 50% de la respuesta generada por dicho antígeno en un modelo de secreción de interferón gamma, interleuquina 2, factor de necrosis tumoral alfa o interleuquina 12.

En otra realización más de la presente invención, las proteínas de fusión descritas más arriba pueden comprender adicionalmente un antígeno de *Leishmania* que consiste en la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 10, una porción inmunogénica de dicho antígeno capaz de generar al menos 25% de la respuesta generada por dicho antígeno en un modelo de secreción de interferón gamma, interleuquina 2, factor de necrosis tumoral alfa o interleuquina 12, o una variante de dicho antígeno que tiene una identidad de al menos 90% con el SEQ ID NO: 10. Preferiblemente, la proteína de fusión comprende además una porción inmunogénica de un antígeno de *Leishmania* que consiste en el SEQ ID NO: 10 capaz de lograr generar al menos 50% de la respuesta generada por dicho antígeno en un modelo de secreción de interferón gamma, interleuquina 2, factor de necrosis tumoral alfa o interleuquina 12. En otro aspecto de la invención se proporcionan los polinucleótidos que codifican la proteína de fusión descrita más arriba. Asimismo se proporcionan vectores de expresión recombinantes que comprenden los polinucleótidos.

En otro aspecto de la invención se proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden las proteínas de fusión descritas más arriba, o los polinucleótidos que las codifican, y un portador fisiológicamente aceptable.

En otro aspecto de la invención se proporcionan composiciones inmunogénicas que comprenden las proteínas de fusión descritas más arriba, o los polinucleótios que las codifican, y un inmunoestimulador.

Dichos inmunoestimuladores se pueden seleccionar del grupo que consiste en: aminoalquilglucosamínido- 4-fosfatos; monofosforil lípido A; y monofosforil lípido A 3-des-O-acilado. En una realización las composiciones inmunogénicas pueden comprender adicionalmente un vehículo de liberación, tal como una microesfera biodegradable.

En otro aspecto de la presente invención se proporcionan las composiciones farmacéuticas y las composiciones inmunogénicas descritas más arriba para su uso en un método de inducción de inmunidad protectora contra la leishmaniasis en un paciente.

En otro aspecto de la invención se proporcionan las composiciones farmacéuticas descritas más arriba para su uso en un método para detectar la infección por *Leishmania* en un paciente, comprendiendo el método las etapas de (a) poner en contacto células dérmicas del paciente con la composición farmacéutica; y (b) detectar la respuesta inmunitaria sobre la piel del paciente. Preferiblemente la respuesta inmunitaria es el endurecimiento.

En otro aspecto de la invención se proporciona un kit de diagnóstico que comprende (a) una composición farmacéutica descrita más arriba y (b) un dispositivo suficiente para poner en contacto células dérmicas de un paciente con la composición farmacéutica.

En otro aspecto de la invención se proporciona una vacuna que comprende (a) una proteína de fusión descrita más arriba o (b) un polinucleótido descrito más arriba, o (c) un vector de expresión recombinante que comprende dicho polinucleótido; y (d) un coadyuvante. Dicha vacuna puede ser proporcionada para su uso en un método de inducción de inmunidad protectora contra la leishmaniasis en un paciente.

Los polipéptidos descritos incluyen, pero no están limitados a, polipéptidos que comprenden porciones inmunogénicas de antígenos de *Leishmania* que comprende las secuencias citadas en la SEQ ID NO: 2 (referido en la presente memoria como M15), SEQ ID NO: 4 (referido en la presente memoria como Ldp23), SEC ID NO: 6 (referido en la presente memoria como Lbhsp83), SEQ ID NO: 8 (referido en la presente memoria como Lt-210), SEQ ID NO: 10 (referido en la presente memoria como LbeIF4A), SEQ ID NO: 20 (referido en la presente memoria como Lmsp1a), SEQ ID NO: 22 (referido en la presente memoria Lmsp9a), SEQ ID NO: 24 y 26 (referidos en la presente memoria como MAPS-1A), y SEQ ID NO: 36-42, 49-53 y 55. Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "polipéptido" abarca cadenas de aminoácidos de cualquier longitud, incluyendo proteínas completas (es decir, antígenos), donde los residuos de aminoácidos están unidos por enlaces covalentes. Por lo tanto, un

polipéptido que comprende una porción inmunogénica de uno de los antígenos anteriores puede consistir enteramente de la porción inmunogénica, o puede contener secuencias adicionales. Las secuencias adicionales pueden derivarse del antígeno de *Leishmania* nativo o pueden ser heterólogas, y dichas secuencias pueden (pero no necesariamente) ser inmunogénicas. Un antígeno "que tiene" una secuencia particular es un antígeno que contiene, dentro de su secuencia completa, la secuencia citada. El antígeno nativo puede, o no, contener una secuencia de aminoácidos adicional.

Una porción inmunogénica de un antígeno de *Leishmania* es una porción que es capaz de provocar una respuesta inmunitaria (es decir, celular y/o humoral) en un paciente (tal como un ser humano o un perro) infectado actualmente o previamente con *Leishmania* y/o en cultivos de células de ganglios linfáticos o células mononucleares de sangre periférica (PBMC) aisladas de individuos infectados actualmente o previamente con *Leishmania*. Las células en las que se provoca una respuesta pueden comprender una mezcla de tipos de células o pueden contener células de componentes aislados (incluyendo, pero no limitadas a, células T, células NK, macrófagos, monocitos y/o células B). En particular, las porciones inmunogénicas son capaces de inducir la proliferación de células T y/o una respuesta de citoquina de tipo Th1 dominantemente (por ejemplo, producción de IL-2, IFN-γ, y/o TNF-α por las células T y/o células NK, y/o producción de IL-12 por monocitos, macrófagos y/o células B). Las porciones inmunogénicas de los antígenos descritos en la presente memoria generalmente se pueden identificar utilizando mecanismos conocidos por los expertos normales en la técnica, incluyendo los métodos representativos proporcionados en la presente memoria.

Las composiciones y métodos de la presente invención también abarcan variantes de los polipéptidos anteriores que comprenden las proteínas de fusión de la presente invención. Un polipéptido "variante", según se utiliza en la presente memoria, es un polipéptido que difiere de una proteína nativa en una o más sustituciones, deleciones, adiciones y/o inserciones, de manera que la inmunogenicidad del polipéptido no disminuye sustancialmente. En otras palabras, la capacidad de una variante para reaccionar con antisueros específicos del antígeno puede aumentar o permanecer invariable, con respecto a la proteína nativa, o puede disminuir menos de 50%, y preferiblemente menos de 20%, con respecto a la proteína nativa. Tales variantes pueden ser identificadas generalmente modificando una o más secuencias de polipéptidos y evaluando la reactividad del polipéptido modificado con anticuerpos o antisueros específicos del antígeno como se describe en la presente memoria. Las variantes preferidas incluyen aquellas en las que una o más porciones, tales como la secuencia líder N-terminal o el dominio transmembrana, han sido eliminados. Otras variantes preferidas incluyen las variantes en las que una pequeña porción (p. ej., 1-30 aminoácidos, preferiblemente 5-15 aminoácidos) ha sido eliminada del extremo N y/o C de la proteína madura.

Las variantes de polipéptidos descritas en la presente memoria incluyen aquellas que muestran una identidad (determinada como se describe más arriba) de al menos aproximadamente 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% o más con los polipéptidos descritos en la presente memoria.

Preferiblemente, una variante contiene sustituciones conservativas. Una "sustitución conservativa" es una en la que un aminoácido está sustituido por otro aminoácido que tiene propiedades similares, de manera que un experto en la técnica de la química de péptidos espera que la estructura secundaria y la naturaleza hidropática del polipéptido permanezcan sustancialmente inalteradas. Las sustituciones de aminoácidos se pueden realizar generalmente basándose en la similitud de la polaridad, la carga, la solubilidad, la hidrofobia, la hidrofilia 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 no cargada que tienen valores de hidrofilia similares incluyen leucina, isoleucina y valina; glicina y alanina; asparragina 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 puede contener (o alternativamente contiene) cambios no conservativos. Preferiblemente, las variantes de polipéptidos difieren de una secuencia nativa por la sustitución, deleción o adición de cinco aminoácidos o menos. Las variantes también pueden estar modificadas (o alternativamente están modificadas), por ejemplo, mediante la deleción o adición de aminoácidos que tienen una influencia mínima sobre la inmunogenicidad, la estructura secundaria y la naturaleza hidropática del polipéptido.

Los polinucleótidos pueden comprender una secuencia nativa (p. ej., una secuencia endógena que codifica una proteína o porción de la misma) o puede comprender una variante, o un equivalente biológico o funcional antigénico de dicha secuencia. Las variantes de polinucleótidos pueden contener una o más sustituciones, adiciones, deleciones y/o inserciones, como se describe adicionalmente más abajo, preferiblemente de manera que la inmunogenicidad del polipéptido codificado no disminuya, con respecto a una proteína tumoral nativa. El efecto sobre la inmunogenicidad del polipéptido codificado se puede evaluar generalmente como se describe en la presente memoria. El término "variantes" también incluye los genes homólogos de origen xenogénico.

Cuando se comparan secuencias de polinucleótidos o polipéptidos, se dice que dos secuencias son "idénticas" si las secuencias de nucleótidos o aminoácidos de las dos secuencias son iguales cuando se alinean para determinar la máxima correspondencia, como se describe más abajo. Las comparaciones entre dos secuencias se realizan típicamente comparando las secuencias a lo largo de una ventana de comparación para identificar y comparar

regiones locales de similitud de secuencia. Una "ventana de comparación" según se utiliza en la presente memoria, hace referencia a un segmento de al menos aproximadamente 20 posiciones contiguas, normalmente de 30 a aproximadamente 75, de 40 a aproximadamente 50, en el que una secuencia se puede comparar con una secuencia de referencia del mismo número de posiciones contiguas después de haber alineado óptimamente las dos secuencias.

El alineamiento óptimo de secuencias para su comparación se puede llevar a cabo utilizando el programa Megalign del grupo Lasergene de soporte lógico bioinformático (DNASTAR, Inc., Madison, WI), utilizando los parámetros por defecto. Este programa incorpora varios esquemas de alineamiento descritos en las siguientes referencias: Dayhoff, M.O. (1978) A model of evolutionary change in proteins – Matrices for detecting distant relationships. En Dayhoff, M.O. (ed.) Atlas of Protein Sequence and Structure, National Biomedical Research Foundation, Washington DC Vol. 5, Supl. 3, págs. 345-358; Hein J. (1990) Unified Approach to Alignment and Phylogenes págs. 626-645 *Methods in Enzymology* vol. 183, Academic Press, Inc., San Diego, CA; Higgind, D.G. y Sharp, P.M. (1989) *CABIOS* 5:151-153; Myers, E.W. y Muller W. (1988) *CABIOS* 4:11-17; Robinson, E.D. (1971) *Comb. Theor. 11*:105; Santou, N. Nes, M. (1987) *Mol. Biol. Evol. 4*:406-425; Sneath, P.H.A. y Sokal, R.R. (1973) *Numerical Taxonomy – the Principles and Practice of Numerical Taxonomy*, Freeman Press, San Franciso, CA; Wilbur, W.J. y Lipman, D.J. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80*:726-730.

Alternativamente, el alineamiento óptimo de secuencias para su comparación se puede llevar a cabo mediante el algoritmo de identidad local de Smith y Waterman (1981) *Add. APL. Math. 2*:482, mediante el algoritmo de alineamiento de identidad de Needleman y Wunsch (1970) *J. Mol. Biol.* 48:443, mediante los métodos de búsqueda de similitud de Pearson y Lipman (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 2444, mediante implementaciones computarizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, BLAST, FASTA, y TFASTA en el Paquete de Soporte Lógico de Genetics Wisconsin, Genetics Computer Group (GCG), 575 Science Dr., Madison, WI), o mediante inspección.

Un ejemplo preferido 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 son descritos por Altschul et al. (1977) *Nucl. Acids Res.* 25:3389-3402 y Altschul et al. (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-410, respectivamente. Se pueden utilizar BLAST y BLAST 2.0, por ejemplo, con los parámetros descritos en la presente memoria, para determinar el porcentaje de identidad de secuencia de los polinucleótidos y polipéptidos de la invención. El soporte lógico para realizar los análisis BLAST se encuentra disponible al público a través del National Center for Biotechnology Information. En un ejemplo ilustrativo, se pueden calcular las puntuaciones cumulativas utilizando, para las secuencias de nucleótidos, los parámetros M (puntuación de recompensa para un par de residuos que se emparejan; siempre >0) y N (puntuación de penalización para residuos que se emparejan erróneamente; siempre <0). Para las secuencias de aminoácidos, se puede utilizar una matriz de puntuación para calcular la puntuación cumulativa. La extensión de las palabras comunes en cada dirección se detiene cuando: la puntuación de alineamiento cumulativa cae en una cantidad X desde su máximo valor alcanzado; la puntuación cumulativa tiende a cero o menos, debido a la acumulación de uno o más alineamientos de residuos de puntuación negativa; o se alcanza el final de cualquiera de las secuencias. Los parámetros del algoritmo BLAST W, T y X determinan la sensibilidad y la velocidad del alineamiento. El programa BLASTN (para secuencias de nucleótidos) utiliza por defecto una longitud de palabra (W) de 11, una expectancia (E) de 10, y los alineamientos de la matriz de puntuación BLOSUM62 (véase Henikoff y Henikoff (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:10915), (B) de 50, expectancia (E) de 10, M=5, N=4 y una comparación de ambas hebras.

Preferiblemente, el "porcentaje de identidad de secuencia" se determina comparando dos secuencias óptimamente alineadas a lo largo de una ventana de comparación de al menos 20 posiciones, donde la porción de la secuencia de polinucleótido o polipéptido de la ventana de comparación puede comprender adiciones o deleciones (es decir, espacios) de 20 por ciento o menos, normalmente de 5 a 15 por ciento, o de 10 a 12 por ciento, en comparación con las secuencias de referencia (que no comprende adiciones ni deleciones) para el alineamiento óptimo de las dos secuencias. El porcentaje se calcula determinando el número de posiciones en las cuales se encuentran bases de ácido nucleico o residuos de aminoácido idénticos en ambas secuencia para dar el número de posiciones emparejadas, dividiendo el número de posiciones emparejadas por el número total de posiciones de la secuencia de referencia (esto es, el tamaño de la ventana) y multiplicando los resultados por 100 para dar el porcentaje de identidad de las secuencias.

Por consiguiente, las proteínas de fusión, y los polinucleótidos que las codifican de la presente invención pueden comprende secuencias de polinucleótidos y polipéptidos que tienen una identidad sustancial con las secuencias descritas en la presente memoria, por ejemplo aquellas que comprenden una identidad de secuencia de al menos 50%, preferiblemente una identidad de secuencia de al menos 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% o superior en comparación con una secuencia de polinucleótido o polipéptido de esta invención utilizando los métodos descritos en la presente memoria, (p. ej., análisis BLAST utilizando parámetros convencionales, como se describe más abajo). Un experto en esta técnica reconocerá que estos valores se pueden ajustar apropiadamente para determinar la identidad correspondiente de las proteínas codificadas por dos secuencias de nucleótidos teniendo en cuenta la degeneración del código genético, la similitud de los aminoácidos, el posicionamiento del marco de lectura y similares.

También se describen en la presente memoria polinucleótidos y polipéptidos aislados que comprenden diferentes longitudes de tramos contiguos de secuencia idéntica o complementaria a una o más de las secuencias descritas en la presente memoria. Por ejemplo, esta invención 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 una o más secuencias descritas en la presente memoria así como todas las longitudes intermedias. Se entenderá fácilmente que "longitudes intermedias", en este contexto, significa cualquier longitud entre los valores citados, tales como 16, 17, 18, 19, etc.; 21, 22, 23, etc.; 30, 31, 32, etc.; 50, 51, 52, 53, etc.; 100, 101, 102, 103, etc.; 150, 151, 152, 153, etc.; incluyendo todos los enteros de 200 a 500; de 500 a 1.000, y similares.

Los polinucleótidos de la presente invención, o sus fragmentos, con independencia de la longitud de la propia secuencia codificante, se pueden combinar con otras secuencias de ADN, tales como promotores, señales de poliadenilación, sitios de enzimas de restricción adicionales, sitios de clonación múltiple, otros segmentos codificantes, y similares, de manera que su longitud total puede variar considerablemente. Por lo tanto se contempla que se puede emplear un fragmento de ácido nucleico de casi cualquier longitud, estando limitada preferiblemente la longitud total por la facilidad de preparación y uso en el protocolo de ADN recombinante pretendido. Por ejemplo, se contempla que sean útiles en muchas implementaciones de esta invención segmentos de ADN ilustrativos con longitudes totales de aproximadamente 10.000, aproximadamente 5.000, aproximadamente 3.000, aproximadamente 1.000, aproximadamente 500, aproximadamente 200, aproximadamente 100, aproximadamente 50 pares de bases de longitud, y similares, (incluyendo todas las longitudes intermedias).

También se describen en la presente memoria polinucleótidos que son capaces de hibridar en condiciones moderadamente restrictivas con una secuencia de polinucleótidos proporcionada en la presente memoria, o un fragmento de la misma, o una secuencia complementaria de la misma. Los mecanismos de hibridación son bien conocidos en la técnica de la biología molecular. Con fines ilustrativos, las condiciones moderadamente restrictivas adecuadas para someter a ensayo la hibridación de un polinucleótido de esta invención con otros polinucleótidos incluyen prelavado en una solución de 5 X SSC, SDS al 0,5%, EDTA 1,0 mM (pH 8,0); hibridación a 50°C-65°C, 5 X SSC, durante la noche; seguido de lavado dos veces a 65°C durante 20 minutos con cada uno de 2X, 0,5X y 0,2X SSC que contiene SDS al 0,1%.

Por otra parte, los expertos normales en la técnica apreciarán que, como resultado de la degeneración del código genético, existen 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. Sin embargo, los polinucleótidos que varían debido a diferencias en el uso de codones se contemplan específicamente en la presente invención. Además, los alelos de los genes que comprenden las secuencias de polinucleótidos proporcionadas en la presente memoria están dentro del alcance de la presente invención. Los alelos son genes endógenos que están alterados 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 necesitan, tener una estructura o una función alterada. Los alelos pueden ser identificados utilizando técnicas convencionales (tales como hibridación, amplificación y/o comparación de secuencias de bases de datos).

"Polipéptidos" según se describe en la presente memoria también incluye polipéptidos combinados, también referidos como proteínas de fusión. Un "polipéptido combinado" es un polipéptido que comprende al menos una de las porciones inmunogénicas anteriores y una o más secuencias de *Leishmania* inmunogénicas adicionales, que están unidas a través de un enlace peptídico a una cadena de aminoácidos única. Las secuencias se pueden unir directamente (es decir, sin aminoácidos intermedios) o se pueden unir por medio de una secuencia conectora (por ejemplo, Gly-Cys-Gly) que no disminuye significativamente las propiedades inmunogénicas de los polipéptidos componentes.

Las proteínas de fusión se pueden preparar generalmente utilizando técnicas convencionales, incluyendo la conjugación química. Preferiblemente, una proteína de fusión es expresada como una proteína recombinante, permitiendo la producción de niveles incrementados, con respecto a una proteína no fusionada, en un sistema de expresión. Brevemente, las secuencias de ADN que codifican los componentes polipeptídicos se pueden ensamblar por separado, y ligar 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 conector peptídico, al extremo 5' de una secuencia de ADN que codifica el segundo componente polipeptídico de manera que los marcos de lectura de las secuencias estén en marco. Esto permite la traducción a una única proteína de fusión que conserva la actividad biológica de ambos componentes polipeptídicos.

Se puede emplear una secuencia conectora peptídica para separar el primer y el segundo componentes polipeptídicos una distancia suficiente para asegurar que cada polipéptido se pliega en sus estructuras secundaria y terciaria. Dicha secuencia conectora peptídica se incorpora a la proteína de fusión utilizando mecanismos convencionales bien conocidos en la técnica. Se pueden elegir secuencias conectoras peptídicas adecuadas basándose en los siguientes factores: (1) su capacidad para adoptar una conformación extendida flexible; (2) su incapacidad para adoptar una estructura secundaria que pueda interaccionar con epítopos funcionales en el primer y el segundo polipéptidos; y (3) la carencia de residuos hidrófobos o cargados que puedan reaccionar con los epítopos funcionales del polipéptido. Las secuencias conectoras peptídicas preferidas contienen residuos de Gly, Asn y Ser. También se pueden utilizar otros aminoácidos neutros próximos, tales como Thr y Ala en la secuencia conectora.

Las secuencias de aminoácidos que se pueden emplear de manera ventajosa como conectores incluyen aquellas descritas por Maratea et al., *Gene 40*:39-46, 1985; Murphy et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83*:8258-8262, 1986; Patente de los Estados Unidos Núm. 4.935.233 y Patente de los Estados Unidos Núm. 4.751.180. La secuencia conectora puede tener generalmente de 1 a aproximadamente 50 aminoácidos de longitud. No se requieren secuencias conectoras cuando el primer y el segundo polipéptidos tienen regiones de aminoácidos N terminales no esenciales que se pueden utilizar para separar los dominios funcionales y evitar las interferencias estéricas.

Las secuencias de ADN ligadas están conectadas operablemente a elementos reguladores de la transcripción o la traducción adecuados. Los elementos reguladores responsables de la expresión del ADN están localizados solamente 5' con respecto a la secuencia de AN que codifica los primeros polipéptidos. De un modo similar, los codones de terminación requeridos para finalizar la traducción y las señales de terminación de la transcripción solamente están presentes 3' con respecto al segundo polípéptido. Las preparaciones de proteínas de fusión de antígenos de *Leishmania* se describen más abajo en el Ejemplo 19.

En general, los antígenos de *Leishmania* que tienen propiedades inmunogénicas, y las secuencias de ADN que codifican dichos antígenos, se pueden preparar usando cualquiera de una variedad de procedimientos de una o más especies de *Leishmania*, incluyendo, pero no limitadas a, *L. donovani, L. chagasi, L. infantum, L. major, L. amazonensis, L. braziliensis, L. panamensis, L. mexicana, L. tropica y L. guyanensis*. Dichas especies están disponibles, por ejemplo, a partir de la Colección de Cultivos Tipo Americana (ATCC), Rockville, MD. Por ejemplo, los péptidos aislados de moléculas MHC de clase II de macrófagos infectados con una especie de *Leishmania* se pueden utilizar para rescatar los correspondientes antígenos donadores de *Leishmania*. Las moléculas del MHC de clase II son expresadas principalmente por células del sistema inmunitario, incluyendo macrófagos. Estas moléculas presentan péptidos, que tienen generalmente 13-17 aminoácidos de longitud, derivados de antígenos foráneos que se degradan en vesículas celulares. Los antígenos peptídicos unidos son reconocidos por las células T CD4. Por consiguiente, los péptidos foráneos aislados de moléculas MHC clase II de, por ejemplo, macrófagos murinos infectados con *Leishmania,* se puede utilizar para identificar las proteínas de *Leishmania* inmunogénicas.

Brevemente, los péptidos derivados de antígenos de *Leishmania* se pueden aislar comparando el perfil de HPLC de fase inversa de los péptidos extraídos de los macrófagos infectados con el perfil de los péptidos extraídos de células no infectadas. Los péptidos que dan lugar a distintos picos de HPLC únicos para macrófagos infectados se pueden secuenciar después utilizando, por ejemplo, la química de Edman como describen Edman y Berg, en *Eur. J. Biochem*, *80*:116-132 (1967). Un fragmento de ADN correspondiente a una porción de un gen de *Leishmania* que codifica el péptido se puede amplificar después a partir de una genoteca de ADNc de *Leishmania* utilizando un cebador oligonucleotídico efector derivado de la secuencia peptídica y un cebador oligo dT antisentido. El fragmento de ADN resultante se puede usar después como sonda para escrutar una genoteca d *Leishmania* para determinar un ADNc completo o un clon genómico que codifica el antígeno de *Leishmania*. Tales escrutinios se pueden realizar generalmente usando mecanismos bien conocidos por los expertos normales en la técnica, tales como los descritos en Sambrook et al., *Molecular Cloning:. A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratories, Cold Spring Harbor, NY (1989).

Se puede utilizar este enfoque para identificar un antígeno de 23 kD de *Leishmania donovani* (referido en la presente memoria como Ldp23). La secuencia de un polinucleótidos que codifica Ldp23 se proporciona en el SEC ID NO: 3 y la secuencia de aminoácidos de Ldp23 se proporciona en el SEC ID NO: 4. Utilizando los métodos descritos en la presente memoria, se ha demostrado que Ldp23 induce una respuesta inmunitaria Th1 en células T preparadas a partir de ratones infectados por *Leishmania*.

Alternativamente, una genoteca de expresión de ADNc o genómico de *Leishmania* se pueden escrutar con suero de un individuo infectado por *Leishmania*, utilizando mecanismos bien conocidos por los expertos normales en la técnica. Los polinucleótidos que codifican antígenos reactivos se puede usar después para expresar el antígeno recombinante para la purificación. Las propiedades inmunogénicas de los antígenos de *Leishmania* purificados se pueden evaluar después utilizando, por ejemplo los métodos representativos descritos en la presente memoria.

Por ejemplo, los sueros de ratones infectados por *Leishmania* se pueden utilizar para escrutar una genoteca de ADNc preparada a partir de amastigotas de *Leishmania*. A continuación se pueden expresar los clones reactivos y analizar las proteínas recombinantes para determinar la capacidad para estimular células T o células NK derivadas de individuos inmunes a *Leishmania* (es decir, individuos que tienen evidencia de infección, como se documenta por la reactividad serológica positiva con anticuerpos específicos de *Leishmania* y/o una respuesta DTH específica de *Leishmania*, sin síntomas clínicos de leishmaniasis). Este procedimiento se puede utilizar para obtener un polinucleótidos recombinante que codifica el antígeno de *Leishmania* designado M15. La secuencia de dicho polinucleótido se proporciona en el SEQ ID NO: 1, y la secuencia de aminoácidos de la proteína codificada se proporciona en el SEC ID NO: 2

Se puede utilizar un enfoque similar para aislar un polinucleótido genómico que codifica un antígeno de *Leishmania braziliensis* inmunogénico, referido en la presente memoria como Lbhsp83. Más específicamente, se puede aislar un clon genómico que codifica Lbhsp83 por medio de escrutinio de una genoteca de expresión de *L. braziliensis* con suero de un individuo infectado por *Leishmania*. El ADN que codifica Lbhsp83 es homólogo al gen que codifica la proteína eucariótica de choque térmico de 83 kD. La secuencia de un polinucleótido que codifica casi todo Lbhsp83

se presenta en el SEQ ID NO: 5, y la secuencia de aminoácidos codificada se proporciona en el SEC ID NO: 6. Utilizando los métodos descritos a continuación, se ha encontrado que Lbhsp83 estimula la proliferación, y un perfil de citoquinas mixto Th1 y Th2, en PBMC aisladas de pacientes infectados con *L. braziliensis*. Por consiguiente, Lbhsp83 es un antígeno de *Leishmania* inmunogénico. Se ha encontrado que las regiones de Lbhsp83 que no se conservan con el gen de mamífero son particularmente potentes para la estimulación de células T y la unión de anticuerpos. Tales regiones se pueden identificar, por ejemplo, mediante inspección visual de la comparación de secuencias proporcionada en la Figura 19.

Este enfoque también se puede utilizar para aislar un polinucleótido que codifica un antígeno inmunogénico de *L. tropica* de 210 kD, referido en la presente memoria como Lt-210. La preparación y caracterización de Lt-210, y las porciones inmunogénicas del mismo (tales como Lt-1 y la repetición inmunogénica y las secuencias no repetidas), se describe con detalle en la Solicitud de Patente de los Estados Unidos Núm. de Serie 08/511.872, presentada el 4 de agosto 1995. La secuencia de un polinucleótido que codifica Lt-1 se proporcionan en el SEQ ID NO: 7 y la secuencia de aminoácidos codificada se presenta en el SEQ ID NO: 8.

El enfoque anterior se puede utilizar además para aislar un polinucleótido que codifica un antígeno de *L. braziliensis* referido en la presente memoria como LbeIF4A. En resumen, dicho clon se puede aislar por escrutinio de una genoteca de expresión de *L. braziliensis* con sueros obtenidos de un paciente afectado con leishmaniasis mucosa, y analizando los antígenos reactivos para determinar la capacidad para estimular respuestas proliferativas y producción de citoquina Th1 preferente en PBMC aisladas de pacientes infectados con *Leishmania*, como se describe a continuación. La preparación y caracterización de LbeIF4A se describe con detalle en las Solicitudes de Patente de los Estados Unidos con los Núms. de Serie 08/454.036 y 08/488.386, que son continuaciones en parte de la Solicitud de Patente de los Estados Unidos con el Núm. de Serie 08/232.534, presentada el 22 de abril 1994. La secuencia de un polinucleótido que codifica LbeIF4A se proporciona en el SEC ID NO: 9 y la secuencia de aminoácidos codificada se presenta en el SEQ ID NO: 10. Los homólogos de LbeIF4A, tales como el encontrado en *L. major*, también se puede aislar utilizando este enfoque, y están dentro del alcance de la presente invención.

Las composiciones descritas en la presente memoria también pueden contener, o alternativamente, contienen antígenos solubles de *Leishmania*. Según se utiliza en la presente memoria, "antígenos soluble de *Leishmania*" hace referencia a una mezcla de por lo menos 8 antígenos de *Leishmania* diferentes que se pueden aislar a partir del sobrenadante de promastigotas de *Leishmania* de cualquier especie cultivada durante 8-12 horas en medio libre de proteínas. En resumen, los organismos se cultivan hasta la fase logarítmica tardía en medio complejo con suero hasta que llegan a una densidad de 2-3 x 10^7 organismos viables por mL de medio. Los organismos se lavan cuidadosamente para eliminar los componentes del medio y se resuspenden a 2-3 x 10^7 organismos viables por ml de medio libre de suero definido que consiste en un medio con partes iguales de RPMI 1640 y medio 199, ambos de Gibco BRL, Gaithersburg, MD. Después de 8-12 horas, el sobrenadante que contiene antígenos solubles de *Leishmania* se separa, se concentra 10 veces y se somete a diálisis frente a solución salina tamponada con fosfato durante 24 horas. La presencia de al menos ocho antígenos diferentes dentro de la mezcla de antígenos de *Leishmania* se puede confirmar utilizando SDS-PAGE (es decir, a través de la observación de por lo menos 8 bandas diferentes). Las propiedades inmunogénicas de los antígenos solubles de *Leishmania* se pueden confirmar mediante la evaluación de la capacidad de la preparación para producir una respuesta inmunitaria en cultivos de células de ganglios linfáticos y/o células mononucleares de sangre periférica (PBMC) aisladas de individuos infectados *Leishmania* actualmente o previamente. Dicha evaluación puede realizarse como se describe a continuación.

Se pueden aislar los antígenos individuales presentes en la mezcla de antígenos solubles de *Leishmania* inmunizando ratones o conejos con sobrenadante de cultivo de *Leishmania*, que contiene antígenos solubles, y empleando el suero resultante para escrutar una genoteca de expresión de ADNc de *Leishmania* como se describe con detalle a continuación. Este procedimiento se puede utilizar para aislar polinucleótidos recombinantes aislados que codifican los antígenos de *L. major* referidos en la presente memoria como Lmsp1a, Lmsp9a y MAPS-1. Las secuencias de ADN que codifican Lmsp1a, Lmsp9a y MAPS-1A se proporcionan en los SEQ ID NO: 19, 21 y 23, respectivamente, presentándose las correspondientes secuencias de aminoácidos pronosticadas en los SEQ ID NO: 20, 22 y 24, respectivamente. De manera similar, los sueros de ratones o conejos inmunizados con sobrenadante de cultivo de *L. major* pueden ser utilizados para escrutar una genoteca de ADN genómico de *L. major*. Como se detalla más abajo, este procedimiento se puede utilizar para aislar polinucleótidos que codifican los antígenos de *L. major* referidos en la presente memoria como LmgSP1, LmgSP3, LmgSP5, LmgSP8, LmgSP9, LmgSP13, LmgSP19, y polinucleótidos que codifican los antígenos de *L. chagasi* LcgSP1, LcgSP3, LcgSP4, LcgSP8, y LcgSP10. Las secuencias de ADN que codifican estos antígenos se proporcionan en los SEQ ID NO: 29-35 y 44-48, respectivamente, proporcionándose las secuencias de aminoácidos correspondientes en los SEQ ID NO: 36-42 y 49-53. Los antígenos de *L. major* referidos en la presente memoria como 1G6-34, 1E6-44, 4A5-63, 1B11-39, 2A10-37, 4G2-83, 4H6-41 y 8G3-100 pueden ser aislados por medio de la clonación para la expresión de las células T CD4+ tal como se describe a continuación. Las secuencias de ADN que codifican estos antígenos se proporcionan en los SEQ ID NO: 72-79, respectivamente, proporcionándose las correspondientes secuencias de aminoácidos predichas en los SEQ ID NO: 80-87. Las propiedades inmunogénicas de los antígenos de *Leishmania* aislados pueden evaluarse utilizando, por ejemplo, los métodos representativos descritos en la presente memoria.

Independientemente del método de preparación, los antígenos descritos en la presente memoria son inmunogénicos. En otras palabras, los antígenos (y porciones inmunogénicas de los mismos) son capaces de provocar una respuesta inmunitaria en cultivos de células de ganglios linfáticos y/o células mononucleares de sangre periférica (PBMC) aisladas de individuos infectados actualmente o previamente por *Leishmania*. Más específicamente, los antígenos y las porciones inmunogénicas de los mismos, tienen la capacidad de inducir la proliferación de células T y/o provocar una respuesta de citoquinas de tipo Th1 dominante (por ejemplo, producción de IL-2, IFN-γ, y/o TNF-α por las células T y/o las células NK; y/o 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 por *Leishmania* puede estar aquejado de una forma de leishmaniasis (tal como subclínica, cutánea, mucosa o visceral activa) o puede ser asintomática. Dichos individuos pueden identificarse utilizando métodos conocidos por los expertos normales en la técnica. Los individuos con leishmaniasis pueden ser identificados basándose en hallazgos clínicos asociados con por lo menos uno de los siguientes: aislamiento de parásitos de lesiones, una prueba cutánea positiva con producto lisado de *Leishmania* o una prueba serológica positiva. Los individuos asintomáticos son individuos infectados que no presentan signos ni síntomas de la enfermedad. Tales individuos pueden ser identificados basándose en una prueba serológica positiva y/o una prueba cutánea con producto 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 sangre periférica, abarca tanto mezclas de células como preparaciones de uno o más tipos de células purificadas. Las PBMC se pueden aislar mediante métodos conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, las PBMC se pueden aislar por centrifugación de densidad a través de, por ejemplo, Ficoll™ (Winthrop Laboratories, Nueva York). Los cultivos de ganglios linfáticos generalmente se pueden preparar mediante la inmunización de ratones BALB/c (por ejemplo, en la almohadilla plantar posterior) con promastigotas de *Leishmania* emulsionadas en coadyuvante completo de Freund. Los ganglios linfáticos de drenaje se puede escindir después de la inmunización y las células T pueden purificarse en una columna de anti-Ig de ratón para eliminar las células B, seguido por 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 una biopsia o una extirpación quirúrgica de un ganglio linfático.

La capacidad de un polipéptido (por ejemplo, un antígeno de *Leishmania* o una porción u otra variante del mismo) para inducir una respuesta en PBMC o cultivos de células de ganglios linfáticos se puede evaluar 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 x 10^5 células varía de aproximadamente 10 ng a aproximadamente 100 µg, y preferiblemente es de aproximadamente 1-10 microgramos. La incubación del polipéptido con las células se realiza normalmente a 37° C durante aproximadamente 1-3 días. Después de la incubación con el polipéptido, las células se analizan para determinar una respuesta apropiada. Si la respuesta es una respuesta proliferativa, se puede emplear cualquiera de una variedad de mecanismos bien conocidos por los expertos normales en la técnica. Por ejemplo, se pueden exponer las células a un pulso de timidina radioactiva y medir la incorporación del marcador al ADN celular. En general, un polipéptido que da como resultado al menos un aumento de tres veces en la proliferación por encima del fondo (es decir, la proliferación observada para las células cultivadas sin polipéptido) se considera capaz de inducir la proliferación.

Alternativamente, la respuesta que se va a medir puede ser la secreción de una o más citoquinas (tales como el interferón γ (IFN-γ), interleuquina 4 (IL-4), interleuquina 12 (p70 y/o p40), interleuquina 2 (IL-2) y/o factor de necrosis tumoral α (TNF-α)) o el cambio en el nivel de ARNm que codifica uno o más citoquinas específicas. En particular, la secreción de interferón γ, interleuquina 2, factor de necrosis tumoral α y/o interleuquina 12 es indicativa de una respuesta Th1, que es responsable del efecto protector contra *Leishmania*. Los análisis para cualquiera de las citoquinas anteriores generalmente se pueden realizar utilizando métodos conocidos por los expertos normales en la técnica, tales como un ensayo de inmunoabsorción con enzima ligada (ELISA). Los anticuerpos adecuados para su uso en tales análisis pueden obtenerse a partir de una variedad de fuentes tales como Chemicon, Temucula, CA y PharMingen, San Diego, CA, y generalmente se pueden usar de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El nivel de ARNm que codifica uno o más citoquinas específicas puede evaluarse, por ejemplo, mediante amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR). En general, un polipéptido que es capaz de inducir, en una preparación de aproximadamente 1-3 x 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.

Las porciones inmunogénicas de los antígenos descritos en la presente memoria se pueden preparar e identificar usando mecanismos bien conocidos, tales como los que resumen Paul, en Fundamental Immunology , 3ª ed., 243-247 (Raven Press, 1993) y las referencias allí citadas. Tales técnicas incluyen polipéptidos de escrutinio derivados del antígeno para determinar las propiedades inmunogénicas utilizando, por ejemplo, los mecanismos representativos descritos en la presente memoria. Una porción inmunogénica de un polipéptido es una porción que, en tales análisis representativos, genera una respuesta inmunitaria (por ejemplo, proliferación y/o producción de citoquinas) que es sustancialmente similar a la generada por el antígeno completo. En otras palabras, una porción inmunogénica de un antígeno puede generar al menos aproximadamente 25%, y preferiblemente al menos aproximadamente 50%, de la respuesta generada por el antígeno completo en los análisis modelo descritos en la presente memoria.

Las porciones y otras variantes de antígenos inmunogénicos de *Leishmania* pueden ser generadas por medios sintéticos o recombinantes. Los polipéptidos sintéticos que tienen menos de aproximadamente 100 aminoácidos, y generalmente menos de aproximadamente 50 aminoácidos, pueden generarse utilizando mecanismos bien conocidos por los expertos normales en la técnica. Por ejemplo, tales polipéptidos pueden sintetizarse utilizando cualquiera de los mecanismos en fase sólida disponibles en el mercado, tales como el método de síntesis en fase sólida de Merrifield, donde los aminoácidos se añaden sucesivamente a una cadena de aminoácidos en crecimiento. Véase Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* 85:2149-2146, 1963. El equipo para la síntesis automatizada de polipéptidos está disponible en el mercado disponible de proveedores tales como Perkin Elmer/Applied BioSystems Division, Foster City, CA, y puede ser manejado de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Los polipéptidos recombinantes que contienen porciones y/o variantes de un antígeno nativo pueden prepararse fácilmente a partir de una secuencia de ADN que codifica el antígeno. Por ejemplo, los sobrenadantes de sistemas anfitrión/vector adecuados que secretan la proteína recombinante a los medios de cultivo se pueden concentrar primero utilizando un filtro disponible en el mercado. Después de la concentración, el producto concentrado puede ser aplicado a una matriz de purificación adecuada tal como una matriz de afinidad o una resina de intercambio iónico. Finalmente, se pueden emplear una o más etapas de HPLC de fase inversa para purificar adicionalmente una proteína recombinante.

En general, se puede emplear cualquiera de una variedad de vectores de expresión conocidos por los expertos normales en la técnica para expresar los polipéptidos recombinantes de esta invención. Se puede lograr la expresión en cualquier célula anfitriona apropiada que haya sido transformada o transfectada con un vector de expresión que contiene un polinucleótido que codifica un polipéptido recombinante. Las células anfitrionas adecuadas incluyen células de procariotas, de levaduras y de eucariotas superiores. Preferiblemente, las células anfitrionas empleadas son *E. coli*, levadura o una línea celular de mamífero tal como COS o CHO. Las secuencias de ADN expresadas de esta manera pueden codificar antígenos de origen natural, porciones de antígenos de origen natural, u otras variantes de los mismos. Por ejemplo, las variantes de un antígeno nativo pueden prepararse generalmente usando técnicas convencionales, tales como mutagénesis de sitio específico dirigida por oligonucleótidos, y se pueden eliminar secciones de la secuencia de ADN para permitir la preparación de polipéptidos truncados.

También se describen en la presente memoria secuencias de repetición epitópica, o epítopos antigénicos, de un antígeno de *Leishmania*, junto con polipéptidos que comprenden al menos dos de tales epítopos antigénicos contiguos. Según se utiliza en la presente memoria un "epítopo" es una porción de un antígeno que reacciona con sueros de individuos infectados por *Leishmania* (es decir, un epítopo se une específicamente a uno o más anticuerpos presentes en tales sueros). Como se comentó anteriormente, los epítopos de los antígenos descritos en la presente solicitud pueden ser identificados generalmente usando mecanismos bien conocidos por los expertos en la técnica.

En una realización, los epítopos antigénicos de la presente invención comprenden una secuencia de aminoácidos proporcionada en los SEQ ID NO: 43, 56, 57 o 58. Como se comenta con más detalle a continuación, los epítopos antigénicos proporcionados en la presente memoria pueden ser empleados en el diagnóstico y el tratamiento de la infección por *Leishmania*, ya sea solos o combinados con otros antígenos de *Leishmania* o epítopos antigénicos. Los epítopos antigénicos y los polipéptidos que comprenden tales epítopos se pueden preparar por métodos sintéticos, como se describe en general más arriba y con detalle en el Ejemplo 15.

En ciertos aspectos de la presente invención, descritos con detalle a continuación, las proteínas de fusión que comprenden los polipéptidos, epítopos antigénicos y/o antígenos solubles de *Leishmania* se pueden incorporar a composiciones farmacéuticas o vacunas.

Las composiciones farmacéuticas comprenden una o más proteínas de fusión, cada una de las cuales puede contener una o más de las anteriores secuencias (o variantes de las mismas), y un portador fisiológicamente aceptable. Las vacunas, también referidas como composiciones inmunogénicas, comprenden una o más de las proteínas de fusión anteriores y un inmunoestimulador, tal como un coadyuvante (por ejemplo, LbeIF4A, interleuquina 12 u otras citoquinas) o un liposoma (en el que se incorpora el polipéptido). Muchos coadyuvantes contienen una sustancia diseñada para proteger el antígeno de un catabolismo rápido, tal como hidróxido de aluminio o aceite mineral, y un estimulador de las respuestas inmunitarias, tal como lípido A, proteínas derivadas de *Bordetella pertussis* o *Mycobacterium tuberculosis*. Ciertos coadyuvantes son asequibles comercialmente, como por ejemplo Coadyuvante Incompleto y Coadyuvante Completo de Freund (Difco Laboratories, Detroit, MI); Coadyuvante 65 de Merck (Merck and Company, Inc., Rathway, NJ); AS-2 (SmithKline Beecham, Philadelphia, PA); sales de aluminio tales como gel de hidróxido de aluminio (alumbre) o fosfato de aluminio; sales de calcio, hierro o cinc; una suspensión insoluble de tirosina acilada; azúcares acilados; polisacáridos derivatizados catiónicamente o aniónicamente; polifosfacenos; microesferas biodegradables; monofosforil lípido A y quil A. Las citoquinas, tales como GM-CSF, interleuquina 2, 6, 12 y otros factores de crecimiento similares, también se pueden utilizar como coadyuvantes.

En ciertas realizaciones de la invención, la composición coadyuvante es preferiblemente una que induce una respuesta inmunitaria predominantemente de tipo Th1. Algunos coadyuvante preferidos para lograr una respuesta predominantemente de tipo Th1 incluyen, por ejemplo, una combinación de monofosforil lípido A, preferiblemente

monofosforil lípido A 3-des-O-acilado, junto con una sal de aluminio. Los coadyuvantes MPL® son asequibles de Corixa Corporation (Seattle, WA; véanse, por ejemplo, las Patentes de los Estados Unidos Núms. 4.436.727; 4.877;611; 4.866.034 y 4.912.094). Los oligonucleótidos que contienen CpG (en los que el dinucleótido de CpG está desmetilado) también inducen una respuesta predominantemente de tipo Th1. Tales oligonucleótidos son bien conocidos y se describen, por ejemplo, en los documentos WO 96/02555, WO 99/33488 y en las Patentes de los Estados Unidos Núms. 6.008.200 y 5.856.462. Las secuencias de ADN inmunoestimuladoras también son descritas, por ejemplo, por Sato et al., *Science 273*:352, 1996. Otro coadyuvante preferido comprende una saponina, tal como Quil A, o sus derivados, incluyendo QS21 y QS7 (Aquila Biopharmaceuticals Inc., Framingham, MA); Escina; Digitonina; o saponinas de *Gypsophila o Chenopodium quinoa*. Otras formulaciones preferidas incluyen más de una saponina en las combinaciones coadyuvantes de la presente invención, por ejemplo combinaciones de al menos dos del siguiente grupo que comprende QS21, QS7, Quil A, β-escina, o digitonina.$$$

Alternativamente, las formulaciones de saponina se pueden combinar con vehículos para vacunas compuestos por quitosana u otros polímeros policatiónicos, partículas de polilactida y polilactida-co-glicólido, matriz polimérica basada en poli-N-acetil glucosamina, partículas compuestas por polisacáridos o polisacáridos modificados químicamente, liposomas y partículas basadas en lípidos, partículas compuestas por monoésteres de glicerol, etc. Las saponinas también se pueden formular en presencia de colesterol para formar estructuras particuladas tales como liposomas o ISCOM. Además, las saponinas se pueden formular junto con un éster o éster de polioxietilano, en una solución o suspensión no particulada, o en una estructura particulada tal como un liposoma paucilamelar o ISCOM. Las saponinas también se pueden formular con excipientes tales como Carbopol® para incrementar la viscosidad, o se pueden formular en forma de polvo seco con un excipiente en polvo tal como lactosa.

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

Otro sistema coadyuvante mejorado implica la combinación de un oligonucleótido que contiene CpG y un derivado de saponina, concretamente la combinación de CpG y QS21, se describe en el documento WO 00(09159. Preferiblemente la formulación comprende adicionalmente una emulsión de aceite en agua y tocoferol.

Los coadyuvantes ilustrativos adicionales para su uso en las composiciones de la invención incluyen Montanide ISA 720 (Serpic, Francia), SAF (Chiron, California, Estados Unidos), ISCOMS (CSL), MF-59 (Chiron), la serie de coadyuvantes SBAS (p. ej., SBAS-2 o SBAS-4, asequible de SmithKline Beecham, Rixensart, Bélgica), Enhanzayn® (Corixa, Hamilton, MT), RC-529 (Corixa, Hamilton, MT) y otros aminoalquil glucosaminida 4-fosfatos (AGP), tales como los descritos en la Patente de los Estados Unidos Núm.6.113.918 y la Solicitud de la Patente de los Estados Unidos pendiente Núm. de Serie 09/074.720, cuyas descripciones se incorporan a la presente memoria como referencia en su totalidad, y coadyuvantes de éter de polioxietileno tales como los descritos en el documento WO 99/52549A1.

Otros coadyuvantes preferidos incluyen moléculas coadyuvantes de fórmula general

(I):$HO(CH_2CH_2O)_n$-A-R,

donde, n es 1-50, A es un enlace o –C(O)-, R es alquilo C_1-C_{50} o Fenilalquilo C_1-C_{50}.

En la presente memoria se describe una formulación de vacuna que comprende un éter de polioxietileno de fórmula general (I), donde *n* está entre 1 y 50, preferiblemente 4-24, muy preferiblemente 9; el componente *R* es alquilo C_1-C_{50}, preferiblemente C_4-C_{20} y muy preferiblemente alquilo C_{12}, y *A* es un enlace. La concentración de los éteres de polioxietileno deben estar en el intervalo de 0,1-20%, preferiblemente de 0,1-10%, y muy preferiblemente en el intervalo de 0,1-1%. Los éteres de polioxietileno preferidos se seleccionan del siguiente grupo: éter polioxietilen-4-laurílico, éter polioxietilen-9-estearílico, éter polioxietilen-8-estearílico, éter polioxietilen-4-laurílico, éter polioxietilen-35-laurílico, y éter polioxietilen-23-laurílico. Los éteres de polioxietileno, tales como el éter polioxietilen-laurílico se describen en el Índice Merck (12ª edición: entrada 7717). Estas moléculas coadyuvantes se describen en el documento WO 99/52549. El éter de polioxietileno de acuerdo con la fórmula general (I) anterior se puede combinar, si se desea, con otro coadyuvante. Por ejemplo, una combinación coadyuvante favorable es preferiblemente con CpG como se describe en la Solicitud de Patente pendiente del Reino Unido GB 9820956.2.

Las vacunas pueden contener adicionalmente un vehículo de liberación, tal como una microesfera biodegradable (descrita, por ejemplo, en las Patentes de los Estados Unidos Núms. 4.897.268 y 5.075.109). Las composiciones farmacéuticas y vacunas dentro del alcance de la presente invención también pueden contener otros antígenos de *Leishmania*, ya sea incorporados a un polipéptido combinado o presente en uno o más polipéptidos separados.

Alternativamente, una composición farmacéutica o vacuna puede contener un inmunoestimulador tal como, un coadyuvante (p. ej., LbelF4, interleuquina 12 u otras citoquinas) o ADN que codifica tales intensificadores, y ADN que codifica uno o más de los polipéptidos como se ha descrito anteriormente, de tal manera que el polipéptido se

genera *in situ*. En tales composiciones farmacéuticas y vacunas, el ADN puede estar presente en cualquiera de una variedad de sistemas de liberación conocidos por los expertos normales en la técnica, incluyendo sistemas de expresión de ácidos nucleicos, bacterias y sistemas de expresión virales. Los sistemas de expresión de ácidos nucleicos adecuados contienen las secuencias de ADN necesarias para la expresión en el paciente (tales como un promotor y una señal de terminación adecuados). Los sistemas de liberación bacterianos implican la administración de una bacteria (tal como *Bacillus de Calmette-Guerrin*) que expresa una porción inmunogénica del polipéptido en su superficie celular. En una realización preferida, el ADN puede ser introducido usando un sistema de expresión viral (por ejemplo, vaccinia u otro virus de la viruela, retrovirus, o adenovirus), que puede implicar el uso de un virus de replicación competente, no patógeno (defectuoso). Los mecanismos para incorporar ADN en tales sistemas de expresión son bien conocidos por los expertos normales en la técnica. El ADN también puede estar "desnudo", como describen, por ejemplo, Ulmer et al., en *Science* 259:1745-1749 (1993) y revisado por Cohen, *Science* 259:1691-1692 (1993). La absorción de ADN desnudo se puede aumentar revistiendo perlas biodegradables con ADN, que son eficazmente transportadas a las células.

Si bien se puede emplear cualquier portador adecuado conocido por los expertos normales en la técnica en las composiciones farmacéuticas de esta invención, el tipo de portador variará dependiendo del modo de administración. Para la administración parenteral, tal como inyección subcutánea, el portador preferiblemente comprende agua, solución salina, alcohol, una grasa, una cera o un tampón. Para la administración oral, se puede emplear cualquiera de los portadores anteriores o un portador sólido, como manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina de sodio, talco, celulosa, glucosa, sacarosa y carbonato de magnesio. Las microesferas biodegradables (por ejemplo, poliláctico-galactido) también se pueden emplear como portadores para las composiciones farmacéuticas de esta invención. Las microesferas biodegradables adecuadas se describen, por ejemplo, en las Patentes de los Estados Unidos. Núms. 4.897.268 y 5.075.109.

Cualquiera de una variedad de coadyuvantes se puede emplear en las vacunas de esta invención para potenciar no específicamente la respuesta inmunitaria. La mayoría de los coadyuvantes contienen una sustancia diseñada para proteger el antígeno de catabolismo rápido, tal como hidróxido de aluminio o aceite mineral, y un estimulador inespecífico de las respuestas inmunitaria, tal como lípido A, *Bordetella pertussis*, o *Mycobacterium tuberculosis*. Los coadyuvantes adecuados están disponibles en el mercado como, por ejemplo, el Coadyuvante Incompleto y el Coadyuvante Completo de Freund (Difco Laboratories, Detroit, MI), Coadyuvante 65 de Merck (Merck and Company, Inc., Rahway, NJ), alumbre, microesferas biodegradables, monofosforil lípido A y quil A. Los coadyuvantes preferidos incluyen LbeIF4A, IL-12 y otras citoquinas tales como IFN-γ o factor estimulador de colonias de granulocitos - macrófagos (GM-CSF). En virtud de su capacidad para inducir una respuesta inmunitaria Th1 exclusiva, es particularmente preferido el uso de LbeIF4A, y variantes del mismo, como coadyuvante en las vacunas de la presente invención.

En una realización preferida, las composiciones de la presente invención incluyen múltiples polipéptidos seleccionados con el fin de proporcionar una protección mejorada contra una variedad de especies de *Leishmania*. Tales polipéptidos se pueden seleccionar basándose en las especies de origen del antígeno nativo o basándose en un alto grado de conservación de la secuencia de aminoácidos entre diferentes especies de *Leishmania*. Una combinación de polipéptidos individuales puede ser particularmente eficaz como vacuna profiláctica y/o terapéutica debido a que (1) la estimulación de la proliferación y/o la producción de citoquinas por polipéptidos individuales puede ser aditiva, (2) la estimulación de la proliferación y/o la producción de citoquinas por una combinación de polipéptidos individuales pueden ser sinérgicas, (3) una combinación de polipéptidos individuales puede estimular los perfiles de citoquinas de tal forma que sean complementarios entre sí y/o (4) los polipéptidos individuales pueden ser complementarios entre sí cuando algunos de ellos se expresan más abundantemente en las especies individuales o cepas de *Leishmania* responsables de la infección. Una combinación concreta contiene polipéptidos que comprenden porciones inmunogénicas de M15, Ldp23, Lbhsp83, Lt-1 y LbeIF4A. Alternativamente, o además, la combinación puede incluir uno o más polipéptidos que comprenden porciones inmunogénicas de otros antígenos de *Leishmania* descritos en la presente memoria, y/o antígenos solubles de *Leishmania*.

En otra realización, las composiciones de la presente invención incluyen combinaciones de los polipéptidos descritos más arriba empleados con una variedad de coadyuvantes, tales como IL-12 (proteína o ADN) para conferir una respuesta protectora contra una variedad de especies de *Leishmania*.

En otra realización más, las composiciones de la presente invención incluyen constructos de ADN de las diferentes especies de *Leishmania* solos o combinados con una variedad de coadyuvantes, tales como IL-12 (proteína o ADN) para conferir una respuesta protectora contra una variedad de especies de *Leishmania*.

Las composiciones farmacéuticas y vacunas anteriores pueden utilizarse, por ejemplo, para inducir inmunidad protectora contra *Leishmania* en un paciente, tal como un ser humano o un perro, para prevenir la *leishmaniasis*. Las dosis apropiadas y los métodos de administración para estos propósitos se describen en detalle a continuación.

Las composiciones farmacéuticas y vacunas descritas en la presente memoria también se pueden utilizar para estimular una respuesta inmunitaria, que puede ser celular y/o humoral, en un paciente. Para pacientes infectados por *Leishmania*, las respuestas inmunitarias que pueden generarse incluyen una respuesta inmunitaria Th1 preferente (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). Para pacientes no infectados, la respuesta inmunitaria puede ser la producción de interleuquina 12 y/o interleuquina 2, o la estimulación de las células T gamma delta. En cualquier categoría de paciente, la respuesta estimulada puede incluir la producción de IL-12. Dichas respuestas también pueden ser logradas en muestras biológicas de PBMC o de sus componentes derivados de individuos infectados por *Leishmania* o no infectados. Como se señaló anteriormente, los análisis para determinar cualquiera de las citoquinas anteriores generalmente se pueden realizar utilizando métodos conocidos por los expertos normales en la técnica, tales como un análisis de inmunoabsorción con enzima ligada (ELISA).

Las composiciones farmacéuticas y vacunas adecuadas para uso en este aspecto de la presente invención son aquellas que contienen al menos una proteína de fusión de la presente invención.

Las composiciones farmacéuticas y vacunas descritas en la presente memoria también se pueden usar para tratar a un paciente que padece una enfermedad sensible a la estimulación de IL-12. El paciente puede ser cualquier animal de sangre caliente, tal como un ser humano o un perro. Dichas enfermedades incluyen infecciones (que pueden ser, por ejemplo, bacterianas, virales o protozoicas) o enfermedades tales como el cáncer. Por ejemplo, la enfermedad puede ser la leishmaniasis, y el paciente puede mostrar síntomas clínicos o puede ser asintomático. En general, la capacidad de respuesta de una enfermedad particular a la estimulación por IL-12 puede determinarse evaluando el efecto del tratamiento con una composición farmacéutica o vacuna de la presente invención sobre correlaciones clínicas de inmunidad. Por ejemplo, si el tratamiento da como resultado una mayor respuesta Th1 o la conversión de un perfil Th2 en Th1, con una mejora clínica complementaria en el paciente tratado, la enfermedad es sensible a la estimulación por IL-12. La administración de polipéptido puede ser como se describe a continuación, o puede prolongarse durante un período de tiempo más largo, dependiendo de la indicación. Preferiblemente, los polipéptidos empleados en las composiciones farmacéuticas y vacunas son complementarios, como se ha descrito anteriormente. Una combinación concreta contiene polipéptidos que comprenden porciones inmunogénicas de M15, Ldp23, Lbhsp83, Lt-1 y LbeIF4A, Lmsp1a, Lmsp9a y MAPS-1A. También se pueden emplear antígenos solubles de *Leishmania*.

Las rutas y frecuencia de administración, así como la dosificación, para los aspectos anteriores de la presente invención variarán de un individuo a otro y se pueden establecer paralelismos con los que actualmente se están utilizando en la inmunización contra otras infecciones, incluyendo infecciones por protozoos, virus y bacterias. En general, las composiciones farmacéuticas y vacunas pueden administrarse por medio de inyección (por ejemplo, intracutánea, intramuscular, intravenosa o subcutánea), intranasalmente (por ejemplo, por aspiración) o por vía oral. Se pueden administrar entre 1 y 12 dosis durante un período de 1 año. Para la vacunación terapéutica (es decir, el tratamiento de un individuo infectado), se administran preferiblemente12 dosis, a intervalos de un mes. Para el uso profiláctico, se administran preferiblemente 3 dosis, a intervalos de 3 meses. En cualquier caso, se pueden administrar después periódicamente vacunas de refuerzo. Pueden ser apropiados protocolos alternativos para pacientes individuales. Una dosis adecuada es una cantidad de polipéptido o ADN que, cuando se administra como se ha descrito anteriormente, es capaz de originar una respuesta inmunitaria en un paciente inmunizado suficiente para proteger al paciente de la leishmaniasis durante por lo menos 1 -2 años. En general, la cantidad de polipéptido presente en una dosis (o producido in situ por el ADN en una dosis) varía de aproximadamente 100 ng a aproximadamente 1 mg por kg de anfitrión, normalmente de aproximadamente 10 µg a aproximadamente 100 µg. Los tamaños adecuados de las dosis variarán con el tamaño del paciente, pero típicamente variarán de aproximadamente 0,1 ml a aproximadamente 5 ml.

En otro aspecto, esta invención proporciona composiciones farmacéuticas para su uso en el diagnóstico de la infección por *Leishmania* en un paciente mediante una prueba cutánea. Según se utiliza en la presente memoria, una "prueba cutánea" es cualquier análisis realizado directamente en un paciente en el que se mide una reacción de hipersensibilidad de tipo retardado (DTH) (tal como endurecimiento y enrojecimiento acompañante) después de la inyección intradérmica de uno o más polipéptidos como se ha descrito anteriormente. Esta inyección se puede lograr usando cualquier dispositivo adecuado suficiente para poner en contacto el polipéptido o los polipéptidos con las células dérmicas del paciente, tal como una jeringa de tuberculina o una jeringa de 1 ml. Preferiblemente, la reacción se mide al menos 48 horas después de la inyección, más preferiblemente 72 horas después de la inyección.

La reacción DTH es una respuesta inmunitaria mediada por células, que es mayor en pacientes que han sido expuestos previamente a una prueba con antígeno (es decir, una porción inmunogénica de un polipéptido empleado, o una variante del mismo). La respuesta puede medirse visualmente, utilizando una regla. En general, el endurecimiento que es mayor que aproximadamente 0,5 cm de diámetro, preferiblemente mayor de aproximadamente 1,0 cm de diámetro, es una respuesta positiva, indicativa de infección por *Leishmania*, que puede o no manifestarse como una enfermedad activa.

Las proteínas de fusión de esta invención preferiblemente se formulan, para su uso en una prueba cutánea, en forma de composiciones farmacéuticas que contienen al menos una proteína de fusión y un portador fisiológicamente aceptable, como se ha descrito anteriormente. Tales composiciones contienen típicamente uno o más de los polipéptidos anteriores en una cantidad que varía de aproximadamente 1 µg a 100 µg, preferiblemente de aproximadamente 10 µg a 50 µg en un volumen de 0,1 ml. Preferiblemente, el portador empleado en dichas composiciones farmacéuticas es una solución salina con conservantes apropiados, tales como fenol y/o Tween $80 ™.

Las proteínas de fusión de la invención también se pueden emplear combinadas con uno o más antígenos de *Leishmania* conocidos en el diagnóstico de la leishmaniasis, utilizando, por ejemplo, la prueba cutánea descrita anteriormente. Preferiblemente, las proteínas de fusión se eligen de tal manera que los polipéptidos que comprenden sean complementarios entre sí. Los ejemplos de los antígenos de *Leishmania* conocidos que pueden ser útilmente empleados junto con los polipéptidos de la invención incluyen K39 (Burns et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1993 90:775-779).

Los siguientes ejemplos se ofrecen a modo de ilustración y no a modo de limitación. Cualquiera de los ejemplos que puede estar fuera del alcance de la invención reivindicada se proporciona solamente para ayudar el experto en la técnica a comprender el campo técnico de la invención.

Ejemplo 1

Preparación de M15

Este ejemplo ilustra la preparación de un antígeno de *Leishmania* M15, que tiene la secuencia proporcionada en el SEQ ID NO: 2.

Se escrutó una genoteca de expresión de ADNc de amastigota de *L. major* (cepa Friedlan) preparada en el vector λZAP II (Stratagene, La Jolla, CA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante utilizando suero obtenido de ratones BALB/c infectados con *L. major* (8 semanas después de la inoculación). Se escrutaron aproximadamente 40.000 placas y se purificaron hasta la homogeneidad cuatro clones que expresaban antígenos reactivos por medio de dos rondas subsiguientes de escrutinio de baja densidad. Se escindieron los insertos del fagémido Bluescript de los clones positivos para su análisis adicional. Con posterioridad se utilizó un fragmento de restricción *Eco*RI/*Sst*II desde el extremo 5' de un inserto de ADNc parcial aislado durante la primera ronda de escrutinio (pLmal-1) como sonda para escrutar de nuevo los clones que contenían insertos de ADNc completo. La sonda se marcó para actividad específica alta (~10^9 cpm/µg) con [α-^{32} P]dCTP utilizando el método del cebador al azar y se utilizó para escrutar ~10.000 placas de la genoteca de expresión de *L. major* descrita más arriba. Los clones positivos se compararon mediante digestión con enzimas de restricción y el clon con el inserto más grande (pfll-1) fue elegido para análisis posteriores.

Los análisis de la secuencia de ADN se realizaron en un secuenciador automatizado de Applied Biosystems utilizando polimerasa Taq y terminadores ddNTP acoplados a colorante o cebadores de secuenciación marcados con colorante. La secuencia completa del inserto de 2685 pb se determinó utilizando una combinación de secuenciación dirigida por el cebador y secuenciación de una serie de subclones de deleción con Exonucleasa III solapantes generados utilizando el sistema Erase-a-base (Promega, Madison, WI). La secuencia de este inserto se proporciona en el SEQ ID NO: 1, y la secuencia de aminoácidos deducida se proporciona en el SEQ ID NO: 2.

El inserto completo del clon pfl-1 se escindió por digestión con *Bam*Rl/*Kpn*I y se subclonó en marco en pQE31 digerido con *Bam*HI/*Kpn*I (QUIAGEN) para generar el constructo pM151A. La *E. coli* que contenía este constructo expresó induciblemente altos niveles del antígeno de *L. major* codificado por pfll-1 (denominado M15) con la adición de una etiqueta de 6-histidina en el extremo amino. Se indujo la expresión de la proteína recombinante en cultivos de gran volumen (500 ml) de células anfitrionas de *E. coli* que contenían el constructo pM151A mediante la adición de IPTG 2 mM a la fase de crecimiento semi-logarítmica. El crecimiento continuó durante 4 a 5 horas y después las bacterias se sedimentaron y se lavaron una vez con PBS frío. Las bacterias se resuspendieron en 20 ml de tampón de lisis (Na_2HPO_4 50 mM, pH 8,0, NaCl 300 mM, mercaptoetanol 10 mM) que contenía 20 mg de lisozima y se lisaron mediante una incubación durante 1 hora a 4°C seguido de breve sonicación. El material insoluble se separó por centrifugación a 10.000 xg durante 10 minutos y aunque se encontró que la proteína recombinante se distribuía uniformemente entre las fracciones soluble e insoluble, se desechó el material insoluble en este punto. La proteína recombinante que contenía la etiqueta de histidina amino terminal se purificó por afinidad utilizando resina Ni-NTA (QIAGEN) según las recomendaciones del fabricante. Brevemente, se añadieron 8 ml de resina Ni-NTA resuspendida en tampón de lisis a la fracción de producto lisado soluble y se llevó a cabo la unión con mezclado constante durante 1 hora a 4°C. Después la mezcla se cargó en una columna de flujo por gravedad y el material no unido se dejó fluir. La matriz de Ni-NTA se lavó 3 veces con 25 ml de tampón de lavado (Na_2HPO_4 50 mM, pH 6,0, NaCl 300 mM, β-Mercaptoetanol 10 mM) y el material unido se hizo eluir en 25 ml de tampón de elución (Na_2HPO_4 50 mM pH 5,0, NaCl 300 mM, β-mercaptoetanol 10 mM). El material eluido se sometió después a diálisis frente a 3 cambios de PBS, se filtró en condiciones estériles y se almacenó a -20°C. Se demostró mediante análisis SDS-PAGE que la proteína recombinante purificada estaba libre de cualquier cantidad significativa de proteína de *E. coli*. Se supuso que un pequeño número de bandas de peso molecular más bajo eran los productos proteolíticos del antígeno de *L. major* basándose en su reactividad mediante análisis de transferencia Western. Se generó un antisuero policlonal de título alto contra M15 en conejos mediante inyección subcutánea repetida de proteína recombinante. El análisis de transferencia Western de productos lisados de promastigotas y amastigotas de *L. major* utilizando este antisuero indicó que la proteína se expresaba constitutivamente a través del ciclo de vida del parásito.

Ejemplo 2

Preparación de Ldp23

Este ejemplo ilustra la preparación de un antígeno de *Leishmania* Ldp23, que tiene la secuencia proporcionada en el SEC ID NO: 4.

A. Purificación de Péptidos Asociados con el MHC de Clase II de Macrófagos P388D1 Infectados con *L. donovani*

Para verificar que la infección *in vitro* de macrófagos podría cargar sus moléculas del MHC de clase II con péptidos de parásitos, se llevaron a cabo experimentos iniciales para someter a ensayo la capacidad de la línea celular de macrófagos infectados con *L. donovani* P388D1 para presentar antígenos de parásitos a células T específicas de *L. donovani*. Se eligió ésta línea celular de macrófagos porque tiene el mismo haplotipo H-2 que el ratón BALB/c, que es una cepa de ratón moderadamente susceptible a la infección por *L. donovani* y se seleccionó para llevar a cabo los experimentos *in vivo*. Utilizando una proporción de 3-5 parásitos por célula y una incubación inicial a temperatura ambiente durante 4-6 horas seguido de 37°C durante 24-48 horas, cerca de 90% de los macrófagos fueron infectados. El nivel de expresión de moléculas del MHC clase II, determinado por medio de análisis FACS, indicó que la infección no ocasionaba un efecto sobre los niveles de expresión de MHC de clase II cuando se comparaba con las células de control no infectadas.

Para someter a ensayo la capacidad de las células P388D1 infectadas con *L. donovani* para presentar antígenos de parásitos, se infectaron macrófagos como se indicó anteriormente y se incubaron a 26°C durante 6 horas, y luego a 37°C, durante 24, 48 o 72 horas. En cada uno de estos momentos puntuales las células no adherentes y los parásitos libres se lavaron y las células adherentes se desprendieron mecánicamente, se lavaron y se fijaron con paraformaldehído. Estas células se utilizaron después como células presentadoras de antígenos (APC) para purificar células T de ganglio linfático de ratones BALB/c inmunizados con promastigotas de *L. donovani*. Para generar estas células T específicas anti-*L. donovani*, se inmunizaron ratones BALB/c (H-2^d) de ambos sexos (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) a las 8 a 14 semanas de edad en la almohadilla plantar trasera con 5-10 x 10^6 promastigotas de *L. donovani* emulsionados en coadyuvante completo de Freund (CFA) (Difco Laboratories, Madison, MI) como describen Rodrigues et al., en *Parasite Immunol. 14*:49 (1992). Los ganglios linfáticos de drenaje se extirparon 8 días después de la inmunización y las células T se purificaron en una columna de anti-Ig de ratón para eliminar las células B, como se describen Bunn-Moreno y Campos-Neto, en *J. Immunol. 127*:427 (1981), seguido de un pase a través de una columna Sephadex G10 para separar los macrófagos.

El índice de estimulación se calculó dividiendo las cpm obtenidas para las células cultivadas en presencia de macrófagos P388D1 infectados por las cpm obtenidas para las células cultivadas en presencia de macrófagos no infectados, pero sometidas a las mismas condiciones que los macrófagos infectados. Los resultados que se muestran la Figura 1 indican que los macrófagos P388D1 infectados con *L. donovani* procesan los antígenos de parásitos y que la presentación óptima se produce después de 48 horas de la infección. No se observó estimulación de las células T por los macrófagos no infectados.

Para aislar los péptidos de L. donovani asociados con el MHC de clase II, se infectaron macrófagos P388D1 con promastigotas de *L. donovani* para una incubación inicial de 6 horas a la temperatura ambiente. Después los cultivos se transfirieron a 37°C durante el resto del período de incubación de 48 horas. En una proporción de 3-5 parásitos por macrófago, casi el 90% de los macrófagos fueron infectados después de 24 horas de incubación a 37°C.

Las moléculas del MHC de clase II se purificaron después por afinidad. Se utilizaron aproximadamente 1,5 x 10^{10} macrófagos P388D1 infectados con *L. donovani* o un número igual de no infectados para cada purificación. Las células se recogieron, se lavaron con PBS y se incubaron durante 30 minutos en tampón de lisis frío (PBS, Nonidet P40 al 1%, yodoacetamida 25 mM, azida de sodio al 0,04%, aprotinina 1 mM y PMSF 1 mM). El material insoluble se eliminó por centrifugación a 40.000 g durante 1 hora y el sobrenadante se recicló durante la noche a 4°C sobre una columna de Sefarosa anti-moléculas del MHC de clase II (H-2^d) (columna de Proteína G-Sefarosa a la que se había unido el anticuerpo monoclonal MK-D6). Los sobrenadantes de cultivo de las células de hibridoma MK-D6 (Colección de Cultivos Tipo Americana, Rockville, MD) se emplearon como fuente de anticuerpo monoclonal anti-MHC de clase II (H-2^d). La columna se lavó con 50 ml de tampón de lisis y después con 50 ml de PBS que contenía detergente octilglucopiranosido al 0,5%. Las moléculas unidas se hicieron eluir de la columna con ácido acético 1 M en NaCl al 0,2%. Las moléculas de MHC/péptido se separaron de la IgG (anticuerpo monoclonal MK-D6) utilizando una unidad de filtro Centricon 100 (Amicon Division, WR Grace & Co., Beverly, MA). Los péptidos se disociaron después de las moléculas de clase II mediante la adición de ácido acético 2,5 M, seguido de la separación utilizando una unidad de filtro Centricon 10. La preparación de péptidos resultante, presente en la muestra de bajo peso molecular, se secó después utilizando un concentrador Speed Vac (Savant Instrument Inc., Farmingdale, NY).

Los péptidos se redisolvieron en 200 µl de TFA al 0,05% y se separaron por medio de cromatografía de líquidos de alta resolución fase inversa (RP-HPLC) utilizando una columna C-18 Vydac de 2,1 mm x 25 cm a una velocidad de flujo de 0,15 ml/min empleando un gradiente de acetonitrilo al 1 - 30% (60 min) seguido de un gradiente de 30 a 60% (30 min) y a continuación un gradiente de 60 a 80% (90-110 min). Las células P388D1 no infectadas se trataron de una manera similar para que sirvieran como control de fondo para los péptidos asociados con el MHC de clase II

endógeno. La Figura 2 muestra un experimento representativo; se indican cuatro picos distintos que están presentes solo en el material aislado de los macrófagos infectados (panel B), y no en el material aislado de macrófagos no infectados (panel A).

De las tres extracciones de péptidos independientes, se aislaron veinticinco picos distintos de péptidos de la HPLC de macrófagos infectados con *L. donovani* y se sometieron a análisis de la secuencia de proteínas utilizando la degradación de Edman automática en un secuenciador de proteínas en fase gaseosa Applied Biosystems 477. La secuencia de proteínas y el análisis de los aminoácidos se llevaron a cabo a través de la W.M. Keck Foundation, Biotechnology Resource Laboratory, Universidad de Yale, New Haven, CT. En prácticamente ninguna de la determinaciones, se pudo realizar ninguna asignación para la primera posición. Asimismo, en la mayoría de los casos la definición de los residuos de aminoácido de las posiciones 10-15 se basó en la dominancia cuantitativa de un residuo sobre otros. Utilizando este enfoque, las secuencias obtenidas para varios péptidos mostraron la presencia de 3-6 residuos diferentes en muchos de los 10-15 ciclos de secuencia analizados para cada determinación, reflejando una mezcla de péptidos. Además, no pudieron obtenerse las secuencias para algunos picos debido a que los péptidos fueron bloqueados. No obstante, se determinaron tres secuencias de péptidos. Se buscaron las secuencias de aminoácidos para determinar la identidad con las proteínas de la base de datos GenBank utilizando los programas GENPETP, PIR y SWISSPROT. El análisis de la base de datos de secuencias reveló que uno de los péptidos era muy homólogo a la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa de diversas especies. Otro péptido tuvo homología con el factor de elongación de varias especies, incluyendo *Leishmania*. La tercera secuencia no estaba claramente relacionada con ninguna de las proteínas conocidas, y se muestra a continuación:

XQXPQ(L/K)VFDEXX (SEQ ID NO: 11).

B.Clonación y Secuenciación del Gen Ldp23

Con el fin de recuperar la proteína de *L. donovani* que se había procesado en un péptido asociado con las moléculas del MHC de clase II de macrófagos infectados, se eligió la secuencia de péptidos de origen incierto para guiar la estrategia de clonación para el gen del parásito correspondiente. Inicialmente se amplificó un fragmento de ADN de ADNc de promastigotas de *L. donovani* mediante PCR. El cebador efector fue un oligonucleótido derivado del péptido (5'> GGAATTCCCCInCAGCTInGTInTTCGAC <3') (SEQ ID NO: 12) que contenía un sitio para la endonucleasa de restricción *Eco*RI (subrayado). Las bases se seleccionaron siguiendo el uso de codones preferentes de *L. donovani*, como describieron Langford et al., en *Exp. Parasitol*. *74*:360 (1992). La inosina se utilizó para los residuos de las posiciones 4, 6 y 7 debido a la escasa seguridad de uso de codones para los aminoácidos correspondientes. Además, el ácido L-glutámico carboxi terminal no se incluyó para el diseño del cebador. El cebador antisentido fue un oligonucleótido de poli-timidina (oligo dT, cebador aguas abajo) que contenía un sitio para la endonucleasa de restricción *Xho*I.

El fragmento del gen se amplificó a partir de una preparación de ADNc de promastigotas de *L. donovani* utilizando las siguientes condiciones de reacción: un ciclo de 3 min a 94°C inmediatamente seguido de 35 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 45°C y 1 min a 72°C. El ADNc de *L. donovani* se preparó a partir de 5 x 10^7 formas promastigotas lavadas cosechadas en la fase de crecimiento log (3 días de cultivo). El ADNc se obtuvo utilizando un kit Invitrogen cDNA Cycle® (Invitrogen Co., San Diego, CA). Los cebadores oligonucleotídicos fueron sintetizados por el Laboratorio de Síntesis de ADN, Departamento de Patología, Facultad de Medicina de la Universidad de Yale.

Los productos de la PCR se analizaron mediante electroforesis en gel. Se obtuvo sólo una banda de aproximadamente 300 pb. Este fragmento se clonó y su secuencia confirmó la secuencia del cebador basado en el péptido incluyendo el codón de ácido glutámico, deliberadamente no incluido en la secuencia del cebador.

El fragmento del gen amplificado por PCR se ligó en el vector pCR™ utilizando el sistema de clonación TA (Invitrogen Co., San Diego, CA). Los transformantes se seleccionaron en medio LB que contenía 100 µg/ml de ampicilina y el ADN plasmídico se aisló usando el kit de purificación de ADN Wizard™ Minipreps (Promega Co., Madison, WI). El ADN del inserto se liberó con las enzimas de restricción *Eco*RI y *Xho*I (New England Biolabs, Beverly, MA), se purificó a partir de una electroforesis en gel de agarosa y se marcó con ^{32}P utilizando un método de cebado al azar (Megaprime Labeling Kit, Amersham Life Science, Buckinghamshire, Inglaterra).

Este fragmento de ADN se utilizó como sonda para sondear una genoteca de ADNc de promastigotas de *L. donovani* como describen Skeiky y col., en *Infect. Immun. 62*:1643 (1994). Se escindió un ADNc de aproximadamente 650 pb (Ldp23) del fagémido por escisión *in vivo* utilizando el protocolo de Stratagene. La secuenciación del ADN se realizó utilizando el sistema Sequenase versión 2 (kit de secuenciación de ADN) en presencia o ausencia de 7-desaza-GTP (United States Biochemical Cleveland, OH). La secuencia se proporciona como el SEQ ID NO: 3, y muestra una homología completa con el fragmento de la PCR de 300 pb original. Se identificó un marco de lectura abierto de 525 pb que contenía un codón ATG que sigue las últimas 4 bases de la secuencia líder empalmada y 3 codones de terminación adyacentes a la cola de poli A. Este marco también codifica la secuencia carboxi terminal (KVFDE) (SEQ ID NO: 13) del péptido asociado con el MHC de clase II purificado. El análisis de secuencia de la secuencia de la proteína deducida reveló un sitio de glicosilación potencial (Asn-Cys-Ser) en las posiciones 68-70.

El análisis de la secuencia se realizó utilizando los programas del Grupo de Ordenadores Genéticos de la Universidad de Wisconsin y las bases de datos EMBL de secuencias de proteínas y ADN. La búsqueda de homología del gen Ldp23 con secuencias conocidas no reveló ninguna homología significativa.

C. Expresión Bacteriana y Purificación de la Proteína Recombinante

La proteína donadora del péptido *L. donovani* recombinante se produjo en *E. coli* transformada con el vector de expresión pGEX 2T en el que se había subclonado en marco el gen Ldp23. Se utilizó la PCR para subclonar el gen clonado en marco en el vector de expresión pGEX 2T. Los cebadores que contenían las enzimas de restricción apropiadas, el sitio de iniciación, y los codones de terminación fueron: 5'> GGATCC ATGGTCAAGTCCCACTACATCTGC <3' (SEQ ID NO: 14) para el cebador aguas arriba y 5'> GAATTC AGACCGGATAGAAATAAGCCAATGAAA <3' (SEQ ID NO: 15) para el cebador aguas abajo (los sitios de restricción de *Bam*HI y *Eco*RI están subrayados respectivamente). Las condiciones de la PCR fueron las indicadas anteriormente para la amplificación del fragmento de ADN relacionado con el péptido original. El molde utilizado fue el plásmido pBluescript que contenía el gen clonado a partir de la genoteca de ADNc.

La expresión en exceso de la proteína de fusión recombinante se llevó a cabo mediante crecimiento de *E. coli* transformada (DH5α) e inducción del promotor *tac* con isopropil-β-tiogalactopiranósido (IPTG) 1 mM (Stratagene, La Jolla, CA). Se recogieron las células, se centrifugaron, y se analizaron para determinar la presencia de la proteína de fusión por medio de SDS-PAGE. Se produjo una proteína de fusión glutatión-S-transferasa de 43-44 kD, indicando una proteína de *Leishmania* de aproximadamente 18 kD, ya que la glutatión-S-transferasa (GST) tiene un PM de 26 kD. Sin embargo, la proteína de fusión era muy insoluble y por lo tanto no pudo ser purificada mediante cromatografía de afinidad utilizando una columna de glutatión. El uso de bajas concentraciones de detergentes como SDS, sarcosilo, desoxicolato, y octil-glucopiranósido durante las etapas de extracción fue eficaz para solubilizar la proteína pero desafortunadamente evitó su unión a la columna de glutatión. Otras maniobras, tales como el crecimiento de la *E. coli* y la incubación e inducción del promotor *tac* con IPTG a 33°C, no mejoraron la solubilidad de las proteínas. Sin embargo, la purificación se logró mediante SDS-PAGE preparativa. La banda se visualizó con KCl 0,1 M, se cortó y se sometió a electroelución a partir del gel seguido de diálisis extensiva contra PBS y concentración en filtros Centricon 10.

Se obtuvieron aproximadamente 500 µg de proteína purificada. La proteína purificada se muestra en la Figura 3. En el panel A, la *E. coli* (DH5α) transformada con el vector de expresión pGEX 2T que contenía el gen Ldp23 se cultivó en medio LB y se indujo el promotor *tac* con IPTG durante 3 horas. Las células se sedimentaron, se resuspendieron en tampón de carga y se sometieron a SDS-PAGE (10%) en condiciones reductoras. El gel se tiñó con azul de Coomassie. La calle 1 muestra la *E. coli* no inducida y la calle 2 muestra la *E. coli* inducida. La flecha indica la proteína recombinante. El panel B muestra la proteína preparada como en el panel A y se sometida a una SDS-PAGE preparativa. La banda correspondiente a la proteína de fusión recombinante expresada en exceso se identificó por medio de KCl, se cortó, se sometió a electroelución de la tira de gel, se sometió a diálisis frente a PBS y se sometió a SDS-PAGE analítica (12%). Los números en el lado izquierdo indican los pesos moleculares de los marcadores. Los intentos para purificar más la proteína de *Leishmania* mediante su escisión de la proteína de fusión GST con trombina fueron infructuosos.

D.Expresión de Ldp23

Para asegurarse de que el péptido Ldp23 se expresaba en organismos de *Leishmania*, se realizó un análisis de transferencia Northern utilizando ARN preparado a partir de diferentes fases de crecimiento (logarítmicas y estacionarias) de promastigotas y a partir de la forma amastigota de estos parásitos.

Se preparó el ARN a partir de 2 x 10^7 células de parásitos utilizando el kit de aislamiento Micro RNA (Stratagene, La Jolla, CA) de acuerdo con las instrucciones recomendadas por la compañía. Se preparó ARN de promastigotas de *L. donovani* (fase de crecimiento logarítmica); de promastigotas de *L. major* (fases de crecimiento logarítmica y estacionaria); de *L. amazonensis*, tanto promastigotas (fases de crecimiento logarítmica y estacionaria) como amastigotas purificados de ratones infectados CBA/J; y de *L. pifanoi*, tanto promastigotas (fases de crecimiento logarítmica y estacionaria) como amastigotas (del medio de cultivo axénico). Los promastigotas de *L. donovani* (cepa 1S), *L. amazonensis* (MHOM/BR/77/LTB0016), *L. major* (MHOM/IR/79/LRC-L251) y *L. pifanoi* (MHOM/VE/60/Ltrod) se hicieron crecer y se mantuvieron a 26°C en medio de Schneider que contenía FCS al 20% y 50 µg/ml de gentamicina. Las formas amastigotas de *L. amazonensis* fueron obtenidas por centrifugación diferencial de una lesión de la almohadilla plantar "de tipo purulento" de un ratón CBA/J infectado durante 6 meses con este parásito. Se obtuvieron amastigotas de *L. pifanoi* de cultivo axénico como informaron previamente Pan et al., en *J. Euk. Microbiol. 40*:213 (1993).

La hibridación se llevó a cabo a 45°C en presencia de formamida al 50%, solución de Denhardt 5x, SDS al 0,1%, 100 µg/ml de ADN de esperma de salmón de hebra sencilla y 5x SSPE utilizando filtros de membrana de Nytran de 0,45 µm (Schleicher & Schuell, Keene, NH). La sonda fue el gen Ldp23 marcado con ^{32}P.

La Figura 4 muestra que se observó una sola banda de ARN de 680 pb para todas las fases de crecimiento y formas de todas las *Leishmania* sometidas a ensayo. En la figura 4, los números 1, 2 y 3 se refieren al ARN obtenido de

promastigotas en la fase de crecimiento logarítmico, promastigotas en la fase de crecimiento estacionario y formas amastigotas, respectivamente, y los números del lado izquierdo indican los pesos moleculares de los marcadores en pares de bases. Este resultado es coherente con el tamaño de gen correspondiente (525 bp) y con el peso molecular de la proteína expresada y los puntos para la distribución ubicua y la expresión de este gen en el género *Leishmania*.

E. Inducción de la Respuesta de Anticuerpos anti-*L. donovani* en Ratones y Conejos por Medio de Proteína Recombinante Purificada

Con el fin de evaluar la inmunogenicidad de la proteína de *Leishmania* recombinante, y para investigar su expresión en los parásitos, se inmunizaron los ratones y los conejos con la proteína de fusión GST en CFA. Los ratones BALB/c se inmunizaron en la almohadilla plantar trasera con 5-10 µg de proteína emulsionada en CFA. La concentración de proteína se determinó utilizando el reactivo Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA). Los ratones fueron reforzados 7 días más tarde con 5-10 µg de proteína emulsionada en coadyuvante incompleto de Freund (IFA) inoculado en la cavidad peritoneal. Los ratones se desangraron 7 días después de la segunda inmunización. Los conejos blancos New Zealand (Millbrook Farm, Amherst, MA) se inmunizaron de acuerdo con el siguiente protocolo: una inyección intra-muscular (IM) de 25-30 µg de proteína recombinante purificada emulsionada en CFA en cada muslo el día uno; una inyección IM de 25-30 µg de proteína purificada emulsionada en CFA en cada hombro el día 7; el día 15, se inyectaron 25-30 µg de la proteína purificada en PBS en el tejido subcutáneo. El conejo se desangró 7 días después de la última inmunización.

Se prepararon los sueros y se midió la respuesta de anticuerpos anti-*Leishmania* se midió por análisis de transferencia Western y por FACScan. En ambos casos se utilizaron promastigotas de *L. donovani* como antígeno. Se cultivaron aproximadamente 2×10^6 promastigotas de *L. donovani* en medio de Schneider durante 3 días (fase log), se lavaron con PBS, se lisaron con tampón de carga de SDS-PAGE y se sometieron a electroforesis en condiciones reductoras utilizando un gel de poliacrilamida al 15%. Las proteínas se transfirieron a una membrana de transferencia Immobilon-P de 0,45 µ (Millipore Co., Bedford, MA) utilizando un electroblotter de tipo húmedo (Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell, Bio Rad Life Science Division, Richmond, CA) durante 2 horas a 50 V. Las membranas se bloquearon durante la noche a temperatura ambiente con PBS que contenía suero normal de cabra al 3% (NGS), Tween-20 al 0,2% y azida de sodio al 0,05%, seguido de 3 lavados con PBS. Las transferencias se incubaron después durante 3-4 horas a 4°C con una dilución 1/200 de suero de conejo preinmune (calle A, Figura 5) o con la misma dilución de antisuero anti-proteína de fusión de conejo (calle B, Figura 5). El suero se absorbió previamente 2 veces con H-37 RA de *Mycobacterium tuberculosis* no viable desecado (Difco Laboratories, Detroit, MI) y se diluyó en PBS que contenía NGS al 1% y leche de vaca en polvo desnatada al 5% (Carnation, Nestlé Food Company, Glendale, CA). Las membranas se lavaron a continuación con PBS, se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente con anticuerpo anti-IgG de conejo de cabra conjugado con fosfatasa alcalina (Promega, Madison, WI), se lavaron una vez con PBS y 2x con tampón veronal pH 9,4. La reacción se visualizó utilizando la mezcla de sustrato 5-bromo-4-cloro-3-indoil-fosfato y nitroazul de tetrazolio (Kirkegaard & Perry Laboratories Inc., Gaithersburg, MD) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

La Figura 5 muestra que el antisuero anti-proteína recombinante de conejo detecta una sola proteína de 23 kDa (Ldp23) en la preparación de antígeno de extracto bruto de *Leishmania*. No se observaron bandas cuando se utilizó un antisuero anti-GST (no mostrado). Además, el análisis FACScan (Figura 6) muestra que el anticuerpo inducido por Ldp23 recombinante reacciona con promastigotas intactos vivos de *L. donovani*, lo que apunta a una expresión en la superficie celular de esta molécula sobre estos organismos. La línea discontinua de la Figura 6 muestra la inmunofluorescencia indirecta realizada utilizando suero pre-inmune del ratón y la línea continua de la Figura 6 muestra el resultado obtenido con el antisuero anti-GST-Ldp23 de ratón. Ambos sueros se diluyeron a 1/100. Los parásitos se lavaron con tampón de tinción y se incubaron con anticuerpo inmunoglobulina anti-ratón de cabra conjugado con FITC. La intensidad de fluorescencia se analizó mediante FACScan.

F.Reconocimiento de Ldp23 Recombinante por Células T de Nódulos Linfáticos Específicas de Leishmania

Para someter a ensayo la respuesta de las células T a la proteína Ldp23, se realizaron dos series de experimentos. En el primer experimento, se estimularon las células T de ganglios linfáticos (10^5/pocillo) de ratones BALB/c inmunizados con promastigotas de *L. donovani* (como se describió anteriormente) para que proliferaran con 2×10^5 células de bazo mononucleares tratadas con Mitomicina C (APC) y se pulsaron con la proteína de fusión recombinante purificada. Se midió la proliferación de las células T a las 72 horas de cultivo. Los valores se expresan en la Figura 7 como cpm y representan la media de incorporación de [^{3}H]TdR de cultivos por triplicado. Las cpm del fondo de las células (células T + APC) cultivadas en presencia de medio solo fueron 1291. Figura 7 muestra que las células T específicas de *Leishmania* proliferan bien y de una manera dosis-respuesta a Ldp23 recombinante. No se observó respuesta cuando se añadió GST purificado en lugar de la proteína de fusión recombinante ni cuando las células T de ganglios linfáticos de los ratones inmunizados con CFA solo fueron estimuladas para que proliferaran en presencia de la proteína de fusión de *Leishmania* (no mostrado).

El reconocimiento de la proteína Ldp23 recombinante por células T específicas de *Leishmania* también se sometió a ensayo utilizando dos modelos murinos de la leishmaniasis, los ratones BALB/c altamente susceptibles a *L. major* y los ratones CBA/J susceptibles a *L. amazonensis* como describen Champsi y McMahon-Pratt, *Infect. Immun.*

56:3212 (1988). Estos modelos fueron seleccionados para investigar el patrón de citoquina inducido por Ldp23. En el modelo de ratón de leishmaniasis, la resistencia está asociada con las citoquinas Th 1 mientras que la susceptibilidad está relacionada con las respuestas Th 2.

Se obtuvieron células de nódulo linfático 3 semanas después del inicio de la infección de ratones BALB/c con *L. major* y se midió la capacidad de estas células para reconocer Ldp23 recombinante mediante la proliferación y la producción de las citoquinas IFN-γ e IL-4. Se cultivaron 2 x 10^6 células obtenidas del ganglio linfático de drenaje poplíteo de los ratones infectados durante 72 horas en presencia de Ldp23 recombinante o producto lisado de *Leishmania*. Los niveles de IFN-γ e IL-4 en los sobrenadantes de cultivo se midieron por medio de ELISA como se describió previamente (Chatelain et al., *J. Immunol. 148*:1172 (1992), Curry et al., *J. Immunol. Meth. 104*:137 (1987), y Mossman y Fong, *J. Immunol Meth 116*:151 (1989)) utilizando anticuerpos monoclonales anti-IFN-γ y anti-IL-4 (PharMingen, San Diego, CA).

Ldp23 estimuló la proliferación de estas células (no mostrado) e indujo una respuesta de citoquinas de tipo Th 1 típica como indicó la producción de altos niveles de IFN-γ (panel A de la Figura 8) y no de IL-4 (panel B de la Figura 8). La estimulación de estas células con un producto lisado bruto de *Leishmania* produjo un perfil de citoquina Th mixto. Se obtuvo exactamente el mismo patrón de producción de citoquinas en los ratones CBA/J infectados con *L. amazonensis* (no mostrado). Estos resultados indican claramente que Ldp23 es un activador potente y selectivo de las citoquinas Th 1 por células de ratón.

Ejemplo 3

Preparación de Hsp83

Este ejemplo ilustra la preparación de un antígeno Hsp83 de *Leishmania*, que tiene la secuencia proporcionada en el SEQ ID NO:. 6

Se construyó una genoteca de expresión genómica con ADN cortado de *L. braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903) en el bacteriófago λZAP II (Stratagene , La Jolla, CA). La genoteca de expresión se escrutó con suero preadsorbido de *Escherichia coli* de un individuo infectado con *L. braziliensis* con LM. Las placas inmunoreactivas se purificaron y el fagémido pBSK(-) se escindió mediante los protocolos sugeridos por el fabricante. Se llevaron a cabo las deleciones anidadas con exonucleasa III para generar deleciones solapantes para las preparaciones del molde de hebra sencilla y la secuenciación. Los moldes monocatenarios se aislaron después de la infección con el fago coadyuvante VCSM13 según lo recomendado por el fabricante (Stratagene, La Jolla, CA) y se secuenciaron mediante el método de terminación de cadena didesoxi o por el sistema de terminación *Taq Dye* utilizando el secuenciador automático Applied Biosystems modelo 373A.

Los antígenos recombinantes producidos por estos clones se purificaron a partir de 500 ml de cultivos inducidos con isopropil-β-D-tiogalactopiranósido (IPTG) como describen Skeiky y col., *J. Exp.. Med.* 176:201-211 (1992). Estos antígenos se analizaron a continuación para determinar la capacidad para estimular en PBMC de individuos infectados por *Leishmania* la proliferación y secreción de citoquinas. La sangre periférica se obtuvo de individuos que vivían en una zona (Corte de Pedra, Bahía, Brasil), donde *L. braziliensis* es endémica y donde se han llevado a cabo estudios epidemiológicos, clínicos e inmunológicos durante más de una década, y las PBMC se aislaron a partir de sangre total mediante centrifugación por gradiente de densidad a través de Ficoll (Winthrop Laboratories, New York, NY). Para los ensayos de proliferación *in vitro*, se cultivaron de 2 X 10^5 a 4 X 10^5 células por pocillo en medio completo (RPMI 1640 con un suplemento con gentamicina, 2-mercaptoetanol, L-glutamina y suero humano A+ escrutado agrupado al 10%; Trimar, Hollywood, Calif.) en placas de fondo plano de 96 pocillos con o sin 10 µg de los antígenos indicados por ml o 5 µg de fitohemaglutinina por ml (Sigma Immunochemicals, St. Louis, MO) durante 5 días. Las células se pulsaron a continuación con 1 µCi de [^{3}H-timidina] para las 18 h finales de cultivo. Para la determinación de la producción de citoquinas se cultivaron de 0,5 a 1 ml de PBMC de 1 X 10^6 a 2 x 10^6 células por ml con o sin los antígenos de *Leishmania* durante 48 y 72 h.

Los sobrenadantes y las células se recogieron y analizaron para determinar las citoquinas o los ARNm de citoquinas secretados. Las alícuotas de los sobrenadantes se analizaron para determinar el interferón gamma (IFN-γ), el factor de necrosis tumoral alfa (TNF-α), la interleuquina-4 (IL-4), y la IL-10 como describen Skeiky y col., J. Exp.. Med. 757:1527-1537 (1995). Para el análisis PCR del ARNm de las citoquinas, se aisló el ARN total de las PBMC y se sintetizó el ADNc utilizando poli(dT) (Pharmacia, Piscataway, NJ) y transcriptasa inversa de virus de la micloblastosis aviar. Después de la normalización para la β-actina, el ADNc diluido se amplificó mediante PCR utilizando polimerasa *Taq* (Perkin-Elmer Cetus, Foster City, CA) con concentraciones 0,2 µM de los cebadores externos 5' y 3' respectivos en un volumen de reacción de 50 µl. Las secuencias de nucleótidos de los pares primarios y las condiciones de PCR utilizadas fueron las descritas por Skeiky y col., J. Exp.. Med. 181:1521-1531 (1995). Los autores de la presente invención verificaron que sus condiciones de PCR estuvieran dentro del rango semicuantitativo realizando inicialmente diluciones en serie de los ADNc y variando el número de ciclos utilizados para la PCR. Se digirieron los plásmidos que contenían las secuencias humanas para IL-2, IFN-γ, IL-4, IL-10, y β-actina, y los insertos de ADN se purificaron después de la separación en geles de agarosa al 1%. Se prepararon sondas radiomarcadas con ^{32}P mediante el método de cebado al azar. Los productos de la PCR se analizaron

mediante electroforesis en geles de agarosa al 1,5%, se transfirieron a membranas de nailon, y se sondearon con el inserto de ADN marcado con ^{32}P apropiado.

Se identificó un clon recombinante en los ensayos anteriores que, tras la comparación de la secuencia de su secuencia de aminoácidos pronosticada con secuencias de otras proteínas, se identificó como un homólogo de *Leishmania braziliensis* de la proteína de choque térmico eucariótica de 83 kD (Lbhsp83). La secuencia del clon se proporciona en el SEQ ID NO: 5 y la secuencia de la proteína deducida se proporciona en el SEQ ID NO: 6. Sobre la base de la homología, este clon, designado Lbhsp83a, parece carecer de los primeros 47 residuos de la longitud completa de 703 residuos de aminoácidos. Lbhsp83 tiene una homología global de 94% (91% de identidad y 3% de sustituciones conservativas), 91% (84% de identidad y 7% de sustituciones conservativas) y 77% (61% de identidad y 16% de sustituciones conservativas) con hsp83 de *L. amazonensis*, hsp83 de *T. cruzi* y hsp89 humana, respectivamente. También se aisló un segundo clon (designado Lbhsp83b), que contenía la porción C-terminal de 43 kD de hsp83 (residuos 331 a 703). La Figura 19 presenta una comparación de la secuencia de Lbhsp83 con hsp83 de *L. amazonensis* (Lahsp83), hsp83 de *T. cruzi* (Tchsp83) y hsp89 humana (Huhsp89).

Los resultados de los ensayos de proliferación utilizando Lbhsp83a se muestran en la Tabla 1. Las células de todos los pacientes con leishmaniasis mucosa (LM) proliferaron fuertemente en respuesta a Lbhsp83a, con índices de estimulación (IE) de 19 a 558 (en comparación con 20 a 1.634 para el producto lisado de parásitos). La proliferación de PBMC de leishmaniasis cutánea (LC) de los pacientes fue variable y excepto por los niveles en dos pacientes (IV y VII), los niveles fueron significativamente inferiores a los de pacientes con LM. En comparación, las respuestas proliferativas de los individuos con LC autocurable a Lbhsp83a fueron similares a las de los individuos con LM. Sin embargo, las respuestas de los seis de individuos autocurables a Lbhsp83 fueron consistentemente más altos que los de Lbhsp83b. Esto sugiere que las PBMC de pacientes con LC autocurable reconocen preferentemente uno o más epítopos de células T localizados dentro de la porción amínica de Lbhsp83.

Tabla 1

Proliferación *in vitro* de PMBC de Individuos Infectados por *L. braziliensis* en Respuesta a Lbhsp83

	Incorporación de [^{3}H]timidina media [10^3 cpm (DT)], SI con:		
Grupo y Paciente	Producto Lisado	Lbhsp83a	Lbhsp83b
LM			
I 41,3, (1,3), 2942,5, (6,6), 22146,7, (1,4), 318			
II44,2, (0,5), 10420, (3,7), 4736,7, (0,76), 86			
III27,4, (1,5), 1508,1, (1,7), 449,9, (0,32), 54			
IV52,7, (3,3), 13854,1, (6,2), 14232,0, (1,3), 84			
V140,6, (7,6), 308151,8, (57), 333150,4, (7,9), 331			
VI15,8, (1,8), 2021,3, (4,4), 2814,4, (1,3), 19			
VII300,1, (9,4), 1634102,1, (7,6), 55841,7, (4,9), 228			
LC			
I0,26, (0,0), 1,50,57 (0,3), 3,30,43 (0,17), 3,3			
II55,63, (8,6), 2180,42, (0,0), 1,60,8, (0,14), 3,2			
III0,39, (0,5), 4,0 3,4, (0,5), 9 2,6, (0,9), 6,6			
IV19,14, (1,3), 877,17, (0,6),325,9, (0,9), 27			
V0,32, (0,2), 3,01,47, (0,5), 140,3, (0,1), 3,0			
VI0,77, (0,1), 4,71,44, (0,2), 91,3, (0,6), 8,0			
VII4,01, (1,0), 2,060,3, (8,5), 1566,7, (3,9), 16,6			
LC autocurable			
I19,7, (4,4), 9461,3, (4,6), 293 5,0, (2,0), 24			
II 0,6, (0,1), 6,5 7,0, (2,0), 79 1,2, (0,8), 13			
III 59,6, (7,1), 519 49,4, (3,1), 429 21,4, (3,7), 186			
IV 0,2, (0,1), 1,6 13,1, (1,7), 108 0,6, (0,1), 5			
V 27,1, (2,0), 225 6,3, (2,6), 52 3,0, (1,5), 25			
VI 130,3, (14), 340 28,2, (2,9), 74 7,7, (3,8), 20			
Control (no infectados)			
I 0,19, (0,0), 1,4 0,18 (0,0), 1,3 0,40 (0,16), 2,8			
II 0,31, (0,1), 1,7 0,19, (0,0), 1,0 0,27, (0,0), 1,5			
III 0,44, (0,2), 4,1 0,48 (0,1), 5,0 0,51 (0,2), 5,2			
IV 0,4, (0,1), 3,2 0,52, (0,2), 5,1 0,50, (0,1), 5,0			

Un análisis más detallado de los patrones de citoquinas de PBMC de pacientes con LM se realizó mediante PCR de transcriptasa inversa. Los ARNm de citoquinas se evaluaron en las células antes del cultivo (Figura 9, calles O) o después del cultivo siguiente en ausencia (calles -) o presencia del antígeno indicado para 48 y 72 h. La Figura 4A muestra los resultados para cinco de los seis pacientes con LM cuyas PBMC fueron analizadas. En aproximadamente la mitad de los pacientes con LM, las PBMC no cultivadas (en reposo) tuvieron niveles

detectables de ARNm para IFN-γ, IL-2 e IL-4 pero no para IL-10. Las PBMC del paciente con LC, sin embargo, tuvieron ARNm de IL-10 en el estado en reposo además de ARNm para las otras citoquinas sometidas a ensayo (Figura 4B). Tras el cultivo *in vitro* sin antígeno, los niveles de ARNm para IFN-γ, IL-2 e IL-4 en células en reposo de pacientes con LM disminuyeron a los niveles de fondo, mientras que los niveles de ARNm de IL-10 aumentaron. En contraste, en la mayoría de las PBMC de pacientes con LC tuvieron niveles de ARNm de IL-10 estables o aumentados, mientras que los ARNm para IL-2, IFN-γ, e IL-4 se redujeron a niveles apenas detectables en ausencia de estimulación con antígenos.

En PBMC de tres pacientes LM, la estimulación con producto lisado dio como resultado el aumento de la expresión de ARNm para IFN-γ, IL-2 e IL-4 pero no para IL-10. En comparación, ambos polipéptidos Lbhsp83 provocaron la producción de ARNm para IFN-γ e IL-2 a partir de todas las PBMC de pacientes con LM sometidas a ensayo. En contraste, los perfiles de ARNm para IL-10 y IL-4 fueron diferentes para los dos polipéptidos hsp83. Lbhsp83a estimuló la producción de ARNm de IL-10 pero no de IL-4 (pacientes I, II, III, y IV), mientras que Lbhsp83b estimuló la producción de ARNm de IL-4 pero no de IL-10 en los seis pacientes.

Todos los pacientes con LC sometidos a ensayo respondieron a ambos polipéptidos Lbhsp83 así como al producto lisado de parásito por regulación al alza de la síntesis de ARNm para IL-2 e IFN-γ, y en dos de cuatro pacientes (I y IV), el nivel de IL-4 ARNm también aumentó, indicando estimulación de ambas citoquinas Th1 y Th2. Curiosamente y como en el caso de PBMC no cultivadas de pacientes con LM que no tenían niveles detectables de ARNm de IL-10, Lbhsp83a y no Lbhsp83b estimuló las PBMC de un paciente (IV) con LC para sintetizar ARNm de IL-10. Sin embargo, en los otros tres pacientes (I, II, y III) con niveles de reposo de ARNm de IL-10, ambos polipéptidos rLbhsp83 así como el producto lisado de parásitos regularon a la baja la expresión de ARNm de IL-10.

También se sometieron a ensayo los sobrenadantes de PBMC para determinar la presencia de IFN-γ, TNF-α, IL-4 e IL-10 secretadas. Las células de todos los pacientes con LM y LC autocurable (siete y seis pacientes, respectivamente) y de cuatro de siete pacientes con LC se analizaron para determinar el IFN-γ secretado después de la estimulación con ambos polipéptidos rLbhsp83, producto lisado de parásitos y Lbhsp70, una proteína de *L. braziliensis* homóloga a la proteína de choque térmico eucariótica de 70 kD (Figura 10A). En general, las PBMC paciente estimuladas con rLbhsp83a secretan niveles de IFN-γ más altos de lo que lo hace rLbhsp83b (0,2 a 36 y 0,13 a 28 ng/ml, respectivamente). La presencia de IFN-γ secretado se correlacionó bien con el ARNm correspondiente detectado mediante PCR.

Las PBMC de cuatro de cinco pacientes (I, II, V, y VII) con LM tuvieron niveles (0,8 a 2,2 ng/ml) de TNF-α en el sobrenadante más altos que los detectados en cultivos de PBMC de controles no infectados después de la estimulación con producto lisado de parásito (Figura 10B). De manera similar, las mismas PBMC fueron estimuladas por rLbhsp83 para producir niveles de TNF-α en el sobrenadante que oscilaban de 0,61 a 2,9 ng/ml. En comparación con las de los controles no infectados, las PBMC de tres (I, V, y VI), cinco (I, II, IV, V, y VI), y dos (II y V) de seis individuos analizados produjeron niveles superiores de TNF-α en respuesta a producto lisado de parásito, rLbhsp83a y rLbhsp83b, respectivamente. Los niveles de TNF-α producidos por PBMC de pacientes con LC en respuesta a producto lisado de parásito fueron comparables a los producidos por controles no infectados. Sin embargo, rLbhsp83 estimuló la producción de TNF-α en las PBMC de dos de estos pacientes. rLbhsp83a estimuló niveles superiores de producción de TNF-α a los que logró rLbhsp83b. En ausencia de estimulación de antígeno, solo las PBMC de pacientes con LM (cinco de seis) produjeron niveles detectables de TNF-α en el sobrenadante (60 a 190 pg/ml).

De acuerdo con el ARNm de IL-10, IL-10 se detectó mediante ELISA en los sobrenadantes de cultivo de PMBC estimulados con antígeno de pacientes con LM y LC. Los niveles (49 a 190 pg) fueron significativamente superiores (hasta 10 veces) tras la estimulación con rLbhsp83a en comparación con los posteriores a la estimulación paralela de las mismas células con rLbhsp83b (Figura 11). El producto lisado de parásito también estimuló las PMBC de algunos de los pacientes para producir IL-10. Aunque rLbhsp83 estimuló las PMBC de individuos no infectados para producir IL-10, con una excepción, los niveles fueron inferiores a los observados con PMBC de paciente. No se detectó IL-4 en ninguno de los sobrenadantes analizados. Por lo tanto, el nivel de cualquier IL-4 secretada está por debajo del límite de detección del ELISA empleado (50 pg/ml). Tomados en conjunto, los resultados demuestran que un perfil de citoquinas de tipo Th1 predominante está asociado con PMBC de individuos infectados por *L. braziliensis* después de la estimulación con polipéptidos rLbhsp83.

Para determinar la correlación entre las respuestas de células T observadas y producción de anticuerpos contra Lbhsp83, los autores de la presente invención compararon las reactividades del anticuerpo (inmunoglobulina G) contra Lbhsp83 en sueros de los tres grupos de pacientes (Figura 12). Las reactividades de ELISA de sueros de pacientes con LM con rLbhsp83a fueron comparables a las observadas con producto lisado de parásitos, y en general, hubo una correlación directa entre el título de anticuerpos anti-Lbhsp83 del paciente con LM y la proliferación de células T. De 23 muestras de suero de pacientes con LM analizadas, 22 fueron positivas (~96%) con valores de absorbancia de 0,20 a >3,0. Once de las muestras de suero de pacientes con LM tuvieron valores de densidad óptica que fueron > 1. En general, los pacientes con LC tuvieron títulos de anticuerpos anti-Lbhsp83 significativamente más bajos $\dot{x} = 0,74$; error típico de la media [ETM] = 0,1) en comparación con aquellos de pacientes con LM. Por lo tanto, los títulos de anticuerpos anti-rhsp83 de pacientes con LM y LC se correlacionaban con sus respectivas respuestas proliferativas de células T. Los títulos de anticuerpos anti-rLbhsp83 fueron significativamente superiores en pacientes con LM ($\dot{x} = 1,5$;. ETM = 0,2) que en pacientes con LC autocurable ($\dot{x} =$

0,35; ETM = 0,056), aunque sus respuestas de células T proliferativas fueron similares. De hecho, los títulos de anticuerpos anti-Lbhsp83 en el suero de pacientes con LC autocurable fueron comparables a los de los controles no infectados ($\dot{x}$ = 0,24; ETM = 0,028). Mediante el uso de 2 desviaciones típicas mayores que el valor de absorbancia medio del control no infectado (0,484) como un criterio de reactividad positiva contra Lbhsp83, ocho de nueve de las muestras de suero de los pacientes autocurables analizadas fueron negativas.

Ejemplo 4

Preparación de clones que codifican LT-210

Este ejemplo ilustra la preparación de clones que codifican porciones del antígeno Lt-210 de *Leishmania*, y que tiene la secuencia proporcionada en el SEQ ID NO: 8.

Se construyó una genoteca de expresión a partir de ADN genómico de *L. tropica* (MHOM/SA/91/WR1063C). El ADN se aisló solubilizando promastigotas de *L. tropica* en Tris-HCl 10 mM, pH 8,3, EDTA 50 mM, SDS al 1% y tratando con 100 µg/ml de RNasa A y 100 µg/ml de proteinasa K. La muestra se extrajo sucesivamente con un volumen igual de fenol, fenol:cloroformo (1:1), y cloroformo. El ADN se precipitó mediante la adición de 0,1 volúmenes de acetato sódico 3M (pH 5,2) y 2,5 volúmenes de etanol del 95%. El precipitado se resuspendió en Tris 10 µM, EDTA 1 mM. El ADN se cortó mediante paso a través de una aguja de calibre 30 a un intervalo de tamaño de 2-6 kilobases, y se reparó mediante incubación con ADN PolI en presencia de DATP, dCTP, dGTP, y dTTP 100 mM cada uno. Se ligaron adaptadores de EcoRI a los fragmentos de ADN. Después de la eliminación de los adaptadores no ligados mediante el paso sobre una columna Sephadex™ G-25, los fragmentos se insertaron en lambda ZAPII cortado con EcoRI (Stratagene, La Jolla, CA).

Se sembraron aproximadamente 43.000 ufp y se escrutaron con sueros aislados de pacientes con leishmaniasis viscerotrópica (VTL). Los sueros de pacientes con VTL fueron recibidos de los Dres. M. Grogl y A. Magill. El grupo de pacientes con VTL incluyó ocho individuos de los que se aislaron y cultivaron los parásitos, siete de los cuales habían confirmado la infección por *L. tropica*. Otros cuatro pacientes fueron negativos para los cultivos, pero aún se consideraron que estaban infectados basándose en cualquiera de los análisis de PCR o un frotis de anticuerpo monoclonal positivo (Dr. Max Grogl, comunicación personal). Las muestras de suero de los 11 pacientes infectados se agruparon y se eliminó la reactividad anti-*E. coli* mediante cromatografía de afinidad (Sambrook et al., más arriba, págs. 12.27 a 12.28). Los fagos lambda que expresaban proteínas reactivas se detectaron después de la unión del anticuerpo por la proteína A-peroxidasa de rábano picante y el sustrato ABTS.

Se identificaron y purificaron tres clones, Lt-1, Lt-2, y Lt-3, que contenían una porción del gen Lt-210. Los clones oscilaron de un tamaño de 1,4 a 3,3 kb y los polipéptidos codificados de 75 kD, 70 kD, y 120 kD, respectivamente. Estos tres clones contenían secuencias parciales del gen Lt-210. Lt-1 y Lt-2 son clones solapantes y se eligieron para su estudio adicional.

Se determinaron las secuencias de ADN de Lt-1 y Lt-2. Se utilizó la digestión con Exonucleasa III para crear deleciones solapantes de los clones (Heinikoff, *Gene 28*:351-359, 1984). Se preparó un molde de hebra sencilla y la secuencia se determinó con un secuenciador automático Applied Biosystems modelo 373A o mediante secuenciación didesoxi de Sanger. Se determinó la secuencia de las dos hebras de la porción codificante del clon Lt-1. Se determinó la secuencia parcial de una cadena del clon Lt-2.

El SEQ ID NO: 7 presenta la secuencia de ADN de Lt-1, y el SEQ ID NO: 8 proporciona la secuencia de aminoácidos pronosticada del marco de lectura abierto. La secuencia de ADN de la porción codificante del clon Lt-1 incluye una secuencia de nucleótidos repetida en la porción 5' del clon que contiene ocho copias de una repetición de 99 pb, tres copias de una unidad repetitiva de 60 pb, que forma parte de la repetición de 99 pb más grande, y 800 pb de la secuencia no repetida. La secuencia de aminoácidos deducida de la repetición de 99 pb contiene degeneraciones limitadas. La masa de la proteína recombinante pronosticada es de 67.060 Daltons. Una búsqueda en la base de datos de PIR con la secuencia de aminoácidos pronosticada del marco de lectura abierto no produjo una homología significativa con las secuencias previamente presentadas. La estructura secundaria pronosticada de la porción de repetición del clon es completamente α-helicoidal.

El análisis de la secuencia de Lt-2 reveló que la porción 3' del clon consistía en una mezcla de repeticiones de 60 y 99 pb que eran idénticas, exceptuando degeneraciones ocasionales, a las repeticiones de 60 y 99 pb observadas en Lt-1. Colectivamente, los datos de secuenciación sugieren que Lt-1 y Lt-2 son diferentes porciones del mismo gen, estando Lt-2 aguas arriba de Lt-1, posiblemente con una pequeña superposición.

El análisis de hibridación confirmó que rLt-2 y rLt-1 contienen secuencias solapantes. Los ADN genómicos de diversas especies de *Leishmania* se restringieron con una variedad de enzimas, separadas por electroforesis en gel de agarosa, y se transfirieron sobre un filtro de membrana Nytran (Schleicher & Schuell, Keene, NH). Insertos de rLt-1 y rLt-2 se marcaron con ^{32}P-CTP mediante transcriptasa inversa a partir de cebadores de oligonucleótidos al azar y se utilizaron como sondas después de la separación a partir de los nucleótidos no incorporados en una columna Sephadex G-50. Se realizaron hibridaciones utilizando la sonda rLt-1 o rLt-2 en NaH_2PO_4 0,2 M/NaCl 3,6 M a 65°C, mientras se realizaba la hibridación utilizando la sonda rLt-lr en NaH_2PO_4 0,2 M/NaCl 3,6 M/EDTA 0,2 M a 60°C

durante la noche. Los filtros se lavan en NaCl 0,075 M/citrato de sodio 0,0075 M pH 7,0 (NaCl0,15 M/citrato de sodio 0,0150 M para la sonda de Lt-lr), más SDS al 0,5% a la misma temperatura que la hibridación.

Se analizaron ADN genómicos de varias especies de *Leishmania* incluyendo *L. tropica* mediante transferencias Southern como se ha descrito anteriormente usando los insertos Lt-1, Lt-2, y Lt-lr por separado como sondas. Colectivamente, varias digestiones de ADN de *L. tropica* indican que este gen tiene un número bajo de copias. Se observó un patrón de solapamiento similar, utilizando el inserto Lt-1 o Lt-2 como sonda, coherente con la premisa de que estos dos clones contienen secuencias cercanas o que se solapan entre sí. Además, las secuencias que hibridan con estos clones están presentes en otras especies de *Leishmania*.

Los productos aislados de *L. tropica* tienen heterogeneidad limitada. Se realizaron análisis Southern del ADN genómico digerido de cuatro cepas de parásito *L. tropica* aisladas de pacientes con VTL y tres cepas de parásitos *L. tropica* aisladas de casos de LC (dos humanos, un canino). El inserto Lt-lr descrito a continuación se marcó y se utilizó como sonda. Los siete productos aislados de *L. tropica* diferentes produjeron intensidades y patrones de restricción similares, solo con un único polimorfismo de longitud de fragmento de restricción entre los productos aislados. Estos datos, junto con los análisis Southern con enzimas adicionales, indican heterogeneidad limitada en esta región entre los productos aislados de *L. tropica*.

Las proteínas recombinantes de Lt-1 y Lt-2 se expresaron y purificaron. El conjunto de deleciones anidadas de Lt-1 formado por secuenciación incluyó un clon denominado Lt-lr, que contiene una y un tercio de repeticiones. Este polipéptido también se expresó y purificó. Se llevó a cabo la escisión in vivo del fagémido pBluescript SK$^-$ de Lambda Zap II de acuerdo con el protocolo del fabricante. Las partículas virales de fagémidos se utilizaron para infectar *E. coli* XL-1 Blue. La producción de proteína se indujo mediante la adición de IPTG. La proteína se recuperó lisando en primer lugar sedimentos de bacterias inducidas en tampón (LB, Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, NaCl 100 mM, EDTA 10 mM) usando una combinación de lisozima (750 µg/mL) y sonicación. Se recuperaron rLt-1, rLt-2, y rLt-lr a partir de los cuerpos de inclusión después de la solubilización en urea 8M (rLt-1 y rLt-2) o urea 4M (rLt-lr). Las proteínas rLt-1 y rLt-2 fueron enriquecidas y separadas por precipitación con sulfato de amonio 25%-40% y rLt-lr fue enriquecido mediante precipitación con sulfato de amonio al 10%-25%. Las proteínas se purificaron adicionalmente mediante electroforesis en gel preparativa de SDS al 10%-PAGE. Las proteínas recombinantes se eluyeron de los geles y se dializaron en solución salina tamponada con fosfato (PBS). La concentración se midió mediante análisis BCA Pierce (Rockford, IL), y la pureza se evaluó mediante tinción con azul de Coomassie después de la SDS-PAGE.

Ejemplo 5

Preparación de LbeIF4A

Este ejemplo ilustra la clonación molecular de una secuencia de ADN que codifica el antígeno ribosómico LbeIF4A de *L. braziliensis*.

Se construyó una genoteca de expresión genómica con ADN cortado de *L. braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903) en el bacteriófago λZAPII (Stratagene, La Jolla, CA). La genoteca de expresión se escrutó con sueros de paciente preadsorbidos con *E. coli* de un individuo infectado por *L. braziliensis* con leishmaniasis mucosa. Las placas que contenían los antígenos recombinantes inmunoreactivos se purificaron, y el fagémido pBSK(-) se escindió utilizando los protocolos del fabricante. Se realizaron las deleciones anidadas con Exonucleasa III para generar deleciones solapantes para preparaciones de moldes de hebra sencilla y la secuenciación. Los moldes de hebra sencilla se aislaron después de la infección con el fago auxiliar VCSM13 según lo recomendado por el fabricante (Stratagene, La Jolla, CA) y se secuenciaron mediante el método de terminación de cadena didesoxi o mediante el sistema de terminación con colorante Taq utilizando el Secuenciador Automático Applied Biosystems modelo 373A.

Los antígenos recombinantes inmunorreactivos se analizaron a continuación en ensayos con células T de pacientes para determinar su capacidad de estimular una producción proliferativa y de citoquina, como se describe más adelante en los Ejemplos 7 y 8.

En los ensayos anteriores se identificó un clon recombinante que, tras la comparación de secuencia de su secuencia de aminoácidos pronosticada con secuencias de otras proteínas, se identificó como un homólogo del factor de iniciación eucariótico 4A (eIF4A) de *Leishmania braziliensis*. El clon aislado (pLeIF.1) carecía de los primeros 48 residuos de aminoácidos (144 nucleótidos) de la secuencia de la proteínas completa. El inserto pLeIF.1 se utilizó con posterioridad para aislar la secuencia genómica completa.

El SEQ ID NO: 9 muestra la secuencia de nucleótidos completa del polipéptido LbeIF4A completo. El marco de lectura abierto (nucleótidos 115 a 1323) codifica una proteína de 403 aminoácidos con un peso molecular pronosticado de 45,3 kD. Una comparación de la secuencia de proteínas pronosticada de LbeIF4A con las proteínas homólogas de tabaco (TeIF4A), ratón (MeIF4A) y levadura (YeIF4A) muestra una extensa homología de secuencia, siendo los primeros 20-30 aminoácidos los más variables. Las longitudes (403, 413, 407, y 395 aminoácidos), pesos moleculares (45,3, 46,8, 46,4, y kDa 44,7), y puntos isoeléctricos (5,9, 5,4, 5,5, y 4,9) de LbeIF4A, TeIF4A, MeIF4A y YeIF4A, respectivamente, son similares. LbeIF4A muestra una homología global de 75,5% (identidad de 57%, sustitución conservativa 18,5%) con TeIF4A, 68,6% (identidad de 50%, sustitución conservativa 18,6%) con MeIF4A y 67,2% (identidad de 47,6%, sustitución conservativa 19,6%) con YeIF4A.

Ejemplo 6

Preparación de Antígenos Solubles de *Leishmania*

Este ejemplo ilustra la preparación de antígenos solubles de *Leishmania* de un sobrenadante de cultivo de *L. major*. Se cultivaron promastigotas de *L. major* hasta la fase logarítmica tardía en medio complejo con suero hasta que se alcanzó una densidad de 2-3 $x10^7$ organismos viables por mL de medio. Los organismos se lavaron concienzudamente para eliminar componentes del medio y se resuspendieron a 2-3 x 10^7 organismos viables por mL de medio sin suero definido consistente en partes iguales de RPMI 1640 y medio 199, ambos de Gibco BRL, Gaithersburg, MD. Al cabo de 8-12 horas, se eliminó el sobrenadante, se concentró 10 veces y se dializó contra solución salina tamponada con fosfato durante 24 horas. La concentración de proteína se determinó a continuación y la presencia de al menos ocho antígenos diferentes se confirmó mediante SDS-PAGE. Esta mezcla se denomina en la presente memoria "antígenos solubles de *Leishmania*."

Ejemplo 7

Comparación de la Producción de interleuquina-4 e interferón-γ Estimulada por Antígenos de *Leishmania*

Este ejemplo ilustra las propiedades inmunogénicas de los antígenos preparados de acuerdo con los Ejemplos 1, 2, 5 y 6, determinadas por su capacidad de estimular IL-4 e IFN-γ en cultivos de ganglios linfáticos de ratones infectados y en preparaciones de PBMC de humanas. Se prepararon cultivos de ganglios linfáticos para su uso en estos estudios a partir de ratones BALB/c infectados por *L. major* 10 días después de la infección, como se ha descrito en el Ejemplo 2. Las PBMC se prepararon utilizando sangre periférica obtenida de individuos con infecciones por *L. donovani* curadas que eran inmunológicamente sensibles a *Leishmania*. El diagnóstico de los pacientes se realizó mediante hallazgos clínicos asociados con al menos uno de los siguientes: aislamiento de parásitos de lesiones, una prueba cutánea positiva con producto lisado de *Leishmania* o una prueba serológica positiva. Las personas no infectadas fueron identificadas basándose en la falta de signos o síntomas clínicos, la falta de antecedentes de exposición o de viajes a zonas endémicas, y la ausencia de una respuesta serológica o celular a los antígenos de *Leishmania*. La sangre periférica se recogió y las PBMC se aislaron por centrifugación de densidad a través de Ficoll™ (Winthrop Laboratories, New York).

Los sobrenadantes de los cultivos se sometieron a ensayo para determinar los niveles de IL-4 e IFN-γ secretados. El IFN-γ se cuantificó mediante un ELISA doble sándwich utilizando mAb de ratón anti-IFN-γ humano (Chemicon, Temucula, CA) y suero policlonal de conejo anti-IFN-γ humano. El rIFN-γ humano (Genentech Inc., San Francisco, CA) se utilizó para generar una curva convencional. La IL-4 se cuantificó en los sobrenadantes mediante un ELISA doble sándwich utilizando un mAb de ratón anti-IL-4 humana (M1) y sueros policlonales de conejo anti-IL-4 humana (P3). La IL-4 (Immunex Corp., Seattle, WA) se utilizó para generar una curva convencional que variaban de 50 pg/ml a 1 ng/ml.

Las Figuras 13A y 13B, ilustran el nivel medio de IL-4 e IFN-γ secretados, respectivamente, 72 horas después de la adición de 10 µg/mL de cada uno de los siguientes antígenos a un cultivo de ganglios linfáticos preparado como se describió anteriormente: antígeno soluble de *Leishmania* (es decir, un extracto preparado de promastigotas rotos que contiene membrana y antígenos internos (SLA)), Ldp23, LbeIF4A (LeIF), Lbhsp83, M15 y LmeIF (el homólogo de LbeIF4A de *L. major*). También se muestran los niveles de IL-4 e IFN-γ secretados en medio solo (es decir, no estimulado). Mientras que los SLA producen una respuesta predominantemente Th2 de células de nódulos linfáticos de ratones infectados por *Leishmania*, Ldp23, LbeIF4A, Lbhsp83 y M15 produjeron cantidades de IL-4 relativamente pequeñas y grandes cantidades de IFN-γ, de acuerdo con un perfil de respuesta Th1.

La Figura 14 muestra el nivel de IFN-γ secretado en producto filtrado de cultivo de preparaciones de PBMC humanas infectadas y no infectadas 72 horas después de la adición de 10 µg/ml de producto lisado de *L. major*, M15 o L-Rack, un antígeno de *Leishmania* inmunodominante en leishmaniasis murina. De una manera similar, la Figura 15 ilustra el nivel de IFN-γ secretado en producto filtrado de cultivo de preparaciones de PBMC humanas infectadas y no infectadas 72 horas después de la adición de 10 µg/ml de producto lisado de *L. major*, antígenos solubles de *Leishmania* (preparados como se ha descrito en el Ejemplo 6) o L-Rack. Estos resultados indican que M15 y los antígenos solubles de *Leishmania*, pero no L-Rack, son estimuladores potentes de la producción de IFN-γ en PBMC de pacientes, pero no en PBMC obtenidas de individuos no infectados. De este modo, M15 y los antígenos solubles de *Leishmania* producen un perfil dominante de citoquinas Th1 en ratones y seres humanos infectados con *Leishmania*.

Ejemplo 8

Comparación de la Proliferación Estimulada por Antígenos de *Leishmania*

Este ejemplo ilustra las propiedades inmunogénicas de los antígenos preparados de acuerdo con los Ejemplos 1, 2, 5 y 6, determinadas por su capacidad para estimular la proliferación en cultivos de ganglios linfáticos de ratones infectados y en preparaciones de PBMC humanas.

Para los ensayos de proliferación *in vitro*, se cultivaron 2 - 4 x 10^5 células/pocillo en medio completo (RPMI 1640 con un suplemento de gentamicina, 2-ME, L-glutamina, y suero humano A+ agrupado escrutado al 10%; Trimar, Hollywood, CA) en placas de fondo plano de 96 pocillos con o sin 10 µg/ml de los antígenos indicados o 5 µg/ml de PHA (Sigma Immunochemicals, St. Louis, MO) durante cinco días. Las células se pulsaron a continuación con 1 µCi de [^{3}H]-timidina durante las últimas 18 horas de cultivo.

La Figura 16 ilustra la proliferación observada después de la adición de 10 µg/ml o 20 µg/mL de cada uno de los siguientes antígenos a un cultivo de ganglios linfáticos preparado como se ha descrito en el Ejemplo 7: SLA, Ldp23, LbeIF4A, Lbhsp83, y M15. También se muestra el nivel de proliferación sin la adición de antígeno. Los datos se representan como cpm medias. Estos resultados demuestran que una variedad de antígenos de *Leishmania* son susceptibles de proliferación estimuladora de células de los ganglios linfáticos de ratones infectados por *Leishmania*.

Las Figuras 17 y 18 ilustran la proliferación observada en preparaciones de PBMC humanas de individuos inmunes a *Leishmania* y no infectados después de la adición de 10 µg/mL de M15 y antígenos solubles de *Leishmania*, respectivamente. Estos valores se comparan con la proliferación observada tras la adición de medio de cultivo, producto lisado de *L. major* o L-Rack. Los resultados muestran que M15 y los antígenos solubles de *Leishmania* estimulan la proliferación en PBMC inmunes a *Leishmania*, pero no en PBMC obtenidas de individuos no infectados, demostrando que M15 y los antígenos solubles (pero no L-Rack) son reconocidos por PBMC de individuos inmunes a *Leishmania* debido a una infección previa.

Ejemplo 9

Preparación de LMSP1A Y LMSP9A

Este ejemplo ilustra la preparación de dos antígenos solubles de *Leishmania*, Lmsp1a y Lmsp9a.

A.Purificación de Lmsp1a y Lmsp9a partir de una mezcla de antígenos solubles de *L. major*

Se produjo un título elevado de sueros de conejo contra antígenos solubles de *L. major*, preparados como se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 6. Específicamente, un conejo blanco New Zealand se inmunizó por vía subcutánea en múltiples sitios con 180 µg de antígenos solubles de *L. major* en una suspensión que contenía 100 µg de muramildipéptido y coadyuvante incompleto de Freund al 50%. Seis semanas más tarde, el conejo recibió un refuerzo subcutáneo de 100 µg de la misma preparación de antígenos solubles en coadyuvante incompleto de Freund. Esto estuvo seguido de dos refuerzos intravenosos espaciados dos semanas, cada uno con 100 µg de la preparación de antígeno soluble. Los sueros se obtuvieron del conejo 11 días después del refuerzo final.

Las reactividades con anticuerpos de *E. coli* se eliminaron de los sueros de conejo mediante pre-adsorción sobre filtros de nitrocelulosa que contenían productos lisados de *E. coli*. Los sueros adsorbidos se evaluaron por medio de análisis de transferencia Western utilizando 10 µg de producto lisado de promastigota de *Leishmania* (calle 1) y 1 µg de mezcla de antígeno soluble de *L. major* (calle 2). Como se muestra en la Figura 20, se encontró que los sueros de conejo que era reactivos con siete antígenos dominantes de la mezcla de antígenos solubles de *L. major* con pesos moleculares que oscilaban de 18 a >200 kDa. Una exposición cuatro veces más larga de la misma transferencia reveló tres especies inmunorreactivas adicionales con pesos moleculares menores de 18 kDa. Los mismos sueros reaccionaron con aproximadamente 10 antígenos del producto lisado de promastigota, pero con un patrón significativamente diferente del observado con los antígenos solubles de *L. major* (Figura 20). Esto sugiere la modificación post-traduccional potencial del mismo antígeno antes (localización intracelular) y después de la secreción/circulación. Tales modificaciones pueden incluir la escisión de una secuencia líder y/o la adición de moléculas de carbohidratos a los antígenos secretados/puestos en circulación.

Los sueros de conejo descritos anteriormente se utilizaron con posterioridad para escrutar una genoteca de expresión de ADNc de *L. major* preparada a partir de ARN de promastigotas de *L. major* utilizando el kit unidireccional Lambda ZAP (uni-ZAP) (Stratagene) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Se escrutaron un total de 70.000 pfu de la genoteca de ADNc amplificada con los sueros de conejo a una dilución 1:250. Se confirmaron diecinueve clones positivos en el escrutinio terciario. El fagémido se escindió y el ADN de cada uno de los 19 clones se secuenciaron utilizando un secuenciador automático Perkin Elmer/Applied Biosystems División Modelo 373A. Se encontró que la totalidad de los 19 clones representan dos secuencias distintas, conocidas como Lmsp1a y Lmsp9a. Las secuencias de ADNc determinadas para Lmsp1a y Lmsp9a se proporcionan en los SEQ ID NO: 19 y 21, respectivamente, con las secuencias de aminoácidos correspondientes se proporcionan en los SEQ ID NO: 20 y 22, respectivamente.

B.Caracterización de Lmsp1a y Lmsp9a

La Fig. 21 muestra el ADNc completo (SEQ ID NO: 19) y secuencia de aminoácidos pronosticada (SEQ ID NO: 20) para el antígeno Lmsp1a. El inserto EcoRI/XhoI tiene 1019 pb de largo y contiene las siguientes características: a) los últimos 17 nt de la secuencia líder empalmada característica de todos los ARNm codificados nuclearmente de Trypanosoma; b) 39 nt de la secuencia 5' no traducida; c) un marco de lectura abierto de 453 nt de longitud que codifica una secuencia deducida de 151 aminoácidos con una masa molecular pronosticada de 16.641 kDa, y d) 471 nt de la secuencia 3' no traducida que termina con una cola poli A. La secuencia de aminoácidos pronosticada

contiene tres posibles sitios de fosforilación en los residuos de aminoácidos 3, 85 y 102. Además, Lmsp1a contiene una secuencia RGD en el residuo 104, una secuencia que puede jugar un papel en la invasión por parásitos de los macrófagos. Se ha demostrado que las secuencias de RGD median la unión de varias proteínas de adherencia a sus receptores de la superficie celular. No hay ninguna secuencia líder obvia (señal secretora) en la porción amino terminal lo que sugiere que la proteína podría ser puesta en circulación o excretada. Lmsp1a parece ser uno de los antígenos más abundantes encontrados en el sobrenadante de cultivo de promastigotas vivos, ya que 17 de los 19 clones contienen secuencias de longitudes variables idénticas a Lmsp1a.

La comparación de la secuencia de aminoácidos de Lmsp1a con secuencias conocidas utilizando el sistema DNA STAR (Versión 87) reveló que Lmsp1a comparte entre 65% a 70% de homología con la proteína nucleósido difosfato quinasa eucariótica, también mencionada en ratones y seres humanos como un gen inhibidor de la metástasis tumoral.

El análisis de transferencia Southern del ADN genómico de *L. major* (cepa Friedlander) digerido con un panel de enzimas de restricción (calles 1 a 7) y de otras seis especies de *Leishmania* de diferentes localizaciones geográficas digerido con PstI (calles 8 a 13) utilizando el inserto de ADNc completo de Lmsp1a, demostró que Lmsp1a está presente en todas las especies caracterizadas con un alto grado de conservación (Fig. 22). Esto sugiere la importancia evolutiva del mantenimiento de Lmsp1a y la existencia de especies homólogas entre todas las especies de *Leishmania*.

Los otros dos clones de ADNc aislados a partir de la mezcla de antígeno soluble de *L. major* representan secuencias idénticas (referida como Lmsp9a; SEQ ID NO: 21), lo que sugiere que las dos copias resultaron de la amplificación de la genoteca primaria. La secuenciación del ADNc de Lmsp9a reveló que el clon no contiene la secuencia 5' completa ya que ésta carece tanto de la secuencia líder empalmada como de la 5' no traducida. El extremo 3' del ADNc contiene un tramo poli A, como sería de esperar para un ARNm de *Leishmania*. De la secuencia pronosticada traducida (SEQ ID NO: 22), 34 de los 201 aminoácidos (17%) representan residuos de cisteína. La comparación de la secuencia de proteína pronosticada con las de proteínas conocidas como las descritas anteriormente, reveló alguna homología con otras proteínas ricas en cisteína tales como el antígeno de superficie principal de trofozoitos de *Giardia lamblia* y proteasas de tipo furina.

Ejemplo 10

Preparación y Caracterización de MAPS-1A

Este ejemplo ilustra la preparación y caracterización del antígeno de *Leishmania* MAPS-1A (SEQ ID NO: 24).

Se obtuvo una reserva de sueros a partir de 5 ratones BALB/c que habían recibido una inmunización primaria y dos refuerzos de sobrenadante de cultivo bruto de promastigota de *L. major* como se describe a continuación en el Ejemplo 12. Se demostró con posterioridad que estos ratones eran protegidos cuando se sensibilizaban con una dosis de promastigotas vivos de *L. major* que generalmente eran letales. Los sueros de ratón obtenidos de este modo se utilizaron para escrutar una genoteca de expresión de amastigotas de ADNc de *L. major* preparada como se ha descrito en el Ejemplo 1. Se aislaron varios clones serorreactivos y se secuenciaron utilizando un Secuenciador Automático Perkin Elmer/Applied Biosystems Division Modelo 373A (Foster City, CA).

Se encontró que uno de estos clones, referido en la presente memoria como MAPS-1A estaba completo. La comparación de las secuencias de ADNc y de aminoácidos deducidas para los MAPS-1A (SEQ ID NOS: 23 y 24, respectivamente) con secuencias conocidas en el banco de genes utilizando el sistema DNA STAR no reveló homologías significativas con secuencias conocidas de *Leishmania*, aunque se encontró cierta similitud de secuencia con un grupo de proteínas, conocidas como antioxidantes específicos de tiol, que se encuentra en otros organismos.

La proteína MAPS-1A recombinante que tenía una etiqueta de HIS en el extremo amino se preparó usando un sistema de alto nivel de expresión de *E. coli* y la proteína recombinante se purificó mediante cromatografía de afinidad como se describe en el Ejemplo 1. El análisis de transferencia Southern de ADN genómico de *L. major* digerido con un panel de enzimas de restricción, otras siete especies de *Leishmania* digerido con PstI, y otros dos patógenos de enfermedades infecciosas (*T. cruzi* y T. brucei), utilizando el inserto de longitud completa de MAPS-1A, demostró que MAPS-1A está presente en las ocho especies de *Leishmania* sometidas a ensayo (Figura 23). El análisis de transferencia Northern de los ARN de promastigotas y amastigotas de *L. major* indicó que los MAPS-1A se expresa constitutivamente.

Utilizando cebadores oligonucleotídicos (SEQ ID NOs: 27 y 28) basados en la secuencia de ADNc de MAPS-1A proporcionada en el SEQ ID NO: 23, se aisló el gen correspondiente de *L. tropica* por medio de PCR (utilizando 30 ciclos de la siguiente secuencia de temperatura por etapas: 94°C, 1 minuto; 50°C, 1 minuto ; 72°C, 1 minuto). La secuencia de ADNc determinada para la proteína MAPAS-1ª de *L. tropica* se proporciona en el SEQ ID NO: 25, proporcionándose la correspondiente secuencia de aminoácidos en el SEQ ID NO: 26.

La capacidad de MAPS-1A recombinante para estimular la proliferación celular se investigó como sigue. Se prepararon PBMC de 3 pacientes infectados por *L. braziliensis* con leishmaniasis mucosa activa, de 4 pacientes

post-infección por kala-azar (previamente infectados con *L. chagasi* y/o *L. donovani*) y de 3 individuos no infectados como se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 7. La capacidad de MAPS-1A para estimular la proliferación de estas PBMC se determinó como se ha descrito en el Ejemplo 8 anterior. Como se muestra en la Figura 24, se observaron niveles significativos de proliferación de PBMC específica de MAPS-1A en 2 de los 7 pacientes de *Leishmania*.

La capacidad de MAPS-1A para estimular la proliferación en cultivos de ganglios linfáticos ratones se determinó como se ha descrito en el Ejemplo 8. La Figura 25 muestra la cantidad de proliferación estimulada por MAPS-1A (a 25 µg/ml, 5 µg/ml y 1 µg/ml) en comparación con la estimulada por el control positivo de ConA y por proteínas de sobrenadante de promastigotas *de L. major* brutas, 20 días después de la infección con *L. major*. Las células aisladas 20 días después de la infección fueron altamente sensibles a MAPS-1A, mientras que las células aisladas 10 días después de la infección eran insensibles.

Ejemplo 11

Inmunorreactividad de antígenos solubles de *Leishmania* con sueros de pacientes infectados por *Leishmania*

La reactividad de MAPS-1A con sueros de individuos no infectados, de pacientes humanos de leishmaniasis con infección cutánea, de pacientes humanos con leishmaniasis visceral aguda, y de ratones BALB/c infectados por *L. major* se determinó como sigue.

Los análisis se realizaron en placas de 96 pocillos recubiertas con 200 ng de antígeno diluido a 50 µl en tampón carbonato de recubrimiento, pH 9,6. Los pocillos se recubrieron durante la noche a 4°C (o 2 horas a 37°C). Los contenidos de la placa se retiraron a continuación y los pocillos se bloquearon durante 2 horas con 200 µl de PBS/BSA al 1%. Después de la etapa de bloqueo, los pocillos se lavaron cinco veces con PBS/Tween 20™ al 0,1%. A continuación se añadieron a cada pocillo 50 µl de sueros, diluidos 1:100 en PBS/Tween 20™ al 0,1%/BSA al 0,1%, y se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente. Las placas se lavaron después de nuevo cinco veces con PBS/Tween 20™ al 0,1%.

El producto conjugado enzimático (peroxidasa de rábano picante - Proteína A, Zymed, San Francisco, CA) se diluyó a continuación 1:10.000 en PBS/Tween 20™ al 0,1%/BSA al 0,1%, y se añadieron 50 µl de producto conjugado diluido a cada pocillo y se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después de la incubación, los pocillos se lavaron cinco veces con PBS/Tween 20™ al 0,1%. Se añadieron 100 µl de tetrametilbencidina (TMB)-peroxidasa (Kirkegaard and Perry Laboratories, Gaithersburg, MD), sin diluir, y se incubaron durante aproximadamente 15 minutos. La reacción se detuvo con la adición de 100 µl de H_2SO_4 1 N a cada pocillo, y las placas se leyeron a 450 nm.

Como se muestra en la Figura 26, aproximadamente el 50% de las muestras de pacientes con leishmaniasis humana mostraron reactividades con MAPS-1A recombinante sustancialmente por encima del fondo. La Figura 27 muestra la reactividad de MAPS-1A con diluciones crecientes de sueros de ratones BALB/c a los que se había administrado previamente ya sea (i) solución salina; (ii) el coadyuvante *B. pertussis*; (iii) antígenos solubles de *Leishmania* más *B. pertussis*; (iv) promastigotas de *L. major* vivos, o (v) antígenos solubles de *Leishmania* más *B. pertussis* seguido de promastigotas vivos de *L. major* (como se describe más adelante en el Ejemplo 12). Se observaron absorbancias considerablemente más altas con sueros de ratones infectados con promastigotas vivos de *L. major* y con ratones infectados con promastigotas vivos de *L. major* después de la inmunización con antígenos solubles de *Leishmania* más *B. pertussis*, que con los sueros de los otros tres grupos de ratones, lo que indica que los títulos de anticuerpos anti-MAPS-1A aumentan después de la infección por *Leishmania*.

Ejemplo 12

Uso de Antígenos de *Leishmania* para la Vacunación Contra la Infección por *Leishmania*

Este ejemplo ilustra la eficacia de los antígenos de *Leishmania* para conferir protección contra la enfermedad en el sistema modelo de leishmaniasis murino experimental. Para una discusión del sistema modelo de leishmaniasis murino véase, por ejemplo, Reiner et al. *Annu. Rev. Immunol.*,13:151-77, 1995.

La eficacia de (i) antígenos de Leishmania solubles brutos, (ii) MAPS-1A, y (iii) una mezcla de Ldp23, LbeIF4A y M15, como vacunas contra la infección por *Leishmania* se determinó como sigue. Se inmunizaron por vía intraperitoneal ratones BALB/c (5 por grupo) tres veces a intervalos bisemanales con (i) 30 µg de antígenos de *Leishmania* solubles brutos, (ii) 20 µg de MAPS-1A o (iii) una mezcla que contenía 10 µg de cada uno de LeIF, Ldp23 y M15, junto con 100 µg del coadyuvante *C. parvum*. Dos grupos de control se inmunizaron con solución salina o *C. parvum* solo. Dos semanas después de la última inmunización, los ratones se estimularon con 2×10^5 de promastigotas de la fase log. tardía de *L. mayor*. La infección se controló semanalmente mediante la medición de la inflamación de la almohadilla plantar. La cantidad de inflamación de la almohadilla plantar observada en los ratones inmunizados con antígenos de *Leishmania* solubles brutos, una mezcla de Ldp23, LbeIF4A y M15 (Figura 28), o MAPS-1A (Figura 29) fue significativamente menor que la observada en ratones inmunizados con *C. parvum* solo. Estos resultados demuestran que los antígenos de *Leishmania* de la presente invención son eficaces para conferir protección contra la infección por *Leishmania*.

Ejemplo 13

Aislamiento de ADN que Codifica Antígenos Solubles de una Genoteca de ADN Genómico de *L. major*

Este ejemplo ilustra el aislamiento de siete genes de antígenos de *Leishmania* solubles de una genoteca de de ADN genómico de *L. major*.

Se preparó una genoteca de expresión de ADN genómico de *L. major* a partir de promastigotas de *L. major* utilizando el kit unidireccional Lambda ZAP (uni-ZAP) (Stratagene) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Esta genoteca se escrutó con sueros de conejo de alto título producidos contra antígenos solubles de *L. major*, como se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 9. Se identificaron siete clones positivos. El fagémido se escindió y el ADN de cada uno de los siete clones se secuenció utilizando un secuenciador automático Perkin Elmer/Applied Biosystems Division Modelo 373A. Las secuencias de ADN para estos antígenos, referidos como LmgSP1, LmgSP3, LmgSP5, LmgSP8, LmgSP9, LmgSP13, LmgSP19, se proporcionan en los SEQ ID NO: 29-35, respectivamente, proporcionándose las secuencias de aminoácidos correspondientes en los SEQ ID NO: 36-42, respectivamente. Se encontró que LmgSP13 contenía una secuencia repetitiva de 39 amino ácidos mostrada en el SEQ ID NO: 43.

Estudios posteriores dieron como resultado el aislamiento de una secuencia completa para LmgSP9. La secuencia de ADN completa se proporciona en el SEC ID NO: 54, proporcionándose la correspondiente secuencia de aminoácidos pronosticada en el SEQ ID NO: 55. Se encontró que la secuencia de aminoácidos contenía seis unidades repetitivas de 14 aminoácidos (SEQ ID NO: 56), dividiéndose adicionalmente cada unidad en dos unidades de 7 aminoácidos, proporcionadas en los SEQ ID NO: 57 y 58.

La comparación de la secuencias de ADN y de aminoácidos para los antígenos aislados como se describió anteriormente, no reveló homologías significativas con LmgSP1, LmgSP3, y LmgSP13. Se encontró que LmgSP5 estaba relacionado con la familia del antígeno 2 de superficie de Promastigotas (PSA2) conocida. Se encontró que LmgSP8 tenía cierta homología con una secuencia identificada previamente en *E. coli* (ácido 2-succinil-6-hidroxi-2,4-ciclohexadieno-1-carboxílico sintasa). LmgSP9 y LmgSP19 resultaron ser homólogos a una proteína de superficie hidrófila de *L. major* denominada Gen B (Flinn, HM et al. Mol. Biochem. Parasit. 65:259-270, 1994), y a la ubiquitina, respectivamente. Para el mejor conocimiento de los autores de la presente invención, no se había demostrado previamente que ninguno de estos antígenos mostrado provocara respuestas de células T o B.

En estudios adicionales, se amplificó un fragmento de ADN de 220 pb de LmgSP5 y se utilizó para escrutar una genoteca genómica de *L. Major* en Lambda ZAP. Se purificaron diecisiete clones positivos después del escrutinio secundario. Para seleccionar un clon que tenía una probabilidad de tener la secuencia 5' del inserto LmgSP5, se utilizó un oligonucleótido marcado de la región 5' para escrutar el ADN de los clones positivos secundarios. El ADN de tres clones hibridó con el oligonucleótido 5', hibridando un clon más fuertemente que los otros dos. Se encontró que este clon (secuencia de ADNc proporcionada en el SEQ ID NO: 103) contenía un inserto de 2421 pb que contenía el marco de lectura abierto completo del gen PSA-2 novedoso. Este ORF se amplificó y se clonó en el vector de expresión pET-17b para la expresión de la proteína recombinante en *E. coli*. La secuencia de ADNc del ORF se proporciona en el SEQ ID NO: 102, proporcionándose la secuencia de aminoácidos correspondiente en el SEQ ID NO: 104.

La reactividad de LmgSP9 recombinante con sueros de pacientes con leishmaniasis visceral, (tanto de Sudán como de Brasil) y de donantes normales se evaluó mediante ELISA como se ha descrito anteriormente. Los valores de absorbancia se compararon con los obtenidos utilizando el antígeno K39 de Leishmania conocido descrito anteriormente, empleándose producto lisado de L. chagasi como control positivo. Los resultados representativos de estos análisis se proporcionan a continuación en la Tabla 2, donde todos los pacientes de Brasil y los de Sudán designados como "VL" estuvieron aquejados de leishmaniasis visceral. Los resultados demostraron que LmgSP9 detecta específicamente anticuerpos en la mayoría de los individuos con leishmaniasis visceral, independientemente de su ubicación geográfica. En algunos casos, los valores de absorbancia de la reactividad de los anticuerpos a LmgSP9 fueron comparables a los observados con K39. Además, LmgSP9 detectó varios casos de leishmaniasis que no fueron detectados utilizando K39. Estos resultados indican que LmgSP9 se puede utilizar para complementar la reactividad de K39.

Tabla 2

Reactividad de LmgSP9 con sueros de pacientes con Leishmania			
Paciente Núm.	Producto lisado de *L. chagasi*	K39	LmgSP9
Muestras Sudaneses:			
B19	1,067	0,306	0,554
B25	1,884	3,435	0,974
B43	1,19	3,225	0,86

Reactividad de LmgSP9 con sueros de pacientes con Leishmania			
Paciente Núm.	Producto lisado de *L. chagasi*	K39	LmgSP9
B47	2,405	2,892	0,375
B50	0,834	0,748	0,432
B58	0,921	0,235	0,92
B63	1,291	0,303	0,764
B70	0,317	0,089	3,056
VL4	1,384	3,035	2,965
VL11	0,382	0,144	0,142
VL12	0,277	0,068	0,098
VL13	0,284	0,12	0,194
Muestras brasileñas:			
105	3,508	3,53	0,374
106	2,979	3,373	2,292
107	2,535	3,444	0,46
109	1,661	3,415	3,319
111	3,595	3,537	0,781
112	2,052	3,469	0,63
113	3,352	3,429	0,963
114	2,316	3,437	1,058
115	2,073	3,502	1,186
116	3,331	3,461	0,96
Donantes normales:			
129	0,157	0,104	0,08
130	0,195	0,076	0,095
131	0,254	0,134	0,086
132	0,102	0,035	0,043

Con el fin de obtener una mayor especificidad para la detección de anticuerpos en sueros de pacientes con leishmaniasis visceral, se aisló un homólogo de LmgSP9 a partir *L. chagasi*, uno de los agentes causantes de la leishmaniasis visceral. Se escrutaron un total de 80.000 ufp de una genoteca genómica de *L. chagasi* amplificada con la región codificante completa de LmgSP9 (amplificada a partir de ADN genómico de *L. major*). Se purificaron hasta su homogeneidad siete clones hibridantes. Las secuencias de ADN determinadas para dos de estos clones, referidos como Gene A de Lc y Gene B de Lc, se proporcionan en los SEQ ID NO: 59 y 60, respectivamente, proporcionándose las correspondientes secuencias de aminoácidos pronosticadas en los SEQ ID NO: 61 y 62, respectivamente. Se encontró que el marco de lectura abierto para Gene A de Lc mostraba cierta homología con Gene A/C, previamente aislado de *L. major* (McKlean et al., Mol. Bio. Parasitol., 85:221-231, 1997). El marco de lectura abierto para Gene B de Lc mostró cierta homología con Gene B de *L. major*, comentado anteriormente, y se encontró que contiene once repeticiones de una unidad repetitiva de 14 aminoácidos (SEQ ID NO: 63), dividiéndose adicionalmente cada repetición en dos unidades de 7 aminoácidos, proporcionadas en los SEQ ID NO: 64 y 65.

Los potenciales diagnósticos de Gene A de Lc y Gene B de Lc fueron evaluados mediante ELISA como se ha descrito anteriormente, utilizando sueros de pacientes con leishmaniasis visceral de Sudán y Brasil, y de los controles no infectados. Los valores de absorbancia se compararon con los obtenidos utilizando LmgSP9. Se obtuvieron valores de absorbancia mucho más altos con Gene A de Lc y Gene B de Lc que con LmgSP9, pareciendo ser más eficaz Gene B de Lc que parece ser más eficaz que Gene A de Lc en la detección de

anticuerpos en algunos casos. Estos resultados indican que Gene B de Lc es altamente eficaz en el diagnóstico de la leishmaniasis visceral.

Con el fin de evaluar el potencial diagnóstico de las repeticiones encontradas dentro de Gene B de Lc, se sintetizó una serie de 6 péptidos (SEQ ID NO: 66-71; referida como Pep 1-6), que difiere en un residuo R o H. Se llevó a cabo un ELISA utilizando la proteína LcGene B completa y los seis péptidos. Los valores de absorbancia obtenidos con Pep 3 fueron superiores a los obtenidos con los otros 5 péptidos, sin embargo, no fueron tan altos como los obtenidos con la proteína completa.

Ejemplo 14

Aislamiento y Caracterización de ADN que Codifica Antígenos Solubles de una Genoteca de ADN genómico de *L. chagasi*

Este ejemplo ilustra la preparación de cinco genes de antígenos solubles de *Leishmania* de una genoteca de ADN genómico de *L. chagasi*.

Se preparó una genoteca de expresión de ADN genómico de *L. chagasi* a partir de promastigotas de *L. chagasi* utilizando el kit Lambda ZAP unidireccional (uni-ZAP) (Stratagene) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Esta genoteca se escrutó con un suero de conejo de alto título producido contra antígenos solubles de *L. major*, como se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 9. Se identificaron cinco clones positivos. El fagémido se escindió y el ADN de cada uno de los Cinco clones se secuenció utilizando un secuenciador automático Perkin Elmer/Applied Biosystems Division Modelo 373A. Las secuencias de ADN para estos antígenos, denominados LcgSP1, LcgSP3, LcgSP4, LcgSP8, y LcgSP10 se proporcionan en los SEQ ID NO: 44-48, respectivamente, proporcionándose las secuencias de aminoácidos correspondientes en los SEQ ID NO: 49-53, respectivamente.

La comparación de estas secuencias con secuencias conocidas en el banco de genes descrito anteriormente no reveló homologías conocidas con LcgSP3, LcgSP4, LcgSP8 y LcgSP10. Se encontró que LcgSP1 era homólogo al antígeno HSP70 conocido.

Las Figuras 30A y B ilustran la respuesta proliferativa de ganglios linfáticos murinos a LcgSP8, LcgSP10 y LcgSP3 recombinantes. Los ganglios linfáticos se tomaron ratones BALB/c 17 días después de la infección con *L. major*. La infección se produjo por inyección en la almohadilla plantar de 2×10^6 parásitos/almohadilla plantar. Las células fueron estimuladas con antígeno recombinante y la proliferación se midió a las 72 horas utilizando ^{3}H-timidina. La Figura 30A muestra CPM, una medición directa de la actividad mitótica en respuesta a los antígenos, y la Figura 30B muestra el índice de estimulación, que mide la respuesta proliferativa con respecto al control negativo.

Ejemplo 15

Aislamiento de ADN que Codifica Antígenos de *L. major* mediante Clonación de la Expresión de Células T CD4 +

Este ejemplo ilustra el aislamiento de antígenos de *L. major* en células T utilizando un enfoque de escrutinio directo de células T.

Se obtuvieron líneas celulares CD4 + T específicas de *Leishmania* a partir de las PBMC de un individuo que dio positivo en la prueba cutánea de leishmania pero no tenía historia clínica de la enfermedad. Estas líneas de células T se utilizaron para escrutar una genoteca de expresión de ADNc de amastigotas de *L. major* preparados como se ha descrito en el Ejemplo 1. Los clones inmunorreactivos se aislaron y se secuenciaron como se ha descrito anteriormente. Las secuencias de ADNc determinadas para los 8 clones aislados referidos como 1G6-34, 1E6-44, 4A5-63, 1B11-39, 2A10-37, 4G2-83, 4H6-41, 8G3-100 se proporcionan en los SEQ ID NO: 72-79, respectivamente, proporcionándose las correspondientes secuencias de aminoácidos en los SEQ ID NO: 80-87, respectivamente. Se cree que las secuencias de ADNc proporcionadas para 1E6-44, 2A10-37, 4G2-83, 4H6-41 y 8G3-100 representan clones parciales. Se demostró que todos estos clones estimulaban la proliferación de células T.

La comparación de estas secuencias con las del banco de genes como se ha descrito anteriormente no reveló homologías conocidas con el antígeno 4A5-63. Se encontró que 1G6-34 tenía cierta homología con la histona H2B previamente identificada en *L. Enrietti*. Los antígenos 1E6-44, 1B11-39 y 8G3 100 mostraron cierta homología con secuencias previamente identificadas en otros eucariotas, en particular *Saccharomyces cerevisiae*. Se encontró que 2A10-37 y 41-4H6 eran homólogas a las dos proteínas alfa tubulina previamente identificada de *L. donovani* y beta tubulina de *L. major*, respectivamente, y se encontró que 4G2-83 era homóloga al factor 2 de iniciación y elongación identificado previamente en *T. cruzi*.

Posteriores estudios de clonación completos, utilizando técnicas convencionales, condujeron al aislamiento de una secuencia de ADNc prolongada para 1E6-44, proporcionada en el SEQ ID NO: 105. La secuencia de aminoácidos correspondiente se proporciona en el SEQ ID NO: 106. Una secuencia de ADNc prolongada para 2A10-37 se proporciona en el SEQ ID NO: 107. Se encontró que esta secuencia contenía un marco de lectura abierto completo que codifica la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 108. Una secuencia de ADNc prolongada para 4G2-83 se proporciona en el SEQ ID NO: 109. Esta secuencia contiene un marco de lectura abierto que codifica la secuencia

de aminoácidos del SEQ ID NO: 110. Una secuencia de ADNc prolongada para 8G3-100 se proporciona en el SEQ ID NO: 111, proporcionándose la secuencia de aminoácidos correspondiente en el SEQ ID NO: 112.

Los ocho antígenos descritos anteriormente (1G6-34, 1E6-44, 4A5-63, 1B11-39, 2A10-37, 4G2-83, 4H6-41, 8G3-100) se expresaron en *E. coli* en forma de proteínas de fusión recombinantes que contienen etiquetas de histidina N-terminales y se purificaron hasta la homogeneidad utilizando cromatografía de afinidad con níquel. Las 8 proteínas recombinantes purificadas provocaron fuertes respuestas proliferativas a partir de las células celulares T CD4+ empleadas en el escrutinio de la genoteca. También se observó reactividad de las células T con 1G6-34, 4H6-41 y 8G3-100 en células T generadas tanto contra producto filtrado de cultivo de promastigotas de *Leishmania* como contra producto filtrado de cultivo de amastigotas, indicando que estos antígenos se expresan en las fases vitales tanto de promastigota como de amastigota a niveles que son suficientes para evocar una respuesta inmunitaria celular fuerte.

Se examino la capacidad de los 8 antígenos para estimular la proliferación y la producción de IFN-γ en PBMC de pacientes con leishmaniasis cutánea activa (LC) y de donantes normales como se ha descrito anteriormente. Además de los 8 antígenos, también se sometieron a ensayo el producto lisado de promastigota de *Leishmania* (LPr) y el derivado de proteína purificado de *M. tuberculosis* (PDD). El número de pacientes y/o donantes que responden a cada antígeno se muestra en la Tabla 3 de más abajo. Todos los pacientes de LC respondieron al menos a uno de los 8 antígenos. Muy destacadamente, los antígenos 1G6-34 y 4H6-41 provocaron proliferación celular en 6/7 y 7/7 pacientes de LC, respectivamente, y producción de IFN-γ en 6/7 y 5/6 pacientes de LC, respectivamente. Además 1G6-34 no fue reconocido por las PBMC de donantes de control no infectados.

Tabla 3

Proliferación Celular y Producción de IFN-γ en PBMC de Pacientes con Leishmaniasis Cutánea

	Pacientes CL		Donantes normales	
Antígeno	Producción de IFN-γ	Proliferación Celular	Producción de IFN-γ	Proliferación Celular
LPr	7/7	6/7	3/8	5/8
1G6-34	6/7	5/7	0/8	0/8
1E6-44	0/7	4/7	5/8	2/8
4A5-63	1/7	1/7	0/8	0/8
1B11-39	5/7	3/7	1/8	0/8
2A10-37	1/7	3/7	1/8	0/8
4H6-41	7/7	5/7	3/8	1/8
8G3-100	0/7	2/7	5/8	2/8
PPD	7/7	7/7	7/8	7/8

Ejemplo 16

Síntesis de Polipéptidos

Los polipéptidos pueden ser sintetizados en un sintetizador de péptidos Perkin Elmer/Applied Biosystems División 430A utilizando la química FMOC con activación con HPTU (hexafluorofosfato de O-benzotriazol-N,N,N',N'-tetrametiluronio). Una secuencia Gly-Cys-Gly puede unirse al extremo amino del péptido para proporcionar un método de conjugación, unión a una superficie inmovilizada, o marcaje del péptido. La escisión de los péptidos del soporte sólido puede llevarse a cabo usando la siguiente mezcla de escisión: ácido trifluoroacético:etanoditiol:tioanisol:agua:fenol (40:1:2:2:3). Después de escindir durante 2 horas, los péptidos se pueden precipitar en metil-t-butil-éter frío. Los sedimentos de los péptidos se pueden disolver a continuación en agua que contiene ácido trifluoroacético (TFA) al 0,1% y liofilizar antes de la purificación por HPLC de fase inversa C18. Se puede utilizar un gradiente de acetonitrilo de 0%-60% (que contiene TFA al 0,1%) en agua (que contiene TFA al 0,1%) para eluir los péptidos. Después de la liofilización de las fracciones puras, los péptidos se pueden caracterizar utilizando espectrometría de masas de electropulverización u otros tipos de espectrometría de masas y mediante análisis de aminoácidos.

Ejemplo 17

Uso de Antígenos de *Leishmania* Más Coadyuvante para la Vacunación Contra la Infección por *Leishmania*

Este ejemplo ilustra la eficacia de los antígenos de *Leishmania* recombinantes, M15 y MAPS, más un coadyuvante, IL-12, para conferir protección contra la enfermedad en el sistema modelo de leishmaniasis murina experimental. Para la discusión del sistema modelo de leishmaniasis murina, véase, por ejemplo, Reiner et al. *Annu. Rev. Immunol.*,13:151-77, 1995. La eficacia de M15 y MAPS combinados con IL-12, como vacuna contra la infección por *Leishmania* se determinó como sigue: Se inmunizaron subcutáneamente ratones BALB/C (5 por grupo) en la almohadilla plantar izquierda, mezclando los 10 µg de los antígenos individuales con 1 µg de IL-12. Como controles, se inmunizaron tres grupos separados de ratones con antígenos solubles de producto lisado de *Leishmania* (SLA) más IL-12, con IL-12 sola o con PBS. Tres semanas después de la última inmunización los ratones se infectaron en la almohadilla plantar derecha con 2 x 10^5 formas promastigota de *L. major* (fase estacionaria). A continuación se midió semanalmente la hinchazón de la almohadilla plantar. Los resultados se expresan en la Fig. 31 e indican claramente que los ratones inmunizados con M15 o MAPS e IL-12 quedaron muy protegidos frente a la infección. La protección inducida por estos antígenos fue tan eficaz o más que la inducida por SLA + IL-12, un régimen conocido por inducir buena protección contra la leishmaniasis en este modelo animal (Afonso, L.C.C., T. M. Scharton, L. Q. Vieira, M. Wysocka, G. Trinchieri, y P. Scott. 1994. The adjuvant effect of intereukin-12 in a vaccine against *Leishmania major*. *Science* 263:235-237). Se obtuvo el mismo patrón de protección descrito anteriormente, es decir, M15, MAPS, y SLA, indujeron protección contra la infección por *L. major* cuando se utilizó como coadyuvante *C. parvum* en lugar de IL-12 (Ejemplo 12). Estos resultados demuestran que los antígenos recombinantes M15 y MAPS inducen una protección excelente contra la infección por *L. major* en el modelo BALB/c de leishmaniasis humana. Además, ambos antígenos indujeron protección cuando se sometieron a ensayo en dos formulaciones de coadyuvante diferentes, (por ejemplo, IL-12 y *C. parvum*). Este descubrimiento tiene una enorme significación puesto que demuestra que la inmunidad contra la leishmaniasis puede ser inducida por antígenos específicos liberados en coadyuvantes que son adecuados para uso en seres humanos.

Ejemplo 18

Uso de ADN de *Leishmania* para la Vacunación contra la Infección por *Leishmania*

Este ejemplo ilustra la eficacia del ADN de *Leishmania* para conferir protección contra la enfermedad en el sistema modelo de leishmaniasis murina experimental. Para una discusión del sistema modelo de leishmaniasis murina véase, por ejemplo, Reiner et al. *Annu. Rev. Immunol.*,13:151-77, 1995. Las propiedades de protección de los antígenos recombinantes se sometió a ensayo inmunizando ratones con ADN desnudo que contenía los genes M15 y MAPS correspondientes. El constructo de ADN utilizado fue el vector pcDNA3.1 (Invitrogen) que contenía un promotor de CMV. Se inyectaron 100 µg de las preparaciones de ADN desnudo indicadas a ratones BALB/c (5 por grupo) en la almohadilla plantar izquierda tres veces (con tres semanas de diferencia). De extrajo sangre de los ratones antes y después de las inmunizaciones para verificar el desarrollo de la respuesta inmunitaria específica. La respuesta de anticuerpos se evaluó mediante ELISA. Los anticuerpos IgG2a anti-M15 y anti-MAPS se detectaron después de la segunda inmunización en el suero de los ratones inmunizados con el ADN desnudo respectivo. La presencia de anticuerpos específicos indica que la inmunización con ADN da como resultado la producción de antígenos proteicos específicos. Tres semanas después de la última inmunización, los ratones se sensibilizaron después en la almohadilla plantar derecha con 2 x 10^5 formas promastigota de *L. major* (fase estacionaria). A continuación se midió la hinchazón de la almohadilla plantar semanalmente en lo sucesivo. Los resultados se expresan en la Fig. 32 e indicaron claramente que, de nuevo, los ratones inmunizados con ADN desnudo que contenía los genes M15 o MAPS protegían enormemente contra la infección por *L. major*. Estos resultados demuestran que los genes tanto M15 como MAPS inducen una protección excelente contra la infección por *L. major* en el modelo BALB/c de leishmaniasis humana.

Ejemplo 19

Preparación y Caracterización de las Proteínas de Fusión de *Leishmania*

Las proteínas de fusión que comprenden los antígenos de *Leishmania* MAPS-1A (SEQ ID NO: 24), M15 (SEQ ID NO: 2), Lbhsp83 (SEQ ID NO: 6) y LbeIF4A (SEQ ID NO: 10) se prepararon como sigue.

Se preparó un constructo de fusión de MAPS-1ª y M15 amplificando en primer lugar mediante PCR la secuencia codificante completa de MAPS-1A utilizando los cebadores de los SEQ ID NO: 88 y 89. Los productos resultantes se digirieron con NdeI y BamHI. Los productos ligados se transformaron en *E. coli* y los transformantes que contenían el inserto correcto se identificaron mediante digestión de restricción y se verificaron mediante secuenciación de ADN. El plásmido MAPS-1A-pET se digirió con BamHI y EcoRI. Los últimos cortes en la secuencia poliligadora del vector pET que está localizada aguas abajo del sitio BamHI.

Los cebadores de los SEQ ID NO: 90 y 91 se emplearon para amplificar mediante PCR la secuencia codificante completa de M15 y el producto resultante se digirió con BamHI y EcoRI seguido de subclonación en el plásmido MAPS-1A-pET predigerido anterior. Los productos ligados se transformaron a continuación en E. coli y los transformantes con el inserto correcto se identificaron mediante digestión de restricción y se verificaron mediante

secuenciación de ADN. El constructo MAPS-1A-M15 pET se transformó en el anfitrión bacteriano (BL21; pLysE). La expresión de la proteína dio como resultado una única molécula recombinante con un peso molecular pronosticado de 85,7 kDa. La proteína de fusión MAPS-1A-M15 recombinante también contenía 33 residuos de aminoácido del vector circulante como resultado de la eliminación del codón de parada de M15 y con posterioridad se digirió con EcoRI. La secuencia de ADN del constructo MAPS-1A-M15 se proporciona en el SEQ ID NO:101.

Los cebadores de los SEQ ID NO: 92 y 93 se utilizaron para amplificar mediante PCR los primeros 226 residuos de aminoácido de LbeIF4A. El producto de PCR resultante se digirió con EcoRI y se subclonó en el plásmido MAPS-1A-M15-pET. Los productos ligados se transformaron a continuación en *E. coli* y los transformantes con el inserto y la orientación correctos se identificaron mediante digestión de restricción y se verificaron mediante secuenciación de ADN. La proteína recombinante expresada se purificó mediante cromatografía de afinidad sobre una columna con Ni. Las secuencias de ADN y de aminoácidos de la proteína de fusión MAPS-1A-M15-LbeIF4A se proporcionan en los SEQ ID NO: 94 y 95, respectivamente.

Se prepararon proteínas de fusión adicionales utilizando la metodología descrita con anterioridad. Las secuencias de aminoácidos de las proteínas de fusión MAPS-1A-M15-Lbhs83 y MAPS-1A-M15-Lbhs83-LbeIF4A se proporcionan en los SEQ ID NO: 96 y 97, respectivamente. La secuencia de ADN que codifica la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 97 se proporciona en el SEQ ID NO: 98. Las secuencias de ADN de los vectores MAPS-1A-M15-Lbhs83 y MAPS-1A-M15-Lbhs83-LbeIF4A empleados en las vacunas de ADN se proporcionan en los SEQ ID NO: 99 y 100, respectivamente.

Ejemplo 20

Uso de Proteínas de Fusión de *Leishmania* Más Coadyuvante para la Vacunación Contra la Infección por *Leishmania*

La capacidad de las proteínas de fusión de *Leishmania* MAPS1A-M15 (referida como diFusión) y MAPS1A-M15-LbeIF4A (referida como triFusión), más coadyuvante, para conferir protección contra la enfermedad en el sistema modelo de leishmaniasis murina experimental se examinó a continuación.

Las diFusión y triFusión se prepararon como se ha descrito anteriormente. En una primera serie de experimentos, se inmunizaron grupos de ratones BALB/c con los antígenos recombinantes individuales, (MAPS1A, M15 o LbeIF4A), la diFusión o la triFusión, con IL-12 como coadyuvante, como se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 17. Los ratones de control se inmunizaron con IL-12 o solución salina. Antes de la sensibilización, se sacrificaron algunos ratones (tres por grupo) y se investigaron la respuestas inmunitarias a las proteínas de fusión y a los antígenos individuales. Se evaluaron las respuestas tanto de las células T (producción de citoquinas por las células del bazo) como de las células B (respuesta de anticuerpos). Los resultados indicaron que la inmunización de los ratones con las proteínas de fusión no interfiere con la inmunogenicidad de los antígenos individuales. Más específicamente, se observaron respuestas Th1 (es decir inducción de la producción de IFN-γ y producción específica de IgG2a) tanto para MAPS1A como para M15, cuando los ratones se inmunizaron con ambas proteínas recombinantes diFusión y triFusión. Además, la inmunización con triFusión dio como resultado una buena respuesta inmunitaria a LeIF.

Para evaluar la protección conferida por estas proteínas de fusión, los ratones inmunizados y de control se infectaron en la almohadilla plantar derecha con 2 x 10^3 formas amastigota de *L. major* y se midió semanalmente después de eso la hinchazón de la almohadilla plantar. Los resultados, mostrados en la Fig. 33, indicaron claramente que ambas proteínas de fusión inducían protección comparable a MAPS1A y M15.

Se realizó una segunda serie de experimentos en los que se empleó MPL-SE (Ribi ImmunoChem Research Inc. (Hamilton, MT) como coadyuvante. Se inmunizaron tres veces (intervalo de tres semanas) ratones BALB/c con 2 µg de los antígenos individuales (MAPS1A, M15 o LbeIF4A), las proteínas diFusión o triFusión más MPL-SE, y se sometieron a ensayo para determinar la inmunogenicidad de los antígenos y para determinar la protección como se ha descrito antes. Como con los experimentos realizados con IL-12 como coadyuvante, los ratones inmunizados con los antígenos individuales así como con las proteínas de fusión mostró ambas respuestas de células T y B específicas contra los antígenos inmunizantes. Por otra parte, no se observó competición antigénica entre los antígenos individuales cuando se utilizan las proteínas de fusión como inmunógenos.

Como con los estudios de protección en los que se utilizó IL-12 como coadyuvante, la protección se logró con los antígenos individuales MAS1A y M15, así como con las dos proteínas de fusión (Fig. 34). Se observó una protección ligeramente mejor en el grupo de ratones inmunizados con la triFusión en lugar de los ratones inmunizados con la diFusión.

Lista de secuencias

<110> Corixa Corporation
Reed, Steven G.
Campos-Neto, Antonio
Webb, John R.
Dillion, Davin C.
Skeiky, Yasir A.W.
Bhatia, Ajay
Coler, Rhea
Probst, Peter

<120> ANTÍGENOS DE LEISHMANIA PARA SU USO EN LA TERAPIA Y EL DIÁGNÓSTICO DE LA LEISHMANIASIS

<130> 210121.42007PC

<140> PCT
<141> 2001-04-05

<160> 112

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1
<211> 3134
<212> ADN
<213> Leishmania major

<220>
<221> característica_misc
<222> (1)...(3134)
<223> n = A,T,C o G

<400> 1

caagtgtcga aggacagtgt tcnccgtgtg agatcgccgg ctgtgcgtgt gaaggcggtg 60
ccatcggana aacaacaccg gtgganccgc aggaaaccat ctttctccgc aggtctcttt 120
ttgttgtcga ttgagagtgc nccaaaccct gctggtgccc ttctcacata tcatgttttt 180
cgttgtgcgc tcgctttgcc tttcctctcc tttccctctc ttccgtggtg ccgtgtatac 240
ttctggcacc cgctacgtca cttcgctggt ttgaacagaa ccactgtgaa cacccacggg 300
cgatcgcaca catacacatc cctcactcac acacacagct acatctatcc tacataaagc 360
tgaaaaaaaa gtctacgaac aattttgttt ttacagtgcg ttgccgcaca tttctccgta 420
atggacgcaa ctgagctgaa gaacaagggg aacgaagagt tctccgccgg ccgctatgtg 480
gaggcggtga actacttctc aaaggcgatc cagttggatg agcagaacag tgtcctctac 540
agcaaccgct ccgcctgttt tgcagccatg cagaaataca aggacgcgct ggacgacgcc 600
gacaagtgca tctcgatcaa gccgaattgg gccaagggct acgtgcgccg aggagcagct 660
ctccatggca tgcgccgcta cgacgatgcc attgccgcgt atgaaaaggg gctcaaggtg 720
gacccttcca acagcggctg cgcgcagggc gtgaaggacg tgcaggtagc caaggcccgc 780
gaagcacgtg accccatcgc tcgcgtcttc accccggagg cgttccgcaa gatccaagag 840
aatcccaagc tgtctctact tatgctgcag ccggactacg tgaagatggt agacaccgtc 900
atccgcgacc cttcgcaggg ccggctgtac atggaagacc agcgctttgc cctgacgctc 960
atgtacctga gcggaatgaa gattcccaac gatggtgatg gcgaggagga ggaacgtccg 1020
tctgcgaagg cggcagagac agcgaagcca aaagaggaga agcctctcac cgacaacgag 1080
aaggaggccc tggcgctcaa ggaggagggc aacaagctgt acctctcgaa gaagtttgag 1140
gaggcgctga ccaagtacca agaggcgcag gtgaaagacc ccaacaacac tttatacatt 1200
ctgaacgtgt cggccgtgta cttcgagcag ggtgactacg acaagtgcat cgccgagtgc 1260

```
gagcacggta tcgagcacgg tcgcgagaac cactgcgact acacaatcat tgcgaagctc    1320
atgacccgga acgccttgtg cctccagagg cagaggaagt acgaggctgc tatcgacctt    1380
tacaagcgcg cccttgtcga gtggcgtaac cctgacaccc tcaagaagct gacggagtgc    1440
gagaaggagc accaaaaggc ggtggaggaa gcctacatcg atcctgagat cgcgaagcag    1500
aagaaagacg aaggtaacca gtacttcaag gaggataagt tccccgaggc cgtggcagcg    1560
tacacggagg ccatcaagcg caaccctgcc gagcacacct cctacagcaa tcgcgcggcc    1620
gcgtacatca agcttggagc cttcaacgac gccctcaagg acgcggagaa gtgcattgag    1680
ctgaagcccg actttgttaa gggctacgcg cgcaagggtc atgcttactt ttggaccaag    1740
cagtacaacc gcgcgctgca ggcgtacgat gagggcctca aggtggaccc gagcaatgcg    1800
gactgcaagg atgggcggta tcgcacaatc atgaagattc aggagatggc atctggccaa    1860
tccgcggatg gcgacgaggc ggcgcgccgg gccatggacg atcctgaaat cgcggcaatc    1920
atgcaagata gctacatgca actagtgttg aaggagatgc agaacgatcc cacgcgcatt    1980
caggagtaca tgaaggactc cgggatctca tcgaagatca acaagctgat ttcagctggc    2040
atcattcgtt ttggtcagta gacttctacg ctgcctcatc ttttccgtgt ctttgcgtcg    2100
gcgggtatcg taaagcacaa taaagcagcg attcacatgc acgagtaaag tgctgcgcct    2160
ctcaaacacg acgtcgaggc tgtggtgcag atgcgcgtcc tgcatgaagg tagtgaagag    2220
gaaagtaagg gatgttgttt gtgggccttc gtggctgcgc acacacctct tatctccttc    2280
gcttggtacc ttctcccttt ttcgtcttca ccccccttcc tcttctcacg ctctccctgg    2340
cgcggtggtg caacgatttc gttttattta cgtctgtgta gctcctctat tcaacggtgc    2400
gatgacgcta acgaagctgg cctgtattcg gctaaggcga aggcaaaaga ctaggagggg    2460
gggggaagg agacggcgtg accatcactg cgaagaaaca agccgaagaa aaggccccga    2520
acgcctgcat ttccgcgcgc cctcgcccgc cttccttcct tccttcgctc tctctctctc    2580
tctctctcgc tatcttctca acggagacat gaaaggcgtt tgttaggaaa agaggggggg    2640
gggaagagtg ggacgacgcg ctgcgtcttt tgggcactgg tcacgtgcgt caccctcttt    2700
ttttatctct attggcactg tcttgtttct tttcctttc ctatcatacg cgtctcgcaa    2760
acgactccgc gctgagcagc catgtgctgc ggcgtggagg aagtacacag acatcacgga    2820
tgcatatgtg cgcgtccgtg tacgcgcttg tatggggctt ctaacagcgc ctgtgtgtgt    2880
ttgtgtgtgt gtgtgtgtgt gtgtctgtgt atttcgagcg tctgtatgct attctattaa    2940
gcaccgaaga agagacacac acgacagcga aggagatggt gtcggctttt cggctaatca    3000
ctcccttcca tagcttctct gaaggaggct ctcttccaga ggaatagact gcagatgggg    3060
tccacgttta tctgaggagt caacggaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa    3120
aaaaaaaact cgag                                                     3134
```

<210> 2
<211> 546
<212> PRT
<213> Leishmania major

<400> 2

```
Met Asp Ala Thr Glu Leu Lys Asn Lys Gly Asn Glu Glu Phe Ser Ala
 1               5                  10                  15
Gly Arg Tyr Val Glu Ala Val Asn Tyr Phe Ser Lys Ala Ile Gln Leu
            20                  25                  30
Asp Glu Gln Asn Ser Val Leu Tyr Ser Asn Arg Ser Ala Cys Phe Ala
        35                  40                  45
Ala Met Gln Lys Tyr Lys Asp Ala Leu Asp Asp Ala Asp Lys Cys Ile
    50                  55                  60
Ser Ile Lys Pro Asn Trp Ala Lys Gly Tyr Val Arg Arg Gly Ala Ala
65                  70                  75                  80
Leu His Gly Met Arg Arg Tyr Asp Asp Ala Ile Ala Ala Tyr Glu Lys
                85                  90                  95
Gly Leu Lys Val Asp Pro Ser Asn Ser Gly Cys Ala Gln Gly Val Lys
            100                 105                 110
Asp Val Gln Val Ala Lys Ala Arg Glu Ala Arg Asp Pro Ile Ala Arg
        115                 120                 125
Val Phe Thr Pro Glu Ala Phe Arg Lys Ile Gln Glu Asn Pro Lys Leu
    130                 135                 140
Ser Leu Leu Met Leu Gln Pro Asp Tyr Val Lys Met Val Asp Thr Val
```

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

<210> 3
<211> 676
<212> ADN
<213> Leishmania donovani

<400> 3

```
aattcggcac gaggcattgt gcataatggt caagtcccac tacatctgcg cgggccgcct      60
ggtgcgcatc ctgcgtggcc cccgccagga ccgcgttggt gtgatcgtcg acattgtcga     120
cgcgaaccgc gtgctggtgg agaacccgga ggacgcgaag atgtggcgcc acgtgcagaa     180
cctgaagaac gtggagccgc tgaagtactg cgtgagcgtc agccgcaact gcagcgcgaa     240
ggcgctgaag gatgcgctgg cctcgtcgaa ggcgctggag aagtacgcga agacgcgcac     300
tgctgcgcgc gtggaggcga agaaggcgtg cgccgcgtcg acggacttcg agcgctacca     360
gctgcgcgtt gcgcgccgtt ctcgcgcgca ctgggcgcgc aaggtgttcg acgagaagga     420
cgcgaagacg cccgtgtcgt ggcacaaggt tgcgctgaag aagatgcaga agaaggccgc     480
aaagatggac tcgaccgagg gcgctaagag gcgcatgcag aaggcgatcg ctgcccgcaa     540
ggcgaaaaag taaggccata ccctcacttc gcttgtttcg tgatttttcg tgggagtcgg     600
tggccctacc agcggtcttt cattggctta tttctatccg gtctgaaaga ggtacaaaaa     660
aaaaaaaaaa aaaaaa                                                     676
```

<210> 4
<211> 175
<212> PRT
<213> Leishmania donovani

<900> 4

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

<210> 5
<211> 2040
<212> ADN
<213> Leishmania braziliensis

<400> 5

```
cgcggtggcg gccgctctag aactagtgga tcccccgggc tgcaggaatt cggcacgaga      60
gagcctgacg gacccggcgg tgctgggcga ggagactcac ctgcgcgtcc gcgtggtgcc     120
ggacaaggcg aacaagacgc tgacggtgga ggataacggc atcggcatga ccaaggcgga     180
cctcgtgaac aatctgggca cgatcgcgcg ctccggcacg aaggctttca tggaggcact     240
ggaggccggc ggcgacatga gcatgatcgg ccagttcggt gtcggcttct actccgcgta     300
ccttgtggcg gaccgcgtga cggtggtgtc gaagaacaac tcggacgagg cgtactggga     360
atcgtctgcg gggggcacgt tcaccatcac gagcgtgcag gagtcggaca tgaagcgcgg     420
cacgagtaca acgctgcacc taaaggagga ccagcaggag tacctggagg agcgccgggt     480
gaaggagctg atcaagaagc actccgagtt catcggctac gacatcgagc tgatggtgga     540
gaagacggcg gagaaggagg tgacggacga ggacgaggag gaggacgagt cgaagaagaa     600
```

```
gtcctgcggg gacgagggcg agccgaaggt ggaggaggtg acggagggcg gcgaggacaa     660
gaagaagaag acgaagaagg tgaaggaggt gaagaagacg tacgaggtca agaacaagca     720
caagccgctc tggacgcgcg acacgaagga cgtgacgaag gaggagtacg cggccttcta     780
caaggccatc tccaacgact gggaggacac ggcggcgacg aagcacttct cggtggaggg     840
ccagctggag ttccgcgcga tcgcgttcgt gccgaagcgc gcgccgttcg acatgttcga     900
gccgaacaag aagcgcaaca acatcaagct gtacgtgcgc cgcgtgttca tcatggacaa     960
ctgcgaggac ctgtgcccgg actggctcgg cttcgtgaag ggcgtcgtgg acagcgagga    1020
cctgccgctg aacatctcgc gcgagaacct gcagcagaac aagatcctga aggtgatccg    1080
caagaacatc gtgaagaagt gcctggagct gttcgaagag atagcggaga acaaggagga    1140
ctacaagcag ttctacgagc agttcggcaa gaacatcaag ctgggcatcc acgaggacac    1200
ggcgaaccgc aagaagctga tggagttgct gcgcttctac agcaccgagt cgggggagga    1260
gatgacgaca ctgaaggact acgtgacgcg catgaagccg gagcagaagt cgatctacta    1320
catcactggc gacagcaaga agaagctgga gtcgtcgccg ttcatcgaga aggcgagacg    1380
ctgcgggctc gaggtgctgt tcatgacgga gccgatcgac gagtacgtga tgcagcaggt    1440
gaaggacttc gaggacaaga agttcgcgtg cctgacgaag gaaggcgtgc acttcgagga    1500
gtccgaggag gagaagaagc agcgcgagga gaagaaggcg gcgtgcgaga agctgtgcaa    1560
gacgatgaag gaggtgctgg gcgacaaggt ggagaaggtg accgtgtcgg agcgcctgtt    1620
gacgtcgccg tgcatcctgg tgacgtcgga gtttgggtgg tcggcgcaca tggaacagat    1680
catgcgcaac caggcgctgc gcgactccag catggcgcag tacatggtgt ccaagaagac    1740
gatggaggtg aaccccgacc accccatcat caaggagctg cgccgccgcg tggaggcgga    1800
cgagaacgac aaggccgtga aggacctcgt cttcctgctc ttcgacacgt cgctgctcac    1860
gtccggcttc cagctggatg accccaccgg ctacgccgag cgcatcaacc gcatgatcaa    1920
gctcggcctg tcgctcgacg aggaggagga ggaggtcgcc gaggcgccgc cggccgaggc    1980
agcccccgcg gaggtcaccg ccggcacctc cagcatggag caggtggact gagccggtaa    2040
```

<210> 6
<211> 656
<212> PRT
<213> Leshmania braziliensis

<400> 6

```
Ser Leu Thr Asp Pro Ala Val Leu Gly Glu Glu Thr His Leu Arg Val
  1               5                  10                  15

Arg Val Val Pro Asp Lys Ala Asn Lys Thr Leu Thr Val Glu Asp Asn
             20                  25                  30

Gly Ile Gly Met Thr Lys Ala Asp Leu Val Asn Asn Leu Gly Thr Ile
         35                  40                  45

Ala Arg Ser Gly Thr Lys Ala Phe Met Glu Ala Leu Glu Ala Gly Gly
     50                  55                  60

Asp Met Ser Met Ile Gly Gln Phe Gly Val Gly Phe Tyr Ser Ala Tyr
 65                  70                  75                  80

Leu Val Ala Asp Arg Val Thr Val Val Ser Lys Asn Asn Ser Asp Glu
                 85                  90                  95

Ala Tyr Trp Glu Ser Ser Ala Gly Gly Thr Phe Thr Ile Thr Ser Val
            100                 105                 110

Gln Glu Ser Asp Met Lys Arg Gly Thr Ser Thr Thr Leu His Leu Lys
        115                 120                 125

Glu Asp Gln Gln Glu Tyr Leu Glu Glu Arg Arg Val Lys Glu Leu Ile
    130                 135                 140
```

```
Lys Lys His Ser Glu Phe Ile Gly Tyr Asp Ile Glu Leu Met Val Glu
145                 150                 155                 160

Lys Thr Ala Glu Lys Glu Val Thr Asp Glu Asp Glu Glu Glu Asp Glu
                165                 170                 175

Ser Lys Lys Lys Ser Cys Gly Asp Glu Gly Glu Pro Lys Val Glu Glu
            180                 185                 190

Val Thr Glu Gly Gly Glu Asp Lys Lys Lys Lys Thr Lys Lys Val Lys
        195                 200                 205

Glu Val Lys Lys Thr Tyr Glu Val Lys Asn Lys His Lys Pro Leu Trp
    210                 215                 220

Thr Arg Asp Thr Lys Asp Val Thr Lys Glu Glu Tyr Ala Ala Phe Tyr
225                 230                 235                 240

Lys Ala Ile Ser Asn Asp Trp Glu Asp Thr Ala Ala Thr Lys His Phe
                245                 250                 255

Ser Val Glu Gly Gln Leu Glu Phe Arg Ala Ile Ala Phe Val Pro Lys
            260                 265                 270

Arg Ala Pro Phe Asp Met Phe Glu Pro Asn Lys Lys Arg Asn Asn Ile
        275                 280                 285

Lys Leu Tyr Val Arg Arg Val Phe Ile Met Asp Asn Cys Glu Asp Leu
    290                 295                 300

Cys Pro Asp Trp Leu Gly Phe Val Lys Gly Val Val Asp Ser Glu Asp
305                 310                 315                 320

Leu Pro Leu Asn Ile Ser Arg Glu Asn Leu Gln Gln Asn Lys Ile Leu
                325                 330                 335

Lys Val Ile Arg Lys Asn Ile Val Lys Lys Cys Leu Glu Leu Phe Glu
            340                 345                 350

Glu Ile Ala Glu Asn Lys Glu Asp Tyr Lys Gln Phe Tyr Glu Gln Phe
        355                 360                 365

Gly Lys Asn Ile Lys Leu Gly Ile His Glu Asp Thr Ala Asn Arg Lys
    370                 375                 380

Lys Leu Met Glu Leu Leu Arg Phe Tyr Ser Thr Glu Ser Gly Glu Glu
385                 390                 395                 400

Met Thr Thr Leu Lys Asp Tyr Val Thr Arg Met Lys Pro Glu Gln Lys
                405                 410                 415

Ser Ile Tyr Tyr Ile Thr Gly Asp Ser Lys Lys Lys Leu Glu Ser Ser
            420                 425                 430

Pro Phe Ile Glu Lys Ala Arg Arg Cys Gly Leu Glu Val Leu Phe Met
        435                 440                 445

Thr Glu Pro Ile Asp Glu Tyr Val Met Gln Gln Val Lys Asp Phe Glu
```

```
     450                 455                 460

Asp Lys Lys Phe Ala Cys Leu Thr Lys Glu Gly Val His Phe Glu Glu
465                 470                 475                 480

Ser Glu Glu Glu Lys Lys Gln Arg Glu Glu Lys Lys Ala Ala Cys Glu
                485                 490                 495

Lys Leu Cys Lys Thr Met Lys Glu Val Leu Gly Asp Lys Val Glu Lys
            500                 505                 510

Val Thr Val Ser Glu Arg Leu Leu Thr Ser Pro Cys Ile Leu Val Thr
        515                 520                 525

Ser Glu Phe Gly Trp Ser Ala His Met Glu Gln Ile Met Arg Asn Gln
    530                 535                 540

Ala Leu Arg Asp Ser Ser Met Ala Gln Tyr Met Val Ser Lys Lys Thr
545                 550                 555                 560

Met Glu Val Asn Pro Asp His Pro Ile Ile Lys Glu Leu Arg Arg Arg
                565                 570                 575

Val Glu Ala Asp Glu Asn Asp Lys Ala Val Lys Asp Leu Val Phe Leu
            580                 585                 590

Leu Phe Asp Thr Ser Leu Leu Thr Ser Gly Phe Gln Leu Asp Asp Pro
        595                 600                 605

Thr Gly Tyr Ala Glu Arg Ile Asn Arg Met Ile Lys Leu Gly Leu Ser
    610                 615                 620

Leu Asp Glu Glu Glu Glu Glu Val Ala Glu Ala Pro Pro Ala Glu Ala
625                 630                 635                 640

Ala Pro Ala Glu Val Thr Ala Gly Thr Ser Ser Met Glu Gln Val Asp
                645                 650                 655
```

<210> 7
<211> 1771
<212> ADN
<213> Leishmania tropica

<400> 7

```
caggcccgcg tccaggccct cgaggaggca gcgcgtctcc gcgcggagct ggaggcggcc      60
gaggaggcgg cccgcctgga tgtcatgcat gcggccgagc aggcccgtgt ccaggccctc     120
gaggaggcag cgcgtctccg cgcggagctg gaggaggccg aggaggcggc ccgcctggat     180
gtcatgcatg cggccgagca ggcccgcgtc caggccctcg aggaggcagc gcgtctccgc     240
gcggagctgg aggctgccga ggaggcggcg cgcctggagg ccatgcacga ggccgagcag     300
gcccgctccc aggccctcga ggaggcagcg cgtctccgcg cggagctgga ggaagccgag     360
gaggcggccc gcctggatgt catgcatgcg gccgagcagg cccgcgtcca ggccctcgag     420
gaggcagcgc gtctccgcgc ggagctggag gaggccgagg aggcggcccg cctggaggcc     480
atgcacgagg ccgagcaggc ccgctcccag gccctcgagg aggcagcgcg tctccgcgcg     540
gagctggagg cggccgagga ggcggcccgc ctggatgtca tgcacgaggc cgagcaggcc     600
cgtgtccagg ccctcgagga ggcggcgcgc ctggatgtca tgcacgaggc cgagcaggcc     660
cgcgtccagg ccctcgagga ggcagcgcgt ctccgcgcgg agctggaggc ggccgaggag     720
```

```
gcggcccgcc tggatgtcat gcacgaggcc gagcaggccc gcgtccaggc cctcgaggag     780
gcagcgcgtc tccgcgcgga gctggaggcg gccgaggagg cggcccgcct ggatgtcatg     840
cacgagggcg agcaggcccg tgtccaggcc ctcgaggagg cggcccgcct ggaggccatg     900
cacgaggccg agcaggcccg ctcccaggcc ctcgaggagg cagcgcgtct ctgcgcggag     960
ctggaggctg aggaggagga aaaagatgag cggccggcga cgtcgagcta cagcgaggag    1020
tgcaaagggc gactgctatc gagggcgcgg ccggatccgc ggaggccgct gccgcggccg    1080
ttcattggga tgtcactgtt ggaggatgtg gagaagagta ttctcattgt ggacgggctc    1140
tacagggatg ggccggcgta ccagacgggc atccgcctcg gggatgtcct cttgcgtatc    1200
gcgggggttt acgtggattc aatagcgaag gcgaggcagg tggtcgatgc gcgttgccgc    1260
tgcggctgcg tcgttcccgt gacgctggcg acgaagatga accagcagta cagcgtggct    1320
ctgtatatca tgacggtgga tccgcagcac aacgacaagc ccttttttct tgatgtgcac    1380
atccaccacc gcatcgagag ctcgcacatg gggaagaagg cgcagtggat ggaagttctt    1440
gagagcccat ccgtatcttc ggctgccacc acccctctcg tgccgctctt gcgtgagccg    1500
acgccgcgta ggggctcaga gctgcagtca agtgctcgtt ccgccttcgt tgccacgtct    1560
tacttctcga gcgcgcgcag gtcggtcagc tcagaaagtg agcgaccgcg cgggtcctct    1620
agcgtggcta tggcggagga ggcgatcgcg ctggcgccgc aagggtatac cccacccaac    1680
caagtgcgcg gccgtagttg acgtctctgt gtgagtgtgt gtcgctccgt ctccttcctt    1740
tttcgtcatg tgttttattc atttcttttt c                                   1771
```

<210> 8
<211> 566
<212> PRT
<213> Leishmania tropica

<400> 8

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

```
            260                 265                 270
Glu Ala Ala Arg Leu Asp Val Met His Glu Gly Glu Gln Ala Arg Val
        275                 280                 285
Gln Ala Leu Glu Glu Ala Ala Arg Leu Glu Ala Met His Glu Ala Glu
    290                 295                 300
Gln Ala Arg Ser Gln Ala Leu Glu Glu Ala Ala Arg Leu Cys Ala Glu
305                 310                 315                 320
Leu Glu Ala Glu Glu Glu Glu Lys Asp Glu Arg Pro Ala Thr Ser Ser
                325                 330                 335
Tyr Ser Glu Glu Cys Lys Gly Arg Leu Leu Ser Arg Ala Arg Pro Asp
            340                 345                 350
Pro Arg Arg Pro Leu Pro Arg Pro Phe Ile Gly Met Ser Leu Leu Glu
        355                 360                 365
Asp Val Glu Lys Ser Ile Leu Ile Val Asp Gly Leu Tyr Arg Asp Gly
    370                 375                 380
Pro Ala Tyr Gln Thr Gly Ile Arg Leu Gly Asp Val Leu Leu Arg Ile
385                 390                 395                 400
Ala Gly Val Tyr Val Asp Ser Ile Ala Lys Ala Arg Gln Val Val Asp
                405                 410                 415
Ala Arg Cys Arg Cys Gly Cys Val Val Pro Val Thr Leu Ala Thr Lys
            420                 425                 430
Met Asn Gln Gln Tyr Ser Val Ala Leu Tyr Ile Met Thr Val Asp Pro
        435                 440                 445
Gln His Asn Asp Lys Pro Phe Phe Phe Asp Val His Ile His His Arg
    450                 455                 460
Ile Glu Ser Ser His Met Gly Lys Lys Ala Gln Trp Met Glu Val Leu
465                 470                 475                 480
Glu Ser Pro Ser Val Ser Ser Ala Ala Thr Thr Pro Leu Val Pro Leu
                485                 490                 495
Leu Arg Glu Pro Thr Pro Arg Arg Gly Ser Glu Leu Gln Ser Ser Ala
            500                 505                 510
Arg Ser Ala Phe Val Ala Thr Ser Tyr Phe Ser Ser Ala Arg Arg Ser
        515                 520                 525
Val Ser Ser Glu Ser Glu Arg Pro Arg Gly Ser Ser Ser Val Ala Met
    530                 535                 540
Ala Glu Glu Ala Ile Ala Leu Ala Pro Gln Gly Tyr Thr Pro Pro Asn
545                 550                 555                 560
Gln Val Arg Gly Arg Ser
                565
```

<210> 9
<211> 1618
<212> ADN
<213> Leishmania braziliensis

<400> 9

```
ccactctctc ggtcgtctgt ctcccacgcg cgcacgcagt tgatttccgc cttcttaaac      60
gctctctttt tttttatttt tcacctgacc aaccgcacca cgtcggcctc catcatgtcg     120
cagcaagacc gagttgcccc acaggaccag gactcgttcc tcgacgacca gcccggcgtc     180
cgcccgatcc cgtccttcga tgacatgccg ttgcaccaga accttctgcg cggcatctac     240
tcgtacggct tcgagaaacc gtccagcatc cagcagcgcg ccatcgcccc cttcacgcgc     300
ggcggcgaca tcatcgcgca ggcgcagtcc ggtaccggca agacgggcgc cttctccatc     360
ggcctgctgc agcgcctgga cttccgccac aacctgatcc agggcctcgt gctctccccg     420
acccgcgagc tggccctgca gacggcggag gtgatcagcc gcatcggcga gttcctgtcg     480
aacagcgcga agttctgtga gacctttgtg ggtggcacgc gcgtgcagga tgacctgcgc     540
aagctgcagg ctggcgtcgt cgtcgccgtg gggacgccgg gccgcgtgtc cgacgtgatc     600
aagcgcggcg cgctgcgcac cgagtccctg cgcgtgctgg tgctcgacga ggctgatgag     660
atgctgtctc agggcttcgc ggatcagatt tacgagatct tccgcttcct gccgaaggac     720
```

```
atccaggtcg cgctcttctc cgccacgatg ccggaggagg tgctggagct gacaaagaag     780
ttcatgcgcg accccgtacg cattctcgtg aagcgcgaga gcctgacgct ggagggcatc     840
aagcagttct tcatcgccgt cgaggaggag cacaagctgg acacgctgat ggacctgtac     900
gagaccgtgt ccatcgcgca gtccgtcatc ttcgccaaca cccgccgcaa ggtggactgg     960
atcgccgaga agctgaatca gagcaaccac accgtcagca gcatgcacgc cgagatgccc    1020
aagagcgacc gcgagcgcgt catgaacacc ttccgcagcg gcagctcccg cgtgctcgta    1080
acgaccgacc tcgtggcccg cggcatcgac gtgcaccacg tgaacatcgt catcaacttc    1140
gacctgccga cgaacaagga gaactacctg caccgcattg gccgcggcgg ccgctacggc    1200
gtaaagggtg ttgccatcaa cttcgtgacg gagaaagacg tggagctgct gcacgagatc    1260
gaggggcact accacacgca gatcgatgag ctcccggtgg actttgccgc ctacctcggc    1320
gagtgagcgg gcccctgccc cccttccctg ccccctctc gcgacgagag aacgcacatc    1380
gtaacacagc cacgcgaacg atagtaaggg cgtgcggcgg cgttcccctc ctcctgccag    1440
cggccccct ccgcagcgct tctcttttga gaggggggca gggggaggcg ctgcgcctgg    1500
ctggatgtgt gcttgagctt gcattccgtc aagcaagtgc tttgttttaa ttatgcgcgc    1560
cgttttgttg ctcgtccctt tcgttggtgt tttttcggcc gaaacggcgt ttaaagca      1618
```

<210> 10
<211> 403
<212> PRT
<213> Leishmania braziliensis

<400> 10

```
Met Ser Gln Gln Asp Arg Val Ala Pro Gln Asp Gln Asp Ser Phe Leu
 1               5                  10                  15
Asp Asp Gln Pro Gly Val Arg Pro Ile Pro Ser Phe Asp Asp Met Pro
            20                  25                  30
Leu His Gln Asn Leu Leu Arg Gly Ile Tyr Ser Tyr Gly Phe Glu Lys
        35                  40                  45
Pro Ser Ser Ile Gln Gln Arg Ala Ile Ala Pro Phe Thr Arg Gly Gly
    50                  55                  60
Asp Ile Ile Ala Gln Ala Gln Ser Gly Thr Gly Lys Thr Gly Ala Phe
65                  70                  75                  80
Ser Ile Gly Leu Leu Gln Arg Leu Asp Phe Arg His Asn Leu Ile Gln
                85                  90                  95
Gly Leu Val Leu Ser Pro Thr Arg Glu Leu Ala Leu Gln Thr Ala Glu
            100                 105                 110
Val Ile Ser Arg Ile Gly Glu Phe Leu Ser Asn Ser Ala Lys Phe Cys
        115                 120                 125
Glu Thr Phe Val Gly Gly Thr Arg Val Gln Asp Asp Leu Arg Lys Leu
    130                 135                 140
Gln Ala Gly Val Val Val Ala Val Gly Thr Pro Gly Arg Val Ser Asp
145                 150                 155                 160
Val Ile Lys Arg Gly Ala Leu Arg Thr Glu Ser Leu Arg Val Leu Val
                165                 170                 175
Leu Asp Glu Ala Asp Glu Met Leu Ser Gln Gly Phe Ala Asp Gln Ile
            180                 185                 190
Tyr Glu Ile Phe Arg Phe Leu Pro Lys Asp Ile Gln Val Ala Leu Phe
        195                 200                 205
Ser Ala Thr Met Pro Glu Glu Val Leu Glu Leu Thr Lys Lys Phe Met
    210                 215                 220
Arg Asp Pro Val Arg Ile Leu Val Lys Arg Glu Ser Leu Thr Leu Glu
225                 230                 235                 240
Gly Ile Lys Gln Phe Phe Ile Ala Val Glu Glu Glu His Lys Leu Asp
                245                 250                 255
Thr Leu Met Asp Leu Tyr Glu Thr Val Ser Ile Ala Gln Ser Val Ile
            260                 265                 270
Phe Ala Asn Thr Arg Arg Lys Val Asp Trp Ile Ala Glu Lys Leu Asn
        275                 280                 285
```

```
Gln Ser Asn His Thr Val Ser Ser Met His Ala Glu Met Pro Lys Ser
    290                 295                 300
Asp Arg Glu Arg Val Met Asn Thr Phe Arg Ser Gly Ser Ser Arg Val
305                 310                 315                 320
Leu Val Thr Thr Asp Leu Val Ala Arg Gly Ile Asp Val His His Val
                325                 330                 335
Asn Ile Val Ile Asn Phe Asp Leu Pro Thr Asn Lys Glu Asn Tyr Leu
            340                 345                 350
His Arg Ile Gly Arg Gly Gly Arg Tyr Gly Val Lys Gly Val Ala Ile
        355                 360                 365
Asn Phe Val Thr Glu Lys Asp Val Glu Leu Leu His Glu Ile Glu Gly
    370                 375                 380
His Tyr His Thr Gln Ile Asp Glu Leu Pro Val Asp Phe Ala Ala Tyr
385                 390                 395                 400
Leu Gly Glu
```

<210> 11
<211> 12
<212> PRT
<213> Leishmania donovani

<220>
<221> VARIANTE
<222> (1)...(5)
<223> Xaa =cualquier aminoácido

<221> VARIANTE
<222> (6)...(6)
<223> Xaa = Leu o Lys

<221> VARIANTE
<222> (7)...(12)
<223> Xaa =cualquier aminoácido

<400> 11

```
Xaa Gln Xaa Pro Gln Xaa Val Phe Asp Glu Xaa Xaa
 1               5                  10
```

<210> 12
<211> 26
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador de PCR sentido

<221> base_modificada
<222> (1)...(26)
<223> I

<221> característica_misc
<222> (1)...(26)
<223> n = A,T,C o G

<400> 12

ggaattcccc ncagctngtn ttcgac26

<210> 13
<211> 5
<212> PRT

<213> Leishmania donovani

<400> 13

Lys Val Phe Asp Glu
1 5

<210> 14
<211> 30
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador de PCR

<400> 14

ggatccatgg tcaagtccca ctacatctgc30

<210> 15
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Cebador de PCR

<400> 15

gaattcagac cggatagaaa taagccaatg aaa33

<210> 16
<211> 701
<212> PRT
<213> Leishmania amozonensis

<400> 16

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

```
                 165                 170                 175
Glu Asp Gln Leu Glu Tyr Leu Glu Ala Arg Arg Leu Lys Glu Leu Ile
            180                 185                 190
Lys Lys His Ser Glu Phe Ile Gly Tyr Asp Ile Glu Leu Met Val Glu
        195                 200                 205
Lys Thr Thr Glu Lys Glu Val Thr Asp Glu Asp Glu Glu Glu Ala Lys
    210                 215                 220
Lys Ala Asp Glu Asp Gly Glu Glu Pro Lys Val Glu Glu Val Thr Glu
225                 230                 235                 240
Gly Glu Glu Asp Lys Lys Lys Lys Thr Lys Lys Val Lys Glu Val Thr
                245                 250                 255
Lys Glu Tyr Glu Val Gln Asn Lys His Lys Pro Leu Trp Thr Arg Asp
            260                 265                 270
Pro Lys Asp Val Thr Lys Glu Glu Tyr Ala Ala Phe Tyr Lys Ala Ile
        275                 280                 285
Ser Asn Asp Trp Glu Asp Pro Pro Ala Thr Lys His Phe Ser Val Glu
    290                 295                 300
Gly Gln Leu Glu Phe Arg Ala Ile Met Phe Val Pro Lys Arg Ala Pro
305                 310                 315                 320
Phe Asp Met Leu Glu Pro Asn Lys Lys Arg Asn Asn Ile Lys Leu Tyr
                325                 330                 335
Val Arg Arg Val Phe Ile Met Asp Asn Cys Glu Asp Leu Cys Pro Asp
            340                 345                 350
Trp Leu Gly Phe Val Lys Gly Val Val Asp Ser Glu Asp Leu Pro Leu
        355                 360                 365
Asn Ile Ser Arg Glu Asn Leu Gln Gln Asn Lys Ile Leu Lys Val Ile
    370                 375                 380
Arg Lys Asn Ile Val Lys Lys Cys Leu Glu Met Phe Glu Glu Val Ala
385                 390                 395                 400
Glu Asn Lys Glu Asp Tyr Lys Gln Phe Tyr Glu Gln Phe Gly Lys Asn
                405                 410                 415
Ile Lys Leu Gly Ile His Glu Asp Thr Ala Asn Arg Lys Lys Leu Met
            420                 425                 430
Glu Leu Leu Arg Phe Tyr Ser Thr Glu Ser Gly Glu Val Met Thr Thr
        435                 440                 445
Leu Lys Asp Tyr Val Thr Arg Met Lys Ala Glu Gln Asn Ser Ile Tyr
    450                 455                 460
Tyr Ile Thr Gly Asp Ser Lys Lys Lys Leu Glu Ser Ser Pro Phe Ile
465                 470                 475                 480
Glu Gln Ala Lys Arg Arg Gly Phe Glu Val Leu Phe Met Thr Glu Pro
                485                 490                 495
Tyr Asp Glu Tyr Val Met Gln Gln Val Lys Asp Phe Glu Asp Lys Lys
            500                 505                 510
Phe Ala Cys Leu Thr Lys Glu Gly Val His Phe Glu Glu Ser Glu Glu
        515                 520                 525
Glu Lys Lys Gln Arg Glu Glu Glu Lys Ala Thr Cys Glu Lys Leu Cys
    530                 535                 540
Lys Thr Met Lys Glu Val Leu Gly Asp Lys Val Glu Lys Val Thr Val
545                 550                 555                 560
Ser Glu Arg Leu Ser Thr Ser Pro Cys Ile Leu Val Thr Ser Glu Phe
                565                 570                 575
Gly Trp Ser Ala His Met Glu Gln Met Met Arg Asn Gln Ala Leu Arg
            580                 585                 590
Asp Ser Ser Met Ala Gln Tyr Met Met Ser Lys Lys Thr Met Glu Leu
        595                 600                 605
Asn Pro Lys His Pro Ile Ile Lys Glu Leu Arg Arg Arg Val Glu Ala
    610                 615                 620
Asp Glu Asn Asp Lys Ala Val Lys Asp Leu Val Phe Leu Leu Phe Asp
```

```
625                 630                 635                 640
Thr Ser Leu Leu Thr Ser Gly Phe Gln Leu Glu Asp Pro Thr Tyr Ala
                645                 650                 655
Glu Arg Ile Asn Arg Met Ile Lys Leu Gly Leu Ser Leu Asp Glu Glu
            660                 665                 670
Glu Glu Glu Glu Ala Val Glu Ala Ala Val Ala Glu Thr Ala Pro Ala
        675                 680                 685
Glu Val Thr Ala Gly Thr Ser Ser Met Glu Leu Val Asp
    690                 695                 700
```

<210> 17
<211> 704
<212> PRT
<213> T. Cruzi

<400> 17

```
Met Thr Glu Thr Phe Ala Phe Gln Ala Glu Ile Asn Gln Leu Met Ser
 1               5                  10                  15
Leu Ile Ile Asn Thr Phe Tyr Ser Asn Lys Glu Ile Phe Leu Arg Glu
            20                  25                  30
Leu Ile Ser Asn Ala Ser Asp Ala Cys Asp Lys Ile Arg Tyr Gln Ser
        35                  40                  45
Leu Thr Asn Gln Ala Val Leu Gly Asp Glu Ser His Leu Arg Ile Arg
    50                  55                  60
Val Val Pro Asp Lys Ala Asn Lys Thr Leu Thr Val Glu Asp Thr Gly
65                  70                  75                  80
Ile Gly Met Thr Lys Ala Glu Leu Val Asn Asn Leu Gly Thr Ile Ala
                85                  90                  95
Arg Ser Gly Thr Lys Ala Phe Met Glu Ala Leu Glu Ala Gly Gly Asp
            100                 105                 110
Met Ser Met Ile Gly Gln Phe Gly Val Gly Phe Tyr Ser Ala Tyr Leu
        115                 120                 125
Val Ala Asp Arg Val Thr Val Val Ser Lys Asn Asn Asp Asp Glu Ala
    130                 135                 140
Tyr Thr Trp Glu Ser Ser Ala Gly Gly Thr Phe Thr Val Thr Pro Thr
145                 150                 155                 160
Pro Asp Cys Asp Leu Lys Arg Gly Thr Arg Ile Val Leu His Leu Lys
                165                 170                 175
Glu Asp Gln Gln Glu Tyr Leu Glu Glu Arg Arg Leu Lys Asp Leu Ile
            180                 185                 190
Lys Lys His Ser Glu Phe Ile Gly Tyr Asp Ile Glu Leu Met Val Glu
        195                 200                 205
Lys Ala Thr Glu Lys Glu Val Thr Asp Glu Asp Glu Asp Glu Ala Ala
    210                 215                 220
Ala Thr Lys Asn Glu Glu Gly Glu Glu Pro Lys Val Glu Glu Val Lys
225                 230                 235                 240
Asp Asp Ala Glu Glu Gly Glu Lys Lys Lys Lys Thr Lys Lys Val Lys
                245                 250                 255
Glu Val Thr Gln Glu Phe Val Val Gln Asn Lys His Lys Pro Leu Trp
            260                 265                 270
Thr Arg Asp Pro Lys Asp Val Thr Lys Glu Glu Tyr Ala Ala Phe Tyr
        275                 280                 285
Lys Ala Ile Ser Asn Asp Trp Glu Glu Pro Leu Ser Thr Lys His Phe
    290                 295                 300
Ser Val Glu Gly Gln Leu Glu Phe Arg Ala Ile Leu Phe Val Pro Lys
305                 310                 315                 320
Arg Ala Pro Phe Asp Met Phe Glu Pro Ser Lys Lys Arg Asn Asn Ile
                325                 330                 335
```

```
Lys Leu Tyr Val Arg Arg Val Phe Ile Met Asp Asn Cys Glu Asp Leu
            340                 345                 350
Cys Pro Glu Trp Leu Ala Phe Val Arg Gly Val Val Asp Ser Glu Asp
        355                 360                 365
Leu Pro Leu Asn Ile Ser Arg Glu Asn Leu Gln Gln Asn Lys Ile Leu
    370                 375                 380
Lys Val Ile Arg Lys Asn Ile Val Lys Lys Ala Leu Glu Leu Phe Glu
385                 390                 395                 400
Glu Ile Ala Glu Asn Lys Glu Asp Tyr Lys Lys Phe Tyr Glu Gln Phe
                405                 410                 415
Gly Lys Asn Val Lys Leu Gly Ile His Glu Asp Ser Ala Asn Arg Lys
            420                 425                 430
Lys Leu Met Glu Leu Leu Arg Phe His Ser Ser Glu Ser Gly Glu Asp
        435                 440                 445
Met Thr Thr Leu Lys Asp Tyr Val Thr Arg Met Lys Glu Gly Gln Lys
    450                 455                 460
Cys Ile Tyr Tyr Val Thr Gly Asp Ser Lys Lys Lys Leu Glu Thr Ser
465                 470                 475                 480
Pro Phe Ile Glu Gln Ala Arg Arg Arg Gly Phe Glu Val Leu Phe Met
                485                 490                 495
Thr Glu Pro Ile Asp Glu Tyr Val Met Gln Gln Val Lys Asp Phe Glu
            500                 505                 510
Asp Lys Lys Phe Ala Cys Leu Thr Lys Glu Gly Val His Phe Glu Glu
        515                 520                 525
Thr Glu Glu Glu Lys Lys Gln Arg Glu Glu Glu Lys Thr Ala Tyr Glu
    530                 535                 540
Arg Leu Cys Lys Ala Met Lys Asp Val Leu Gly Asp Lys Val Glu Lys
545                 550                 555                 560
Val Val Val Ser Glu Arg Leu Ala Thr Ser Pro Cys Ile Leu Val Thr
                565                 570                 575
Ser Glu Phe Gly Trp Ser Ala His Met Glu Gln Ile Met Arg Asn Gln
            580                 585                 590
Ala Leu Arg Asp Ser Ser Met Ser Ala Tyr Met Met Ser Lys Lys Thr
        595                 600                 605
Met Glu Ile Asn Pro Ala His Pro Ile Val Lys Glu Leu Lys Arg Arg
    610                 615                 620
Val Glu Ala Asp Glu Asn Asp Lys Ala Val Lys Asp Leu Val Tyr Leu
625                 630                 635                 640
Leu Phe Asp Thr Ala Leu Leu Thr Ser Gly Phe Thr Leu Asp Asp Pro
                645                 650                 655
Thr Ser Tyr Ala Glu Arg Ile His Arg Met Ile Lys Leu Gly Leu Ser
            660                 665                 670
Leu Asp Asp Glu Asp Asn Gly Asn Glu Glu Ala Glu Pro Ala Ala Ala
        675                 680                 685
Val Pro Ala Glu Pro Val Ala Gly Thr Ser Ser Met Glu Gln Val Asp
    690                 695                 700
```

<210> 18
<211> 732
<212> PRT
<213> Homo sapien

<400> 18

```
Met Pro Glu Glu Thr Gln Thr Gln Asp Gln Pro Met Glu Glu Glu Glu
 1               5                  10                  15
Val Glu Thr Phe Ala Phe Gln Ala Glu Ile Ala Gln Leu Met Ser Leu
            20                  25                  30
Ile Ile Asn Thr Phe Tyr Ser Asn Lys Glu Ile Phe Leu Arg Glu Leu

        35                  40                  45
Ile Ser Asn Ser Ser Asp Ala Leu Asp Lys Ile Arg Tyr Glu Ser Leu
    50                  55                  60
Thr Asp Pro Ser Lys Leu Asp Ser Gly Lys Glu Leu His Ile Asn Leu
65                  70                  75                  80
Ile Pro Asn Lys Gln Asp Arg Ala Leu Thr Ile Val Asp Thr Gly Ile
                85                  90                  95
Gly Met Thr Lys Ala Asp Leu Ile Asn Asn Leu Gly Thr Ile Ala Lys
            100                 105                 110
Ser Gly Thr Lys Ala Phe Met Glu Ala Leu Gln Ala Gly Ala Asp Ile
        115                 120                 125
Ser Met Ile Gly Gln Phe Gly Val Gly Phe Tyr Ser Ala Tyr Leu Val
    130                 135                 140
Ala Glu Lys Val Thr Val Ile Thr Lys His Asn Asp Asp Glu Gln Tyr
145                 150                 155                 160
Ala Trp Glu Ser Ser Ala Gly Gly Ser Phe Thr Val Arg Thr Asp Thr
                165                 170                 175
Gly Glu Pro Met Gly Arg Gly Thr Lys Val Ile Leu His Leu Lys Glu
            180                 185                 190
Asp Gln Thr Glu Tyr Leu Glu Glu Arg Arg Ile Lys Glu Ile Val Lys
        195                 200                 205
Lys His Ser Gln Phe Ile Gly Tyr Pro Ile Thr Leu Phe Val Glu Lys
    210                 215                 220
Glu Arg Asp Lys Glu Val Ser Asp Asp Glu Ala Glu Glu Lys Glu Asp
225                 230                 235                 240
Lys Glu Glu Glu Lys Glu Lys Glu Glu Lys Glu Ser Glu Asp Lys Pro
                245                 250                 255
Glu Ile Glu Asp Val Gly Ser Asp Glu Glu Asp Glu Lys Lys Asp Gly
            260                 265                 270
Asp Lys Lys Lys Lys Lys Lys Ile Lys Glu Lys Tyr Ile Asp Lys Glu
        275                 280                 285
Glu Leu Asn Lys Thr Lys Pro Ile Trp Thr Arg Asn Pro Asp Asp Ile
    290                 295                 300
Thr Asn Glu Glu Tyr Gly Glu Phe Tyr Lys Ser Leu Thr Asn Asp Trp
305                 310                 315                 320
Glu Asp His Leu Ala Val Lys His Phe Ser Val Glu Gly Gln Leu Glu
                325                 330                 335
Phe Arg Ala Leu Leu Phe Val Pro Arg Arg Ala Pro Phe Asp Leu Phe
            340                 345                 350
Glu Asn Arg Lys Lys Lys Asn Asn Ile Lys Leu Tyr Val Arg Arg Val
        355                 360                 365
Phe Ile Met Asp Asn Cys Glu Glu Leu Ile Pro Glu Tyr Leu Asn Phe
    370                 375                 380
Ile Arg Gly Val Val Asp Ser Glu Asp Leu Pro Leu Asn Ile Ser Arg
385                 390                 395                 400
Glu Met Leu Gln Gln Ser Lys Ile Leu Lys Val Ile Arg Lys Asn Leu
                405                 410                 415
Val Lys Lys Cys Leu Glu Leu Phe Thr Glu Leu Ala Glu Asp Lys Glu
            420                 425                 430
Asn Tyr Lys Lys Phe Tyr Glu Gln Phe Ser Lys Asn Ile Lys Leu Gly
        435                 440                 445
Ile His Glu Asp Ser Gln Asn Arg Lys Lys Leu Ser Glu Leu Leu Arg
    450                 455                 460
Tyr Tyr Thr Ser Ala Ser Gly Asp Glu Met Val Ser Leu Lys Asp Tyr
465                 470                 475                 480
Cys Thr Arg Met Lys Glu Asn Gln Lys His Ile Tyr Tyr Ile Thr Gly
                485                 490                 495
Glu Thr Lys Asp Gln Val Ala Asn Ser Ala Phe Val Glu Arg Leu Arg
```

```
                500                 505                 510
Lys His Gly Leu Glu Val Ile Tyr Met Ile Glu Pro Ile Asp Glu Tyr
        515                 520                 525
Cys Val Gln Gln Leu Lys Glu Phe Glu Gly Lys Thr Leu Val Ser Val
    530                 535                 540
Thr Lys Glu Gly Leu Glu Leu Pro Glu Asp Glu Glu Glu Lys Lys Lys
545                 550                 555                 560
Gln Glu Glu Lys Lys Thr Lys Phe Glu Asn Leu Cys Lys Ile Met Lys
                565                 570                 575
Asp Ile Leu Glu Lys Lys Val Glu Lys Val Val Val Ser Asn Arg Leu
            580                 585                 590
Val Thr Ser Pro Cys Cys Leu Val Thr Ser Thr Tyr Gly Trp Thr Ala
        595                 600                 605
Asn Met Glu Arg Ile Met Lys Ala Gln Ala Leu Arg Asp Asn Ser Thr
    610                 615                 620
Met Gly Tyr Met Ala Ala Lys Lys His Leu Glu Ile Asn Pro Asp His
625                 630                 635                 640
Ser Ile Ile Glu Thr Leu Arg Gln Lys Ala Glu Ala Asp Lys Asn Asp
                645                 650                 655
Lys Ser Val Lys Asp Leu Val Ile Leu Leu Tyr Glu Thr Ala Leu Leu
            660                 665                 670
Ser Ser Gly Phe Ser Leu Glu Asp Pro Gln Thr His Ala Asn Arg Ile
        675                 680                 685
Tyr Arg Met Ile Lys Leu Gly Leu Gly Ile Asp Glu Asp Asp Pro Thr
    690                 695                 700
Ala Asp Asp Thr Ser Ala Ala Val Thr Glu Glu Met Pro Pro Leu Glu
705                 710                 715                 720
Gly Asp Asp Asp Thr Ser Arg Met Glu Glu Val Asp
                725                 730
```

<210> 19
<211> 1019
<212> ADN
<213> Leishmania major

<400> 19

```
gaattcggca cgaggtttct gtactttatt gcttccagcc tttattcact cttcgatttc      60
ctctaacacc atgtcctccg agcgcacctt tattgccgtc aagccggacg gcgtgcagcg     120
cggcctcgtt ggcgagatca tcgcccgctt cgagcgcaag ggctacaagc tcgtcgcctt     180
gaagatactg cagccgacga cggagcaggc ccagggtcac tataaggacc tttgctccaa     240
gccgtttttc ccggcccttg tgaagtactt ctcctctggc ccgatcgtgt gtatggtgtg     300
ggagggtaag aacgtggtga agagcggccg cgtgctgctc ggcgcgacga acccggccga     360
ctcacagccc ggcacgatcc gtggcgactt tgccgtggat gtgggccgca acgtgtgcca     420
cgggtccgac tctgtggaga gcgcggagcg cgagatcgcc ttttggttca aggcggatga     480
gatcgcgagc tggacgtcgc actccgtgtc ccagatctat gagtaacggt gattgcggac     540
acgctttgag gacgtagctg tacccccaat gaattcttct ctgaaaacca catcataagc     600
ctcttaagag gttatttttc ttgatcgatg cccggtggtg accagcacca ttcctttatc     660
ggattcactc acactcctag cgaatcatgt agtgcggtga gagtgggctc tggaggagac     720
tgttgtgtag ccatggcttc aggagagaaa acaaaataca aggaaaggca atatgtaact     780
atggggttcc ctttttact atgcaaagtt tttataactc ctgatcggca aaaacaacaa     840
caaccgccat acaccaagag caaatgcttt cttctgcgga ctgtgcttct gttttttttt     900
atgaaggagt gactcgcgcg atgaaaagtg tgtgcgtggg agatgtattt cctttttttg     960
ttcatagtgg cgacagctca ctgttgacga tgacaaaaaa aaaaaaaaaa aaactcgag     1019
```

<210> 20
<211> 151
<212> PRT
<213> Leishmania major

<400> 20

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

<210> 21
<211> 1523
<212> ADN
<213> Leishmania major

<400> 21

```
gaattcggca cgagtgctgc ccgacatgac atgctcgctg accggacttc agtgcacaga      60
cccgaactgc aagacctgca caacttacgg tcagtgcaca gactgcaacg acggctacgg     120
tctcacctcc tccagcgttt gcgtgcgctg cagtgtagcg ggctgcaaga gctgccccgt     180
cgacgctaac gtctgcaaag tgtgtctcgg cggcagcgag ccgatcaaca atatgtgccc     240
ctgcaccgac cccaactgcg ccagctgccc cagcgacgct ggcacgtgca ctcagtgcgc     300
gaacggctac ggtctcgtgg acggcgcctg tgtgagatgc caggagccca actgcttcag     360
ctgcgacagc gacgcgaata agtgcacaca atgtgcgccg aactactacc tcaccccgct     420
cttgacctgc tccccggtgg cctgcaacat cgagcactgc atgcagtgcg acccacagac     480
gccgtcgcgc tgccaggagt gcgtgtcccc ctacgtggtt gacagctacg acggcctctg     540
caggctctcc gatgcctgct ccgtgcccaa ctgcaagaag tgcgagaccg gtacctccag     600
gctctgcgcc gagtgcgaca ccggctacag tctctccgcc gacgcgacga gctgcagcag     660
tccaaccacg cagccgtgcg aggtggagca ctgcaacaca tgtgtgaacg gcgatagcac     720
ccgctgtgcc tactgcaaca ccggctacta cgtctccgat ggcaagtgca aggccatgca     780
gggctgctac gtgtcgaact gcgcgcagtg catgctgctt gacagcacca agtgctccac     840
gtgcgtgaaa gggtacctgc tcacgtcgtc ctacagttgc gtctcgcaga aagtcatcaa     900
cagtgcggcc gcgccctact ctctgtgggt ggccgccgcc gtgctcctca cctcttttgc     960
catgcaccta gcatagtgcg cagcggcatg cgaacaaccc cactctcatt ctccaacatg    1020
tgcatacaca cacacacaga cagcggggca gcacccccctc cccacacaca cacacgcact    1080
tccccccttgt cttgttcttc tttcctcgtt cgcatttctt tctctcgtgc gctggcgccg    1140
gcctcctgca cgtcgctccc ctccccctaa cctctattct ctctctctct ctctctcgcc    1200
ggcatcattg cttcttaccc ttttctgatc cttgctcgcg tgggcggaca ctgccacagt    1260
cccacagcgc agacacacgt gtttaaacgg cgcaggcatc cctccctatc acttcatttc    1320
tcctaaagcc actcaccaag tcgcacaccg ccctccccca tcggccgccc ttccgggcgc    1380
agctgtgcgg aatgggtgtg tgctcgacct cgttcctggc agctcactcg catgtgtaca    1440
gccactccaa ccacgaaagc tctcttctgc gcacataaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaact    1500
cgaggggggg cccggtaccc aaa                                            1523
```

<210> 22
<211> 320
<212> PRT
<213> Leishmania major

<400> 22

```
Val Leu Pro Asp Met Thr Cys Ser Leu Thr Gly Leu Gln Cys Thr Asp
 1               5                  10                  15
Pro Asn Cys Lys Thr Cys Thr Thr Tyr Gly Gln Cys Thr Asp Cys Asn
            20                  25                  30
Asp Gly Tyr Gly Leu Thr Ser Ser Ser Val Cys Val Arg Cys Ser Val
        35                  40                  45
Ala Gly Cys Lys Ser Cys Pro Val Asp Ala Asn Val Cys Lys Val Cys
    50                  55                  60
Leu Gly Gly Ser Glu Pro Ile Asn Asn Met Cys Pro Cys Thr Asp Pro
65                  70                  75                  80
Asn Cys Ala Ser Cys Pro Ser Asp Ala Gly Thr Cys Thr Gln Cys Ala
                85                  90                  95
Asn Gly Tyr Gly Leu Val Asp Gly Ala Cys Val Arg Cys Gln Glu Pro
            100                 105                 110
Asn Cys Phe Ser Cys Asp Ser Asp Ala Asn Lys Cys Thr Gln Cys Ala
        115                 120                 125
Pro Asn Tyr Tyr Leu Thr Pro Leu Leu Thr Cys Ser Pro Val Ala Cys
    130                 135                 140
Asn Ile Glu His Cys Met Gln Cys Asp Pro Gln Thr Pro Ser Arg Cys
145                 150                 155                 160
Gln Glu Cys Val Ser Pro Tyr Val Val Asp Ser Tyr Asp Gly Leu Cys
                165                 170                 175
Arg Leu Ser Asp Ala Cys Ser Val Pro Asn Cys Lys Lys Cys Glu Thr
            180                 185                 190
Gly Thr Ser Arg Leu Cys Ala Glu Cys Asp Thr Gly Tyr Ser Leu Ser
        195                 200                 205
Ala Asp Ala Thr Ser Cys Ser Ser Pro Thr Thr Gln Pro Cys Glu Val
    210                 215                 220
Glu His Cys Asn Thr Cys Val Asn Gly Asp Ser Thr Arg Cys Ala Tyr
225                 230                 235                 240
Cys Asn Thr Gly Tyr Tyr Val Ser Asp Gly Lys Cys Lys Ala Met Gln
                245                 250                 255
Gly Cys Tyr Val Ser Asn Cys Ala Gln Cys Met Leu Leu Asp Ser Thr
            260                 265                 270
Lys Cys Ser Thr Cys Val Lys Gly Tyr Leu Leu Thr Ser Ser Tyr Ser
        275                 280                 285
Cys Val Ser Gln Lys Val Ile Asn Ser Ala Ala Ala Pro Tyr Ser Leu
    290                 295                 300
Trp Val Ala Ala Ala Val Leu Leu Thr Ser Phe Ala Met His Leu Ala
305                 310                 315                 320
```

<210> 23
<211> 797
<212> ADN
<213> Leishmania major

<400> 23

```
ctgtacttta ttgccaccag ccagccatgt cctgcggtaa cgccaagatc aactctcccg      60
cgccgtcctt cgaggaggtg gcgctcatgc ccaacggcag cttcaagaag atcagcctct     120
cctcctacaa gggcaagtgg gtcgtgctct tcttctaccc gctcgacttt agcttcgtgt     180
gcccgacaga ggtcatcgcg ttctccgaca gcgtgagtcg cttcaacgag ctcaactgcg     240
aggtcctcgc gtgctcgata gacagcgagt acgcgcacct gcagtggacg ctgcaggacc     300
gcaagaaggg cggcctcggg accatggcga tcccaatgct agccgacaag accaagagca     360
tcgctcgttc ctacggcgtg ctggaggaga gccagggcgt ggcctaccgc ggtctcttca     420
```

```
tcatcgaccc ccatggcatg ctgcgtcaga tcaccgtcaa tgacatgccg gtgggccgca     480
gcgtggagga ggttctacgc ctgctggagg cttttcagtt cgtggagaag cacggcgagg     540
tgtgccccgc gaactggaag aagggcgccc ccacgatgaa gccggaaccg aatgcgtctg     600
tcgagggata cttcagcaag cagtaaacct gtgagcgtcg caggagtcag tgtgacctca     660
cccgcctctg ccagtgggtg cgagagggcg tgagggattg tgggaaggct gttggatatg     720
atgcagacag cgatgaatgc aactcccaca cactggccct cctcagccct ctccacacag     780
acacacgcac gcatgtg                                                    797
```

<210> 24
<211> 199
<212> PRT
<213> Leishmania major

<400> 24

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

<210> 25
<211> 637
<212> ADN
<213> Leishmania tropica

<400> 25

```
ttacatatgc atcaccacca ccaccacatg tcctgcggta acgccaagat caactctccc      60
gcgccgccct tcgaggagat ggcgctcatg cccaacggca gcttcaagaa gatcagcctc     120
tccgcctaca agggcaagtg ggtcgtgctc ttcttctacc cgctcgactt caccttcgtg     180
tgcccgacag agatcatcgc gttctccgac aacgtgagtc gcttcaacga gctcaactgc     240
gaggtcctcg cgtgctcgat ggacagcgag tacgcgcacc tgcagtggac gctgcaggac     300
cgcaagaagg gcggcctcgg ggccatggcg atcccaatgc tggccgacaa gactaagagc     360
atcgctcgtt cctacggcgt gctggaggag agccagggcg tggcctaccg cggtctcttc     420
atcatcgacc cccgtggcat ggtgcgtcag atcaccgtca acgacatgcc ggtgggccgc     480
aacgtggagg aggctctgcg cctgctggag gctttgcagt tcgtggagaa gcacggcgag     540
gtgtgccccg cgaactggaa gaagggcgcc cccacgatga agccggaacc gaaggcgtct     600
gtcgagggat acttcagcaa gcagtaagaa ttccatg                              637
```

<210> 26
<211> 206
<212> PRT
<213> Leishmania tropica

<400> 26

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

<210> 27
<211> 51
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador de PCR

<400> 27

caattacata tgcatcacca tcaccatcac atgtcctgcg gtaacgccaa g 51

<210> 28
<211> 31
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador de PCR

<400> 28

catggaattc ttactgcttg ctgaagtatc c 31

<210> 29
<211> 520
<212> ADN
<213> Leishmania major

<220>
<221> característica_misc
<222> (1)...(520)
<223> n = A, T, C o G

<400> 29

ggcacgagcc cttgcctaca tttgctcgcc gatattcgcg gggagttctt caatttgcgt 60
cgcgtagaac tgctcaatgt cgcgcaacaa gcgcagctcg tcgtggcgca cgaaggtgat 120
ggccagtcca gtgcggccca tgcggccagt gcggccgatg cggtgaatgt actgctcacg 180
cgcgagcggc aaatcgtagc tgaggacgag cgagacgcgc tccacatcaa tgccacgcgc 240
ccacaggtcc gttgtaatga ncacgcggct gtgtccatta cggaatgccg cataatctcg 300
tcgcgctccg cctggggcat gtcgccgtgc atggcggaca cagcgaaatt ctcgcgcgtc 360
atcttcttgg caagctgctc caccttttg cgggtgttgc anaaaaccac ngcgtgggcg 420
atcgttaagc tgtcgtacaa actccatcaa gaaatcgaat ttgtttttct cttcgtcnac 480
nganacaaan tactgtttaa cgctntccac ggtgatctca 520

<210> 30
<211> 600
<212> ADN
<213> Leishmania major

<220>
<221> característica_misc
<222> (1)...(600)
<223> A, T, C o G

<400> 30

ggcacaaggt tttcgggtta tcttcacgca tggtggagcg cagatgggtg aagtaaatac 60
gcggaccgaa ctgcttgatc atatcaacca gatcgttgtc agcacgcacg ccgtangaac 120
cggtgcacat ggtaaaaccg tntgccatgc tgtttacggt atcaaccatc cactgcatat 180
cttcaatggt ggaaacaatg cgcggcaggc cgaggatccg gcgcggctca tcatnnagnt 240
natnaaccan tcgcacgtct anttctgcac taaactacaa ntatcggtna catatnataa 300
ggccnatttt cggtccagga ntatgtnctn tcaaaatgcc ncgttannca ctcttaaatg 360
tctcangngn aaantngttc taaagggtgt ccaaaannтn nttaccnttc cccncttact 420
tcaananctc ctcnaattcc cnggcccttn gacnannatt tnctattaaa anatanaann 480
ttcaaattna ttcccnacct nccntnncca aannntancna ataatcannc ccctntcann 540
anntcccanc ttaccctccn ntngnnnggn nnnccnattn ccccaanccc ncnctaaata 600

<210> 31
<211> 600
<212> ADN
<213> Leishmania major

<220>
<221> característica_misc
<222> (1)...(600)
<223> n = A, T, C o G

<400> 31

ggcacgagcc tcagtggagc tcaatgaaga tattgcagta tcttactctg gatggcactc 60
aggtctccgg cacgctgccg ccccagtgga gcgcgatggc atcggtgcga attcttaacc 120
tgnagggtac tgaggtctct ggtacgctgc cgcctgagtg gatatcnatg ancaggctgc 180
aaactctgaa tctgcggcgc acgaaantat ccggcactct gccgcccgaa tgganttcta 240
tgaacagcct ggagtacttt cacctttatc ttactcaggt ctccggcacg ctgccgcccg 300
agtggagtgg gatgtcnaag gccgcatact tctggctgga atactgcgac ctgtccggca 360

ntctgccgcc cnagtggtcg tcnatgccaa agctgcgcgg tatctcactg ancggcaaca 420
aattcttgcg ngtgtntncc ngactcntgg gattcagaaa ggtggtcctt gttgttgggc 480
atcnaaggan caaaccccaa ngggcccncn aattgcttgg gcntgcttaa gganttgcac 540
naaccaacnc cnccaaaaac ccccccccacc ncnaaannac nancccccac ttaanncccn 600

<210> 32
<211> 600
<212> ADN
<213> Leishmania major

<220>
<221> característica_misc
<222> (1)...(600)
<223> n = A,T,C o G

<400> 32

ngcacgagaa gcgcaactgg cgcatcgcat ctgtgactat ctgcctgaac aggggcaatn 60
gtttgttggt aacagcctgg tggtacgtct gattgatncg cttncgcaan ttccggcagg 120
ttacccggtg tacancaacc gtggggccan cggtatcnac nggctgcttt cgaccgccgc 180
cggngttcan cgggcaancg gcaaaccgac gctggcgatt gtgggcgatc tctccgcact 240
ttacgatctc aacgcnctgg cgttattgcg tcaggtttct gcgccgctgg tattaattgt 300
ggtgaacaac aacggcnggg caaaattttc tcgctgttgc caacgccccc aaagcnagcg 360
tgaagcgttt ctatctgatg ccgcaaaacg tccattttga aacacgccgc cncccatgtt 420
tcganctgaa aatatcatcg tccgcaaaac tggcangaaa cttngaaaac cgcattttgc 480
cgacnccctg gcncacgccc aacccaccca ccggttgatt gaaaatggtg ggttaacgaa 540
nccnnatggg tgccccaaan cncnnccanc caaatttctg ggcccaggtt aaancccttt 600

<210> 33
<211> 600
<212> ADN
<213> Leishmania major

<220>
<221> característica_misc
<222> (1)...(600)
<223> n = A,T,C o G

<400> 33

acgatgacca tgccccgaag gaggatggcc atgcgccgaa gaacgatgac catgccccga 60
aggaggatgg ccatgcgccg aagaacgatg accatgcccc gaaggaggat ggccatgcgc 120
cgaagaacga cggggatgtg cagaanaaga gcgaagatgg agacaacgtg ggagagggag 180
gcaagggcaa tgaggatggt aacgatgatc agccgaagga gcacgctgcc ggcaactagt 240
gggctgcgtc cgggcttgtg tgcganccgt gctctgcacc ccgccgctcg tgcatcctcg 300
catgtggact gcgtgtgtct ctcccgcttt gtctctctcc cccacacagt ggctgatgcc 360
tgcacggggt tgctgtggct gcacctcctg accactgcca gctttcttgg cttgcctccc 420
ctctgcgcct ccgctcgtgc cgctcgtgcc gaattcgata tcaagcttat cgataccgtc 480
nacctcgaag gggggcccgg ttacccattc gccctatant gagtcntatt acaattcctg 540
gcgtcgtttt acacgtcgtg actgggaaaa accctggcgt tccccactta tcgccttgca 600

<210> 34
<211> 516
<212> ADN
<213> Leishmania major

<400> 34

agctgcagca gcgcctagac accgccacgc agcagcgcgc cgagctggag gcacgggtgg 60
cacggctggc cgcggaccgc gacgaggcgc gccagcagct ggccgcgaac gccgaggagc 120
tgcagcagcg cctagacacc gccacgcagc agcgcgccga gctggaggca cgggtggcac 180

ggctggccgc ggacggcgac gaggcccgcc agcagctggc cgcgaacgcc gaggagctgc 240
agcagcgcct agacaccgcc acgcagcagc gcgccgagct ggaggcacag gtggcacggc 300
tggccgcgaa cgccgaggag ctgcagcagc gcctagacac cgccacgcag cagcgcgccg 360
agctggaggc acgggtggca cggctggccg cggaccgcga cgaggcgcgc cagcagctgg 420
ccgcgaacgc cgaggagctg cagcagcgcc tagacaccgc cacgcagcag cgcgccgagc 480
tggargcaca ggtggcacgg ctggccgcga amgccg 516

<210> 35
<211> 822
<212> ADN
<213> Leishmania major

<220>
<221> característica_misc
<222> (1)...(822)
<223> n = A,T,C o G

<400> 35

```
ggcacganag atcttcgtga agacgctgac cggcaanacg atcgcgctgg aggtggagcc      60
gagcgacacg atcgagaacg tgaaggccaa gatccaggac aaggagggca tcccgccgga     120
ccagcagcgc ctgatcttcg ccggcaagca gctggaggan ggccgcacgc tctcggacta     180
caacatccag aaggagtcca cgctgcacct ggtgctgcgc ctgcgcggcg gcatgcanat     240
cttcgtgaaa acgctnaccg gcaanacaat cgcgctggaa gtggagccga acgaccnatc     300
gaaaacgtga aggccnanat ccangacaag gaaggcntcc cgccgganca gcacgcctga     360
tcttccnccg gcaaccactt gangaagggc ncacgctctc ngactacnac atccanaaag     420
gattccnccc tgcaccttgt tgcttgcncc ttgctcgggg ggcatgccna atcttccttn     480
aaaacctcaa ccggcaanaa caatcccccn cngaagttgg aacccaacca ncccattcna     540
aaactttaaa ggccnnnatt ccngaacaan gaagggcttc ccccccggac cnncaancnc     600
cctgattntt ccccccggnnn ncantttgga angaagggcc ccncccctccn ccgaattncn     660
acntcccnaa anggattccc cccctnccct tgnttttttgc gccnnnnnnnc ggcnncntnc     720
cnaaattccg nccnaaggnc cccantanan cnactttccc nttccccccc nnnnttttgc     780
ntaaantttt tnccccccnna aanntcccnt ttncnanttn an                       822
```

<210> 36
<211> 146
<212> PRT
<213> Leishmania major

<220>
<221> VARIANTE
<222> (1)...(146)
<223> Xaa = Cualquier aminoácido

<400> 36

```
Gly Thr Ser Pro Cys Leu His Leu Leu Ala Asp Ile Arg Gly Glu Phe
 1               5                  10                  15
Phe Asn Leu Arg Arg Val Glu Leu Leu Asn Val Ala Gln Gln Ala Gln
            20                  25                  30
Leu Val Val Ala His Glu Gly Asp Gly Gln Ser Ser Ala Ala His Ala
        35                  40                  45
Ala Ser Ala Ala Asp Ala Val Asn Val Leu Leu Thr Arg Glu Arg Gln
    50                  55                  60
Ile Val Ala Glu Asp Glu Arg Asp Ala Leu His Ile Asn Ala Thr Arg
65                  70                  75                  80
Pro Gln Val Arg Cys Asn Xaa His Ala Ala Val Ser Ile Thr Glu Cys
                85                  90                  95
Arg Ile Ile Ser Ser Arg Ser Ala Trp Gly Met Ser Pro Cys Met Ala
            100                 105                 110

Asp Thr Ala Lys Phe Ser Arg Val Ile Phe Leu Ala Ser Cys Ser Thr
        115                 120                 125
Phe Leu Arg Val Leu Xaa Lys Thr Thr Ala Trp Ala Ile Val Lys Leu
    130                 135                 140
Ser Tyr
145
```

<210> 37

<211> 77
<212> PRT
<213> Leishmania major

<220>
<221> VARIANTE
<222> (1)...(77)
<223> Xaa = Cualquier aminoácido

<400> 37

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

<210> 38
<211> 68
<212> PRT
<213> Leishmania major

<220>
<221> VARIANTE
<222> (1)...(68)
<223> Xaa = Cualquier aminoácido

<400> 38

```
His Glu Pro Gln Trp Ser Ser Met Lys Ile Leu Gln Tyr Leu Thr Leu
 1               5                  10                  15
Asp Gly Thr Gln Val Ser Gly Thr Leu Pro Pro Gln Trp Ser Ala Met
            20                  25                  30
Ala Ser Val Arg Ile Leu Asn Leu Xaa Gly Thr Glu Val Ser Gly Thr
        35                  40                  45
Leu Pro Pro Glu Trp Ile Ser Met Xaa Arg Leu Gln Thr Leu Asn Leu
    50                  55                  60
Arg Arg Thr Lys
65
```

<210> 39
<211> 65
<212> PRT
<213> Leishmania major

<220>
<221> VARIANTE
<222> (1)...(65)
<223> Xaa = Cualquier aminoácido

<400> 39

```
Ala Arg Glu Ala Gln Leu Ala His Arg Ile Cys Asp Tyr Leu Pro Glu
 1               5                  10                  15
Gln Gly Gln Xaa Phe Val Gly Asn Ser Leu Val Val Arg Leu Ile Asp
            20                  25                  30
Xaa Leu Xaa Gln Xaa Pro Ala Gly Tyr Pro Val Tyr Xaa Asn Arg Gly
        35                  40                  45
Ala Xaa Gly Ile Xaa Xaa Leu Leu Ser Thr Ala Ala Gly Val Xaa Arg
    50                  55                  60
Ala
65
```

<210> 40
<211> 78
<212> PRT
<213> Leishmania major

<220>
<221> VARIANTE
<222> (1)...(78)
<223> Xaa = Cualquier aminoácido

<400> 40

```
Asp Asp His Ala Pro Lys Glu Asp Gly His Ala Pro Lys Asn Asp Asp
 1               5                  10                  15
His Ala Pro Lys Glu Asp Gly His Ala Pro Lys Asn Asp Asp His Ala
            20                  25                  30
Pro Lys Glu Asp Gly His Ala Pro Lys Asn Asp Gly Asp Val Gln Xaa
        35                  40                  45
Lys Ser Glu Asp Gly Asp Asn Val Gly Glu Gly Gly Lys Gly Asn Glu
    50                  55                  60
Asp Gly Asn Asp Asp Gln Pro Lys Glu His Ala Ala Gly Asn
65                  70                  75
```

<210> 41
<211> 169
<212> PRT
<213> Leishmania major

<400> 41

```
Leu Gln Gln Arg Leu Asp Thr Ala Thr Gln Gln Arg Ala Glu Leu Glu
 1               5                  10                  15
Ala Arg Val Ala Arg Leu Ala Ala Asp Arg Asp Glu Ala Arg Gln Gln
            20                  25                  30
Leu Ala Ala Asn Ala Glu Glu Leu Gln Gln Arg Leu Asp Thr Ala Thr
        35                  40                  45
Gln Gln Arg Ala Glu Leu Glu Ala Arg Val Ala Arg Leu Ala Ala Asp
    50                  55                  60
Gly Asp Glu Ala Arg Gln Gln Leu Ala Ala Asn Ala Glu Glu Leu Gln
65                  70                  75                  80
Gln Arg Leu Asp Thr Ala Thr Gln Gln Arg Ala Glu Leu Glu Ala Gln
                85                  90                  95
Val Ala Arg Leu Ala Ala Asn Ala Glu Glu Leu Gln Gln Arg Leu Asp
            100                 105                 110
Thr Ala Thr Gln Gln Arg Ala Glu Leu Glu Ala Arg Val Ala Arg Leu
```

```
          115                 120                 125
Ala Ala Asp Arg Asp Glu Ala Arg Gln Gln Leu Ala Ala Asn Ala Glu
    130                 135                 140
Glu Leu Gln Gln Arg Leu Asp Thr Ala Thr Gln Gln Arg Ala Glu Leu
145                 150                 155                 160
Glu Ala Gln Val Ala Arg Leu Ala Ala
                165
```

<210> 42
<211> 98
<212> PRT
<213> Leishmania major

<220>
<221> VARIANTE
<222> (1)...(98)
<223> Xaa = Cualquier aminoácido

<400> 42

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

<210> 43
<211> 39
<212> PRT
<213> Leishmania major
<400> 43

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

<210> 44
<211> 600
<212> ADN
<213> Leishmania chagasi

<220>
<221> característica_misc
<222> (1)...(600)
<223> n = A,T,C o G

<400> 44

cggccgcctc agcgaggagg agatcgagcg catggtgcgc gaggctgccg agttcgagga 60
tgaggaccgc aaggtgcgcg aacgtgtcga agcgaagaac tcgctagaga gcatcgcgta 120
ctcgcttcgc aaccagatca acgacaagga caagcttggt gacaagctcg ccgcggacga 180
caagaaggcg atcgaggagg ctgtgaagga tgccctcgac tttgtccacg agaaccccaa 240
tgcagaccgt gaggagttcg aggctgctcg cacgaagctg cagagtgtga cgaaccccat 300
cattcaaaag gtgtaccagg gcgccgccgg ctctggtgca gaagaggcgg acgcgatgga 360
tgacttgtta gtcggccgcg tgaaaagaaa aacagggaaa gcgggaacat nccacaanaa 420
ccnaagaaga aagggggtng cgacaccgct cgaacaccga cggcncacat ncntcatggg 480
catgctcagc tttcctctcc ccaacaaacc agaaggtttt ctccaaacnc cgtctcngcn 540
cccaaaatac ggaaangtta ancgaaaaan ccccttccac caattgnngt tcttttgttt 600

<210> 45
<211> 1748
<212> ADN
<213> Leishmania chagasi

<400> 45

ctagtggatc ccccgggctg caggaattca cggaatacgt acctcctccc ccttcttggt 60
agaagaacaa caacaacgtt caagacgacg ccgcgccttc ttgtaccgca tttgcttctg 120
agcacgttca atccgtgcct tgcaaacatg gaggcgtaca agaagctgga aacgatcttt 180
acgaaggtct accgcctgga ccacttcctc ggtctgggca actgggacat gaacacaaac 240
atgcccccca agggcgagga atcacgcggt gaggcgatgg cgatgctctc ggagctccgc 300
tttggcttca tcacggcacc ggaggtgaaa agcctgattg agagtgccac caagggcagc 360
gaggagctga atgcggtgca gcgcgctaac ttgcgggaga tgaggcgtgc gtggaagagc 420
gccaccgcct tgccggctga gtttgtgggc cgcaagatgc gcctcacgac acacgcgcac 480
agcgtgtggc gcgacagccg caaagcaaat gacttcgcca agttcctacc ggtgctcagg 540
gacctggtgg cgctcgcccg tgaggagggc tcatacctcg ccgccggcac ctccctctcc 600
ccgtatgagg cgctcatgaa cgagtacgag ccaggaatca cgacacaaaa gctggatgag 660
gtgtacgcaa atgtaaagtc gtggctgccg cagctgctaa aggacattgt gcagaagcag 720
tccggcgagt cggtgattgc gttctcgcat aagttcccgc aggacaagca ggaagcactg 780
tgcaaggaat tcatgaagat ctggcacttc gacaccgatg ccggtcgcct cgacgtcagc 840
ccccaccctt tcacgggaat gacgaaggag gactgccgac tcacaacaaa ctacatcgaa 900
gacacgtttg ttcagagctt gtatggcgtc atccacgaga gtgggcatgg caagtacgag 960
cagaactgtg gcccacgcga gcacatcacg cagccggtgt gcaacgcccg ctctcttggc 1020
ctgcatgaga gccagagcct ctttgcggag tttcagatcg gccacgcgac gcccttcatc 1080
gactacctca caactcgcct tcctgagttc ttcgaggcgc agccagcgtt ctcgcaggac 1140
aacatgcgca agtcgctgca gcaggtgaag ccgggctaca ttcgcgtcga tgccgatgag 1200
gtgtgctacc ctctgcacgt gatcctgcgc tacgagatcg agcgcgactt gatggagggc 1260
aaaatggagg tggaagacgt gccgcgcgcg tggaacgcaa agatgcagga gtacttgggt 1320
ctctcaacgg agggccgtga cgacgttggg tgcctgcagg acgtgcattg gtccatggtg 1380
cgctcggcta ctctccgacg tactcgctcg gcgccatgta tgcggcgcag atcatggcga 1440
gcatccgaaa ggagctggga gacgacaagg tggatgagtg cctgcgcacc ggtgagctcg 1500
gccccctcct ggaaaagcag caggagaaga tctgggatca tgggtgcctg tacgagacgg 1560
acgacctcat gacgcgtgcg acgggcgaga cgctgaaccc cgagtacctg cgccgccacc 1620
tggaggcgcg ctacataaac gcctgagtcg cgagcggttg acacacgcgc tcgctagcac 1680
atgacgcgtc tttattattc tttgttgtgc attcggaatt ccgcggaatt cgatatcaag 1740
cttatcga 1748

<210> 46
<211> 560
<212> ADN
<213> Leishmania chagasi

<220>
<221> característica_misc
<222> (1)...(560)
<223> n = A,T,C o G

<400> 46 –

cggaaggagg atggccatac acagaaaaat gacggcgatg gccctaagga ggacggcggt 60
acacagaaaa acgacgacgg tggccctaag gaggacggcc atacacagaa aaatgacggc 120
gatggcccta aggaggacgg ccgtacacag aaaaataacg gcgatggccc tnaggaggac 180
ggccatacac agaaaaatga cggcgatgcc cctnaggagg acggccgtac acanaaaaat 240
gacggcnatg gccctnagga ggacggccgt acacagaaaa atgacngcca tggcccttag 300
gangacgccg tacacagaaa aatgacgcna tggccctnag ggaggacggc catacccana 360
aaaattgacg gcnatngccc ttaggangac ggccgtnccc anaaanantg acngcggtng 420
cccttaagga agatgaaaat ctgccaccaa aacnattggg aatgcncagg aaaanaacna 480
anatngaccc cacgtggggg atgganctta cngcnattaa nattgttacc attatcnacc 540
naaggacnng ttgccgncaa 560

<210> 47
<211> 600
<212> ADN
<213> Leishmania chagasi

<220>
<221> característica_misc
<222> (1)...(600)
<223> n = A,T,C o G

<400> 47

cgtccgagaa acccgtacat gtatgctgct ggtagaaggc gcagagctgg tccctctgat 60
gcacaagcat gaggtcgtac attgcctggt tcgtcatttt ccagagcaca acgagcagcg 120
tcatcataca gcatccaata gccgccagag tgaatgcgat gcgcacacca agtcgaaagt 180
ggtcgaccag taggggaatg tgaccctggc tggcgtgcaa catgatcgcc acgccagcgg 240
tgggccacac cacaacagag gcgacgaaag agaacatgaa cttgctcacg aagctnacaa 300
taagggcgtc gctngtgatg ctaagaacca cgccnaggta gacggcgaag ancaaactaa 360
acacaagcgt gacgatcccg aaaagaagga tctctgcgga attttcgtga gataganaat 420
gcccgtactg gaaaaanaag ccggcaggcg cgcgataacg ctgcaacttg ccgctcctcg 480
cgggcgcgtt ttcgctcctt ctccgacttg atggcgcngt cngncttgac aaaacggtta 540
agctcctcat gccccagccg attcccagct cacggtccac ttccggccat gcccacggac 600

<210> 48
<211> 1053
<212> ADN
<213> Leishmania chagasi

<220>
<221> característica_misc
<222> (1)...(1053).
<223> n = A,T,C o G

<400> 48

gggaaaaaag tggagctcca ccgcggtggc ggccgctcta gaactagtgg atcccccggg 60
ctgcaggaat tccgcggaat tccgcggaat tccgcggaat tccgtccgac gcggcacccg 120
cacaggggtc gacagtgacg caacctcctc caccactgcg gcctacgacg gcgccggctc 180
cgcgccagtg atggttgacg ccaatgtgag ccaccctccg tacgcggggc atgaccaagt 240
gtacatgcac gtcggcaagc ccatcgtggg caacaccctc gacggataca acgggtgcgt 300
gttcgcctac gggcanacgg gcagcggcaa aaccttcacg atgctcggnt acgcgccgag 360
cacgancgac atccgcgctc gcaaagggtc cgtcccctgc ggggccagca gcatggagaa 420
cagcactcct cttgacagcg ctgtggagcc gtttgagagc gatgacggcg acgacgtggt 480
ggacaagacg gggctggatc cgaacgagct gcaaggcatc atcccgcgcg cgtgcacgga 540
cctgttcgat ggtctccgtg cgaagcgcgc caaggactcc gacttcacgt accgcgtgga 600
ggtgtcttac tacgagatct acaacgagaa ggtgttcgat ctcatccggc cgcagcgcaa 660
cacggacctg aggatacgta actcgcccaa ctccggtcca tttatcgaag gcctgacgtg 720
gaagatggtg tccaaggagg aagacgtcgc ccgcgtgatt cgcaagggca tgcaggagcg 780

```
ccacacggct gcgaccaagt tcaacgaccg cagcagccgc agccacgcca tcctcacctt     840
caacattgtg cagctgtcga tggacgactc cgacaacgcg ttccagatgc gcagcaagct     900
gaacctggtg gaccttgctg ggtcggagcg cactggtgcg gccggagccg agggcaatga     960
gttccacgac ggtgtgaaga tcaaccactc gctgacggtg ctggggcgcg tgatcgaccg    1020
tctggcggac ctctcgcaga acaagggagg ggg                                 1053
```

<210> 49
<211> 136
<212> PRT
<213> Leishmania chagasi

<400> 49

```
Gly Arg Leu Ser Glu Glu Glu Ile Glu Arg Met Val Arg Glu Ala Ala
 1               5                  10                  15
Glu Phe Glu Asp Glu Asp Arg Lys Val Arg Glu Arg Val Glu Ala Lys
            20                  25                  30
Asn Ser Leu Glu Ser Ile Ala Tyr Ser Leu Arg Asn Gln Ile Asn Asp
        35                  40                  45
Lys Asp Lys Leu Gly Asp Lys Leu Ala Ala Asp Asp Lys Lys Ala Ile
    50                  55                  60
Glu Glu Ala Val Lys Asp Ala Leu Asp Phe Val His Glu Asn Pro Asn
65                  70                  75                  80
Ala Asp Arg Glu Glu Phe Glu Ala Ala Arg Thr Lys Leu Gln Ser Val
                85                  90                  95
Thr Asn Pro Ile Ile Gln Lys Val Tyr Gln Gly Ala Ala Gly Ser Gly
            100                 105                 110
Ala Glu Glu Ala Asp Ala Met Asp Asp Leu Leu Val Gly Arg Val Lys
        115                 120                 125
Arg Lys Thr Gly Lys Ala Gly Thr
    130                 135
```

<210> 50
<211> 510
<212> PRT
<213> Leishmania chagasi

<400> 50

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

```
                165                 170                 175
Gly Ser Tyr Leu Ala Ala Gly Thr Ser Leu Ser Pro Tyr Glu Ala Leu
            180                 185                 190
Met Asn Glu Tyr Glu Pro Gly Ile Thr Thr Gln Lys Leu Asp Glu Val
        195                 200                 205
Tyr Ala Asn Val Lys Ser Trp Leu Pro Gln Leu Leu Lys Asp Ile Val
    210                 215                 220
Gln Lys Gln Ser Gly Glu Ser Val Ile Ala Phe Ser His Lys Phe Pro
225                 230                 235                 240
Gln Asp Lys Gln Glu Ala Leu Cys Lys Glu Phe Met Lys Ile Trp His
                245                 250                 255
Phe Asp Thr Asp Ala Gly Arg Leu Asp Val Ser Pro His Pro Phe Thr
            260                 265                 270
Gly Met Thr Lys Glu Asp Cys Arg Leu Thr Thr Asn Tyr Ile Glu Asp
        275                 280                 285
Thr Phe Val Gln Ser Leu Tyr Gly Val Ile His Glu Ser Gly His Gly
    290                 295                 300
Lys Tyr Glu Gln Asn Cys Gly Pro Arg Glu His Ile Thr Gln Pro Val
305                 310                 315                 320
Cys Asn Ala Arg Ser Leu Gly Leu His Glu Ser Gln Ser Leu Phe Ala
                325                 330                 335
Glu Phe Gln Ile Gly His Ala Thr Pro Phe Ile Asp Tyr Leu Thr Thr
            340                 345                 350
Arg Leu Pro Glu Phe Phe Glu Ala Gln Pro Ala Phe Ser Gln Asp Asn
        355                 360                 365
Met Arg Lys Ser Leu Gln Gln Val Lys Pro Gly Tyr Ile Arg Val Asp
    370                 375                 380
Ala Asp Glu Val Cys Tyr Pro Leu His Val Ile Leu Arg Tyr Glu Ile
385                 390                 395                 400
Glu Arg Asp Leu Met Glu Gly Lys Met Glu Val Glu Asp Val Pro Arg
                405                 410                 415
Ala Trp Asn Ala Lys Met Gln Glu Tyr Leu Gly Leu Ser Thr Glu Gly
            420                 425                 430
Arg Asp Asp Val Gly Cys Leu Gln Asp Val His Trp Ser Met Val Arg
        435                 440                 445
Ser Ala Thr Leu Arg Arg Thr Arg Ser Ala Pro Cys Met Arg Arg Arg
    450                 455                 460
Ser Trp Arg Ala Ser Glu Arg Ser Trp Glu Thr Thr Arg Trp Met Ser
465                 470                 475                 480
Ala Cys Ala Pro Val Ser Ser Ala Pro Ser Trp Lys Ser Ser Arg Arg
                485                 490                 495
Arg Ser Gly Ile Met Gly Ala Cys Thr Arg Arg Thr Thr Ser
            500                 505                 510
```

<210> 51
<211> 107
<212> PRT
<213> Leishmania chagasi

<220>
<221> VARIANTE
<222> (1)...(107)
<223> Xaa = Cualquier aminoácido

<400> 51

```
Gly Arg Arg Met Ala Ile His Arg Lys Met Thr Ala Met Ala Leu Arg
 1               5                  10                  15
Arg Thr Ala Val His Arg Lys Thr Thr Thr Val Ala Leu Arg Arg Thr
```

```
            20                  25                  30
Ala Ile His Arg Lys Met Thr Ala Met Ala Leu Arg Arg Thr Ala Val
        35                  40                  45
His Arg Lys Ile Thr Ala Met Ala Leu Arg Arg Thr Ala Ile His Arg
    50                  55                  60
Lys Met Thr Ala Met Pro Leu Arg Arg Thr Ala Val His Xaa Lys Met
65                  70                  75                  80
Thr Ala Met Ala Leu Arg Arg Thr Ala Val His Arg Lys Met Thr Ala
                85                  90                  95
Met Ala Leu Arg Xaa Thr Pro Tyr Thr Glu Lys
            100                 105
```

<210> 52
<211> 63
<212> PRT
<213> Leishmania chagasi

<400> 52

```
Val Arg Glu Thr Arg Thr Cys Met Leu Leu Val Glu Gly Ala Glu Leu
 1               5                  10                  15
Val Pro Leu Met His Lys His Glu Val Val His Cys Leu Val Arg His
            20                  25                  30
Phe Pro Glu His Asn Glu Gln Arg His His Thr Ala Ser Asn Ser Arg
        35                  40                  45
Gln Ser Glu Cys Asp Ala His Thr Lys Ser Lys Val Val Asp Gln
    50                  55                  60
```

<210> 53
<211> 324
<212> PRT
<213> Leishmania chagasi

<220>
<221> VARIANTE
<222> (1)...(324)
<223> Xaa = Cualquier aminoácido

<400> 53

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

```
Ala Lys Arg Ala Lys Asp Ser Asp Phe Thr Tyr Arg Val Glu Val Ser
                165                 170                 175
Tyr Tyr Glu Ile Tyr Asn Glu Lys Val Phe Asp Leu Ile Arg Pro Gln
            180                 185                 190
Arg Asn Thr Asp Leu Arg Ile Arg Asn Ser Pro Asn Ser Gly Pro Phe
        195                 200                 205
Ile Glu Gly Leu Thr Trp Lys Met Val Ser Lys Glu Glu Asp Val Ala
    210                 215                 220
Arg Val Ile Arg Lys Gly Met Gln Glu Arg His Thr Ala Ala Thr Lys
225                 230                 235                 240
Phe Asn Asp Arg Ser Ser Arg Ser His Ala Ile Leu Thr Phe Asn Ile
                245                 250                 255
Val Gln Leu Ser Met Asp Asp Ser Asp Asn Ala Phe Gln Met Arg Ser
            260                 265                 270
Lys Leu Asn Leu Val Asp Leu Ala Gly Ser Glu Arg Thr Gly Ala Ala
        275                 280                 285
Gly Ala Glu Gly Asn Glu Phe His Asp Gly Val Lys Ile Asn His Ser
    290                 295                 300
Leu Thr Val Leu Gly Arg Val Ile Asp Arg Leu Ala Asp Leu Ser Gln
305                 310                 315                 320
Asn Lys Gly Gly
```

<210> 54
<211> 1585
<212> ADN
<213> Leishmania major

<220>
<221> característica_misc
<222> (1)..(1585)
<223> n = A,T,C o G

<400> 54

```
aaagctggag ctccaccgcg gtggcggccg ctctagaact agtggatccc ccgggctgca      60
ggaattcggc acgagtgctg cccgacatga catgctcgct gaccggactt cagtgcacag     120
acccgaactg caagacctgc acaacttacg gtcagtgcac agactgcaac gacggctacg     180
gtctcacctc ctccagcgtt tgcgtgcgct gcagtgtagc gggctgcaag agctgccccg     240
tcgacgctaa cgtctgcaaa gtgtgtctcg gcggcagcga gccgatcaac aatatgtgcc     300
cctgcaccga ccccaactgc gccagctgcc ccagcgacgc tggcacgtgc actcagtgcg     360
cgaacggcta cggtctcgtg gacggcgcct gtgtgagatg ccaggagccc aactgcttca     420
gctgcgacag cgacgcgaat aagtgcacac aatgtgcgcc gaactactac ctcaccccgc     480
tcttgacctg ctccccggtg gcctgcaaca tcgagcactg catgcagtgc gacccacaga     540
cgccgtcgcg ctgccaggag tgcgtgtccc cctacgtggt tgacagctac gacggcctct     600
gcaggctctc cgatgcctgc tccgtgccca actgcaagaa gtgcgagacc ggtacctcca     660
ggctctgcgc cgagtgcgac accggctaca gtctctccgc cgacgcgacg agctgcagca     720
gtccaaccac gcagccgtgc gaggtggagc actgcaacac atgtgtgaac ggcgatagca     780
cccgctgtgc ctactgcaac accggctact acgtctccga tggcaagtgc aaggccatgc     840
agggctgcta cgtgtcgaac tgcgcgcagt gcatgctgct tgacagcacc aagtgctcca     900
cgtgcgtgaa agggtacctg ctcacgtcgt cctacagttg cgtctcgcag aaagtcatca     960
acagtgcggc cgcgccctac tctctgtggg tggccgccgc cgtgctcctc acctcttttg    1020
ccatgcacct agcatagtgc gcagcggcat gcgaacaacc ccactctcat tctccaacat    1080
gtgcatacac acacacacag acagcggggc agcaccccct ccccacacac acacacgcac    1140
ttcccccttg tcttgttctt ctttcctcgn ttcgcatttc tttctctcgt gcgctggcgc    1200
cggcctcctg cacgtcgctc ccctcccccc aacctctatt ctctctctct ctctctctcg    1260
ccggcatcat tgcttcttac ccttttctga tccttgctcg cgtgggcgga cactgccaca    1320
gtcccacagc gcagacacac gtgtttaaac ggcgcaggca tccctcccta tcacttcatt    1380
tctcctaaag ccactcacca agtcgcacac cgccctcccc catcggccgc ccttccgggc    1440
```

```
gcagctgtgc ggaatgggtg tgtgctcgac ctcgttcctg gcagctcact cgcatgtgta    1500
cagccactcc aaccacgaaa gctctcttct gcgcacataa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa    1560
ctcgaggggg ggcccggtac ccaaa                                         1585
```

<210> 55
<211> 320
<212> PRT
<213> Leishmania major

<400> 55

```
Val Leu Pro Asp Met Thr Cys Ser Leu Thr Gly Leu Gln Cys Thr Asp
 1               5                  10                  15
Pro Asn Cys Lys Thr Cys Thr Thr Tyr Gly Gln Cys Thr Asp Cys Asn
            20                  25                  30
Asp Gly Tyr Gly Leu Thr Ser Ser Ser Val Cys Val Arg Cys Ser Val
        35                  40                  45
Ala Gly Cys Lys Ser Cys Pro Val Asp Ala Asn Val Cys Lys Val Cys
    50                  55                  60
Leu Gly Gly Ser Glu Pro Ile Asn Asn Met Cys Pro Cys Thr Asp Pro
65                  70                  75                  80
Asn Cys Ala Ser Cys Pro Ser Asp Ala Gly Thr Cys Thr Gln Cys Ala
                85                  90                  95
Asn Gly Tyr Gly Leu Val Asp Gly Ala Cys Val Arg Cys Gln Glu Pro
            100                 105                 110
Asn Cys Phe Ser Cys Asp Ser Asp Ala Asn Lys Cys Thr Gln Cys Ala
        115                 120                 125
Pro Asn Tyr Tyr Leu Thr Pro Leu Leu Thr Cys Ser Pro Val Ala Cys
    130                 135                 140
Asn Ile Glu His Cys Met Gln Cys Asp Pro Gln Thr Pro Ser Arg Cys
145                 150                 155                 160
Gln Glu Cys Val Ser Pro Tyr Val Val Asp Ser Tyr Asp Gly Leu Cys
                165                 170                 175
Arg Leu Ser Asp Ala Cys Ser Val Pro Asn Cys Lys Lys Cys Glu Thr
            180                 185                 190
Gly Thr Ser Arg Leu Cys Ala Glu Cys Asp Thr Gly Tyr Ser Leu Ser
        195                 200                 205
Ala Asp Ala Thr Ser Cys Ser Ser Pro Thr Thr Gln Pro Cys Glu Val
    210                 215                 220
Glu His Cys Asn Thr Cys Val Asn Gly Asp Ser Thr Arg Cys Ala Tyr
225                 230                 235                 240
Cys Asn Thr Gly Tyr Tyr Val Ser Asp Gly Lys Cys Lys Ala Met Gln
                245                 250                 255
Gly Cys Tyr Val Ser Asn Cys Ala Gln Cys Met Leu Leu Asp Ser Thr
            260                 265                 270
Lys Cys Ser Thr Cys Val Lys Gly Tyr Leu Leu Thr Ser Ser Tyr Ser
        275                 280                 285
Cys Val Ser Gln Lys Val Ile Asn Ser Ala Ala Ala Pro Tyr Ser Leu
    290                 295                 300
Trp Val Ala Ala Ala Val Leu Leu Thr Ser Phe Ala Met His Leu Ala
305                 310                 315                 320
```

<210> 56
<211> 14
<212> PRT
<213> Leishmania major

<400> 56

Pro Lys Glu Asp Gly His Ala Pro Lys Asn Asp Asp His Ala

1 5 10

<210> 57
<211> 7
<212> PRT
<213> Leishmania major

<400> 57

Pro Lys Glu Asp Gly His Ala
1 5

<210> 58
<211> 7
<212> PRT
<213> Leishmania major

<400> 58

Pro Lys Asn Asp Asp His Ala
1 5

<210> 59
<211> 264
<212> ADN
<213> Leishmania chagasi

<400> 59

atgcaccatc atcaccatca catgggaagc tcctgcacga aggactccgc aaaggagccc 60
cagaagcgtg ctgataacat cgatacgacc actcgaagcg atgagaagga cggcatccat 120
gtccaggaga gcgccggtcc tgtgcaggag aacttcgggg atgcgcagga gaagaacgaa 180
gatggacaca acgtggggga tggagctaac gacaatgagg atggtaacga tgatcagccg 240
aaggagcagg ttgccggcaa ctag 264

<210> 60
<211> 744
<212> ADN
<213> Leishmania chagasi

<400> 60

atgggagcct actgcacgaa ggactccgca aaggagcccc agaagcgtgc tgataacatc 60
cataaaacca ctgaggccaa tcacagaggc gccgccggtg tgcccccgaa gcacgccggc 120
ggtgcgatga acgactctgc cccgaaggag gatggccata cacagaaaaa tgacggcgat 180
ggccctaagg aggacggccg tacacagaaa aacgacgacg gtggccctaa ggaggacggc 240
catacacaga aaaatgacgg cgatggccct aaggaggacg gccgtacaca gaaaaataac 300
ggcgatggcc ctaaggagga cggccataca cagaaaaatg acggcgatgc ccctaaggag 360
gacggccgta cacagaaaaa tgacggcgat ggccctaagg aggacggccg tacacagaaa 420
aatgacggcg atggccctaa ggaggacggc cgtacacaga aaaatgacgg cgatggccct 480
aaggaggacg gccgtacaca gaaaaatgac ggcgatggcc ctaaggagga cggccataca 540
cagaaaaatg acggcgatgg ccctaaggag gacggccgta cacagaaaaa tgacggcggt 600
ggccctaagg aggatgagaa tctgcagcaa aacgatggga atgcgcagga gaagaacgaa 660
gatggacaca acgtggggga tggagctaac ggcaatgagg atggtaacga tgatcagccg 720
aaggagcagg ttgccggcaa ctag 744

<210> 61
<211> 80
<212> PRT
<213> Leishmania chagasi

<400> 61

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

<210> 62
<211> 247
<212> PRT
<213> Leishmania chagasi

<400> 62

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

<210> 63
<211> 14
<212> PRT
<213> Leishmania chagasi

<220>
<221> VARIANTE
<222> (6)...(6)
<223> Xaa = His o Arg

<221> VARIANTE
<222> (12)...(12)
<223> Xaa = Gly o Asp

<221> VARIANTE
<222> (13)...(13)
<223> Xaa = Asp o Gly

<400> 63

Pro Lys Glu Asp Gly Xaa Thr Gln Lys Asn Asp Xaa Xaa Gly
1 5 10

<210> 64
<211> 7
<212> PRT
<213> Leishmania chagasi

<220>
<221> VARIANTE
<222> (6)...(6)
<223> Xaa = His o Arg

<400> 64

Pro Lys Glu Asp Gly Xaa Thr
1 5

<210> 65
<211> 7
<212> PRT
<213> Leishmania chagasi

<220>
<221> VARIANTE
<222> (5)...(5)
<223> Xaa = Gly o Asp

<221> VARIANTE
<222> (6)...(6)
<223> Xaa = Asp o Gly

<400> 65

Gln Lys Asn Asp Xaa Xaa Gly
1 5

<210> 66
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Péptido sintético para evaluar el potencial diagnóstico de repetición en Lc Gen B

<400> 66

Gly Cys Gly Pro Lys Glu Asp Gly Arg Thr Gln Lys Asn Asp Gly Asp
1 5 10 15

Gly

<210> 67
<211> 31
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Péptido sintético para evaluar el potencial diagnóstico de repetición en Lc Gen B

<400> 67

Gly Cys Gly Pro Lys Glu Asp Gly Arg Thr Gln Lys Asn Asp Gly Asp
1 5 10 15
Gly Pro Lys Glu Asp Gly Arg Thr Gln Lys Asn Asp Gly Asp Gly
20 25 30

<210> 68
<211> 45
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Péptido sintético para evaluar el potencial diagnóstico de repetición en Lc Gen B

<400> 68

Gly Cys Gly Pro Lys Glu Asp Gly Arg Thr Gln Lys Asn Asp Gly Asp
1 5 10 15
Gly Pro Lys Glu Asp Gly Arg Thr Gln Lys Asn Asp Gly Asp Gly Pro
20 25 30
Lys Glu Asp Gly Arg Thr Gln Lys Asn Asp Gly Asp Gly
35 40 45

<210> 69
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Péptido sintético para evaluar el potencial diagnóstico de repetición en Lc Gen B

<400> 69

Gly Cys Gly Pro Lys Glu Asp Gly His Thr Gln Lys Asn Asp Gly Asp
1 5 10 15
Gly

<210> 70
<211> 31
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Péptido sintético para evaluar el potencial diagnóstico de repetición en Lc Gen B

<400> 70

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

<210> 71
<211> 45
<212> PRT
<213> Gly Cys Gly Pro Lys Glu Asp Gly His Thr Gln

<220>
<223> Péptido sintético para evaluar el potencial diagnóstico de repetición en Lc Gen B

<400> 71

```
Gly Cys Gly Pro Lys Glu Asp Gly His Thr Gln Lys Asn Asp Gly Asp
 1               5                  10                  15
Gly Pro Lys Glu Asp Gly His Thr Gln Lys Asn Asp Gly Asp Gly Pro
            20                  25                  30
Lys Glu Asp Gly His Thr Gln Lys Asn Asp Gly Asp Gly
        35                  40                  45
```

<210> 72
<211> 664
<212> ADN
<213> Leishmania major

<220>
<221> característica_misc
<222> (1)...(664)
<223> n = A,T,C o G

<400> 72

```
gctgcaggaa ttcggcacga gattgcttcc cagcccacct tcgctatcca gccactctcg      60
ctcttctaca tctcccaccc cctcacaccg ccatggcttc ttcccgcaag gcttccaacc     120
cgcacaagtc gcaccgcaag ccgaagcgct cgtggaacgt gtacgtgggc cgctcgctga     180
aggcgatcaa cgcccagatg tcgatgtcgc accgcacgat gaagatcgtg aactcgtacg     240
tgaacgacgt gatggagcgc atctgcactg aggccgcgtc gattgttcgc gcgaacaaga     300
agcgcacgtt gggtgcgcgc gaggtgcaga cggcggtgcg cattgtgctg ccggcggagc     360
tcgcgaagca tgccatggct gagggcacga aggccgtgtc gagcgcgtcc cgctaaagcg     420
gcttgccgga tgccgtgtga gtaggagggt ggcttgccgc aaacgctgac ctcggcgatt     480
gcggcgtggc gctccccttc tcctccttgt ccggcggtgt gtgtcatgca tttgcgtgac     540
tcctccctct tatagatgca agctttttt ttctcttgac gttttatttt ctcctccccc     600
tcccttaacg tgaagtgtat atganagcgt actggacatg ananaaaaaa aaaanaaact     660
cgag                                                                 664
```

<210> 73
<211> 1432
<212> ADN
<213> Leishmania major

<220>-
<221> característica_misc
<222> (1) ... (1432)
<223> **n** = A, T, C o G

<400> 73

gatgaagaag aggaggacac caccatcaac aactccgacg tggtggtgcg ctacaagaag 60
gccgcaacgt ggtgcaatga aacgttgcgc gtgcttatcg atgccacaaa acctggcgcc 120
aaggtgtgcg acctgtgccg cctcggtgat gacaccatca ccgccnaggt caagacaatg 180
ttcaaaggca cggaaaaagg catcgctttc ccgacctgca tctcggtcaa caactgcgta 240
tgccacaaca gccctggcgt gtcggacgag acgacgcagc aagagatcgc gatgggtgac 300
gtcgtgcact acgacctggg catccacgtg gacggctact gcgccgtcgt cgcgcacacc 360
attcaggtga cagaggacaa tgagcttggc aaggacgaga aggcggcgcg cgtcattaca 420
gcggcgtaca acatcctgaa cacggcgctg cgccagatgc gtcccggtac gaccatctac 480
caggtgacag acgtagttga gaaggctgcg gagcactaca aggtgactcc ggtagacggc 540
gtcctctcgc atatgatgaa gcgctacatc atagacngat accgctgtat cccgcagcgc 600
agggtcgcgg agcacatggt gcacgactac gatctcgaga aagcgcaggt gtggacgcta 660
gacattgtca tgacctccgg caagggcaag ctgaaggagc gcgatgcgcg gccgtgcgtg 720
ttcaaggtgg ctctggactc caactactct gtgaaaatgg aaagcgcgaa ggaggttcag 780
aaggaaatcg actccnagta tgccaccttc ccctttgcca tccgcaacct ggaggccaag 840
aaggcccgcc tcggtctcaa cgagatggcg aagcacggtg ctgtcatccc gtaccctatt 900
ctcttcgaaa aggaaggcga ggtcgtcgcc catttcaaga ttacggtgct catcagcaac 960
aagaagattg agccgattac cggcctgaag ccgcagaagg ccccggcgct cgagccatac 1020
acggacgaga tgctgcttgc gacgaacaag ctcttcgctg tcgctagaga agaaggcggc 1080
gaagtagacg gccgtggcat ccgtgacgct gtactgcgag ctttcgtagg cgtacgcctc 1140
ttgtgaggcg tacacgtgtg ctgtttgcgg acgaggaggc acccattctg ttccccttct 1200
tcgctaatct tcgcgtttcc tctgacgctg gcttctytgc cggagtgtgg tgaggcgcgt 1260
gggggagaaa cggcccacty gcatgcctgt gcatacgcga gcacggtagg gagcgcggtg 1320
tgtgtgtgtg tgggggggcg tgttacgagt acaaaagagg ctcgatcttt gcgatctttt 1380
ctttctgtaa acaggaacat aagtaaccaa aaaaaaaaaa aaaaaactcg ag 1432

<210> 74
<211> 873
<212> ADN
<213> Leishmania major

<220>
<221> característica_misc
<222> (1).1. (873)
<223> n = A,T,C o G

<400> 74

ctttattgtc atcactgtaa agcactgttt tttctttcac tttttcttga gtgttttctt 60
ctattcacca tgagcattat caaggaggac gacgccgtgg gctgctacat gacggtgacc 120
ctcgtggacg acaccaaggt ggagggtacc atcttcacct acaattccaa ggagggcatc 180
atagtactcc tgtccctccg cgacgatcag acgaacatga agctaatccg cactccgtac 240
atcaaagact tcagcctttc acacgctgag gagggagcgc acctgccccc ggcactggac 300
tccttcaacg agcttccgtc catgcacgcc ggccgcgaca agtccatctt caagcacgcc 360
agcacgcagc tcaagaacgc cgaggcgaac cgcgaaaagc acttcaactc tgtcacgacc 420
gacacaccga ttgccacact tgatgcgtac ctcaagctcc tgcggctata ccccttaatt 480
gagtggaaca gcgacgaggg tgtcatccag gtctcggaca ccgtcattgt cgtaggagac 540
cccgactggc ggacgcccaa ggcaatgctg gtggacggcg cccctgagaa ggacagaccg 600
cttgtagatc gcctgcaggt tgcgctcggm aacggcaaga agtgattcag tgtgtagcgg 660
acagaacatc gtgtgcttgt gtgtctgttt gangtttgtt tgttttctct ttgtggtact 720
gcgtacgacg gcgccttctc ccggtggtgg gtgagtccat aagcagttga gttctyggtt 780
gtagnaavgc ctyacygccg accatatggg agagggcgaa caaatntttg atagaagttg 840
aaaatcccaa agtyaaaaga aaaaaaaaan aaa 873

<210> 75
<211> 1238
<212> ADN
<213> Leishmania major

<220>
<221> característica_misc
<222> (1) ... (1238)
<223> n = A,T,C o G

<400> 75

```
tttctgtact ttattgaaca tcagtagaac acgttcttcc cgcaaagatg gccaagaagc      60
acctcaagcg cttgtatgcg cccaaggact ggatgctgag caagctgacc ggcgtgttcg     120
cgccgcgtcc gcgtccgggt ccgcacaagc tgcgcgagtg cctgccgctn ctggtgatca     180
tccgcaaccg gctgaagtac gcgctgaacg cgcgcgaggg tgagatgatc ctgcgccagg     240
gtctggtgca cgtggacaac cacccgcgcc gcgacggcaa gtatcccgcc ggtttcatgg     300
acgtggtcga gatcccgaag acgggcgacc gcttccgcct gatgtacgac gtcaagggcc     360
gcttcgcgtt ggtgaacctg tccgaggcgg aggcgcagat caagctgatg aaggttgtga     420
acctgtacac ggccaccggc cgcgtgccgg tcgctgtgac gcacgacggc caccgcatcc     480
gctacccgga cccgcacacc tccattggtg acaccatcgt gtacaacgtc aaggagaaga     540
agtgcgtgga cctgatcaag aaccgccagg gcaaggccgt gatcgtgacc ggtggcgcca     600
accgcggccg catcggcgag atcgtgaagg tggagtgcca ccccggtgcg ttcaacattg     660
cgcacctgaa ggacgcgtcc ggcgccgagt tcgccacccg cgccgcgaac atcttcgtga     720
tcggcaagga cctgaacaac ctgcaggtaa cggtgccgaa gcagcagggc ctgcgcatga     780
acgtgatcca ggagcgcgag gagcgcctga tcgcggcgga ggcccgcaag aacgcgccgg     840
ctcgtggtgc ccgcagggcc cgcaagtgag gaggcgatta cacgcatgcg tgtttgtggc     900
tctgaagcga cttggcgggt cggctgtgag ggtttgagag gaggtgtgtg atgcgtgtga     960
agtccttctc cgttctcagc tctctctgtg ctgtagctgt gcctttcccc agatcgcttt    1020
accgcatttg catacatctg tgtagtcgca tgtgcgtgtt tctgtctctc ggtgggtctc    1080
cctctccctc cctttctgcc tctctctttg agtgggtgtg catgcgtcgc gcgcgacggg    1140
ctccgcttna gtgattctct cgtgttttan ggctgtttty tttctyagtt nagcgtttty    1200
gttcatgatt tcctcagacc caaaaaaaaa aaaaaaaa                            1238
```

<210> 76
<211> 712
<212> ADN
<213> Leishmania major

<220>
<221> característica_misc
<222> (1) ... (712)
<223> n = A,T,C o G

<400> 76

```
ctgacggagt tccagacgaa ccttgtgccg tacccgcgca tccacttcgt gctgacaagc      60
tacgctccgg tggtgtctgc cgagaaggcg taccacgagc agctntccgt cgcggacatc     120
acgaactcgg tntttgagcc tgctggcatg ctnacaaagt gcgatcctcg ccacggcaag     180
tacatgtcgt gctgcctcat gtaccgcggt gatgtcgtgc cgaaggatgt caacgccgcg     240
attgcgacga tcaagacgaa gcgcacaatt cagttcgtgg actggtgccc gaccggcttc     300
aagtgcggca tcaactacca gccgccgacc gttgtgcccg gcggtgacct cgcgaaggtg     360
cagcgcgccg tgtgcatgat tgccaactcg accgcgatcg ctgaggtgtt tgcccgcatc     420
gaccacaagt tcgacctgat gtacagcaag cgcgcgtttg tgcactggta cgtgggtgag     480
ggcatggagg agggcgagtt ctccgaggcg cgcgaggatc tcgctgcgct ggagaaggac     540
tacgaggagg ttggcgccga gtccgccgac gacatgggcg aggaggacgt cgaggagtac     600
taaggtagac tcgtgccgcg cgctgatgat gtaggtgcac gcgtgcgtgt gctgcagcgg     660
agccgccgcc accgcgactg tgtgtgtgtg cgcgcgtgac gaccggctcg ag             712
```

<210> 77
<211> 1086
<212> ADN
<213> Leishmania major

<220>
<221> característica_misc
<222> (1)...(1086)
<223> n = A,T,C o G

<400> 77

caagaagtgg atcaagcagg agacgaacgc cgatggcgag cgcgtgcgcc gcgcgttctg 60
ccagttctgc ctagacccca tctaccagat cttcgacgct gtgatgaacg agaagaagga 120
caaggtggac aagatgctca agtcgctgca cgtgacgctn acggctgagg agcgcgagca 180
ggtgccgaan aagcttctga agacggtgat gatgaanttc ctgccggctg ctgagacgct 240
gctacagatg atcgtggcgc acctgccgtc gcccaagaag gcgcaggcgt accgtgcgga 300
gatgctgtac tctggcgagg cgtcgccgga ggacaagtac ttcatgggta tcaagaactg 360
cgaccccgct gcgccgctca tgctgtacat cagcaagatg gtgccgacgg ccgaccgcgg 420
ccgcttcttc gcctttggcc gcatcttctc cggtaaggtg cgcagcggcc agaaggtgcg 480
catcatgggt aacaactacg tctacggcaa gaagcaggac ctgtacgagg acaagcctgt 540
gcagcgctcc gtgctgatga tgggccgcta ccaggaggcc gtggaggaca tgccgtgcgg 600
taacgtggtg ggccttgtgg gcgtggacaa gtacatcgtg aagtccgcga cgatcacgga 660
cgatggcgag agcccgcacc cgctgcgcga catgaagtac tctgtgtcgc ccgtcgtgcg 720
tgtggccgtg gaggcgaaga acccgtccga cctgccgaag cttgtggagg gcctgaagcg 780
ccttgccaag tccgacccgc tggtggtgtg cagcattgag gagtctggcg agcacattgt 840
tgccggcgct ggcgagcttc accttgagat ttgcctgaag gatctccagg aggacttcat 900
gaacggcgcg ccgctnaaga tctccgagcc ggtggtgtcg ttccgcgaga cggtgacgga 960
tgtgtcgtcg cagcagtgcc tgtcgaagtc tgcgaacaag cacaaccgtc tcttctgccg 1020
cggtgcgccg ctnacagagg anctggcgct ggcgatngan gaaggcaccg ctggtcccga 1080
ngcgga 1086

<210> 78
<211> 447
<212> ADN
<213> Leishmania major

<220>
<221> característica_misc
<222> (1)...(447)
<223> n = A,T,C o G

<400> 78

cgcatcaacg tctacttcga tnagtcgacg ggaggccgct acgtgccgcg cgccgtgctg 60
atggacctcg agcccggcac tatggactcc gttcgcgccg gcccgtacgg ccagctgttc 120
cgcccggaca acttcatctt tggtcagtcc ggcgctggca acaactgggc caagggccac 180
tacactgagg gcgcggagct gatcgactcc gtgcttgatg tgtgccgcaa ggaggcggag 240
agctgcgact gcctgcaggg cttccagctg tctcactccc tcggcggcgg cacgggctcc 300
ggcatgggca cgctgctcat ttccaanctg cgcgangagt acccggaccg gatcatgatg 360
accttctccg tcatcccgtc cccccgcgtg tcggataccg ttgtggancc gtacaacacg 420
accctctctg tgcaccagct cgtggaa 447

<210> 79
<211> 375
<212> ADN
<213> Leishmania major

<220>
<221> característica_misc
<222> (1)...(375)
<223> n = A,T,C o G

<400> 79

gtaacccgct ggtgtacgca tatgtagaca cagacgggca gcacgagacg acgttcctcg 60
cgatccctgt ggtgcttggc atgaatggaa tcgagaagcg cctgccgatt ggtccgctgc 120

actcgacgga ggaaacgctg ctgaaggcgg cactgccggt gatcaagaag aatatcgtga 180
agggcagcga gttcgcgcgc tcacacctgt agcacctcag ctttttttttt ttgcgttaaa 240
cgggcgtggg aagcacctcg atacttcgct tcgcgctgac ggacccgcac gacatcgttc 300
gtcatccccc tccccctctt cggccctata cgcatgaagg agtggaatta tgcaacagca 360
tgttnatatc aagtg 375

<210> 80

<211> 107
<212> PRT
<213> Leishmania major

<400> 80

```
Met Ala Ser Ser Arg Lys Ala Ser Asn Pro His Lys Ser His Arg Lys
 1               5                  10                  15
Pro Lys Arg Ser Trp Asn Val Tyr Val Gly Arg Ser Leu Lys Ala Ile
            20                  25                  30
Asn Ala Gln Met Ser Met Ser His Arg Thr Met Lys Ile Val Asn Ser
        35                  40                  45
Tyr Val Asn Asp Val Met Glu Arg Ile Cys Thr Glu Ala Ala Ser Ile
    50                  55                  60
Val Arg Ala Asn Lys Lys Arg Thr Leu Gly Ala Arg Glu Val Gln Thr
65                  70                  75                  80
Ala Val Arg Ile Val Leu Pro Ala Glu Leu Ala Lys His Ala Met Ala
                85                  90                  95
Glu Gly Thr Lys Ala Val Ser Ser Ala Ser Arg
            100                 105
```

<210> 81
<211> 381
<212> PRT
<213> Leishmania major

<220>
<221> VARIANTE
<222> (1)...(381)
<223> Xaa = Cualquier aminoácido

<400> 81

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

```
Gln Val Thr Asp Val Val Glu Lys Ala Ala Glu His Tyr Lys Val Thr
                165                 170                 175
Pro Val Asp Gly Val Leu Ser His Met Met Lys Arg Tyr Ile Ile Asp
            180                 185                 190
Xaa Tyr Arg Cys Ile Pro Gln Arg Arg Val Ala Glu His Met Val His
        195                 200                 205
Asp Tyr Asp Leu Glu Lys Ala Gln Val Trp Thr Leu Asp Ile Val Met
    210                 215                 220
Thr Ser Gly Lys Gly Lys Leu Lys Glu Arg Asp Ala Arg Pro Cys Val
225                 230                 235                 240
Phe Lys Val Ala Leu Asp Ser Asn Tyr Ser Val Lys Met Glu Ser Ala
                245                 250                 255
Lys Glu Val Gln Lys Glu Ile Asp Ser Xaa Tyr Ala Thr Phe Pro Phe
            260                 265                 270
Ala Ile Arg Asn Leu Glu Ala Lys Lys Ala Arg Leu Gly Leu Asn Glu
        275                 280                 285
Met Ala Lys His Gly Ala Val Ile Pro Tyr Pro Ile Leu Phe Glu Lys
    290                 295                 300
Glu Gly Glu Val Val Ala His Phe Lys Ile Thr Val Leu Ile Ser Asn
305                 310                 315                 320
Lys Lys Ile Glu Pro Ile Thr Gly Leu Lys Pro Gln Lys Ala Pro Ala
                325                 330                 335
Leu Glu Pro Tyr Thr Asp Glu Met Leu Leu Ala Thr Asn Lys Leu Phe
            340                 345                 350
Ala Val Ala Arg Glu Glu Gly Gly Glu Val Asp Gly Arg Gly Ile Arg
        355                 360                 365
Asp Ala Val Leu Arg Ala Phe Val Gly Val Arg Leu Leu
    370                 375                 380
```

<210> 82
<211> 191
<212> PRT
<213> Leishmania major

<400>. 82

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

180 **185** **190**

<210> 83
<211> 273
<212> PRT
<213> Leishmania major

<400> 83

```
Met Ala Lys Lys His Leu Lys Arg Leu Tyr Ala Pro Lys Asp Trp Met
 1               5                  10                  15
Leu Ser Lys Leu Thr Gly Val Phe Ala Pro Arg Pro Arg Pro Gly Pro
            20                  25                  30
His Lys Leu Arg Glu Cys Leu Pro Leu Leu Val Ile Ile Arg Asn Arg
        35                  40                  45
Leu Lys Tyr Ala Leu Asn Ala Arg Glu Gly Glu Met Ile Leu Arg Gln
    50                  55                  60
Gly Leu Val His Val Asp Asn His Pro Arg Arg Asp Gly Lys Tyr Pro
65                  70                  75                  80
Ala Gly Phe Met Asp Val Val Glu Ile Pro Lys Thr Gly Asp Arg Phe
                85                  90                  95
Arg Leu Met Tyr Asp Val Lys Gly Arg Phe Ala Leu Val Asn Leu Ser
            100                 105                 110
Glu Ala Glu Ala Gln Ile Lys Leu Met Lys Val Val Asn Leu Tyr Thr
        115                 120                 125
Ala Thr Gly Arg Val Pro Val Ala Val Thr His Asp Gly His Arg Ile
    130                 135                 140
Arg Tyr Pro Asp Pro His Thr Ser Ile Gly Asp Thr Ile Val Tyr Asn
145                 150                 155                 160
Val Lys Glu Lys Lys Cys Val Asp Leu Ile Lys Asn Arg Gln Gly Lys
                165                 170                 175
Ala Val Ile Val Thr Gly Gly Ala Asn Arg Gly Arg Ile Gly Glu Ile
            180                 185                 190
Val Lys Val Glu Cys His Pro Gly Ala Phe Asn Ile Ala His Leu Lys
        195                 200                 205
Asp Ala Ser Gly Ala Glu Phe Ala Thr Arg Ala Ala Asn Ile Phe Val
    210                 215                 220
Ile Gly Lys Asp Leu Asn Asn Leu Gln Val Thr Val Pro Lys Gln Gln
225                 230                 235                 240
Gly Leu Arg Met Asn Val Ile Gln Glu Arg Glu Glu Arg Leu Ile Ala
                245                 250                 255
Ala Glu Ala Arg Lys Asn Ala Pro Ala Arg Gly Ala Arg Arg Ala Arg
            260                 265                 270
Lys
```

<210> 84
<211> 200
<212> PRT
<213> Leishmania major

<400> 84

```
Leu Thr Glu Phe Gln Thr Asn Leu Val Pro Tyr Pro Arg Ile His Phe
 1               5                  10                  15
Val Leu Thr Ser Tyr Ala Pro Val Val Ser Ala Glu Lys Ala Tyr His
            20                  25                  30
Glu Gln Leu Ser Val Ala Asp Ile Thr Asn Ser Val Phe Glu Pro Ala
        35                  40                  45
Gly Met Leu Thr Lys Cys Asp Pro Arg His Gly Lys Tyr Met Ser Cys
```

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

<210> 85
<211> 361
<212> PRT
<213> Leishmania major

<220>
<221> VARIANTE
<222> (1)...(361)
<223> Xaa = Cualquier aminoácido

<400> 85

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

```
    210                 215                 220
Pro His Pro Leu Arg Asp Met Lys Tyr Ser Val Ser Pro Val Val Arg
225                 230                 235                 240
Val Ala Val Glu Ala Lys Asn Pro Ser Asp Leu Pro Lys Leu Val Glu
                245                 250                 255
Gly Leu Lys Arg Leu Ala Lys Ser Asp Pro Leu Val Val Cys Ser Ile
            260                 265                 270
Glu Glu Ser Gly Glu His Ile Val Ala Gly Ala Gly Glu Leu His Leu
        275                 280                 285
Glu Ile Cys Leu Lys Asp Leu Gln Glu Asp Phe Met Asn Gly Ala Pro
    290                 295                 300
Leu Lys Ile Ser Glu Pro Val Val Ser Phe Arg Glu Thr Val Thr Asp
305                 310                 315                 320
Val Ser Ser Gln Gln Cys Leu Ser Lys Ser Ala Asn Lys His Asn Arg
                325                 330                 335
Leu Phe Cys Arg Gly Ala Pro Leu Thr Glu Xaa Leu Ala Leu Ala Xaa
            340                 345                 350
Xaa Glu Gly Thr Ala Gly Pro Xaa Ala
        355                 360
```

<210> 86
<211> 149
<212> PRT
<213> Leishmania major

<220>
<221> VARIANTE
<222> (1)...(149)
<223> Xaa = Cualquier aminoácido

<400> 86

```
Arg Ile Asn Val Tyr Phe Asp Xaa Ser Thr Gly Gly Arg Tyr Val Pro
 1               5                  10                  15
Arg Ala Val Leu Met Asp Leu Glu Pro Gly Thr Met Asp Ser Val Arg
            20                  25                  30
Ala Gly Pro Tyr Gly Gln Leu Phe Arg Pro Asp Asn Phe Ile Phe Gly
        35                  40                  45
Gln Ser Gly Ala Gly Asn Asn Trp Ala Lys Gly His Tyr Thr Glu Gly
    50                  55                  60
Ala Glu Leu Ile Asp Ser Val Leu Asp Val Cys Arg Lys Glu Ala Glu
65                  70                  75                  80
Ser Cys Asp Cys Leu Gln Gly Phe Gln Leu Ser His Ser Leu Gly Gly
                85                  90                  95
Gly Thr Gly Ser Gly Met Gly Thr Leu Leu Ile Ser Xaa Leu Arg Xaa
            100                 105                 110
Glu Tyr Pro Asp Arg Ile Met Met Thr Phe Ser Val Ile Pro Ser Pro
        115                 120                 125
Arg Val Ser Asp Thr Val Val Xaa Pro Tyr Asn Thr Thr Leu Ser Val
    130                 135                 140
His Gln Leu Val Glu
145
```

<210> 87
<211> 69
<212> PRT
<213> Leishmania major

<400> 87

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

<210> 88
<211> 54
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador de PCR

<400> 88

agtattcata tgcaccacca ccaccaccac atgtcctgcg gtaacgccaa gatc 54

<210> 89
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador de PCR

<400> 89

ctcacaggat ccctgcttgc tgaagtatcc ttc 33

<210> 90
<211> 36
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador de PCR

<400> 90

catttcggat ccatggacgc aactgagctg aagaac 36

<210> 91
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador de PCR

<400> 91

cgtagagaat tcctgaccaa aacgaatgat gcc 33

<210> 92
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador de PCR

<400> 92

caccacgaat tcatggcgca gaatgataag atc 33

<210> 93
<211> 34
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador de PCR

<400> 93

actgacctcg aggaattctt agtcgcgcat gaac 34

<210> 94
<211> 3012
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencia de ADN que codifica construcciones de fusión (poli-proteína) que comprenden múltiples antígenos de Leishmania

<400> 94

catatgcacc accaccacca ccacatgtcc tgcggtaacg ccaagatcaa ctctcccgcg 60
ccgtccttcg aggaggtggc gctcatgccc aacggcagct tcaagaagat cagcctctcc 120
tcctacaagg gcaagtgggt cgtgctcttc ttctacccgc tcgacttcac cttcgtgtgc 180
ccgacagagg tcatcgcgtt ctccgacagc gtgagtcgct tcaacgagct caactgcgag 240
gtcctcgcgt gctcgataga cagcgagtac gcgcacctgc agtggacgct gcaggaccgc 300
aagaagggcg gcctcgggac catggcgatc ccaatgctag ccgacaagac caagagcatc 360
gctcgttcct acggcgtgct ggaggagagc cagggcgtgg cctaccgcgg tctcttcatc 420
atcgaccccc atggcatgct gcgtcagatc accgtcaatg acatgccggt gggccgcagc 480
gtggaggagg ttctacgcct gctggaggct tttcagttcg tggagaagca cggcgaggtg 540
tgccccgcga actggaagaa gggcgccccc acgatgaagc cggaaccgaa tgcgtctgtc 600
gagggatact tcagcaagca gggatccatg gacgcaactg agctgaagaa caaggggaac 660
gaagagttct ccgccggccg ctatgtggag gcggtgaact acttctcaaa ggcgatccag 720
ttggatgagc agaacagtgt cctctacagc aaccgctccg cctgttttgc agccatgcag 780
aaatacaagg acgcgctgga cgacgccgac aagtgcatct cgatcaagcc gaattgggcc 840
aagggctacg tgcgccgagg agcagctctc catggcatgc gccgctacga cgatgccatt 900
gccgcgtatg aaaaggggct caaggtggac ccttccaaca gcggctgcgc gcagggcgtg 960
aaggacgtgc aggtagccaa ggcccgcgaa gcacgtgacc ccatcgctcg cgtcttcacc 1020
ccggaggcgt tccgcaagat ccaagagaat cccaagctgt ctctacttat gctgcagccg 1080
gactacgtga agatggtaga caccgtcatc cgcgaccctt cgcagggccg gctgtacatg 1140
gaagaccagc gctttgccct gacgctcatg tacctgagcg gaatgaagat tcccaacgat 1200
ggtgatggcg aggaggagga acgtccgtct gcgaaggcgg cagagacagc gaagccaaaa 1260
gaggagaagc ctctcaccga caacgagaag gaggccctgg cgctcaagga ggagggcaac 1320
aagctgtacc tctcgaagaa gtttgaggag gcgctgacca agtaccaaga ggcgcaggtg 1380
aaagacccca acaacacttt atacattctg aacgtgtcgg ccgtgtactt cgagcagggt 1440
gactacgaca agtgcatcgc cgagtgcgag cacggtatcg agcacggtcg cgagaaccac 1500
tgcgactaca caatcattgc gaagctcatg acccggaacg ccttgtgcct ccagaggcag 1560
aggaagtacg aggctgctat cgacctttac aagcgcgccc ttgtcgagtg gcgtaaccct 1620

```
gacaccctca agaagctgac ggagtgcgag aaggagcacc aaaaggcggt ggaggaagcc 1680
tacatcgatc ctgagatcgc gaagcagaag aaagacgaag gtaaccagta cttcaaggag 1740
gataagttcc ccgaggccgt ggcagcgtac acggaggcca tcaagcgcaa ccctgccgag 1800
cacacctcct acagcaatcg cgcggccgcg tacatcaagc ttggagcctt caacgacgcc 1860
ctcaaggacg cggagaagtg cattgagctg aagcccgact ttgttaaggg ctacgcgcgc 1920
aagggtcatg cttacttttg gaccaagcag tacaaccgcg cgctgcaggc gtacaatgag 1980
ggcctcaagg tggacccgag caatgcggac tgcaaggatg ggcggtatcg cacaatcatg 2040
aagattcagg agatggcatc tggccaatcc gcggatggcg acgaggcggc gcgccgggcc 2100
atggacgatc ctgaaatcgc ggcaatcatg caagatagct acatgcaact agtgttgaag 2160
gagatgcaga acgatcccac gcgcattcag gagtacatga aggactccgg gatctcatcg 2220
aagatcaaca agctgatttc agctggcatc attcgttttg gtcaggaatt catggcgcag 2280
aatgataaga tcgccccccа ggaccaggac tccttcctcg atgaccagcc cggcgttcgc 2340
ccgatcccgt ccttcgacga catgccgctg caccagaacc tgctgcgtgg catctactcg 2400
tacgggttcg agaagccgtc cagcatccag cagcgcgcga tagccccctt cacgcgcggc 2460
ggcgacatca tcgcgcaggc ccagtccggt accggcaaga cgggtgcctt ctccatcggt 2520
ctgctgcagc gcctggactt ccgccacaac ctgatccagg gcctcgtgct ctcccccact 2580
cgcgagctgg ccctgcagac ggcggaggtg atcagccgca tcggtgagtt cctgtcgaac 2640
agctccaagt tctgcgagac ctttgtcggc ggcacgcgcg tgcaggatga cctgcgcaag 2700
ctgcaggccg gcgtcatcgt tgccgtgggc acgccgggcc gcgtgtccga cgtgatcaag 2760
cgtggcgcgc tgcgcacaga gtcgctgcgc gtgctggtgc tcgacgaggc tgatgagatg 2820
ctgtctcagg gcttcgcgga ccagatttac gagatcttcc gcttcctgcc gaaggacatc 2880
caggtcgcgc tcttctccgc cacgatgccg gaggaggtac tggagctgac gaagaagttc 2940
atgcgcgact aagaattcct cgagcagatc cggctgctaa caaagcccga aaggaagctg 3000
aatggctgct gc                                                     3012
```

<210> 95
<211> 982
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Construcciones de fusión (poli-proteína) que comprenden múltiples antígenos de Leishmania

<400> 95

```
Met His His His His His His Met Ser Cys Gly Asn Ala Lys Ile Asn
                  5                  10                  15

Ser Pro Ala Pro Ser Phe Glu Glu Val Ala Leu Met Pro Asn Gly Ser
             20                  25                  30

Phe Lys Lys Ile Ser Leu Ser Ser Tyr Lys Gly Lys Trp Val Val Leu
         35                  40                  45

Phe Phe Tyr Pro Leu Asp Phe Thr Phe Val Cys Pro Thr Glu Val Ile
     50                  55                  60

Ala Phe Ser Asp Ser Val Ser Arg Phe Asn Glu Leu Asn Cys Glu Val
 65                  70                  75                  80

Leu Ala Cys Ser Ile Asp Ser Glu Tyr Ala His Leu Gln Trp Thr Leu
                 85                  90                  95

Gln Asp Arg Lys Lys Gly Gly Leu Gly Thr Met Ala Ile Pro Met Leu
            100                 105                 110

Ala Asp Lys Thr Lys Ser Ile Ala Arg Ser Tyr Gly Val Leu Glu Glu
```

```
        115                 120                 125

Ser Gln Gly Val Ala Tyr Arg Gly Leu Phe Ile Ile Asp Pro His Gly
    130                 135                 140

Met Leu Arg Gln Ile Thr Val Asn Asp Met Pro Val Gly Arg Ser Val
145                 150                 155                 160

Glu Glu Val Leu Arg Leu Leu Glu Ala Phe Gln Phe Val Glu Lys His
                165                 170                 175

Gly Glu Val Cys Pro Ala Asn Trp Lys Lys Gly Ala Pro Thr Met Lys
            180                 185                 190

Pro Glu Pro Asn Ala Ser Val Glu Gly Tyr Phe Ser Lys Gln Gly Ser
        195                 200                 205

Met Asp Ala Thr Glu Leu Lys Asn Lys Gly Asn Glu Glu Phe Ser Ala
    210                 215                 220

Gly Arg Tyr Val Glu Ala Val Asn Tyr Phe Ser Lys Ala Ile Gln Leu
225                 230                 235                 240

Asp Glu Gln Asn Ser Val Leu Tyr Ser Asn Arg Ser Ala Cys Phe Ala
                245                 250                 255

Ala Met Gln Lys Tyr Lys Asp Ala Leu Asp Asp Ala Asp Lys Cys Ile
            260                 265                 270

Ser Ile Lys Pro Asn Trp Ala Lys Gly Tyr Val Arg Arg Gly Ala Ala
        275                 280                 285

Leu His Gly Met Arg Arg Tyr Asp Asp Ala Ile Ala Ala Tyr Glu Lys
    290                 295                 300

Gly Leu Lys Val Asp Pro Ser Asn Ser Gly Cys Ala Gln Gly Val Lys
305                 310                 315                 320

Asp Val Gln Val Ala Lys Ala Arg Glu Ala Arg Asp Pro Ile Ala Arg
                325                 330                 335

Val Phe Thr Pro Glu Ala Phe Arg Lys Ile Gln Glu Asn Pro Lys Leu
            340                 345                 350

Ser Leu Leu Met Leu Gln Pro Asp Tyr Val Lys Met Val Asp Thr Val
        355                 360                 365

Ile Arg Asp Pro Ser Gln Gly Arg Leu Tyr Met Glu Asp Gln Arg Phe
    370                 375                 380

Ala Leu Thr Leu Met Tyr Leu Ser Gly Met Lys Ile Pro Asn Asp Gly
385                 390                 395                 400

Asp Gly Glu Glu Glu Glu Arg Pro Ser Ala Lys Ala Ala Glu Thr Ala
                405                 410                 415

Lys Pro Lys Glu Glu Lys Pro Leu Thr Asp Asn Glu Lys Glu Ala Leu
            420                 425                 430
```

Ala Leu Lys Glu Glu Gly Asn Lys Leu Tyr Leu Ser Lys Lys Phe Glu
435 440 445

Glu Ala Leu Thr Lys Tyr Gln Glu Ala Gln Val Lys Asp Pro Asn Asn
450 455 460

Thr Leu Tyr Ile Leu Asn Val Ser Ala Val Tyr Phe Glu Gln Gly Asp
465 470 475 480

Tyr Asp Lys Cys Ile Ala Glu Cys Glu His Gly Ile Glu His Gly Arg
485 490 495

Glu Asn His Cys Asp Tyr Thr Ile Ile Ala Lys Leu Met Thr Arg Asn
500 505 510

Ala Leu Cys Leu Gln Arg Gln Arg Lys Tyr Glu Ala Ala Ile Asp Leu
515 520 525

Tyr Lys Arg Ala Leu Val Glu Trp Arg Asn Pro Asp Thr Leu Lys Lys
530 535 540

Leu Thr Glu Cys Glu Lys Glu His Gln Lys Ala Val Glu Glu Ala Tyr
545 550 555 560

Ile Asp Pro Glu Ile Ala Lys Gln Lys Lys Asp Glu Gly Asn Gln Tyr
565 570 575

Phe Lys Glu Asp Lys Phe Pro Glu Ala Val Ala Ala Tyr Thr Glu Ala
580 585 590

Ile Lys Arg Asn Pro Ala Glu His Thr Ser Tyr Ser Asn Arg Ala Ala
595 600 605

Ala Tyr Ile Lys Leu Gly Ala Phe Asn Asp Ala Leu Lys Asp Ala Glu
610 615 620

Lys Cys Ile Glu Leu Lys Pro Asp Phe Val Lys Gly Tyr Ala Arg Lys
625 630 635 640

Gly His Ala Tyr Phe Trp Thr Lys Gln Tyr Asn Arg Ala Leu Gln Ala
645 650 655

Tyr Asn Glu Gly Leu Lys Val Asp Pro Ser Asn Ala Asp Cys Lys Asp
660 665 670

Gly Arg Tyr Arg Thr Ile Met Lys Ile Gln Glu Met Ala Ser Gly Gln
675 680 685

Ser Ala Asp Gly Asp Glu Ala Ala Arg Arg Ala Met Asp Asp Pro Glu
690 695 700

Ile Ala Ala Ile Met Gln Asp Ser Tyr Met Gln Leu Val Leu Lys Glu
705 710 715 720

Met Gln Asn Asp Pro Thr Arg Ile Gln Glu Tyr Met Lys Asp Ser Gly
725 730 735

Ile Ser Ser Lys Ile Asn Lys Leu Ile Ser Ala Gly Ile Ile Arg Phe
740 745 750

Gly Gln Glu Phe Met Ala Gln Asn Asp Lys Ile Ala Pro Gln Asp Gln
755 760 765

Asp Ser Phe Leu Asp Asp Gln Pro Gly Val Arg Pro Ile Pro Ser Phe
770 775 780

Asp Asp Met Pro Leu His Gln Asn Leu Leu Arg Gly Ile Tyr Ser Tyr
785 790 795 800

Gly Phe Glu Lys Pro Ser Ser Ile Gln Gln Arg Ala Ile Ala Pro Phe
805 810 815

Thr Arg Gly Gly Asp Ile Ile Ala Gln Ala Gln Ser Gly Thr Gly Lys
820 825 830

Thr Gly Ala Phe Ser Ile Gly Leu Leu Gln Arg Leu Asp Phe Arg His
835 840 845

Asn Leu Ile Gln Gly Leu Val Leu Ser Pro Thr Arg Glu Leu Ala Leu
850 855 860

Gln Thr Ala Glu Val Ile Ser Arg Ile Gly Glu Phe Leu Ser Asn Ser
865 870 875 880

Ser Lys Phe Cys Glu Thr Phe Val Gly Gly Thr Arg Val Gln Asp Asp
885 890 895

Leu Arg Lys Leu Gln Ala Gly Val Ile Val Ala Val Gly Thr Pro Gly
900 905 910

Arg Val Ser Asp Val Ile Lys Arg Gly Ala Leu Arg Thr Glu Ser Leu
915 920 925

Arg Val Leu Val Leu Asp Glu Ala Asp Glu Met Leu Ser Gln Gly Phe
930 935 940

Ala Asp Gln Ile Tyr Glu Ile Phe Arg Phe Leu Pro Lys Asp Ile Gln
945 950 955 960

Val Ala Leu Phe Ser Ala Thr Met Pro Glu Glu Val Leu Glu Leu Thr
965 970 975

Lys Lys Phe Met Arg Asp
980

<210> 96
<211> 1641
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Construcciones de fusión (poli-proteína) que comprenden múltiples antígenos de Leishmania

<400> 96

```
Met His His His His His His Met Ser Cys Gly Asn Ala Lys Ile Asn
                  5                  10                  15

Ser Pro Ala Pro Ser Phe Glu Glu Val Ala Leu Met Pro Asn Gly Ser
             20                  25                  30

Phe Lys Lys Ile Ser Leu Ser Ser Tyr Lys Gly Lys Trp Val Val Leu
         35                  40                  45

Phe Phe Tyr Pro Leu Asp Phe Thr Phe Val Cys Pro Thr Glu Val Ile
     50                  55                  60

Ala Phe Ser Asp Ser Val Ser Arg Phe Asn Glu Leu Asn Cys Glu Val
 65                  70                  75                  80

Leu Ala Cys Ser Ile Asp Ser Glu Tyr Ala His Leu Gln Trp Thr Leu
                 85                  90                  95

Gln Asp Arg Lys Lys Gly Gly Leu Gly Thr Met Ala Ile Pro Met Leu
            100                 105                 110

Ala Asp Lys Thr Lys Ser Ile Ala Arg Ser Tyr Gly Val Leu Glu Glu
        115                 120                 125

Ser Gln Gly Val Ala Tyr Arg Gly Leu Phe Ile Ile Asp Pro His Gly
    130                 135                 140

Met Leu Arg Gln Ile Thr Val Asn Asp Met Pro Val Gly Arg Ser Val
145                 150                 155                 160

Glu Glu Val Leu Arg Leu Leu Glu Ala Phe Gln Phe Val Glu Lys His
                165                 170                 175

Gly Glu Val Cys Pro Ala Asn Trp Lys Lys Gly Ala Pro Thr Met Lys
            180                 185                 190

Pro Glu Pro Asn Ala Ser Val Glu Gly Tyr Phe Ser Lys Gln Gly Ser
        195                 200                 205

Met Asp Ala Thr Glu Leu Lys Asn Lys Gly Asn Glu Glu Phe Ser Ala
    210                 215                 220

Gly Arg Tyr Val Glu Ala Val Asn Tyr Phe Ser Lys Ala Ile Gln Leu
225                 230                 235                 240

Asp Glu Gln Asn Ser Val Leu Tyr Ser Asn Arg Ser Ala Cys Phe Ala
                245                 250                 255

Ala Met Gln Lys Tyr Lys Asp Ala Leu Asp Asp Ala Asp Lys Cys Ile
            260                 265                 270

Ser Ile Lys Pro Asn Trp Ala Lys Gly Tyr Val Arg Arg Gly Ala Ala
        275                 280                 285

Leu His Gly Met Arg Arg Tyr Asp Asp Ala Ile Ala Ala Tyr Glu Lys
    290                 295                 300
```

```
Gly Leu Lys Val Asp Pro Ser Asn Ser Gly Cys Ala Gln Gly Val Lys
305                 310                 315                 320

Asp Val Gln Val Ala Lys Ala Arg Glu Ala Arg Asp Pro Ile Ala Arg
                325                 330                 335

Val Phe Thr Pro Glu Ala Phe Arg Lys Ile Gln Glu Asn Pro Lys Leu
            340                 345                 350

Ser Leu Leu Met Leu Gln Pro Asp Tyr Val Lys Met Val Asp Thr Val
        355                 360                 365

Ile Arg Asp Pro Ser Gln Gly Arg Leu Tyr Met Glu Asp Gln Arg Phe
    370                 375                 380

Ala Leu Thr Leu Met Tyr Leu Ser Gly Met Lys Ile Pro Asn Asp Gly
385                 390                 395                 400

Asp Gly Glu Glu Glu Glu Arg Pro Ser Ala Lys Ala Ala Glu Thr Ala
                405                 410                 415

Lys Pro Lys Glu Glu Lys Pro Leu Thr Asp Asn Glu Lys Glu Ala Leu
            420                 425                 430

Ala Leu Lys Glu Glu Gly Asn Lys Leu Tyr Leu Ser Lys Lys Phe Glu
        435                 440                 445

Glu Ala Leu Thr Lys Tyr Gln Glu Ala Gln Val Lys Asp Pro Asn Asn
    450                 455                 460

Thr Leu Tyr Ile Leu Asn Val Ser Ala Val Tyr Phe Glu Gln Gly Asp
465                 470                 475                 480

Tyr Asp Lys Cys Ile Ala Glu Cys Glu His Gly Ile Glu His Gly Arg
                485                 490                 495

Glu Asn His Cys Asp Tyr Thr Ile Ile Ala Lys Leu Met Thr Arg Asn
            500                 505                 510

Ala Leu Cys Leu Gln Arg Gln Arg Lys Tyr Glu Ala Ala Ile Asp Leu
        515                 520                 525

Tyr Lys Arg Ala Leu Val Glu Trp Arg Asn Pro Asp Thr Leu Lys Lys
    530                 535                 540

Leu Thr Glu Cys Glu Lys Glu His Gln Lys Ala Val Glu Glu Ala Tyr
545                 550                 555                 560

Ile Asp Pro Glu Ile Ala Lys Gln Lys Lys Asp Glu Gly Asn Gln Tyr
                565                 570                 575

Phe Lys Glu Asp Lys Phe Pro Glu Ala Val Ala Ala Tyr Thr Glu Ala
            580                 585                 590

Ile Lys Arg Asn Pro Ala Glu His Thr Ser Tyr Ser Asn Arg Ala Ala
        595                 600                 605
```

Ala Tyr Ile Lys Leu Gly Ala Phe Asn Asp Ala Leu Lys Asp Ala Glu
610 615 620

Lys Cys Ile Glu Leu Lys Pro Asp Phe Val Lys Gly Tyr Ala Arg Lys
625 630 635 640

Gly His Ala Tyr Phe Trp Thr Lys Gln Tyr Asn Arg Ala Leu Gln Ala
645 650 655

Tyr Asn Glu Gly Leu Lys Val Asp Pro Ser Asn Ala Asp Cys Lys Asp
660 665 670

Gly Arg Tyr Arg Thr Ile Met Lys Ile Gln Glu Met Ala Ser Gly Gln
675 680 685

Ser Ala Asp Gly Asp Glu Ala Ala Arg Arg Ala Met Asp Asp Pro Glu
690 695 700

Ile Ala Ala Ile Met Gln Asp Ser Tyr Met Gln Leu Val Leu Lys Glu
705 710 715 720

Met Gln Asn Asp Pro Thr Arg Ile Gln Glu Tyr Met Lys Asp Ser Gly
725 730 735

Ile Ser Ser Lys Ile Asn Lys Leu Ile Ser Ala Gly Ile Ile Arg Phe
740 745 750

Gly Gln Glu Phe Ser Leu Thr Asp Pro Ala Val Leu Gly Glu Glu Thr
755 760 765

His Leu Arg Val Arg Val Val Pro Asp Lys Ala Asn Lys Thr Leu Thr
770 775 780

Val Glu Asp Asn Gly Ile Gly Met Thr Lys Ala Asp Leu Val Asn Asn
785 790 795 800

Leu Gly Thr Ile Ala Arg Ser Gly Thr Lys Ala Phe Met Glu Ala Leu
805 810 815

Glu Ala Gly Gly Asp Met Ser Met Ile Gly Gln Phe Gly Val Gly Phe
820 825 830

Tyr Ser Ala Tyr Leu Val Ala Asp Arg Val Thr Val Val Ser Lys Asn
835 840 845

Asn Ser Asp Glu Ala Tyr Val Trp Glu Ser Ser Ala Gly Gly Thr Phe
850 855 860

Thr Ile Thr Ser Val Pro Glu Ser Asp Met Lys Arg Gly Thr Arg Ile
865 870 875 880

Thr Leu His Leu Lys Glu Asp Gln Gln Glu Tyr Leu Glu Glu Arg Arg
885 890 895

Val Lys Glu Leu Ile Lys Lys His Ser Glu Phe Ile Gly Tyr Asp Ile
900 905 910

Glu Leu Met Val Glu Lys Thr Ala Glu Lys Glu Val Thr Asp Glu Asp

915 920 925

Glu Glu Glu Asp Glu Ser Lys Lys Lys Ser Cys Gly Asp Glu Gly Glu
930 935 940

Pro Lys Val Glu Glu Val Thr Glu Gly Gly Glu Asp Lys Lys Lys Lys
945 950 955 960

Thr Lys Lys Val Lys Glu Val Thr Lys Thr Tyr Glu Val Gln Asn Lys
965 970 975

His Lys Pro Leu Trp Thr Arg Asp Pro Lys Asp Val Thr Lys Glu Glu
980 985 990

Tyr Ala Ala Phe Tyr Lys Ala Ile Ser Asn Asp Trp Glu Asp Pro Ala
995 1000 1005

Ala Thr Lys His Phe Ser Val Glu Gly Gln Leu Glu Phe Arg Ala Ile
1010 1015 1020

Ala Phe Val Pro Lys Arg Ala Pro Phe Asp Met Phe Glu Pro Asn Lys
1025 1030 1035 1040

Lys Arg Asn Asn Ile Lys Leu Tyr Val Arg Arg Val Phe Ile Met Asp
1045 1050 1055

Asn Cys Glu Asp Leu Cys Pro Asp Trp Leu Gly Phe Val Lys Gly Val
1060 1065 1070

Val Asp Ser Glu Asp Leu Pro Leu Asn Ile Ser Arg Glu Asn Leu Gln
1075 1080 1085

Gln Asn Lys Ile Leu Lys Val Ile Arg Lys Asn Ile Val Lys Lys Cys
1090 1095 1100

Leu Glu Leu Phe Glu Glu Ile Ala Glu Asn Lys Glu Asp Tyr Lys Gln
1105 1110 1115 1120

Phe Tyr Glu Gln Phe Gly Lys Asn Ile Lys Leu Gly Ile His Glu Asp
1125 1130 1135

Thr Ala Asn Arg Lys Lys Leu Met Glu Leu Leu Arg Phe Tyr Ser Thr
1140 1145 1150

Glu Ser Gly Glu Glu Met Thr Thr Leu Lys Asp Tyr Val Thr Arg Met
1155 1160 1165

Lys Pro Glu Gln Lys Ser Ile Tyr Tyr Ile Thr Gly Asp Ser Lys Lys
1170 1175 1180

Lys Leu Glu Ser Ser Pro Phe Ile Glu Lys Ala Arg Arg Cys Gly Leu
1185 1190 1195 1200

Glu Val Leu Phe Met Thr Glu Pro Ile Asp Glu Tyr Val Met Gln Gln
1205 1210 1215

Val Lys Asp Phe Glu Asp Lys Lys Phe Ala Cys Leu Thr Lys Glu Gly
1220 1225 1230

Val His Phe Glu Glu Ser Glu Glu Glu Lys Lys Gln Arg Glu Glu Lys
1235 1240 1245

Lys Ala Ala Cys Glu Lys Leu Cys Lys Thr Met Lys Glu Val Leu Gly
1250 1255 1260

Asp Lys Val Glu Lys Val Thr Val Ser Glu Arg Leu Ser Thr Ser Pro
1265 1270 1275 1280

Cys Ile Leu Val Thr Ser Glu Phe Gly Trp Ser Ala His Met Glu Gln
1285 1290 1295

Ile Met Arg Asn Gln Ala Leu Arg Asp Ser Ser Met Ala Gln Tyr Met
1300 1305 1310

Val Ser Lys Lys Thr Met Glu Val Asn Pro Asp His Pro Ile Ile Lys
1315 1320 1325

Glu Leu Arg Arg Arg Val Glu Ala Asp Glu Asn Asp Lys Ala Val Lys
1330 1335 1340

Asp Leu Val Phe Leu Leu Phe Asp Thr Ser Leu Leu Thr Ser Gly Phe
1345 1350 1355 1360

Gln Leu Asp Asp Pro Thr Gly Tyr Ala Glu Arg Ile Asn Arg Met Ile
1365 1370 1375

Lys Leu Gly Leu Ser Leu Asp Glu Glu Glu Glu Glu Val Ala Glu Ala
1380 1385 1390

Pro Pro Ala Glu Ala Ala Pro Ala Glu Val Thr Ala Gly Thr Ser Ser
1395 1400 1405

Met Glu Gln Val Asp Asp Ile Met Ala Gln Asn Asp Lys Ile Ala Pro
1410 1415 1420

Gln Asp Gln Asp Ser Phe Leu Asp Asp Gln Pro Gly Val Arg Pro Ile
1425 1430 1435 1440

Pro Ser Phe Asp Asp Met Pro Leu His Gln Asn Leu Leu Arg Gly Ile
1445 1450 1455

Tyr Ser Tyr Gly Phe Glu Lys Pro Ser Ser Ile Gln Gln Arg Ala Ile
1460 1465 1470

Ala Pro Phe Thr Arg Gly Gly Asp Ile Ile Ala Gln Ala Gln Ser Gly
1475 1480 1485

Thr Gly Lys Thr Gly Ala Phe Ser Ile Gly Leu Leu Gln Arg Leu Asp
1490 1495 1500

Phe Arg His Asn Leu Ile Gln Gly Leu Val Leu Ser Pro Thr Arg Glu
1505 1510 1515 1520

Leu Ala Leu Gln Thr Ala Glu Val Ile Ser Arg Ile Gly Glu Phe Leu
1525 1530 1535

Ser Asn Ser Ser Lys Phe Cys Glu Thr Phe Val Gly Gly Thr Arg Val
1540 1545 1550

Gln Asp Asp Leu Arg Lys Leu Gln Ala Gly Val Ile Val Ala Val Gly
1555 1560 1565

Thr Pro Gly Arg Val Ser Asp Val Ile Lys Arg Gly Ala Leu Arg Thr
1570 1575 1580

Glu Ser Leu Arg Val Leu Val Leu Asp Glu Ala Asp Glu Met Leu Ser
1585 1590 1595 1600

Gln Gly Phe Ala Asp Gln Ile Tyr Glu Ile Phe Arg Phe Leu Pro Lys
1605 1610 1615

Asp Ile Gln Val Ala Leu Phe Ser Ala Thr Met Pro Glu Glu Val Leu
1620 1625 1630

Glu Leu Thr Lys Lys Phe Met Arg Asp
1635 1640

<210> 97
<211> 1427
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Construcciones de fusión (poli-proteína) que comprenden múltiples antígenos de Leishmania

<400> 97

Met His His His His His His Met Ser Cys Gly Asn Ala Lys Ile Asn
5 10 15

Ser Pro Ala Pro Ser Phe Glu Glu Val Ala Leu Met Pro Asn Gly Ser
20 25 30

Phe Lys Lys Ile Ser Leu Ser Ser Tyr Lys Gly Lys Trp Val Val Leu
35 40 45

Phe Phe Tyr Pro Leu Asp Phe Thr Phe Val Cys Pro Thr Glu Val Ile
50 55 60

Ala Phe Ser Asp Ser Val Ser Arg Phe Asn Glu Leu Asn Cys Glu Val
65 70 75 80

Leu Ala Cys Ser Ile Asp Ser Glu Tyr Ala His Leu Gln Trp Thr Leu
85 90 95

Gln Asp Arg Lys Lys Gly Gly Leu Gly Thr Met Ala Ile Pro Met Leu
100 105 110

Ala Asp Lys Thr Lys Ser Ile Ala Arg Ser Tyr Gly Val Leu Glu Glu
115 120 125

Ser Gln Gly Val Ala Tyr Arg Gly Leu Phe Ile Ile Asp Pro His Gly

130 135 140

Met Leu Arg Gln Ile Thr Val Asn Asp Met Pro Val Gly Arg Ser Val
145 150 155 160

Glu Glu Val Leu Arg Leu Leu Glu Ala Phe Gln Phe Val Glu Lys His
165 170 175

Gly Glu Val Cys Pro Ala Asn Trp Lys Lys Gly Ala Pro Thr Met Lys
180 185 190

Pro Glu Pro Asn Ala Ser Val Glu Gly Tyr Phe Ser Lys Gln Gly Ser
195 200 205

Met Asp Ala Thr Glu Leu Lys Asn Lys Gly Asn Glu Glu Phe Ser Ala
210 215 220

Gly Arg Tyr Val Glu Ala Val Asn Tyr Phe Ser Lys Ala Ile Gln Leu
225 230 235 240

Asp Glu Gln Asn Ser Val Leu Tyr Ser Asn Arg Ser Ala Cys Phe Ala
245 250 255

Ala Met Gln Lys Tyr Lys Asp Ala Leu Asp Asp Ala Asp Lys Cys Ile
260 265 270

Ser Ile Lys Pro Asn Trp Ala Lys Gly Tyr Val Arg Arg Gly Ala Ala
275 280 285

Leu His Gly Met Arg Arg Tyr Asp Asp Ala Ile Ala Ala Tyr Glu Lys
290 295 300

Gly Leu Lys Val Asp Pro Ser Asn Ser Gly Cys Ala Gln Gly Val Lys
305 310 315 320

Asp Val Gln Val Ala Lys Ala Arg Glu Ala Arg Asp Pro Ile Ala Arg
325 330 335

Val Phe Thr Pro Glu Ala Phe Arg Lys Ile Gln Glu Asn Pro Lys Leu
340 345 350

Ser Leu Leu Met Leu Gln Pro Asp Tyr Val Lys Met Val Asp Thr Val
355 360 365

Ile Arg Asp Pro Ser Gln Gly Arg Leu Tyr Met Glu Asp Gln Arg Phe
370 375 380

Ala Leu Thr Leu Met Tyr Leu Ser Gly Met Lys Ile Pro Asn Asp Gly
385 390 395 400

Asp Gly Glu Glu Glu Glu Arg Pro Ser Ala Lys Ala Ala Glu Thr Ala
405 410 415

Lys Pro Lys Glu Glu Lys Pro Leu Thr Asp Asn Glu Lys Glu Ala Leu
420 425 430

Ala Leu Lys Glu Glu Gly Asn Lys Leu Tyr Leu Ser Lys Lys Phe Glu
435 440 445

Glu Ala Leu Thr Lys Tyr Gln Glu Ala Gln Val Lys Asp Pro Asn Asn
450 455 460

Thr Leu Tyr Ile Leu Asn Val Ser Ala Val Tyr Phe Glu Gln Gly Asp
465 470 475 480

Tyr Asp Lys Cys Ile Ala Glu Cys Glu His Gly Ile Glu His Gly Arg
485 490 495

Glu Asn His Cys Asp Tyr Thr Ile Ile Ala Lys Leu Met Thr Arg Asn
500 505 510

Ala Leu Cys Leu Gln Arg Gln Arg Lys Tyr Glu Ala Ala Ile Asp Leu
515 520 525

Tyr Lys Arg Ala Leu Val Glu Trp Arg Asn Pro Asp Thr Leu Lys Lys
530 535 540

Leu Thr Glu Cys Glu Lys Glu His Gln Lys Ala Val Glu Glu Ala Tyr
545 550 555 560

Ile Asp Pro Glu Ile Ala Lys Gln Lys Lys Asp Glu Gly Asn Gln Tyr
565 570 575

Phe Lys Glu Asp Lys Phe Pro Glu Ala Val Ala Ala Tyr Thr Glu Ala
580 585 590

Ile Lys Arg Asn Pro Ala Glu His Thr Ser Tyr Ser Asn Arg Ala Ala
595 600 605

Ala Tyr Ile Lys Leu Gly Ala Phe Asn Asp Ala Leu Lys Asp Ala Glu
610 615 620

Lys Cys Ile Glu Leu Lys Pro Asp Phe Val Lys Gly Tyr Ala Arg Lys
625 630 635 640

Gly His Ala Tyr Phe Trp Thr Lys Gln Tyr Asn Arg Ala Leu Gln Ala
645 650 655

Tyr Asn Glu Gly Leu Lys Val Asp Pro Ser Asn Ala Asp Cys Lys Asp
660 665 670

Gly Arg Tyr Arg Thr Ile Met Lys Ile Gln Glu Met Ala Ser Gly Gln
675 680 685

Ser Ala Asp Gly Asp Glu Ala Ala Arg Arg Ala Met Asp Asp Pro Glu
690 695 700

Ile Ala Ala Ile Met Gln Asp Ser Tyr Met Gln Leu Val Leu Lys Glu
705 710 715 720

Met Gln Asn Asp Pro Thr Arg Ile Gln Glu Tyr Met Lys Asp Ser Gly
725 730 735

Ile Ser Ser Lys Ile Asn Lys Leu Ile Ser Ala Gly Ile Ile Arg Phe
740 745 750

```
Gly Gln Glu Phe Ser Leu Thr Asp Pro Ala Val Leu Gly Glu Glu Thr
        755                 760                 765

His Leu Arg Val Arg Val Val Pro Asp Lys Ala Asn Lys Thr Leu Thr
    770                 775                 780

Val Glu Asp Asn Gly Ile Gly Met Thr Lys Ala Asp Leu Val Asn Asn
785                 790                 795                 800

Leu Gly Thr Ile Ala Arg Ser Gly Thr Lys Ala Phe Met Glu Ala Leu
                805                 810                 815

Glu Ala Gly Gly Asp Met Ser Met Ile Gly Gln Phe Gly Val Gly Phe
            820                 825                 830

Tyr Ser Ala Tyr Leu Val Ala Asp Arg Val Thr Val Val Ser Lys Asn
        835                 840                 845

Asn Ser Asp Glu Ala Tyr Val Trp Glu Ser Ser Ala Gly Gly Thr Phe
    850                 855                 860

Thr Ile Thr Ser Val Pro Glu Ser Asp Met Lys Arg Gly Thr Arg Ile
865                 870                 875                 880

Thr Leu His Leu Lys Glu Asp Gln Gln Glu Tyr Leu Glu Glu Arg Arg
                885                 890                 895

Val Lys Glu Leu Ile Lys Lys His Ser Glu Phe Ile Gly Tyr Asp Ile
            900                 905                 910

Glu Leu Met Val Glu Lys Thr Ala Glu Lys Glu Val Thr Asp Glu Asp
        915                 920                 925

Glu Glu Glu Asp Glu Ser Lys Lys Lys Ser Cys Gly Asp Glu Gly Glu
    930                 935                 940

Pro Lys Val Glu Glu Val Thr Glu Gly Gly Glu Asp Lys Lys Lys Lys
945                 950                 955                 960

Thr Lys Lys Val Lys Glu Val Thr Lys Thr Tyr Glu Val Gln Asn Lys
                965                 970                 975

His Lys Pro Leu Trp Thr Arg Asp Pro Lys Asp Val Thr Lys Glu Glu
            980                 985                 990

Tyr Ala Ala Phe Tyr Lys Ala Ile Ser Asn Asp Trp Glu Asp Pro Ala
        995                 1000                1005

Ala Thr Lys His Phe Ser Val Glu Gly Gln Leu Glu Phe Arg Ala Ile
    1010                1015                1020

Ala Phe Val Pro Lys Arg Ala Pro Phe Asp Met Phe Glu Pro Asn Lys
1025                1030                1035                1040

Lys Arg Asn Asn Ile Lys Leu Tyr Val Arg Arg Val Phe Ile Met Asp
                1045                1050                1055

Asn Cys Glu Asp Leu Cys Pro Asp Trp Leu Gly Phe Val Lys Gly Val
```

1060 1065 1070

Val Asp Ser Glu Asp Leu Pro Leu Asn Ile Ser Arg Glu Asn Leu Gln
1075 1080 1085

Gln Asn Lys Ile Leu Lys Val Ile Arg Lys Asn Ile Val Lys Lys Cys
1090 1095 1100

Leu Glu Leu Phe Glu Glu Ile Ala Glu Asn Lys Glu Asp Tyr Lys Gln
1105 1110 1115 1120

Phe Tyr Glu Gln Phe Gly Lys Asn Ile Lys Leu Gly Ile His Glu Asp
1125 1130 1135

Thr Ala Asn Arg Lys Lys Leu Met Glu Leu Leu Arg Phe Tyr Ser Thr
1140 1145 1150

Glu Ser Gly Glu Glu Met Thr Thr Leu Lys Asp Tyr Val Thr Arg Met
1155 1160 1165

Lys Pro Glu Gln Lys Ser Ile Tyr Tyr Ile Thr Gly Asp Ser Lys Lys
1170 1175 1180

Lys Leu Glu Ser Ser Pro Phe Ile Glu Lys Ala Arg Arg Cys Gly Leu
1185 1190 1195 1200

Glu Val Leu Phe Met Thr Glu Pro Ile Asp Glu Tyr Val Met Gln Gln
1205 1210 1215

Val Lys Asp Phe Glu Asp Lys Lys Phe Ala Cys Leu Thr Lys Glu Gly
1220 1225 1230

Val His Phe Glu Glu Ser Glu Glu Glu Lys Lys Gln Arg Glu Glu Lys
1235 1240 1245

Lys Ala Ala Cys Glu Lys Leu Cys Lys Thr Met Lys Glu Val Leu Gly
1250 1255 1260

Asp Lys Val Glu Lys Val Thr Val Ser Glu Arg Leu Ser Thr Ser Pro
1265 1270 1275 1280

Cys Ile Leu Val Thr Ser Glu Phe Gly Trp Ser Ala His Met Glu Gln
1285 1290 1295

Ile Met Arg Asn Gln Ala Leu Arg Asp Ser Ser Met Ala Gln Tyr Met
1300 1305 1310

Val Ser Lys Lys Thr Met Glu Val Asn Pro Asp His Pro Ile Ile Lys
1315 1320 1325

Glu Leu Arg Arg Arg Val Glu Ala Asp Glu Asn Asp Lys Ala Val Lys
1330 1335 1340

Asp Leu Val Phe Leu Leu Phe Asp Thr Ser Leu Leu Thr Ser Gly Phe
1345 1350 1355 1360

Gln Leu Asp Asp Pro Thr Gly Tyr Ala Glu Arg Ile Asn Arg Met Ile
1365 1370 1375

Lys Leu Gly Leu Ser Leu Asp Glu Glu Glu Glu Glu Val Ala Glu Ala
1380 1385 1390

Pro Pro Ala Glu Ala Ala Pro Ala Glu Val Thr Ala Gly Thr Ser Ser
1395 1400 1405

Met Glu Gln Val Asp Asp Ile His His Thr Gly Gly Arg Ser Ser Arg
1410 1415 1420

Ser Gly Cys
1425

<210> 98
<211> 4929
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencia de ADN que codifica construcciones de fusión (poli-proteína) que comprenden múltiples antígenos de Leishmania

<400> 98

catatgcacc accaccacca ccacatgtcc tgcggtaacg ccaagatcaa ctctcccgcg 60
ccgtccttcg aggaggtggc gctcatgccc aacggcagct tcaagaagat cagcctctcc 120
tcctacaagg gcaagtgggt cgtgctcttc ttctacccgc tcgacttcac cttcgtgtgc 180
ccgacagagg tcatcgcgtt ctccgacagc gtgagtcgct tcaacgagct caactgcgag 240
gtcctcgcgt gctcgataga cagcgagtac gcgcacctgc agtggacgct gcaggaccgc 300
aagaagggcg gcctcgggac catggcgatc ccaatgctag ccgacaagac caagagcatc 360
gctcgttcct acggcgtgct ggaggagagc cagggcgtgg cctaccgcgg tctcttcatc 420
atcgaccccc atggcatgct gcgtcagatc accgtcaatg acatgccggt gggccgcagc 480
gtggaggagg ttctacgcct gctggaggct tttcagttcg tggagaagca cggcgaggtg 540
tgccccgcga actggaagaa gggcgccccc acgatgaagc cggaaccgaa tgcgtctgtc 600
gagggatact tcagcaagca gggatccatg gacgcaactg agctgaagaa caaggggaac 660
gaagagttct ccgccggccg ctatgtggag gcggtgaact acttctcaaa ggcgatccag 720
ttggatgagc agaacagtgt cctctacagc aaccgctccg cctgttttgc agccatgcag 780
aaatacaagg acgcgctgga cgacgccgac aagtgcatct cgatcaagcc gaattgggcc 840
aagggctacg tgcgccgagg agcagctctc catggcatgc gccgctacga cgatgccatt 900
gccgcgtatg aaaaggggct caaggtggac ccttccaaca gcggctgcgc gcagggcgtg 960
aaggacgtgc aggtagccaa ggcccgcgaa gcacgtgacc ccatcgctcg cgtcttcacc 1020
ccggaggcgt tccgcaagat ccaagagaat cccaagctgt ctctacttat gctgcagccg 1080
gactacgtga agatggtaga caccgtcatc cgcgaccctt cgcagggccg gctgtacatg 1140
gaagaccagc gctttgccct gacgctcatg tacctgagcg gaatgaagat tcccaacgat 1200
ggtgatggcg aggaggagga acgtccgtct gcgaaggcgg cagagacagc gaagccaaaa 1260
gaggagaagc ctctcaccga caacgagaag gaggccctgg cgctcaagga ggagggcaac 1320
aagctgtacc tctcgaagaa gtttgaggag gcgctgacca agtaccaaga ggcgcaggtg 1380
aaagacccca acaacacttt atacattctg aacgtgtcgg ccgtgtactt cgagcagggt 1440
gactacgaca agtgcatcgc cgagtgcgag cacggtatcg agcacggtcg cgagaaccac 1500
tgcgactaca caatcattgc gaagctcatg acccggaacg ccttgtgcct ccagaggcag 1560
aggaagtacg aggctgctat cgacctttac aagcgcgccc ttgtcgagtg gcgtaaccct 1620
gacaccctca agaagctgac ggagtgcgag aaggagcacc aaaaggcggt ggaggaagcc 1680
tacatcgatc ctgagatcgc gaagcagaag aaagacgaag gtaaccagta cttcaaggag 1740
gataagttcc ccgaggccgt ggcagcgtac acggaggcca tcaagcgcaa ccctgccgag 1800
cacacctcct acagcaatcg cgcggccgcg tacatcaagc ttggagcctt caacgacgcc 1860
ctcaaggacg cggagaagtg cattgagctg aagcccgact ttgttaaggg ctacgcgcgc 1920
aagggtcatg cttacttttg gaccaagcag tacaaccgcg cgctgcaggc gtacaatgag 1980

```
ggcctcaagg tggacccgag caatgcggac tgcaaggatg ggcggtatcg cacaatcatg 2040
aagattcagg agatggcatc tggccaatcc gcggatggcg acgaggcggc gcgccgggcc 2100
atggacgatc ctgaaatcgc ggcaatcatg caagatagct acatgcaact agtgttgaag 2160
gagatgcaga acgatcccac gcgcattcag gagtacatga aggactccgg gatctcatcg 2220
aagatcaaca agctgatttc agctggcatc attcgttttg gtcaggaatt cagcctgacg 2280
gacccggcgg tgctgggcga ggagactcac ctgcgcgtcc gcgtggtgcc ggacaaggcg 2340
aacaagacgc tgacggtgga ggataacggc atcggcatga ccaaggcgga cctcgtgaac 2400
aatctgggca cgatcgcgcg ctccggcacg aaggcgttca tggaggcact ggaggccggc 2460
ggcgacatga gcatgatcgg ccagttcggt gtcggcttct actccgcgta ccttgtggcg 2520
gaccgcgtga cggtggtgtc gaagaacaac tcggacgagg cgtacgtatg ggagtcgtcc 2580
gcgggcggca cgttcaccat cacgagcgtg ccggagtcgg acatgaagcg cggcacgcgc 2640
atcacgctgc acctaaagga ggaccagcag gagtacctgg aggagcgccg ggtgaaggag 2700
ctgatcaaga agcactccga gttcatcggc tacgacatcg agctgatggt ggagaagacg 2760
gcggagaagg aggtgacgga cgaggacgag gaggaggacg agtcgaagaa gaagtcctgc 2820
ggggacgagg gcgagccgaa ggtggaggag gtgacggagg gcggcgagga caagaagaag 2880
aagacgaaga aggtgaagga ggtgacgaag acgtacgagg tccagaacaa gcacaagccg 2940
ctctggacgc gcgacccgaa ggacgtgacg aaggaggagt acgcggcctt ctacaaggcc 3000
atctccaacg actgggagga cccggcggcg acgaagcact tctcggtgga gggccagctg 3060
gagttccgcg cgatcgcgtt cgtgccgaag cgcgcgccgt tcgacatgtt cgagccgaac 3120
aagaagcgca acaacatcaa gctgtacgtg cgccgcgtgt tcatcatgga caactgcgag 3180
gacctgtgcc cggactggct cggcttcgtg aagggcgtcg tggacagcga ggacctgccg 3240
ctgaacatct cgcgcgagaa cctgcagcag aacaagatcc tgaaggtgat ccgcaagaac 3300
atcgtgaaga agtgcctgga gctgttcgaa gagatagcgg agaacaagga ggactacaag 3360
cagttctacg agcagttcgg caagaacatc aagctgggca tccacgagga cacggcgaac 3420
cgcaagaagc tgatggagtt gctgcgcttc tacagcaccg agtcgggggа ggagatgacg 3480
acactgaagg actacgtgac gcgcatgaag ccggagcaga agtcgatcta ctacatcact 3540
ggcgacagca agaagaagct ggagtcgtcg ccgttcatcg agaaggcgag acgctgcggg 3600
ctcgaggtgc tgttcatgac ggagccgatc gacgagtacg tgatgcagca ggtgaaggac 3660
ttcgaggaca agaagttcgc gtgcctgacg aaggaaggcg tgcacttcga ggagtccgag 3720
gaggagaaga agcagcgcga ggagaagaag gcggcgtgcg agaagctgtg caagacgatg 3780
aaggaggtgc tgggcgacaa ggtggagaag gtgaccgtgt cggagcgcct gtcgacgtcg 3840
ccgtgcatcc tggtgacgtc ggagtttggg tggtcggcgc acatggaaca gatcatgcgc 3900
aaccaggcgc tgcgcgactc cagcatggcg cagtacatgg tgtccaagaa gacgatggag 3960
gtgaaccccg accaccccat catcaaggag ctgcgccgcc gcgtggaggc ggacgagaac 4020
gacaaggccg tgaaggacct cgtcttcctg ctcttcgaca cgtcgctgct cacgtccggc 4080
ttccagctgg atgaccccac cggctacgcc gagcgcatca accgcatgat caagctcggc 4140
ctgtcgctcg acgaggagga ggaggaggtc gccgaggcgc cgccggccga ggcagccccc 4200
gcggaggtca ccgccggcac ctccagcatg gagcaggtgg acgatatcat ggcgcagaat 4260
gataagatcg ccccccagga ccaggactcc ttcctcgatg accagcccgg cgttcgcccg 4320
atcccgtcct tcgacgacat gccgctgcac cagaacctgc tgcgtggcat ctactcgtac 4380
gggttcgaga agccgtccag catccagcag cgcgcgatag ccccccttcac gcgcggcggc 4440
gacatcatcg cgcaggccca gtccggtacc ggcaagacgg gtgccttctc catcggtctg 4500
ctgcagcgcc tggacttccg ccacaacctg atccagggcc tcgtgctctc ccccactcgc 4560
gagctggccc tgcagacggc ggaggtgatc agccgcatcg gtgagttcct gtcgaacagc 4620
tccaagttct gcgagacctt tgtcggcggc acgcgcgtgc aggatgacct gcgcaagctg 4680
caggccggcg tcatcgttgc cgtgggcacg ccgggccgcg tgtccgacgt gatcaagcgt 4740
ggcgcgctgc gcacagagtc gctgcgcgtg ctggtgctcg acgaggctga tgagatgctg 4800
tctcagggct tcgcggacca gatttacgag atcttccgct tcctgccgaa ggacatccag 4860
gtcgcgctct tctccgccac gatgccggag gaggtactgg agctgacgaa gaagttcatg 4920
cgcgactaa                                                        4929
```

<210> 99
<211> 4233
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencia de ADN que codifica construcciones de fusión (poli-proteína) que comprenden múltiples antígenos de Leishmania

<400> 99

ccagtgtggt ggatgtcctg cggtaacgcc aagatcaact ctcccgcgcc gtccttcgag 60
gaggtggcgc tcatgcccaa cggcagcttc aagaagatca gcctctcctc ctacaagggc 120
aagtgggtcg tgctcttctt ctacccgctc gacttcacct tcgtgtgccc gacagaggtc 180
atcgcgttct ccgacagcgt gagtcgcttc aacgagctca actgcgaggt cctcgcgtgc 240
tcgatagaca gcgagtacgc gcacctgcag tggacgctgc aggaccgcaa gaagggcggc 300
ctcgggacca tggcgatccc aatgctagcc gacaagacca agagcatcgc tcgttcctac 360
ggcgtgctgg aggagagcca gggcgtggcc taccgcggtc tcttcatcat cgacccccat 420
ggcatgctgc gtcagatcac cgtcaatgac atgccggtgg gccgcagcgt ggaggaggtt 480
ctacgcctgc tggaggcttt tcagttcgtg gagaagcacg gcgaggtgtg ccccgcgaac 540
tggaagaagg gcgcccccac gatgaagccg gaaccgaatg cgtctgtcga gggatacttc 600
agcaagcagg gatccatgga cgcaactgag ctgaagaaca aggggaacga agagttctcc 660
gccggccgct atgtggaggc ggtgaactac ttctcaaagg cgatccagtt ggatgagcag 720
aacagtgtcc tctacagcaa ccgctccgcc tgttttgcag ccatgcagaa atacaaggac 780
gcgctggacg acgccgacaa gtgcatctcg atcaagccga attgggccaa gggctacgtg 840
cgccgaggag cagctctcca tggcatgcgc cgctacgacg atgccattgc cgcgtatgaa 900
aaggggctca aggtggaccc ttccaacagc ggctgcgcgc agggcgtgaa ggacgtgcag 960
gtagccaagg cccgcgaagc acgtgacccc atcgctcgcg tcttcacccc ggaggcgttc 1020
cgcaagatcc aagagaatcc caagctgtct ctacttatgc tgcagccgga ctacgtgaag 1080
atggtagaca ccgtcatccg cgacccttcg cagggccggc tgtacatgga agaccagcgc 1140
tttgccctga cgctcatgta cctgagcgga atgaagattc ccaacgatgg tgatggcgag 1200
gaggaggaac gtccgtctgc gaaggcggca gagacagcga agccaaaaga ggagaagcct 1260
ctcaccgaca acgagaagga ggccctggcg ctcaaggagg agggcaacaa gctgtacctc 1320
tcgaagaagt ttgaggaggc gctgaccaag taccaagagg cgcaggtgaa agaccccaac 1380
aacactttat acattctgaa cgtgtcggcc gtgtacttcg agcagggtga ctacgacaag 1440
tgcatcgccg agtgcgagca cggtatcgag cacggtcgcg agaaccactg cgactacaca 1500
atcattgcga agctcatgac ccggaacgcc ttgtgcctcc agaggcagag gaagtacgag 1560
gctgctatcg acctttacaa gcgcgccctt gtcgagtggc gtaaccctga caccctcaag 1620
aagctgacgg agtgcgagaa ggagcaccaa aaggcggtgg aggaagccta catcgatcct 1680
gagatcgcga agcagaagaa agacgaaggt aaccagtact tcaaggagga taagttcccc 1740
gaggccgtgg cagcgtacac ggaggccatc aagcgcaacc ctgccgagca cacctcctac 1800
agcaatcgcg cggccgcgta catcaagctt ggagccttca acgacgccct caaggacgcg 1860
gagaagtgca ttgagctgaa gcccgacttt gttaagggct acgcgcgcaa gggtcatgct 1920
tacttttgga ccaagcagta caaccgcgcg ctgcaggcgt acaatgaggg cctcaaggtg 1980
gacccgagca atgcggactg caaggatggg cggtatcgca caatcatgaa gattcaggag 2040
atggcatctg gccaatccgc ggatggcgac gaggcggcgc gccgggccat ggacgatcct 2100
gaaatcgcgg caatcatgca agatagctac atgcaactag tgttgaagga gatgcagaac 2160
gatcccacgc gcattcagga gtacatgaag gactccggga tctcatcgaa gatcaacaag 2220
ctgatttcag ctggcatcat tcgttttggt caggaattca gcctgacgga cccggcggtg 2280
ctgggcgagg agactcacct gcgcgtccgc gtggtgccgg acaaggcgaa caagacgctg 2340
acggtggagg ataacggcat cggcatgacc aaggcggacc tcgtgaacaa tctgggcacg 2400
atcgcgcgct ccggcacgaa ggcgttcatg gaggcactgg aggccggcgg cgacatgagc 2460
atgatcggcc agttcggtgt cggcttctac tccgcgtacc ttgtggcgga ccgcgtgacg 2520
gtggtgtcga agaacaactc ggacgaggcg tacgtatggg agtcgtccgc gggcggcacg 2580
ttcaccatca cgagcgtgcc ggagtcggac atgaagcgcg gcacgcgcat cacgctgcac 2640
ctaaaggagg accagcagga gtacctggag gagcgccggg tgaaggagct gatcaagaag 2700
cactccgagt tcatcggcta cgacatcgag ctgatggtgg agaagacggc ggagaaggag 2760
gtgacggacg aggacgagga ggaggacgag tcgaagaaga agtcctgcgg ggacgagggc 2820
gagccgaagg tggaggaggt gacggagggc ggcgaggaca agaagaagaa gacgaagaag 2880
gtgaaggagg tgacgaagac gtacgaggtc cagaacaagc acaagccgct ctggacgcgc 2940
gacccgaagg acgtgacgaa ggaggagtac gcggccttct acaaggccat ctccaacgac 3000
tgggaggacc cggcggcgac gaagcacttc tcggtggagg gccagctgga gttccgcgcg 3060
atcgcgttcg tgccgaagcg cgcgccgttc gacatgttcg agccgaacaa gaagcgcaac 3120
aacatcaagc tgtacgtgcg ccgcgtgttc atcatggaca actgcgagga cctgtgcccg 3180
gactggctcg gcttcgtgaa gggcgtcgtg gacagcgagg acctgccgct gaacatctcg 3240

```
cgcgagaacc tgcagcagaa caagatcctg aaggtgatcc gcaagaacat cgtgaagaag 3300
tgcctggagc tgttcgaaga gatagcggag aacaaggagg actacaagca gttctacgag 3360
cagttcggca agaacatcaa gctgggcatc cacgaggaca cggcgaaccg caagaagctg 3420
atggagttgc tgcgcttcta cagcaccgag tcgggggagg agatgacgac actgaaggac 3480
tacgtgacgc gcatgaagcc ggagcagaag tcgatctact acatcactgg cgacagcaag 3540
aagaagctgg agtcgtcgcc gttcatcgag aaggcgagac gctgcgggct cgaggtgctg 3600
ttcatgacgg agccgatcga cgagtacgtg atgcagcagg tgaaggactt cgaggacaag 3660
aagttcgcgt gcctgacgaa ggaaggcgtg cacttcgagg agtccgagga ggagaagaag 3720
cagcgcgagg agaagaaggc ggcgtgcgag aagctgtgca agacgatgaa ggaggtgctg 3780
ggcgacaagg tggagaaggt gaccgtgtcg gagcgcctgt cgacgtcgcc gtgcatcctg 3840
gtgacgtcgg agtttgggtg gtcggcgcac atggaacaga tcatgcgcaa ccaggcgctg 3900
cgcgactcca gcatggcgca gtacatggtg tccaagaaga cgatggaggt gaaccccgac 3960
caccccatca tcaaggagct gcgccgccgc gtggaggcgg acgagaacga caaggccgtg 4020
aaggacctcg tcttcctgct cttcgacacg tcgctgctca cgtccggctt ccagctggat 4080
gaccccaccg gctacgccga gcgcatcaac cgcatgatca agctcggcct gtcgctcgac 4140
gaggaggagg aggaggtcgc cgaggcgccg ccggccgagg cagcccccgc ggaggtcacc 4200
gccggcacct ccagcatgga gcaggtggac taa                              4233
```

<210> 100
<211> 4917
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencia de ADN que codifica construcciones de fusión (poli-proteína) que comprenden múltiples antígenos de Leishmania

<400> 100

```
ccagtgtggt ggatgtcctg cggtaacgcc aagatcaact ctcccgcgcc gtccttcgag 60
gaggtggcgc tcatgcccaa cggcagcttc aagaagatca gcctctcctc ctacaagggc 120
aagtgggtcg tgctcttctt ctacccgctc gacttcacct tcgtgtgccc gacagaggtc 180
atcgcgttct ccgacagcgt gagtcgcttc aacgagctca actgcgaggt cctcgcgtgc 240
tcgatagaca gcgagtacgc gcacctgcag tggacgctgc aggaccgcaa gaagggcggc 300
ctcgggacca tggcgatccc aatgctagcc gacaagacca agagcatcgc tcgttcctac 360
ggcgtgctgg aggagagcca gggcgtggcc taccgcggtc tcttcatcat cgacccccat 420
ggcatgctgc gtcagatcac cgtcaatgac atgccggtgg gccgcagcgt ggaggaggtt 480
ctacgcctgc tggaggcttt tcagttcgtg gagaagcacg gcgaggtgtg ccccgcgaac 540
tggaagaagg gcgcccccac gatgaagccg gaaccgaatg cgtctgtcga gggatacttc 600
agcaagcagg gatccatgga cgcaactgag ctgaagaaca aggggaacga agagttctcc 660
gccggccgct atgtggaggc ggtgaactac ttctcaaagg cgatccagtt ggatgagcag 720
aacagtgtcc tctacagcaa ccgctccgcc tgttttgcag ccatgcagaa atacaaggac 780
gcgctggacg acgccgacaa gtgcatctcg atcaagccga attgggccaa gggctacgtg 840
cgccgaggag cagctctcca tggcatgcgc cgctacgacg atgccattgc cgcgtatgaa 900
aaggggctca aggtggaccc ttccaacagc ggctgcgcgc agggcgtgaa ggacgtgcag 960
gtagccaagg cccgcgaagc acgtgacccc atcgctcgcg tcttcacccc ggaggcgttc 1020
cgcaagatcc aagagaatcc caagctgtct ctacttatgc tgcagccgga ctacgtgaag 1080
atggtagaca ccgtcatccg cgacccttcg cagggccggc tgtacatgga agaccagcgc 1140
tttgccctga cgctcatgta cctgagcgga atgaagattc ccaacgatgg tgatggcgag 1200
gaggaggaac gtccgtctgc gaaggcggca gagacagcga agccaaaaga ggagaagcct 1260
ctcaccgaca acgagaagga ggccctggcg ctcaaggagg agggcaacaa gctgtacctc 1320
tcgaagaagt ttgaggaggc gctgaccaag taccaagagg cgcaggtgaa agaccccaac 1380
aacactttat acattctgaa cgtgtcggcc gtgtacttcg agcagggtga ctacgacaag 1440
tgcatcgccg agtgcgagca cggtatcgag cacggtcgcg agaaccactg cgactacaca 1500
atcattgcga agctcatgac ccggaacgcc ttgtgcctcc agaggcagag gaagtacgag 1560
gctgctatcg acctttacaa gcgcgccctt gtcgagtggc gtaaccctga caccctcaag 1620
aagctgacgg agtgcgagaa ggagcaccaa aaggcggtgg aggaagccta catcgatcct 1680
```

gagatcgcga agcagaagaa agacgaaggt aaccagtact tcaaggagga taagttcccc 1740
gaggccgtgg cagcgtacac ggaggccatc aagcgcaacc ctgccgagca cacctcctac 1800
agcaatcgcg cggccgcgta catcaagctt ggagccttca acgacgccct caaggacgcg 1860
gagaagtgca ttgagctgaa gcccgacttt gttaagggct acgcgcgcaa gggtcatgct 1920
tacttttgga ccaagcagta caaccgcgcg ctgcaggcgt acaatgaggg cctcaaggtg 1980
gacccgagca atgcggactg caaggatggg cggtatcgca caatcatgaa gattcaggag 2040
atggcatctg gccaatccgc ggatggcgac gaggcggcgc gccgggccat ggacgatcct 2100
gaaatcgcgg caatcatgca agatagctac atgcaactag tgttgaagga gatgcagaac 2160
gatcccacgc gcattcagga gtacatgaag gactccggga tctcatcgaa gatcaacaag 2220
ctgatttcag ctggcatcat tcgttttggt caggaattca gcctgacgga cccggcggtg 2280
ctgggcgagg agactcacct gcgcgtccgc gtggtgccgg acaaggcgaa caagacgctg 2340
acggtggagg ataacggcat cggcatgacc aaggcggacc tcgtgaacaa tctgggcacg 2400
atcgcgcgct ccggcacgaa ggcgttcatg gaggcactgg aggccggcgg cgacatgagc 2460
atgatcggcc agttcggtgt cggcttctac tccgcgtacc ttgtggcgga ccgcgtgacg 2520
gtggtgtcga agaacaactc ggacgaggcg tacgtatggg agtcgtccgc gggcggcacg 2580
ttcaccatca cgagcgtgcc ggagtcggac atgaagcgcg gcacgcgcat cacgctgcac 2640
ctaaaggagg accagcagga gtacctggag gagcgccggg tgaaggagct gatcaagaag 2700
cactccgagt tcatcggcta cgacatcgag ctgatggtgg agaagacggc ggagaaggag 2760
gtgacggacg aggacgagga ggaggacgag tcgaagaaga agtcctgcgg ggacgagggc 2820
gagccgaagg tggaggaggt gacggagggc ggcgaggaca agaagaagaa gacgaagaag 2880
gtgaaggagg tgacgaagac gtacgaggtc cagaacaagc acaagccgct ctggacgcgc 2940
gacccgaagg acgtgacgaa ggaggagtac gcggccttct acaaggccat ctccaacgac 3000
tgggaggacc cggcggcgac gaagcacttc tcggtggagg gccagctgga gttccgcgcg 3060
atcgcgttcg tgccgaagcg cgcgccgttc gacatgttcg agccgaacaa gaagcgcaac 3120
aacatcaagc tgtacgtgcg ccgcgtgttc atcatggaca actgcgagga cctgtgcccg 3180
gactggctcg gcttcgtgaa gggcgtcgtg gacagcgagg acctgccgct gaacatctcg 3240
cgcgagaacc tgcagcagaa caagatcctg aaggtgatcc gcaagaacat cgtgaagaag 3300
tgcctggagc tgttcgaaga gatagcggag aacaaggagg actacaagca gttctacgag 3360
cagttcggca agaacatcaa gctgggcatc cacgaggaca cggcgaaccg caagaagctg 3420
atggagttgc tgcgcttcta cagcaccgag tcgggggagg agatgacgac actgaaggac 3480
tacgtgacgc gcatgaagcc ggagcagaag tcgatctact acatcactgg cgacagcaag 3540
aagaagctgg agtcgtcgcc gttcatcgag aaggcgagac gctgcgggct cgaggtgctg 3600
ttcatgacgg agccgatcga cgagtacgtg atgcagcagg tgaaggactt cgaggacaag 3660
aagttcgcgt gcctgacgaa ggaaggcgtg cacttcgagg agtccgagga ggagaagaag 3720
cagcgcgagg agaagaaggc ggcgtgcgag aagctgtgca agacgatgaa ggaggtgctg 3780
ggcgacaagg tggagaaggt gaccgtgtcg gagcgcctgt cgacgtcgcc gtgcatcctg 3840
gtgacgtcgg agtttgggtg gtcggcgcac atggaacaga tcatgcgcaa ccaggcgctg 3900
cgcgactcca gcatggcgca gtacatggtg tccaagaaga cgatggaggt gaaccccgac 3960
caccccatca tcaaggagct gcgccgccgc gtggaggcgg acgagaacga caaggccgtg 4020
aaggacctcg tcttcctgct cttcgacacg tcgctgctca cgtccggctt ccagctggat 4080
gaccccaccg gctacgccga gcgcatcaac cgcatgatca agctcggcct gtcgctcgac 4140
gaggaggagg aggaggtcgc cgaggcgccg ccggccgagg cagcccccgc ggaggtcacc 4200
gccggcacct ccagcatgga gcaggtggac gatatcatgg cgcagaatga taagatcgcc 4260
ccccaggacc aggactcctt cctcgatgac cagcccggcg ttcgcccgat cccgtccttc 4320
gacgacatgc cgctgcacca gaacctgctg cgtggcatct actcgtacgg gttcgagaag 4380
ccgtccagca tccagcagcg cgcgatagcc cccttcacgc gcggcggcga catcatcgcg 4440
caggcccagt ccggtaccgg caagacgggt gccttctcca tcggtctgct gcagcgcctg 4500
gacttccgcc acaacctgat ccagggcctc gtgctctccc ccactcgcga gctggccctg 4560
cagacggcgg aggtgatcag ccgcatcggt gagttcctgt cgaacagctc caagttctgc 4620
gagacctttg tcggcggcac gcgcgtgcag gatgacctgc gcaagctgca ggccggcgtc 4680
atcgttgccg tgggcacgcc gggccgcgtg tccgacgtga tcaagcgtgg cgcgctgcgc 4740
acagagtcgc tgcgcgtgct ggtgctcgac gaggctgatg agatgctgtc tcagggcttc 4800
gcggaccaga tttacgagat cttccgcttc ctgccgaagg acatccaggt cgcgctcttc 4860
tccgccacga tgccggagga ggtactggag ctgacgaaga agttcatgcg cgactaa 4917

<210> 101
<211> 2735
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia de ADN que codifica construcciones de fusión (poli-proteína) que comprenden múltiples antígenos de Leishmania

<400> 101

catatgcacc accaccacca ccacatgtcc tgcggtaacg ccaagatcaa ctctcccgcg 60
ccgtccttcg aggaggtggc gctcatgccc aacggcagct tcaagaagat cagcctctcc 120
tcctacaagg gcaagtgggt cgtgctcttc ttctacccgc tcgacttcac cttcgtgtgc 180
ccgacagagg tcatcgcgtt ctccgacagc gtgagtcgct tcaacgagct caactgcgag 240
gtcctcgcgt gctcgataga cagcgagtac gcgcacctgc agtggacgct gcaggaccgc 300
aagaagggcg gcctcgggac catggcgatc ccaatgctag ccgacaagac caagagcatc 360
gctcgttcct acggcgtgct ggaggagagc cagggcgtgg cctaccgcgg tctcttcatc 420
atcgaccccc atggcatgct gcgtcagatc accgtcaatg acatgccggt gggccgcagc 480
gtggaggagg ttctacgcct gctggaggct tttcagttcg tggagaagca cggcgaggtg 540
tgccccgcga actggaagaa gggcgccccc acgatgaagc cggaaccgaa tgcgtctgtc 600
gagggatact tcagcaagca gggatccatg gacgcaactg agctgaagaa caaggggaac 660
gaagagttct ccgccggccg ctatgtggag gcggtgaact acttctcaaa ggcgatccag 720
ttggatgagc agaacagtgt cctctacagc aaccgctccg cctgttttgc agccatgcag 780
aaatacaagg acgcgctgga cgacgccgac aagtgcatct cgatcaagcc gaattgggcc 840
aagggctacg tgcgccgagg agcagctctc catggcatgc gccgctacga cgatgccatt 900
gccgcgtatg aaaaggggct caaggtggac ccttccaaca gcggctgcgc gcagggcgtg 960
aaggacgtgc aggtagccaa ggcccgcgaa gcacgtgacc ccatcgctcg cgtcttcacc 1020
ccggaggcgt tccgcaagat ccaagagaat cccaagctgt ctctacttat gctgcagccg 1080
gactacgtga agatggtaga caccgtcatc cgcgaccctt cgcagggccg gctgtacatg 1140
gaagaccagc gctttgccct gacgctcatg tacctgagcg gaatgaagat tcccaacgat 1200
ggtgatggcg aggaggagga acgtccgtct gcgaaggcgg cagagacagc gaagccaaaa 1260
gaggagaagc ctctcaccga caacgagaag gaggccctgg cgctcaagga ggagggcaac 1320
aagctgtacc tctcgaagaa gtttgaggag gcgctgacca agtaccaaga ggcgcaggtg 1380
aaagacccca acaacacttt atacattctg aacgtgtcgg ccgtgtactt cgagcagggt 1440
gactacgaca agtgcatcgc cgagtgcgag cacggtatcg agcacggtcg cgagaaccac 1500
tgcgactaca caatcattgc gaagctcatg acccggaacg ccttgtgcct ccagaggcag 1560
aggaagtacg aggctgctat cgacctttac aagcgcgccc ttgtcgagtg gcgtaaccct 1620
gacaccctca agaagctgac ggagtgcgag aaggagcacc aaaaggcggt ggaggaagcc 1680
tacatcgatc ctgagatcgc gaagcagaag aaagacgaag gtaaccagta cttcaaggag 1740
gataagttcc ccgaggccgt ggcagcgtac acggaggcca tcaagcgcaa ccctgccgag 1800
cacacctcct acagcaatcg cgcggccgcg tacatcaagc ttggagcctt caacgacgcc 1860
ctcaaggacg cggagaagtg cattgagctg aagcccgact ttgttaaggg ctacgcgcgc 1920
aagggtcatg cttacttttg gaccaagcag tacaaccgcg cgctgcaggc gtacaatgag 1980
ggcctcaagg tggacccgag caatgcggac tgcaaggatg ggcggtatcg cacaatcatg 2040
aagattcagg agatggcatc tggccaatcc gcggatggcg acgaggcggc gcgccgggcc 2100
atggacgatc ctgaaatcgc ggcaatcatg caagatagct acatgcaact agtgttgaag 2160
gagatgcaga acgatcccac gcgcattcag gagtacatga aggactccgg gatctcatcg 2220
aagatcaaca agctgatttc agctggcatc attcgttttg gtcaggaatt ctgcagatat 2280
ccatcacact ggcggccgct cgagcagatc cggctgctaa caaagcccga aaggaagctg 2340
agttggctgc tgccaccgct gagcaataac tagcataacc ccttggggcc tctaaacggg 2400
tcttgagggg ttttttgctg aaaggaggaa ctatatccgg ataattcttg aagacgaaag 2460
ggcctcgtga tacgcctatt tttataggtt aatgtcatga taataatggt ttcttagacg 2520
tcaggtggca cttttcgggg aaatgtgcgc ggaacccctа tttggttatt tttctaaata 2580
cattcaaata tgtatccgct catgagacaa taacccytga taaatgcttc aataatattg 2640
aaaaaaggaa gaatatgaag tatttcaaca tttcccgggt ccccttatt ccctttttt 2700
gccgccattt tgcctttctg tttttggttc accca 2735

<210> 102
<211> 1713
<212> ADN
<213> Leishmania major

<400> 102

```
atggcgcagt gcgtgcgtcg gctggtgctg gcggcgacgc tcgccgctgc ggtggcgctg 60
ctgctgtgca cgagcagtgc gccggtggcg cgtgctgctg ggacgaacga cttcactgcg 120
gcgcagcgga cgaacacgct ggcggtgctg caggcgtttg ggcgtgcgat ccctgagctt 180
ggggagaagt gggcgggcaa cgacttctgc tcatgggagt ttatcgtgtg taatgttata 240
ggtgtgaacg tacggggaat cagtccgacg tatgccggca cgctgccgga gatacctgtg 300
aacgtcgact acaggcacgt cgtgatcaag cagctcgact tttccgaaat ggggccgggg 360
ctgagcggga cgctgccgga cagctggagc aagctggaag gactgacttc ccttacgttg 420
tcgggcaaca aagtgagcgg tacgctgccc gcctcatggc acttgatgaa gcggttgaca 480
tctttggtaa ttgcagactt tgacagtatc accggcagcc tgccgcctga gtggagctcg 540
atgcctaatt taaacgctgt ggagctgaag cgactaaaac tgagcggtac gttgcctgcg 600
gactggagct ctttgaaatc actgtcgaac gtcgttcttg aggacacgcc gatcacaggc 660
ttgttgcccc cggagtgggc ctcgctggag agaatacagc agctggttct acggaaattg 720
aagctgaccg gccctctccc tcctcagtgg agctcaatga agatattgca gtatcttact 780
ctggatggca ctcaggtctc cggcacgctg ccgccccagt ggagcgcgat ggcatcggtg 840
cgaattctta acctggaggg tactgaggtc tctggtacgc tgccgcctga gtggatatcg 900
atgagcaggc tgcaaactct gaatctgcgg cgcacgaaag tatccggcac tctgccgccc 960
gaatggagtt ctatgagcag cctggagtac tttcaccttt atcttactca ggtctccggc 1020
acgctgccgc ccgagtggag tgggatgtcg aaggccgcat acttctggct ggaatactgc 1080
gacctgtccg gcagtctgcc gcccgagtgg tcgtcgatgc caaagctgcg cggtatctca 1140
ctgagcggca acaagttctg cgggtgtgtg ccggactcgt gggatcagaa ggctggtctt 1200
gttgtgggca tcgaggacaa gcacaagggc agcgactgct tggctgctaa ggactgcaca 1260
acgaccacca caaaaccccc caccacgaca acgaccccca ctaagccgcc tgccacaacc 1320
accactgagg caccggctga acccacgacc accactgagg caccggctga acccacgacc 1380
accactgagg caccggctga acccacgacc accactgagg caccggctga acccacaacc 1440
accactgagg caccggctga acccacgacc actgctaccc caacaaacac gccgactcct 1500
gcaccagaga cggagtgcga ggtggatggg tgtgaggtgt gcgaggggga ctccgctgcg 1560
aggtgcgcga ggtgccgtga ggactacttc ctgacggacg agaggacgtg cctggtgtac 1620
tgcgatggcg gtgttgctgc tgtgtcgagc ggagtggcag cagcagctgt tgtgtgcgtg 1680
gctgtgctgt tcagcgtggg gctggcggcg tga                              1713
```

<210> 103
<211> 2421
<212> ADN
<213> Leishmania major

<220>
<221> característica_misc
<222> (1) ... (2421)
<223> n=A, T, C o G

<400> 103

```
tcgaattcgg cacgagggca cgcacaagac gaagagttcc aaacagcaac gagtatacgc 60
cactgtcgaa aaacagacac gcagtagaga gaaggaggag gaggaggagg agggggaga 120
gcaagaggcg ggtgggggtt ggagggacag cgctgcgtgc cgccgtctga catgtccgtt 180
ttgatgcgtc ttcgcagagt ggagggagga caccactggc gctgttggcg tgtangcaga 240
gcatcgctcg gctcgtgccg aattcggcac gagcggcacg agccctcgct ctgcctggta 300
agctcagcag acaccgacgc ccgagcaatc ccgcccacgg acctgctgcc gccccgctct 360
gctcgtgacc ctggctgcga atggcgcagt gcgtgcgtcg gctggtgctg gcggcgacgc 420
tcgccgctgc ggtggcgctg ctgctgtgca cgagcagtgc gccggtggcg cgtgctgctg 480
ggacgaacga cttcactgcg gcgcagcgga cgaacacgct ggcggtgctg caggcgtttg 540
ggcgtgcgat ccctgagctt ggggagaagt gggcgggcaa cgacttctgc tcatgggagt 600
ttatcgtgtg taatgttata ggtgtgaacg tacggggaat cagtccgacg tatgccggca 660
cgctgccgga gatacctgtg aacgtcgact acaggcacgt cgtgatcaag cagctcgact 720
```

```
tttccgaaat ggggccgggg ctgagcggga cgctgccgga cagctggagc aagctggaag 780
gactgacttc ccttacgttg tcgggcaaca aagtgagcgg tacgctgccc gcctcatggc 840
acttgatgaa gcggttgaca tctttggtaa ttgcagactt tgacagtatc accggcagcc 900
tgccgcctga gtggagctcg atgcctaatt taaacgctgt ggagctgaag cgactaaaac 960
tgagcggtac gttgcctgcg gactggagct ctttgaaatc actgtcgaac gtcgttcttg 1020
aggacacgcc gatcacaggc ttgttgcccc cggagtgggc ctcgctggag agaatacagc 1080
agctggttct acggaaattg aagctgaccg gccctctccc tcctcagtgg agctcaatga 1140
agatattgca gtatcttact ctggatggca ctcaggtctc cggcacgctg ccgccccagt 1200
ggagcgcgat ggcatcggtg cgaattctta acctggaggg tactgaggtc tctggtacgc 1260
tgccgcctga gtggatatcg atgagcaggc tgcaaactct gaatctgcgg cgcacgaaag 1320
tatccggcac tctgccgccc gaatggagtt ctatgagcag cctggagtac tttcaccttt 1380
atcttactca ggtctccggc acgctgccgc ccgagtggag tgggatgtcg aaggccgcat 1440
acttctggct ggaatactgc gacctgtccg gcagtctgcc gcccgagtgg tcgtcgatgc 1500
caaagctgcg cggtatctca ctgagcggca acaagttctg cgggtgtgtg ccggactcgt 1560
gggatcagaa ggctggtctt gttgtgggca tcgaggacaa gcacaagggc agcgactgct 1620
tggctgctaa ggactgcaca acgaccacca caaaaccccc caccacgaca acgaccccca 1680
ctaagccgcc tgccacaacc accactgagg caccggctga acccacgacc accactgagg 1740
caccggctga acccacgacc accactgagg caccggctga acccacgacc accactgagg 1800
caccggctga acccacaacc accactgagg caccggctga acccacgacc actgctaccc 1860
caacaaacac gccgactcct gcaccagaga cggagtgcga ggtggatggg tgtgaggtgt 1920
gcgaggggga ctccgctgcg aggtgcgcga ggtgccgtga ggactacttc ctgacggacg 1980
agaggacgtg cctggtgtac tgcgatggcg gtgttgctgc tgtgtcgagc ggagtggcag 2040
cagcagctgt tgtgtgcgtg gctgtgctgt tcagcgtggg gctggcggcg tgaggacgct 2100
gctgctgttg cgcgcaggca gcggcccccg ctgcgtggca cacgactgtc tgcgtgcttg 2160
cgtgcagcgc cgccccctgc gttggcgtgc gcgtgcgtgt ctctgtgagc atggctgcca 2220
gtggtgccct cgctcctgcc tctcggtgcc tctgcctctc tcggcgtgtt gatgctgtgg 2280
gctgtgtgtg gggctctcat gcggcgctgc tgctcccgcg gtgtcgctcn tctgccccga 2340
ctctctctgc tgccctcctc tctcgcatgc gggagaggga ggggtggcac gtgcgcgcgc 2400
gcmgttgcgc ttgcgattgt g                                          2421
```

<210> 104
<211> 570
<212> PRT
<213> Leishmania major

<400> 104

```
Met Ala Gln Cys Val Arg Arg Leu Val Leu Ala Ala Thr Leu Ala Ala
                5                  10                  15

Ala Val Ala Leu Leu Leu Cys Thr Ser Ser Ala Pro Val Ala Arg Ala
            20                  25                  30

Ala Gly Thr Asn Asp Phe Thr Ala Ala Gln Arg Thr Asn Thr Leu Ala
        35                  40                  45

Val Leu Gln Ala Phe Gly Arg Ala Ile Pro Glu Leu Gly Glu Lys Trp
    50                  55                  60

Ala Gly Asn Asp Phe Cys Ser Trp Glu Phe Ile Val Cys Asn Val Ile
65                  70                  75                  80

Gly Val Asn Val Arg Gly Ile Ser Pro Thr Tyr Ala Gly Thr Leu Pro
                85                  90                  95

Glu Ile Pro Val Asn Val Asp Tyr Arg His Val Val Ile Lys Gln Leu
            100                 105                 110
```

```
Asp Phe Ser Glu Met Gly Pro Gly Leu Ser Gly Thr Leu Pro Asp Ser
        115                 120                 125

Trp Ser Lys Leu Glu Gly Leu Thr Ser Leu Thr Leu Ser Gly Asn Lys
    130                 135                 140

Val Ser Gly Thr Leu Pro Ala Ser Trp His Leu Met Lys Arg Leu Thr
145                 150                 155                 160

Ser Leu Val Ile Ala Asp Phe Asp Ser Ile Thr Gly Ser Leu Pro Pro
                165                 170                 175

Glu Trp Ser Ser Met Pro Asn Leu Asn Ala Val Glu Leu Lys Arg Leu
            180                 185                 190

Lys Leu Ser Gly Thr Leu Pro Ala Asp Trp Ser Ser Leu Lys Ser Leu
        195                 200                 205

Ser Asn Val Val Leu Glu Asp Thr Pro Ile Thr Gly Leu Leu Pro Pro
    210                 215                 220

Glu Trp Ala Ser Leu Glu Arg Ile Gln Gln Leu Val Leu Arg Lys Leu
225                 230                 235                 240

Lys Leu Thr Gly Pro Leu Pro Pro Gln Trp Ser Ser Met Lys Ile Leu
                245                 250                 255

Gln Tyr Leu Thr Leu Asp Gly Thr Gln Val Ser Gly Thr Leu Pro Pro
            260                 265                 270

Gln Trp Ser Ala Met Ala Ser Val Arg Ile Leu Asn Leu Glu Gly Thr
        275                 280                 285

Glu Val Ser Gly Thr Leu Pro Pro Glu Trp Ile Ser Met Ser Arg Leu
    290                 295                 300

Gln Thr Leu Asn Leu Arg Arg Thr Lys Val Ser Gly Thr Leu Pro Pro
305                 310                 315                 320

Glu Trp Ser Ser Met Ser Ser Leu Glu Tyr Phe His Leu Tyr Leu Thr
                325                 330                 335

Gln Val Ser Gly Thr Leu Pro Pro Glu Trp Ser Gly Met Ser Lys Ala
            340                 345                 350

Ala Tyr Phe Trp Leu Glu Tyr Cys Asp Leu Ser Gly Ser Leu Pro Pro
        355                 360                 365

Glu Trp Ser Ser Met Pro Lys Leu Arg Gly Ile Ser Leu Ser Gly Asn
    370                 375                 380

Lys Phe Cys Gly Cys Val Pro Asp Ser Trp Asp Gln Lys Ala Gly Leu
385                 390                 395                 400

Val Val Gly Ile Glu Asp Lys His Lys Gly Ser Asp Cys Leu Ala Ala
                405                 410                 415

Lys Asp Cys Thr Thr Thr Thr Thr Lys Pro Pro Thr Thr Thr Thr Thr
```

```
                420                 425                 430

Pro Thr Lys Pro Pro Ala Thr Thr Thr Glu Ala Pro Ala Glu Pro
        435                 440                 445

Thr Thr Thr Thr Glu Ala Pro Ala Glu Pro Thr Thr Thr Thr Glu Ala
    450                 455                 460

Pro Ala Glu Pro Thr Thr Thr Thr Glu Ala Pro Ala Glu Pro Thr Thr
465                 470                 475                 480

Thr Thr Glu Ala Pro Ala Glu Pro Thr Thr Thr Ala Thr Pro Thr Asn
                485                 490                 495

Thr Pro Thr Pro Ala Pro Glu Thr Glu Cys Glu Val Asp Gly Cys Glu
            500                 505                 510

Val Cys Glu Gly Asp Ser Ala Ala Arg Cys Ala Arg Cys Arg Glu Asp
        515                 520                 525

Tyr Phe Leu Thr Asp Glu Arg Thr Cys Leu Val Tyr Cys Asp Gly Gly
    530                 535                 540

Val Ala Ala Val Ser Ser Gly Val Ala Ala Ala Ala Val Val Cys Val
545                 550                 555                 560

Ala Val Leu Phe Ser Val Gly Leu Ala Ala
                565                 570
```

<210> 105
<211> 1688
<212> ADN
<213> Leishmania major

<400> 105

```
taacgctata taagtatcag tttctgtact ttattgctca tcactgccgt ttgactgccg     60
cgggcattgg cgctaccact ttcctcactc tttatccctt cagcattgtt tcgtacacac    120
gcacgcgcac gtgaaagagc cgcacgccga cagagcagcc gttccggact ctccgataac    180
tgaacgccac ccacccaaaa aaaatgtcaa agaacgctga ccaggaggag tgggaggatt    240
acggcgacga ggaggtgcag gatgaagaag aggaggacac caccatcaac aactccgacg    300
tggtggtgcg ctacaagaag gccgcaacgt ggtgcaatga aacgttgcgc gtgcttatcg    360
atgccacaaa acctggcgcc aaggtgtgcg acctgtgccg cctcggtgat gacaccatca    420
ccgccaaggt caagacaatg ttcaaaggca cggaaaaagg catcgctttc ccgacctgca    480
tctcggtcaa caactgcgta tgccacaaca gccctggcgt gtcggacgag acgacgcagc    540
aagagatcgc gatgggtgac gtcgtgcact acgacctggg catccacgtg gacggctact    600
gcgccgtcgt cgcgcacacc attcaggtga cagaggacaa tgagcttggc aaggacgaga    660
aggcggcgcg cgtcattaca gcggcgtaca acatcctgaa cacggcgctg cgccagatgc    720
gtcccggtac gaccatctac caggtgacag acgtagttga gaaggctgcg gagcactaca    780
aggtgactcc ggtagacggc gtcctctcgc atatgatgaa gcgctacatc atagacggat    840
accgctgtat cccgcagcgc agggtcgcgg agcacatggt gcacgactac gatctcgaga    900
aagcgcaggt gtggacgcta gacattgtca tgacctccgg caagggcaag ctgaaggagc    960
gcgatgcgcg gccgtgcgtg ttcaaggtgg ctctggactc caactactct gtgaaaatgg   1020
aaagcgcgaa ggaggttcag aaggaaatcg actccaagta tgccaccttc ccctttgcca   1080
tccgcaacct ggaggccaag aaggcccgcc tcggtctcaa cgagatggcg aagcacggtg   1140
ctgtcatccc gtaccctatt ctcttcgaaa aggaaggcga ggtcgtcgcc catttcaaga   1200
ttacggtgct catcagcaac aagaagattg agccgattac cggcctgaag ccgcagaagg   1260
ccccggcgct cgagccatac acggacgaga tgctgcttgc gacgaacaag ctctcgctgt   1320
```

```
cgctagagaa gaaggcggcg aagtagacgg ccgtggcatc cgtgacgctg tactgcgagc    1380
tttcgtaggc gtacgcctct tgtgaggcgt acacgtgtgc tgtttgcgga cgaggaggca    1440
cccattctgt tccccttctt cgctaatctc cgcgtttcct ctgacgctgg cttctctgcc    1500
ggagtgtggt gaggcgcgtg ggggagaaac ggcccactcg catgcctgtg catacgcgag    1560
cacggtaggg agcgcggtgt gtgtgtgtgt ggggggggcgt gttacgagta caaaagaggc    1620
tcgatctctg cgactctttt ctttctgtaa acagggaaca taagtaacca aaaaaaaaaa    1680
aaaaaaaa                                                            1688
```

<210> 106
<211> 380
<212> PRT
<213> Leishmania major

<400> 106

```
Met Ser Lys Asn Ala Asp Gln Glu Glu Trp Glu Asp Tyr Gly Asp Glu
 1               5                  10                  15
Glu Val Gln Asp Glu Glu Glu Glu Asp Thr Thr Ile Asn Asn Ser Asp
            20                  25                  30
Val Val Val Arg Tyr Lys Lys Ala Ala Thr Trp Cys Asn Glu Thr Leu
        35                  40                  45
Arg Val Leu Ile Asp Ala Thr Lys Pro Gly Ala Lys Val Cys Asp Leu
    50                  55                  60
Cys Arg Leu Gly Asp Asp Thr Ile Thr Ala Lys Val Lys Thr Met Phe
65                  70                  75                  80
Lys Gly Thr Glu Lys Gly Ile Ala Phe Pro Thr Cys Ile Ser Val Asn
                85                  90                  95
Asn Cys Val Cys His Asn Ser Pro Gly Val Ser Asp Glu Thr Thr Gln
            100                 105                 110
Gln Glu Ile Ala Met Gly Asp Val Val His Tyr Asp Leu Gly Ile His
        115                 120                 125
Val Asp Gly Tyr Cys Ala Val Val Ala His Thr Ile Gln Val Thr Glu
    130                 135                 140
Asp Asn Glu Leu Gly Lys Asp Glu Lys Ala Ala Arg Val Ile Thr Ala
145                 150                 155                 160
Ala Tyr Asn Ile Leu Asn Thr Ala Leu Arg Gln Met Arg Pro Gly Thr
                165                 170                 175
Thr Ile Tyr Gln Val Thr Asp Val Val Glu Lys Ala Ala Glu His Tyr
            180                 185                 190
Lys Val Thr Pro Val Asp Gly Val Leu Ser His Met Met Lys Arg Tyr
        195                 200                 205
Ile Ile Asp Gly Tyr Arg Cys Ile Pro Gln Arg Arg Val Ala Glu His
    210                 215                 220
Met Val His Asp Tyr Asp Leu Glu Lys Ala Gln Val Trp Thr Leu Asp
225                 230                 235                 240
Ile Val Met Thr Ser Gly Lys Gly Lys Leu Lys Glu Arg Asp Ala Arg
                245                 250                 255
Pro Cys Val Phe Lys Val Ala Leu Asp Ser Asn Tyr Ser Val Lys Met
            260                 265                 270
Glu Ser Ala Lys Glu Val Gln Lys Glu Ile Asp Ser Lys Tyr Ala Thr
        275                 280                 285
Phe Pro Phe Ala Ile Arg Asn Leu Glu Ala Lys Lys Ala Arg Leu Gly
    290                 295                 300
Leu Asn Glu Met Ala Lys His Gly Ala Val Ile Pro Tyr Pro Ile Leu
305                 310                 315                 320
Phe Glu Lys Glu Gly Glu Val Val Ala His Phe Lys Ile Thr Val Leu
                325                 330                 335
Ile Ser Asn Lys Lys Ile Glu Pro Ile Thr Gly Leu Lys Pro Gln Lys
```

```
            340                 345                 350
Ala Pro Ala Leu Glu Pro Tyr Thr Asp Glu Met Leu Leu Ala Thr Asn
        355                 360                 365
Lys Leu Ser Leu Ser Leu Glu Lys Lys Ala Ala Lys
    370                 375                 380
```

<210> 107
<211> 1565
<212> ADN
<213> Leishmania major

<400> 107

```
taacgctata taagtatcag tttctgtact ttattgctct tcgctctcgt tcttcgaaca      60
aacaccttta aaccgccttc caacccctct ttcttctttt tcagccatgc gtgaggctat     120
ctgcatccac atcggccagg ccggctgcca ggtcggtaac gcgtgctggg agctgttctg     180
ccttgagcac ggcatccagc ctgatggctc catgccctct gacaagtgca tcggtgttga     240
ggatgacgcg ttcaacacgt tcttctcgga gaccggtgct ggcaagcacg ttccgcgctg     300
catcttcctg gacctcgagc ctacggtcgt ggatgaggtg cgcaccggca cgtaccgcca     360
gctgttcaac cccgagcagc tggtgtctgg caaggaggat gcggcgaaca actacgctcg     420
tggccactac acgatcggca aggagatcgt cgaccttgcg ctggaccgca ttcgcaagct     480
ggcggacaac tgcactggtc tccagggctt tatggtgttc cacgctgtgg gtggcggcac     540
cggctctggc ctcggtgcgc tgctgctgga gcgcctgtct gtggactacg gcaagaagtc     600
caagctcggc tacaccgtgt acccgagccc gcaggtgtcg actgccgtcg tggagccgta     660
caactgcgtg ctgtcgacgc actcgctgct cgagcacacc gatgttgcga cgatgctcga     720
caatgaggcc atctacgacc tcactcgtcg ttctctcgac attgagcgcc cgtcgtacac     780
gaacgtgaac cgcctgatcg gccaggtggt gtcgtctctg acggcgtcgc tgcgcttcga     840
tggtgcgctg aacgtggacc tgacggagtt ccagacgaac cttgtgccgt acccgcgcat     900
ccacttcgtg ctgacgagct acgctccggt ggtgtctgcc gagaaggcgt accacgagca     960
gctgtccgtc gcggacatca cgaactcggt gtttgagcct gctggcatgc tgacgaagtg    1020
cgatcctcgc cacggcaagt acatgtcgtg ctgcctcatg taccgcggtg atgtcgtgcc    1080
gaaggatgtc aacgccgcga ttgcgacgat caagacgaag cgcacaattc agttcgtgga    1140
ctggtgcccg accggcttca agtgcggcat caactaccag ccgccgaccg ttgtgcccgg    1200
cggtgacctc gcgaaggtgc agcgcgccgt gtgcatgatt gccaactcga ccgcgatcgc    1260
tgaggtgttt gcccgcatcg accacaagtt cgacctgatg tacagcaagc gcgcgtttgt    1320
gcactggtac gtgggtgagg gcatggagga gggcgagttc tccgaggcgc gcgaggatct    1380
cgctgcgctg gagaaggact acgaggaggt tggcgccgag tccgccgacg acatgggcga    1440
ggaggacgtc gaggagtact aaggtagact cgtgccgcgc gctgatgatg taggtgcacg    1500
cgtgcgtgtg ctgcagcgga gccgccgcca ccgcgactgt gtgtgtgtgc gcgcgtgacg    1560
accgg                                                               1565
```

<210> 108
<211> 451
<212> PRT
<213> Leishmania major

<400> 108

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

```
Gly Thr Tyr Arg Gln Leu Phe Asn Pro Glu Gln Leu Val Ser Gly Lys
                85                  90                  95
Glu Asp Ala Ala Asn Asn Tyr Ala Arg Gly His Tyr Thr Ile Gly Lys
            100                 105                 110
Glu Ile Val Asp Leu Ala Leu Asp Arg Ile Arg Lys Leu Ala Asp Asn
        115                 120                 125
Cys Thr Gly Leu Gln Gly Phe Met Val Phe His Ala Val Gly Gly Gly
    130                 135                 140
Thr Gly Ser Gly Leu Gly Ala Leu Leu Leu Glu Arg Leu Ser Val Asp
145                 150                 155                 160
Tyr Gly Lys Lys Ser Lys Leu Gly Tyr Thr Val Tyr Pro Ser Pro Gln
                165                 170                 175
Val Ser Thr Ala Val Val Glu Pro Tyr Asn Cys Val Leu Ser Thr His
            180                 185                 190
Ser Leu Leu Glu His Thr Asp Val Ala Thr Met Leu Asp Asn Glu Ala
        195                 200                 205
Ile Tyr Asp Leu Thr Arg Arg Ser Leu Asp Ile Glu Arg Pro Ser Tyr
    210                 215                 220
Thr Asn Val Asn Arg Leu Ile Gly Gln Val Val Ser Ser Leu Thr Ala
225                 230                 235                 240
Ser Leu Arg Phe Asp Gly Ala Leu Asn Val Asp Leu Thr Glu Phe Gln
                245                 250                 255
Thr Asn Leu Val Pro Tyr Pro Arg Ile His Phe Val Leu Thr Ser Tyr
            260                 265                 270
Ala Pro Val Val Ser Ala Glu Lys Ala Tyr His Glu Gln Leu Ser Val
        275                 280                 285
Ala Asp Ile Thr Asn Ser Val Phe Glu Pro Ala Gly Met Leu Thr Lys
    290                 295                 300
Cys Asp Pro Arg His Gly Lys Tyr Met Ser Cys Cys Leu Met Tyr Arg
305                 310                 315                 320
Gly Asp Val Val Pro Lys Asp Val Asn Ala Ala Ile Ala Thr Ile Lys
                325                 330                 335
Thr Lys Arg Thr Ile Gln Phe Val Asp Trp Cys Pro Thr Gly Phe Lys
            340                 345                 350
Cys Gly Ile Asn Tyr Gln Pro Pro Thr Val Val Pro Gly Gly Asp Leu
        355                 360                 365
Ala Lys Val Gln Arg Ala Val Cys Met Ile Ala Asn Ser Thr Ala Ile
    370                 375                 380
Ala Glu Val Phe Ala Arg Ile Asp His Lys Phe Asp Leu Met Tyr Ser
385                 390                 395                 400
Lys Arg Ala Phe Val His Trp Tyr Val Gly Glu Gly Met Glu Glu Gly
                405                 410                 415
Glu Phe Ser Glu Ala Arg Glu Asp Leu Ala Ala Leu Glu Lys Asp Tyr
            420                 425                 430
Glu Glu Val Gly Ala Glu Ser Ala Asp Asp Met Gly Glu Glu Asp Val
        435                 440                 445
Glu Glu Tyr
    450
```

<210> 109
<211> 1908
<212> ADN
<213> Leishmania major

<220>
<221> característica_misc
<222> (1)...(1908)

<223> n = A,T,C o G

<400> 109

```
taacgctata taagtatcag tttctgtact ttattgtaag cgcaatcgag tttcaacagc      60
taacaaaatg gtgaacttta ccgtcgatca ggtccgcgag ctgatggact atccggacca     120
gatccggaac atgtccgtga ttgctcacgt cgaccacggc aagtcgacgc tgtccgactc     180
tctcgttggt gctgccggca tcatcaagat ggaggaggct ggcgataagc ggatcatgga     240
tacacgcgcg gatgagatcg cgcgtggtat cacgatcaag tccaccgcca tctccatgca     300
ctaccacgtg ccgaaggaga tgatcggcga tctggatgac gacaagcgcg acttcctgat     360
caacctgatc gactcccccg gacacgtcga cttcagctcc gaggtgactg ccgctcttcg     420
tgtgacggac ggcgcgctgg tcgtggtgga ctgcgtggag ggcgtgtgcg tgcagacgga     480
gacggtgctg cgccaggcgc tgacggagcg catccgccct gttgtgttca tcaacaaggt     540
ggaccgcgcc atccttgagc tccaactgga ccccgaggag gcgtaccagg gcttcgtgaa     600
gacgctgcag aacgtgaacg tggtggttgc cacgtacaat gaccccagca tgggcgacgt     660
gcaggtgtcc cccgagaagg gcactgtggc gatcggctct ggcctgcagg cgtgggcgtt     720
ctcgctgacc cgctttgcga acatgtatgc ggcgaagttc ggcgtggacg agctgaagat     780
gcgcgagcgc ctgtggggcg acaacttctt tgacgcgaag aacaagaagt ggatcaagca     840
ggagacgaac gccgatggcg agcgcgtgcg ccgcgcgttc tgccagttct gcctagaccc     900
catctaccag atcttcgacg ctgtgatgaa cgagaagaag gacaaggtgg acaagatgct     960
caagtcgctg cacgtgacgc tgacggctga ggagcgcgag caggtgccga agaagcttct    1020
gaagacggtg atgatgaagt tcctgccggc tgctgagacg ctgctacaga tgatcgtggc    1080
gcacctgccg tcgcccaaga aggcgcaggc gtaccgtgcg gagatgctgt actctggcga    1140
ggcgtcgccg gaggacaagt acttcatggg tatcaagaac tgcgaccccg ctgcgccgct    1200
catgctgtac atcagcaaga tggtgccgac ggccgaccgc ggccgcttct tcgcctttgg    1260
ccgcatcttc tccggtaagg tgcgcagcgg ccagaaggtg cgcatcatgg gtaacaacta    1320
cgtctacggc aagaagcagg acctgtacga ggacaagcct gtgcagcgct ccgtgctgat    1380
gatgggccgc taccaggagg ccgtggagga catgccgtgc ggtaacgtgg tgggccttgt    1440
gggcgtggac aagtacatcg tgaagtccgc gacgatcacg gacgatggcg agagcccgca    1500
cccgctgcgc gacatgaagt actctgtgtc gcccgtcgtg cgtgtggccg tggaggcgaa    1560
gaacccgtcc gacctgccga agcttgtgga gggcctgaag cgccttgcca agtccgaccc    1620
gctggtggtg tgcagcattg aggagtctgg cgagcacatt gttgccggcg ctggcgagct    1680
tcaccttgag atttgcctga aggatctcca ggaggacttc atgaacggcg cgccgctnaa    1740
gatctccgag ccggtggtgt cgttccgcga gacggtgacg gatgtgtcgt cgcagcagtg    1800
cctgtcgaag tctgcgaaca agcacaaccg tctcttctgc cgcggtgcgc cgctnacaga    1860
gganctggcg ctggcgatng angaaggcac cgctggtccc gangcgga                 1908
```

<210> 110
<211> 845
<212> PRT
<213> Leishmania major

<220>
<221> VARIANTE
<222> (1)...(845)
<223> Xaa = Cualquier aminoácido

<400> 110

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

Val Pro Lys Glu Met Ile Gly Asp Leu Asp Asp Lys Arg Asp Phe
85 90 95
Leu Ile Asn Leu Ile Asp Ser Pro Gly His Val Asp Phe Ser Ser Glu
100 105 110
Val Thr Ala Ala Leu Arg Val Thr Asp Gly Ala Leu Val Val Val Asp
115 120 125
Cys Val Glu Gly Val Cys Val Gln Thr Glu Thr Val Leu Arg Gln Ala
130 135 140
Leu Thr Glu Arg Ile Arg Pro Val Val Phe Ile Asn Lys Val Asp Arg
145 150 155 160
Ala Ile Leu Glu Leu Gln Leu Asp Pro Glu Glu Ala Tyr Gln Gly Phe
165 170 175
Val Lys Thr Leu Gln Asn Val Asn Val Val Val Ala Thr Tyr Asn Asp
180 185 190
Pro Ser Met Gly Asp Val Gln Val Ser Pro Glu Lys Gly Thr Val Ala
195 200 205
Ile Gly Ser Gly Leu Gln Ala Trp Ala Phe Ser Leu Thr Arg Phe Ala
210 215 220
Asn Met Tyr Ala Ala Lys Phe Gly Val Asp Glu Leu Lys Met Arg Glu
225 230 235 240
Arg Leu Trp Gly Asp Asn Phe Phe Asp Ala Lys Asn Lys Lys Trp Ile
245 250 255
Lys Gln Glu Thr Asn Ala Asp Gly Glu Arg Val Arg Arg Ala Phe Cys
260 265 270
Gln Phe Cys Leu Asp Pro Ile Tyr Gln Ile Phe Asp Ala Val Met Asn
275 280 285
Glu Lys Lys Asp Lys Val Asp Lys Met Leu Lys Ser Leu His Val Thr
290 295 300
Leu Thr Ala Glu Glu Arg Glu Gln Val Pro Xaa Lys Leu Leu Lys Thr
305 310 315 320
Val Met Met Xaa Phe Leu Pro Ala Ala Glu Thr Leu Leu Gln Met Ile
325 330 335
Val Ala His Leu Pro Ser Pro Lys Lys Ala Gln Ala Tyr Arg Ala Glu
340 345 350
Met Leu Tyr Ser Gly Glu Ala Ser Pro Glu Asp Lys Tyr Phe Met Gly
355 360 365
Ile Lys Asn Cys Asp Pro Ala Ala Pro Leu Met Leu Tyr Ile Ser Lys
370 375 380
Met Val Pro Thr Ala Asp Arg Gly Arg Phe Phe Ala Phe Gly Arg Ile
385 390 395 400
Phe Ser Gly Lys Val Arg Ser Gly Gln Lys Val Arg Ile Met Gly Asn
405 410 415
Asn Tyr Val Tyr Gly Lys Lys Gln Asp Leu Tyr Glu Asp Lys Pro Val
420 425 430
Gln Arg Ser Val Leu Met Met Gly Arg Tyr Gln Glu Ala Val Glu Asp
435 440 445
Met Pro Cys Gly Asn Val Val Gly Leu Val Gly Val Asp Lys Tyr Ile
450 455 460
Val Lys Ser Ala Thr Ile Thr Asp Asp Gly Glu Ser Pro His Pro Leu
465 470 475 480
Arg Asp Met Lys Tyr Ser Val Ser Pro Val Val Arg Val Ala Val Glu
485 490 495
Ala Lys Asn Pro Ser Asp Leu Pro Lys Leu Val Glu Gly Leu Lys Arg
500 505 510
Leu Ala Lys Ser Asp Pro Leu Val Val Cys Ser Ile Glu Glu Ser Gly
515 520 525
Glu His Ile Val Ala Gly Ala Gly Glu Leu His Leu Glu Ile Cys Leu
530 535 540

```
Lys Asp Leu Gln Glu Asp Phe Met Asn Gly Ala Pro Leu Lys Ile Ser
545                 550                 555                 560
Glu Pro Val Val Ser Phe Arg Glu Thr Val Thr Asp Val Ser Ser Gln
                565                 570                 575
Gln Cys Leu Ser Lys Ser Ala Asn Lys His Asn Arg Leu Phe Cys Arg
            580                 585                 590
Gly Ala Pro Leu Thr Glu Glu Leu Ala Leu Ala Met Glu Glu Gly Thr
        595                 600                 605
Ala Gly Pro Glu Ala Asp Pro Lys Val Arg Ala Arg Phe Leu Ala Asp
    610                 615                 620
Asn Tyr Glu Trp Asp Val Gln Glu Ala Arg Lys Ile Trp Cys Tyr Gly
625                 630                 635                 640
Pro Asp Asn Arg Gly Pro Asn Val Val Val Asp Val Thr Lys Gly Val
                645                 650                 655
Gln Asn Met Ala Glu Met Lys Asp Ser Phe Val Ala Ala Trp Gln Trp
            660                 665                 670
Ala Thr Arg Glu Gly Val Leu Cys Asp Glu Asn Met Arg Gly Val Arg
        675                 680                 685
Val Asn Val Glu Asp Val Thr Met His Ala Asp Ala Ile His Arg Gly
    690                 695                 700
Gly Val Gln Ile Ile Pro Thr Ala Arg Arg Val Phe Tyr Ala Cys Cys
705                 710                 715                 720
Leu Thr Ala Ser Pro Arg Leu Met Glu Pro Met Phe Val Val Asp Ile
                725                 730                 735
Gln Thr Val Glu His Ala Met Gly Gly Ile Tyr Gly Val Leu Thr Arg
            740                 745                 750
Arg Arg Gly Val Ile Ile Gly Glu Glu Asn Arg Pro Gly Thr Pro Ile
        755                 760                 765
Tyr Asn Val Arg Ala Tyr Leu Pro Val Ala Glu Ser Phe Gly Phe Thr
    770                 775                 780
Ala Asp Leu Arg Ala Gly Thr Gly Gly Gln Ala Phe Pro Gln Cys Val
785                 790                 795                 800
Phe Asp His Trp Gln Glu Tyr Pro Gly Asp Pro Leu Glu Pro Lys Ser
                805                 810                 815
Leu Ala Asn Thr Thr Thr Leu Gly Ile Arg Thr Arg Lys Gly Leu Lys
            820                 825                 830
Pro Asp Ile Pro Gly Leu Asp Gln Phe Met Asp Lys Leu
        835                 840                 845
```

<210> 111
<211> 997
<212> ADN
<213> Leishmania major

<400> 111

```
ggatccgccg ccaccatggt gaacgtgtgc gttgttggtg ctgccggcgg cattggccag      60
tcgctgtcgc tgctgttggt gcgccagctg ccgtacggga gcacgttgtc gctgttcgac     120
gttgtgggcg ctgcaggcgt cgcagcagac ctgtcgcatg tggacaacgc cggtgtgcag     180
gtgaagtttg cggagggcaa gatcggccat aagcgcgacc ctgcgctggc agagcttgcg     240
aagggcgtgg atgtgtttgt aatggtggct ggcgttccac gcaagccggg catgacgcgc     300
gacgaccttt tcaaaatcaa cgccggaatc atcctggacc ttgtgctgac gtgcgcgtcg     360
tcgagtccaa aggcggtgtt ctgcattgtg acgaaccctg tgaacagcac ggtcgcgatc     420
gcggcagagg cgctgaagag ccttggcgta tacgaccgaa accggctgct tggcgtgtcg     480
ctgctggacg ggctgcgcgc gacgtgcttc atcaacgagg cgcgcaagcc cttagtcgtg     540
tcgcaggtac cagttgttgg cgggcacagc gacacaacga ttgtgccgtt gttctaccag     600
ctaccggggc cgttgccgga gcaggcgacg ctggacaaga tcgtgaagcg cgtgcaggtc     660
```

```
gcaggcacag aagtggtgaa ggcgaaggcc gggcgcgggt ctgcgacgct gtcgatggcg     720
gaggctggcg cgcggttcgc gttgaaggtt gtggagggtc tgaccggcac gggtaacccg     780
ctggtgtacg catatgtaga cacagacggg cagcacgaga cgacgttcct cgcgatccct     840
gtggtgcttg gcatgaatgg aatcgagaag cgcctgccga ttggtccgct gcactcgacg     900
gaggaaacgc tgctgaaggc ggcactgccg gtgatcaaga agaatatcgt gaagggcagc     960
gagttcgcgc gctcacacct gtagcacctc agaattc                              997
```

<210> 112
<211> 322
<212> PRT
<213> Leishmania major

<400> 112

```
Met Val Asn Val Cys Val Val Gly Ala Ala Gly Gly Ile Gly Gln Ser
 1               5                  10                  15
Leu Ser Leu Leu Leu Val Arg Gln Leu Pro Tyr Gly Ser Thr Leu Ser
            20                  25                  30
Leu Phe Asp Val Val Gly Ala Ala Gly Val Ala Ala Asp Leu Ser His
        35                  40                  45
Val Asp Asn Ala Gly Val Gln Val Lys Phe Ala Glu Gly Lys Ile Gly
    50                  55                  60
His Lys Arg Asp Pro Ala Leu Ala Glu Leu Ala Lys Gly Val Asp Val
65                  70                  75                  80
Phe Val Met Val Ala Gly Val Pro Arg Lys Pro Gly Met Thr Arg Asp
                85                  90                  95
Asp Leu Phe Lys Ile Asn Ala Gly Ile Ile Leu Asp Leu Val Leu Thr
            100                 105                 110
Cys Ala Ser Ser Ser Pro Lys Ala Val Phe Cys Ile Val Thr Asn Pro
        115                 120                 125
Val Asn Ser Thr Val Ala Ile Ala Ala Glu Ala Leu Lys Ser Leu Gly
    130                 135                 140
Val Tyr Asp Arg Asn Arg Leu Leu Gly Val Ser Leu Leu Asp Gly Leu
145                 150                 155                 160
Arg Ala Thr Cys Phe Ile Asn Glu Ala Arg Lys Pro Leu Val Val Ser
                165                 170                 175
Gln Val Pro Val Val Gly Gly His Ser Asp Thr Thr Ile Val Pro Leu
            180                 185                 190
Phe Tyr Gln Leu Pro Gly Pro Leu Pro Glu Gln Ala Thr Leu Asp Lys
        195                 200                 205
Ile Val Lys Arg Val Gln Val Ala Gly Thr Glu Val Val Lys Ala Lys
    210                 215                 220
Ala Gly Arg Gly Ser Ala Thr Leu Ser Met Ala Glu Ala Gly Ala Arg
225                 230                 235                 240
Phe Ala Leu Lys Val Val Glu Gly Leu Thr Gly Thr Gly Asn Pro Leu
                245                 250                 255
Val Tyr Ala Tyr Val Asp Thr Asp Gly Gln His Glu Thr Thr Phe Leu
            260                 265                 270
Ala Ile Pro Val Val Leu Gly Met Asn Gly Ile Glu Lys Arg Leu Pro
        275                 280                 285
Ile Gly Pro Leu His Ser Thr Glu Glu Thr Leu Leu Lys Ala Ala Leu
    290                 295                 300
Pro Val Ile Lys Lys Asn Ile Val Lys Gly Ser Glu Phe Ala Arg Ser
305                 310                 315                 320
His Leu
```

REIVINDICACIONES

1. Una proteína de fusión que comprende:

(i) un polipéptido que comprende un antígeno de *Leishmania* que consiste en la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 2, una porción inmunogénica de dicho antígeno capaz de generar al menos 25% de la respuesta generada por dicho antígeno en un modelo de secreción de interferón gamma, interleuquina 2, factor de necrosis tumoral alfa o interleuquina 12, o una variante de dicho antígeno que tiene una identidad de al menos 90% con el SEQ ID NO: 2; y

(ii) un polipéptido que comprende un antígeno de *Leishmania* que consiste en la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 24, una porción inmunogénica de dicho antígeno capaz de generar al menos 25% de la respuesta generada por dicho antígeno en un modelo de secreción de interferón gamma, interleuquina 2, factor de necrosis tumoral alfa o interleuquina 12, o una variante de dicho antígeno que tiene una identidad de al menos 90% con el SEQ ID NO: 24.

2. Una proteína de fusión de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende:

(i) una porción inmunogénica de un antígeno de *Leishmania* que consiste en el SEQ ID NO: 2, capaz de generar al menos 50% de la respuesta generada por dicho antígeno en un modelo de secreción de interferón gamma, interleuquina 2, factor de necrosis tumoral alfa o interleuquina 12; y

(ii) una porción inmunogénica de un antígeno de *Leishmania* que consiste en el SEQ ID NO: 24, capaz de generar al menos 50% de la respuesta generada por dicho antígeno en un modelo de secreción de interferón gamma, interleuquina 2, factor de necrosis tumoral alfa o interleuquina 12.

3. Una proteína de fusión de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende una secuencia de polipéptidos que tiene una identidad de al menos 90% con la secuencia de aminoácidos codificada por el SEQ ID NO: 101.

4. Una proteína de fusión de acuerdo con la reivindicación 3, que consiste en una secuencia de polipéptidos que tiene una identidad de al menos 90% con la secuencia de aminoácidos codificada por el SEQ ID NO: 101.

5. Una proteína de fusión de acuerdo con la reivindicación 3, que comprende el polipéptido codificado por el SEQ ID NO: 101.

6. Una proteína de fusión de acuerdo con la reivindicación 5, que consiste en el polipéptido codificado por el SEQ ID NO: 101.

7. Una proteína de fusión de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende una secuencia de polipéptidos que tiene una identidad de al menos 90% con el SEQ ID NO: 95.

8. Una proteína de fusión de acuerdo con la reivindicación 7, que consiste en una secuencia de polipéptidos que tiene una identidad de al menos 90% con el SEQ ID NO: 95.

9. Una proteína de fusión de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende una secuencia de polipéptidos que tiene una identidad de al menos 90% con el SEQ ID NO: 96.

10. Una proteína de fusión de acuerdo con la reivindicación 9, que consiste en una secuencia de polipéptidos que tiene una identidad de al menos 90% con el SEQ ID NO: 96.

11. Una proteína de fusión de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende una secuencia de polipéptidos que tiene una identidad de al menos 90% con el SEQ ID NO: 97.

12. Una proteína de fusión de acuerdo con la reivindicación 11, que consiste en una secuencia de polipéptidos que tiene una identidad de al menos 90% con el SEQ ID NO: 97.

13. Una proteína de fusión de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende adicionalmente un polipéptido que comprende un antígeno de *Leishmania* que consiste en la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 6, una porción inmunogénica de dicho antígeno capaz de generar al menos 25% de la respuesta generada por dicho antígeno en un modelo de secreción de interferón gamma, interleuquina 2, factor de necrosis tumoral alfa o interleuquina 12, o una variante de dicho antígeno que tiene una identidad de al menos 90% con el SEQ ID NO: 6.

14. Una proteína de fusión de acuerdo con la reivindicación 13, que comprende una porción inmunogénica de un antígeno de *Leishmania* que consiste en el SEQ ID NO: 6 capaz de generar al menos 50% de la respuesta generada por dicho antígeno en un modelo de secreción de interferón gamma, interleuquina 2, factor de necrosis tumoral alfa o interleuquina 12.

15. Una proteína de fusión de acuerdo con la reivindicación 1, 13 o 14, que comprende adicionalmente un polipéptido que comprende un antígeno de *Leishmania* que consiste en la secuencia de aminoácidos del SEQ ID

NO: 10, una porción inmunogénica de dicho antígeno capaz de generar al menos 25% de la respuesta generada por dicho antígeno en un modelo de secreción de interferón gamma, interleuquina 2, factor de necrosis tumoral alfa o interleuquina 12, o una variante de dicho antígeno que tiene una identidad de al menos 90% con el SEQ ID NO: 10.

16. Una proteína de fusión de acuerdo con la reivindicación 15, que comprende una porción inmunogénica de un antígeno de *Leishmania* que consiste en el SEQ ID NO: 10 capaz de generar al menos 50% de la respuesta generada por dicho antígeno en un modelo de secreción de interferón gamma, interleuquina 2, factor de necrosis tumoral alfa o interleuquina 12.

17. Un polinucleótido que codifica una proteína de fusión de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16.

18. Un vector de expresión recombinante que comprende un polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 17.

19. Una composición farmacéutica que comprende una proteína de fusión de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, y un portador fisiológicamente aceptable.

20. Una composición farmacéutica que comprende un polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 17, y un portador fisiológicamente aceptable.

21. Una composición inmunogénica que comprende la proteína de fusión de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16 y un inmunoestimulador.

22. Una composición inmunogénica que comprende el polinucleótido de la reivindicación 17 y un inmunoestimulador.

23. La composición de la reivindicación 21 o 22, donde el inmunoestimulador se selecciona del grupo que consiste en: aminoalquilglucosaminido-4-fosfatos; monofosforil lípido A; y monofosforil lípido A 3-des-O-acilado.

24. Una composición inmunogénica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 21 a 23, que comprende adicionalmente un vehículo de liberación.

25. La composición inmunogénica de la reivindicación 24, donde el vehículo de liberación es una microesfera biodegradable.

26. La composición farmacéutica de la reivindicación 19 o 20, para su uso en un método para inducir inmunidad protectora contra la leishmaniasis en un paciente.

27. La composición inmunogénica de una cualquiera de las reivindicaciones 21 a 25, para su uso en un método para inducir inmunidad protectora contra la leishmaniasis en un paciente.

28. La composición farmacéutica de la reivindicación 19 o 20, para su uso en un método para detectar la infección por *Leishmania* en un paciente, comprendiendo el método las etapas de:

a) poner en contacto células dérmicas del paciente con la composición farmacéutica; y

b) detectar una respuesta inmunitaria en la piel del paciente.

29. La composición farmacéutica de la reivindicación 28, donde la respuesta inmunitaria es el endurecimiento.

30. Un kit de diagnóstico que comprende:

a) una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 19; y

b) un aparato suficiente para poner en contacto las células dérmicas de un paciente con la composición farmacéutica.

31. Una vacuna que comprende:

a) una proteína de fusión de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16; o

b) el polinucleótido de la reivindicación 17; o

c) un vector de expresión recombinante de acuerdo con la reivindicación 18; y

d) un coadyuvante.

32. La vacuna de la reivindicación 31, para su uso en la inducción de inmunidad protectora contra la leishmaniasis en un paciente.

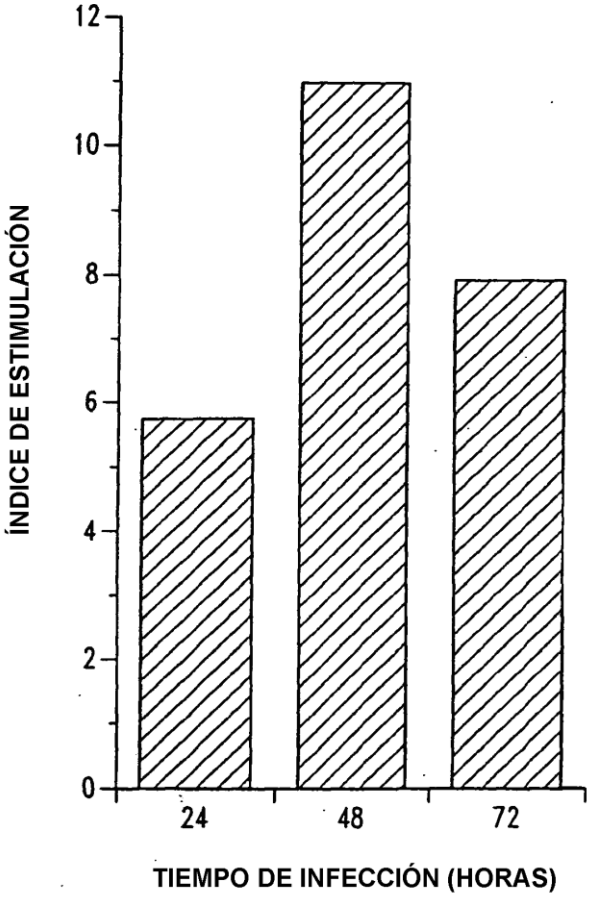

12
10
8
6
4
2
0
ÍNDICE DE ESTIMULACIÓN
24
48
72
TIEMPO DE INFECCIÓN (HORAS)

Fig. 1

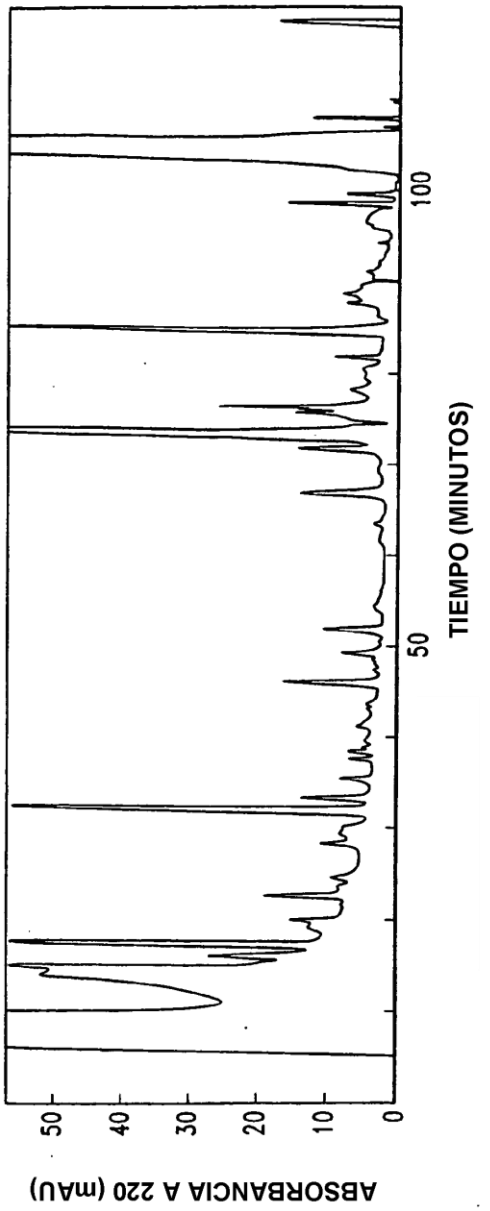

ABSORBANCIA A 220 (mAU)
0
10
20
30
40
50
50
100
TIEMPO (MINUTOS)

Fig. 2A

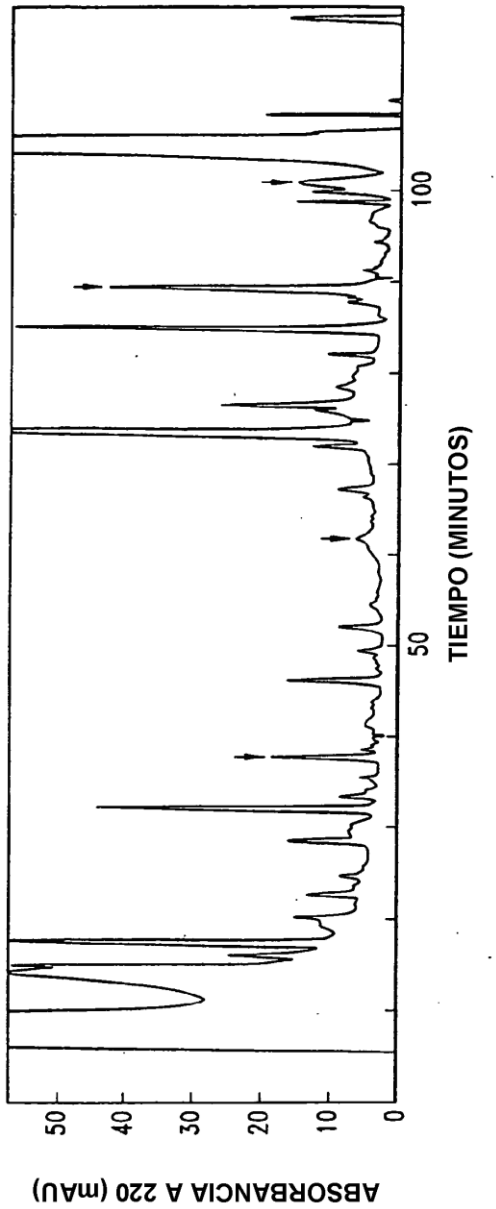

ABSORBANCIA A 220 (mAU)
0
10
20
30
40
50
50
100
TIEMPO (MINUTOS)

Fig. 2B

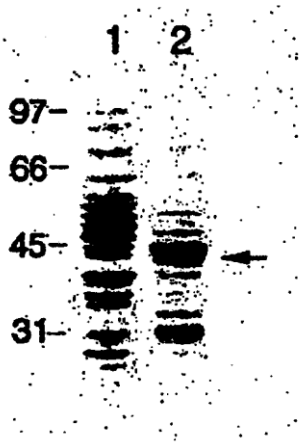


Fig. 3A

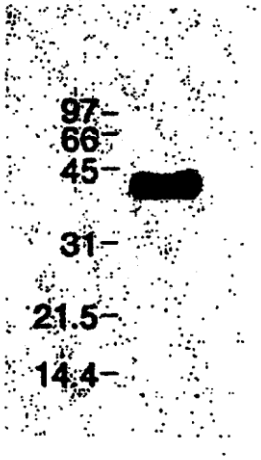


Fig. 3B

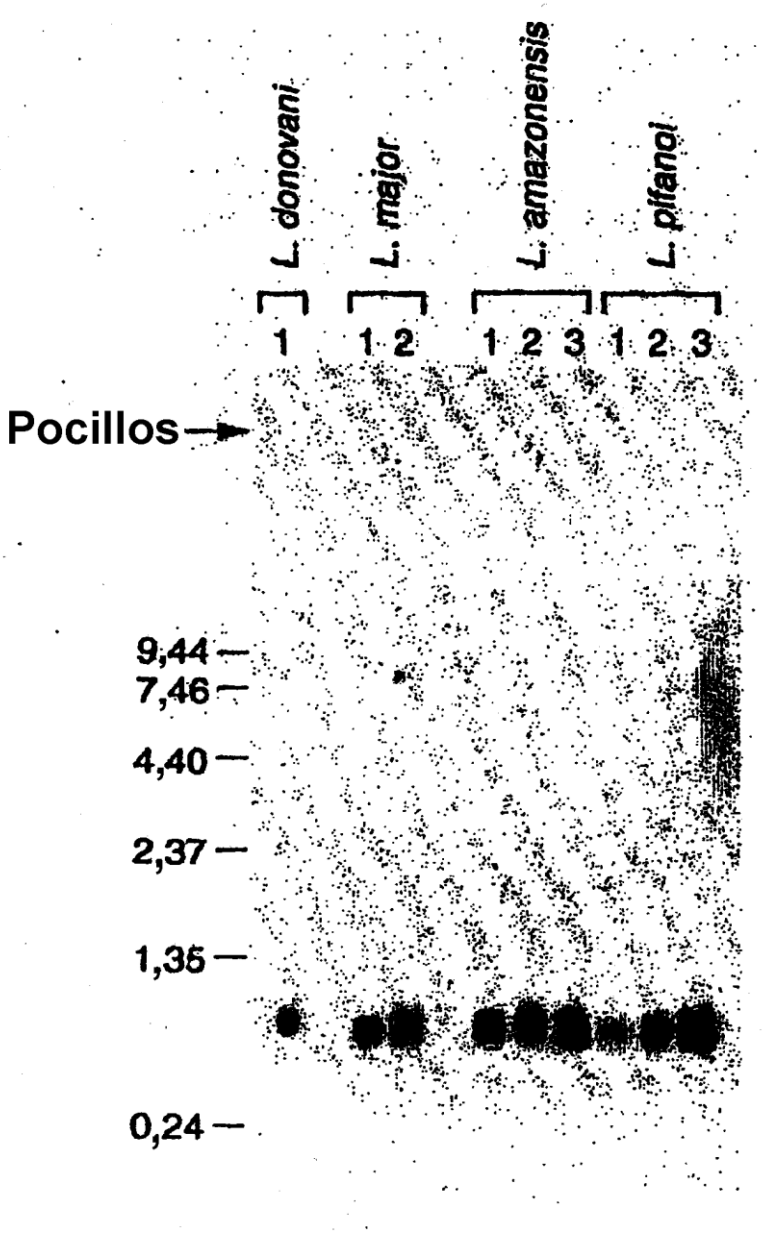

L. donovani
L. major
L. amazonensis
L. pifanoi
1
1 2
1 2 3
1 2 3
Pocillos
9,44
7,46
4,40
2,37
1,35
0,24

Fig. 4



Fig. 5A



Fig. 5B

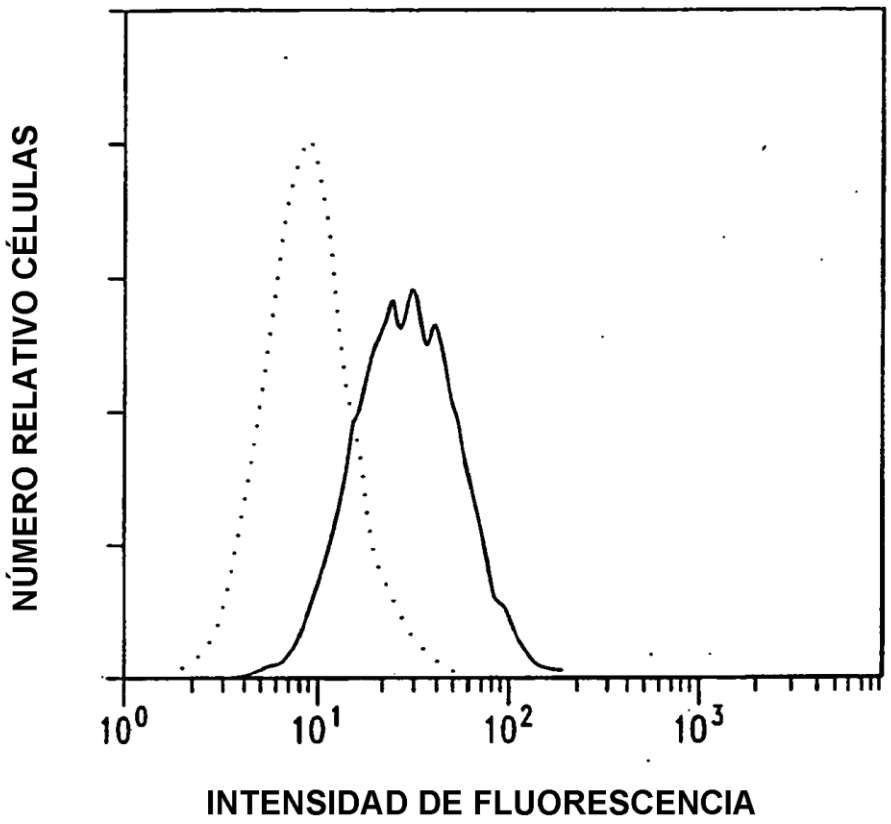

NÚMERO RELATIVO CÉLULAS
10^0
10^1
10^2
10^3
INTENSIDAD DE FLUORESCENCIA

Fig. 6

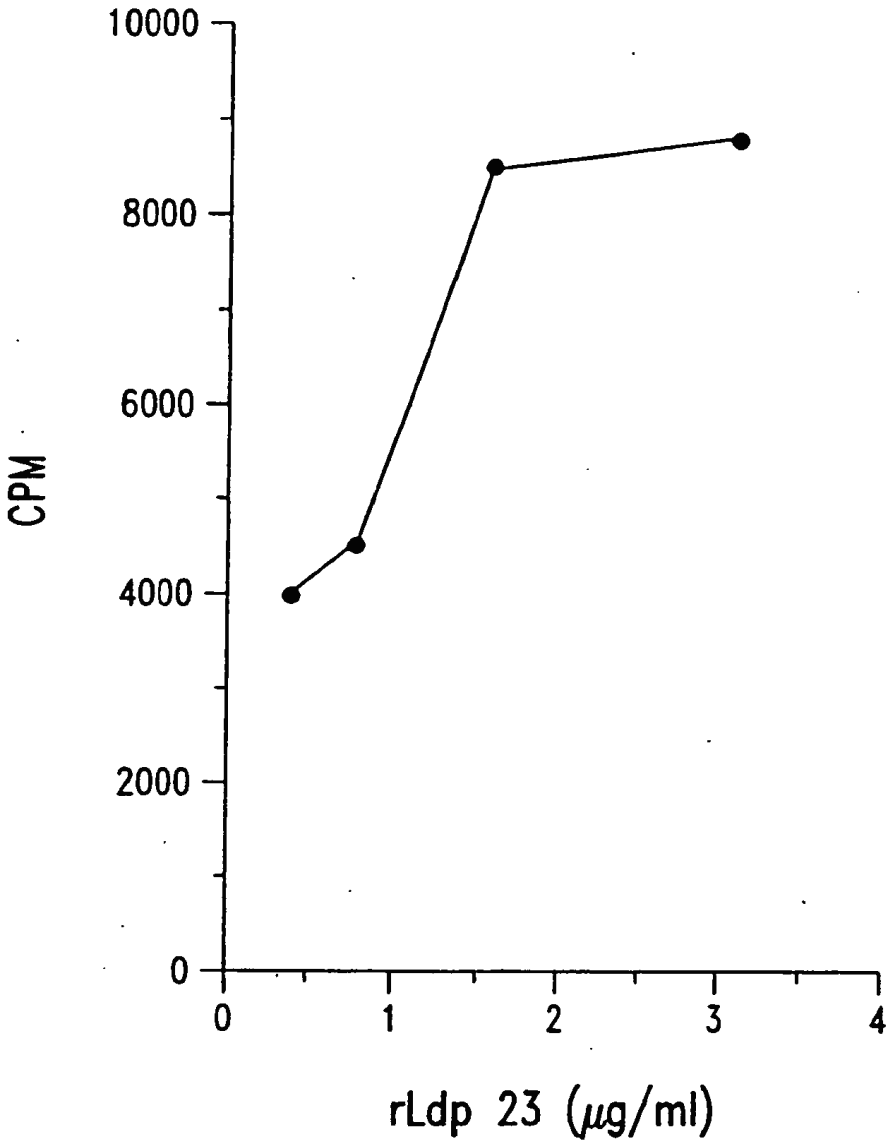


Fig. 7

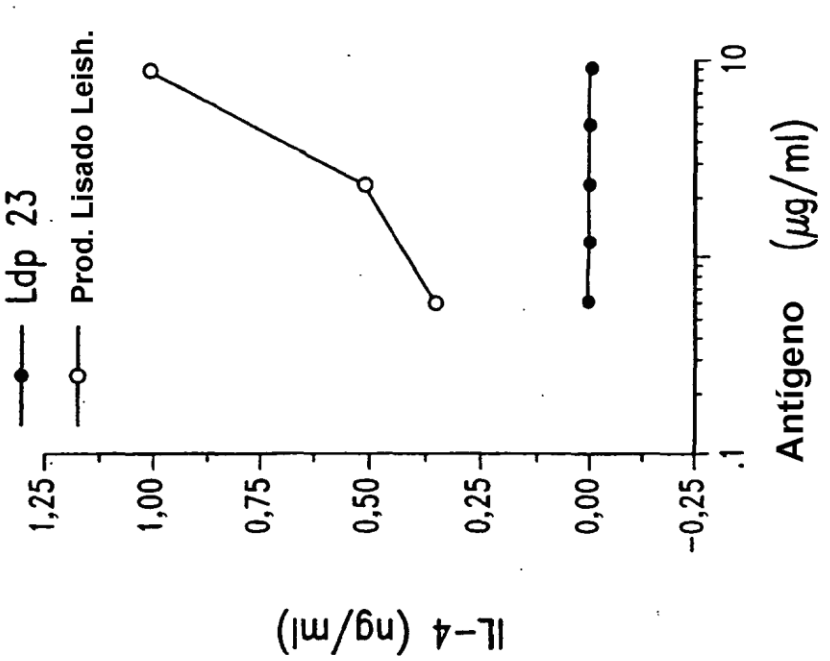

Ldp 23
Prod. Lisado Leish.
1,25
1,00
0,75
0,50
0,25
0,00
-0,25
IL-4 (ng/ml)
.1
10
Antígeno (µg/ml)

Fig. 8B

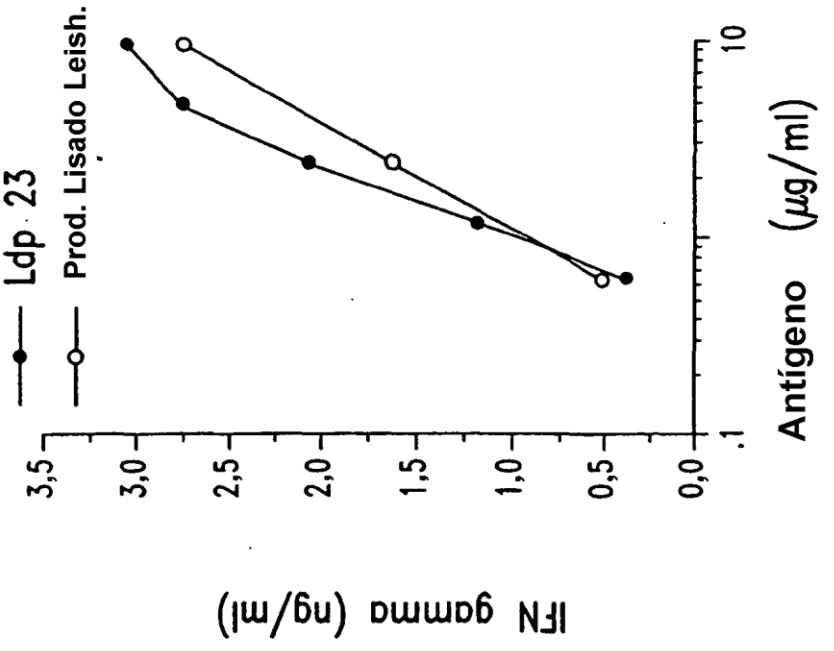

Ldp 23
Prod. Lisado Leish.
3,5
3,0
2,5
2,0
1,5
1,0
0,5
0,0
IFN gamma (ng/ml)
.1
10
Antígeno (µg/ml)

Fig. 8A

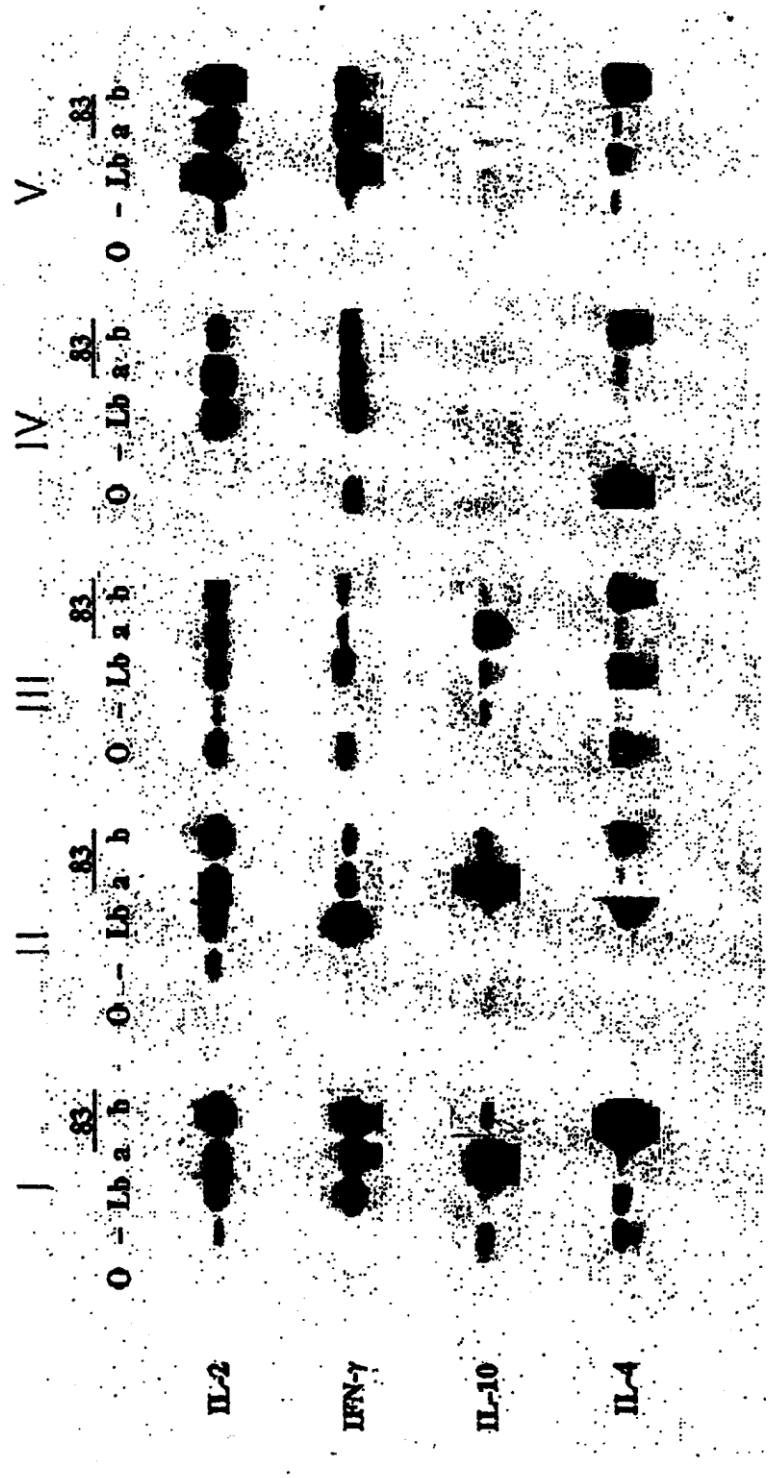


Fig. 9A

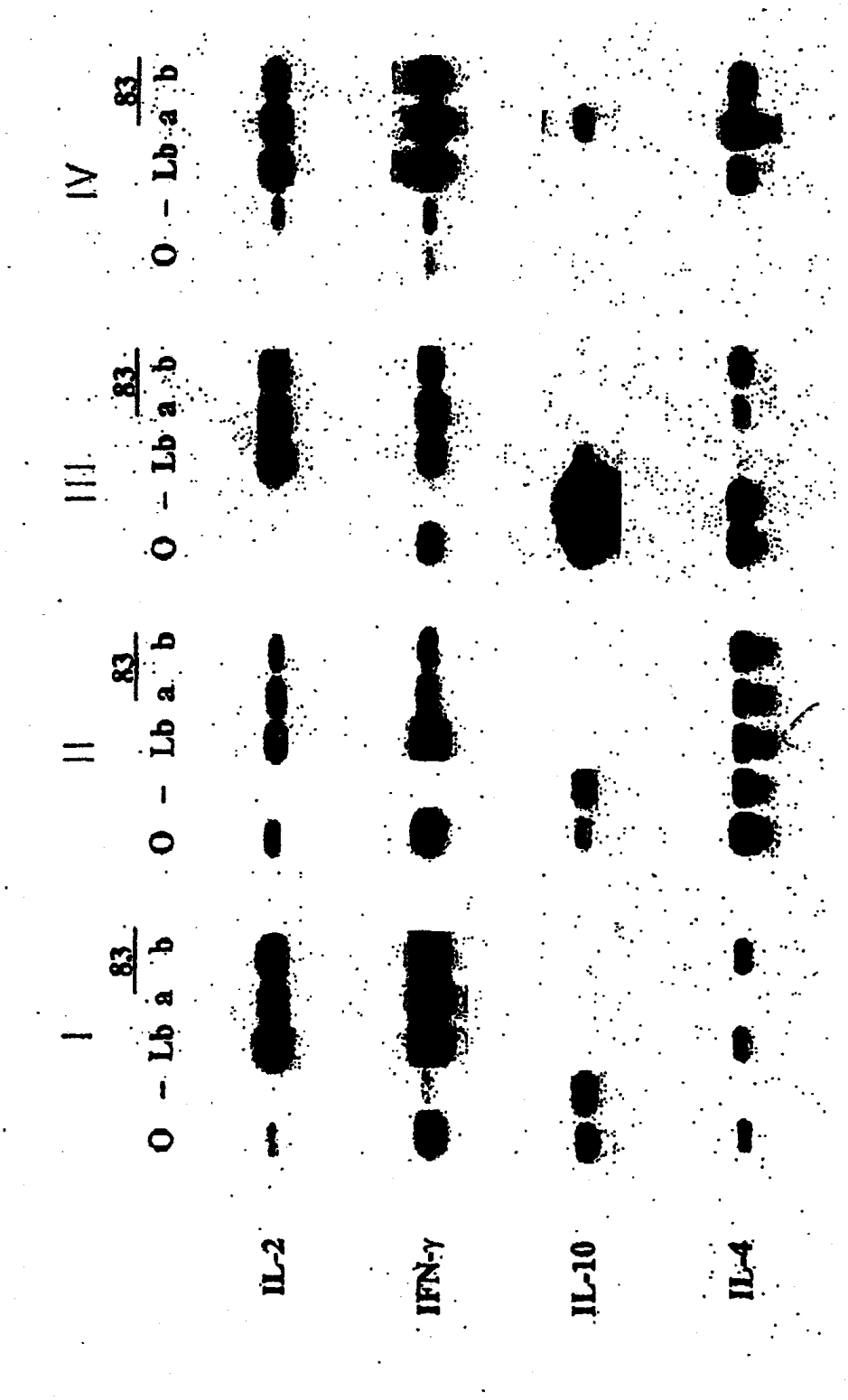


Fig. 9B

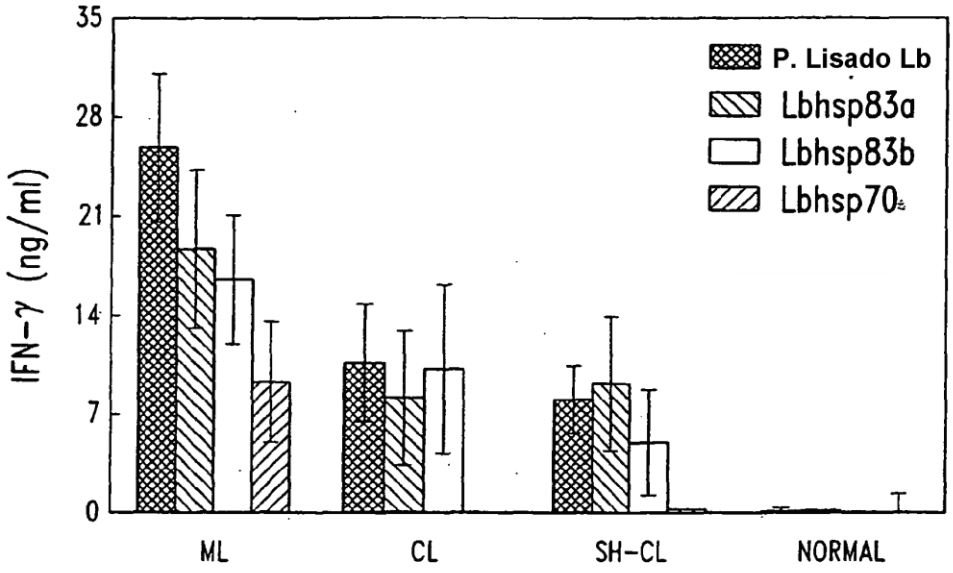


Fig. 10A

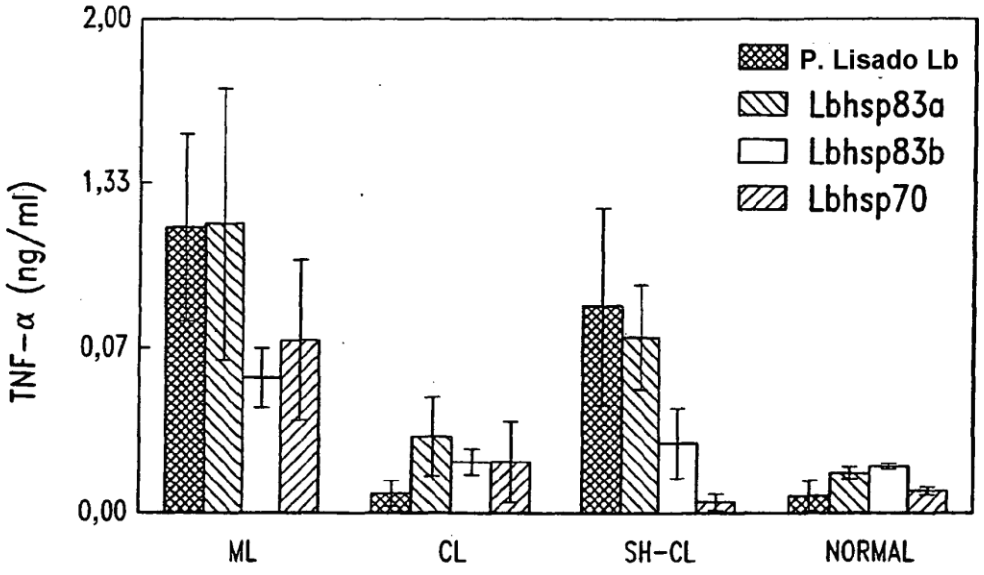


Fig. 10B

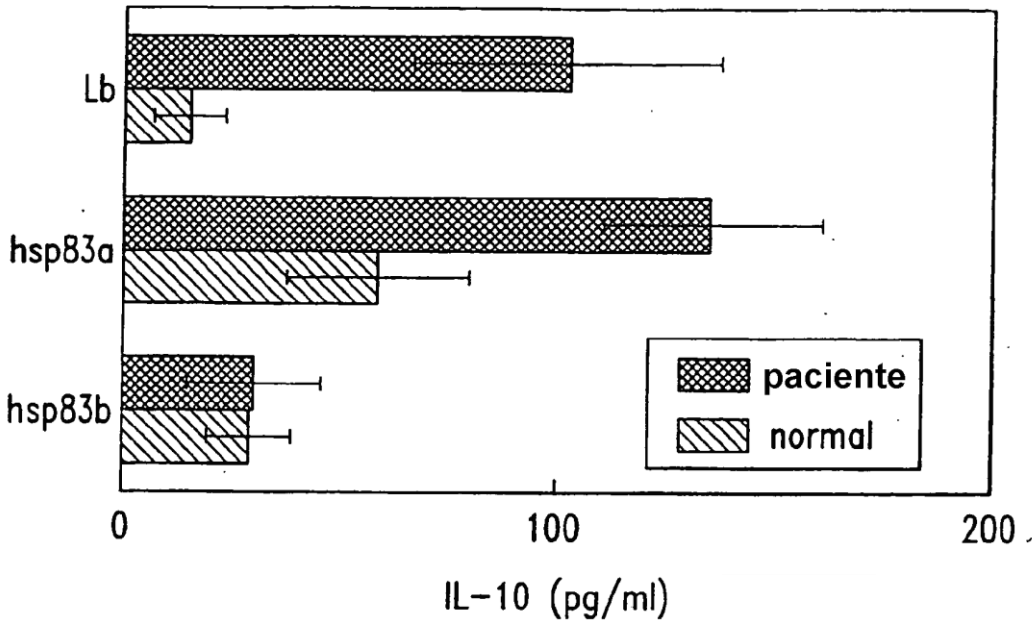

Lb
hsp83a
hsp83b
paciente
normal
0
100
200
IL-10 (pg/ml)

Fig. 11

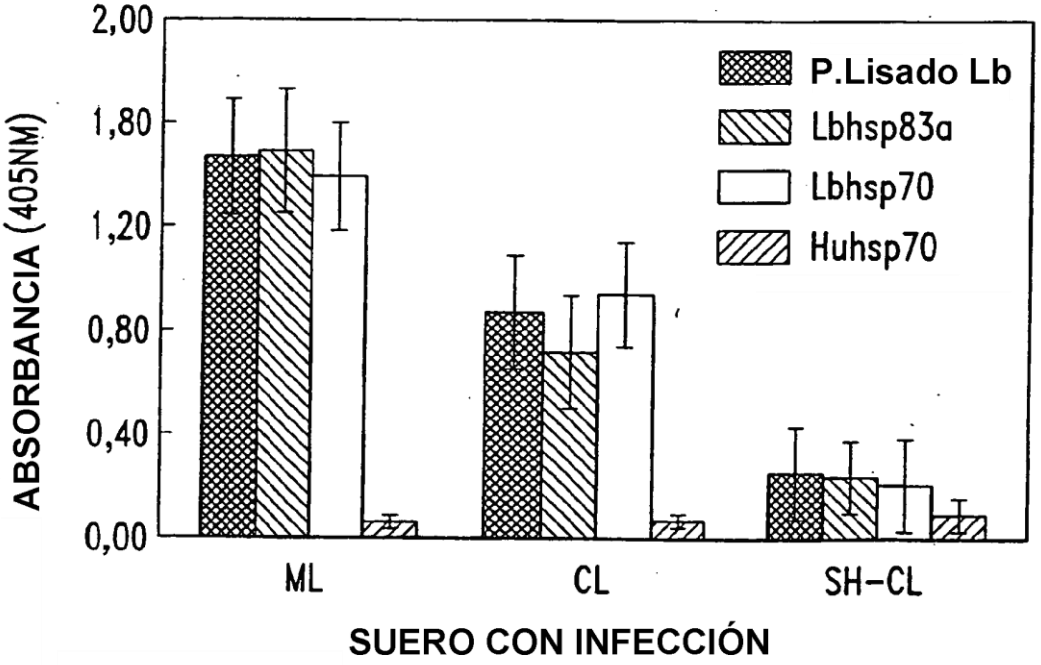

2,00
1,80
1,20
0,80
0,40
0,00
ABSORBANCIA (405NM)
P.Lisado Lb
Lbhsp83a
Lbhsp70
Huhsp70
ML
CL
SH-CL
SUERO CON INFECCIÓN

Fig. 12

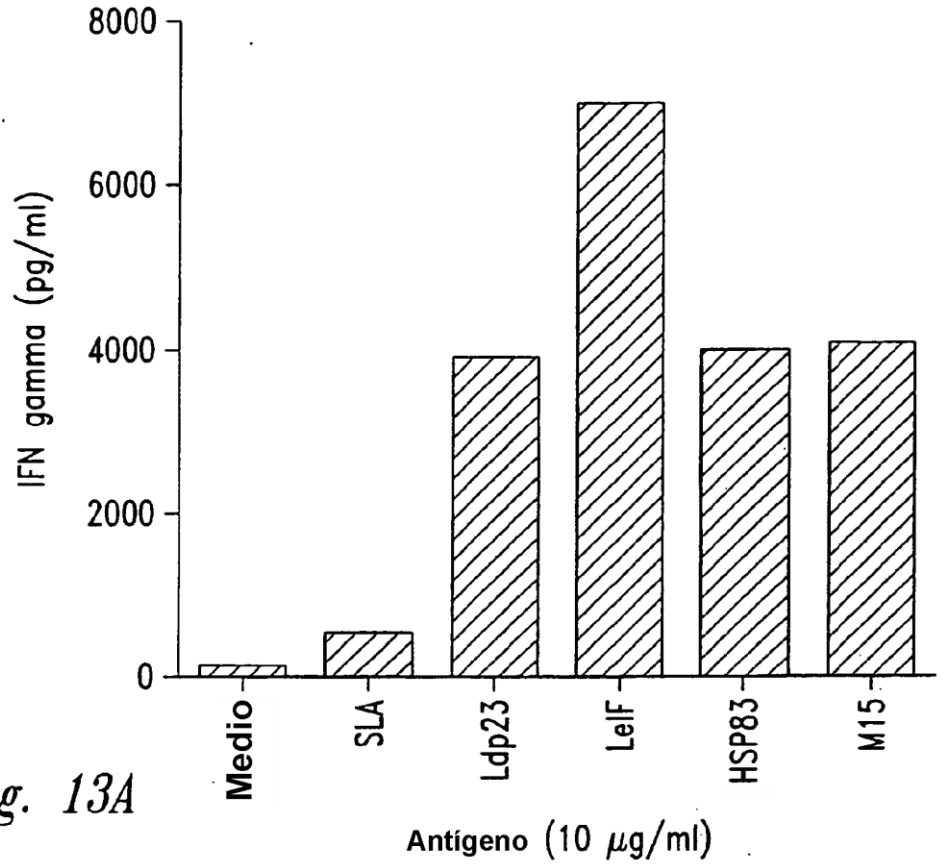


Fig. 13A

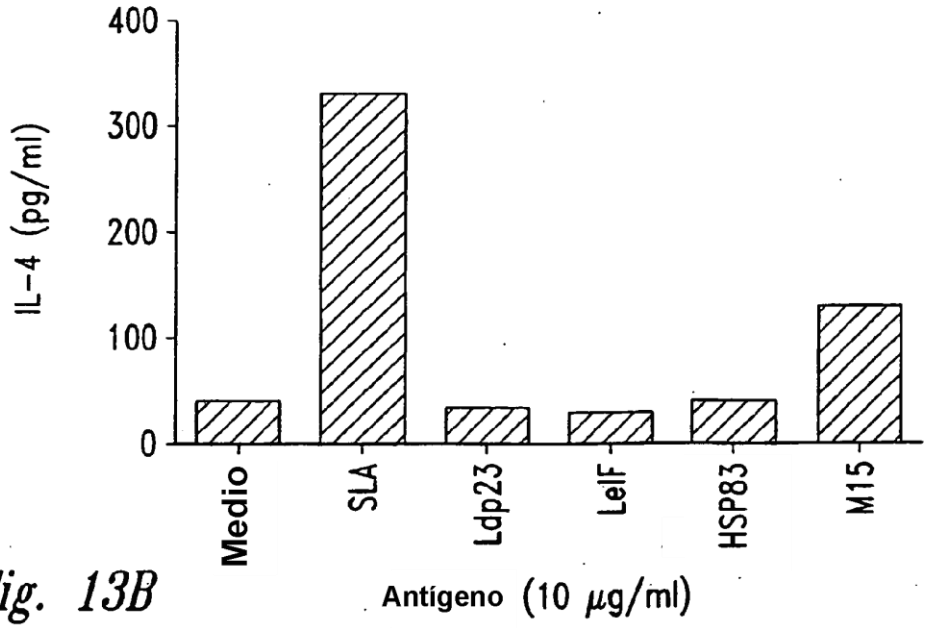


Fig. 13B

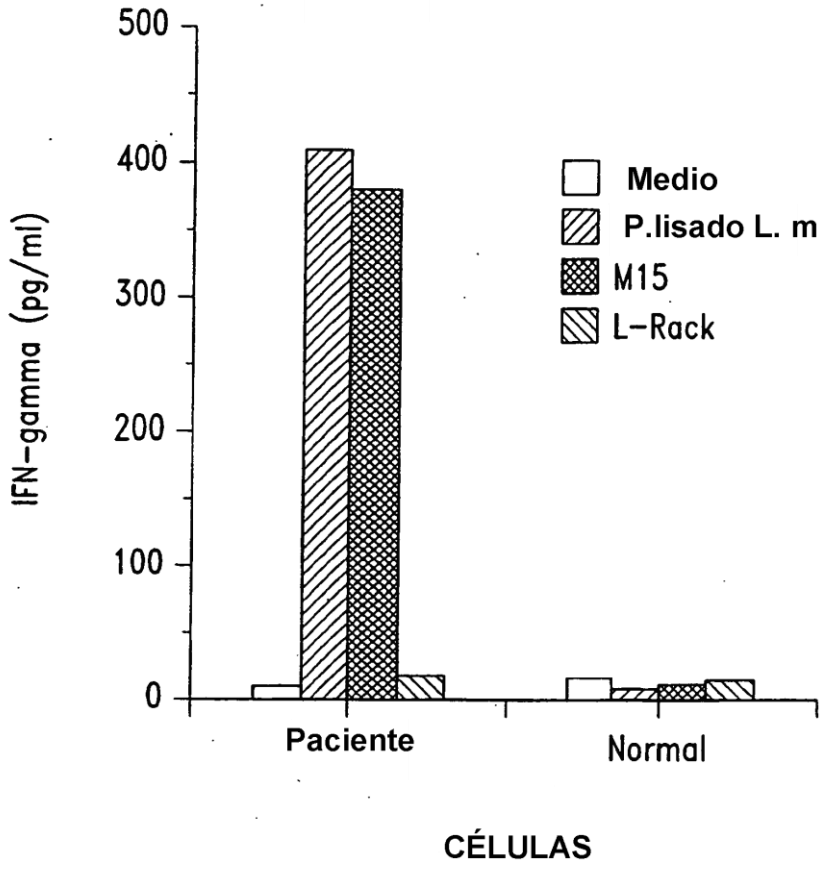

500
400
300
200
100
0
IFN-gamma (pg/ml)
Medio
P.lisado L. m
M15
L-Rack
Paciente
Normal
CÉLULAS

Fig. 14

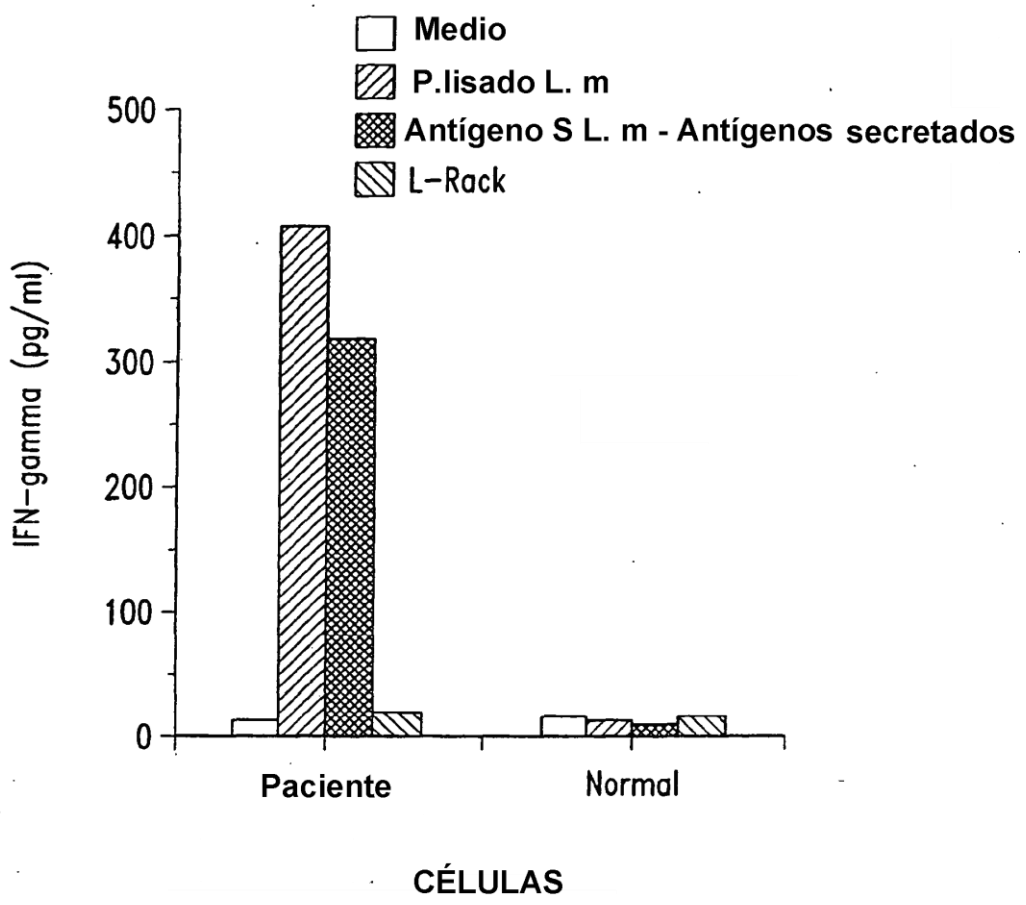

Medio
P.lisado L. m
Antígeno S L. m - Antígenos secretados
L-Rack
500
400
300
200
100
0
IFN-gamma (pg/ml)
Paciente
Normal
CÉLULAS

Fig. 15

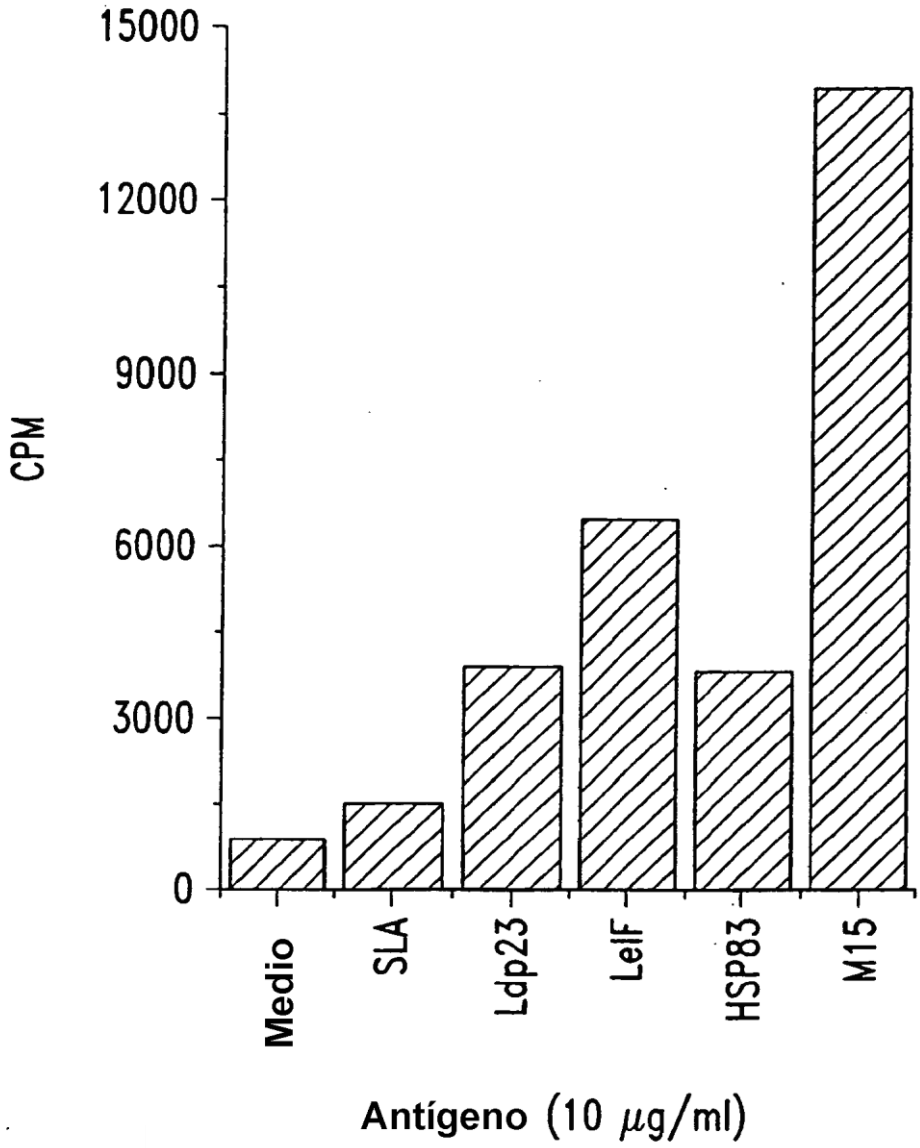

15000
12000
9000
6000
3000
0
CPM
Medio
SLA
Ldp23
LelF
HSP83
M15
Antígeno (10 μg/ml)

Fig. 16

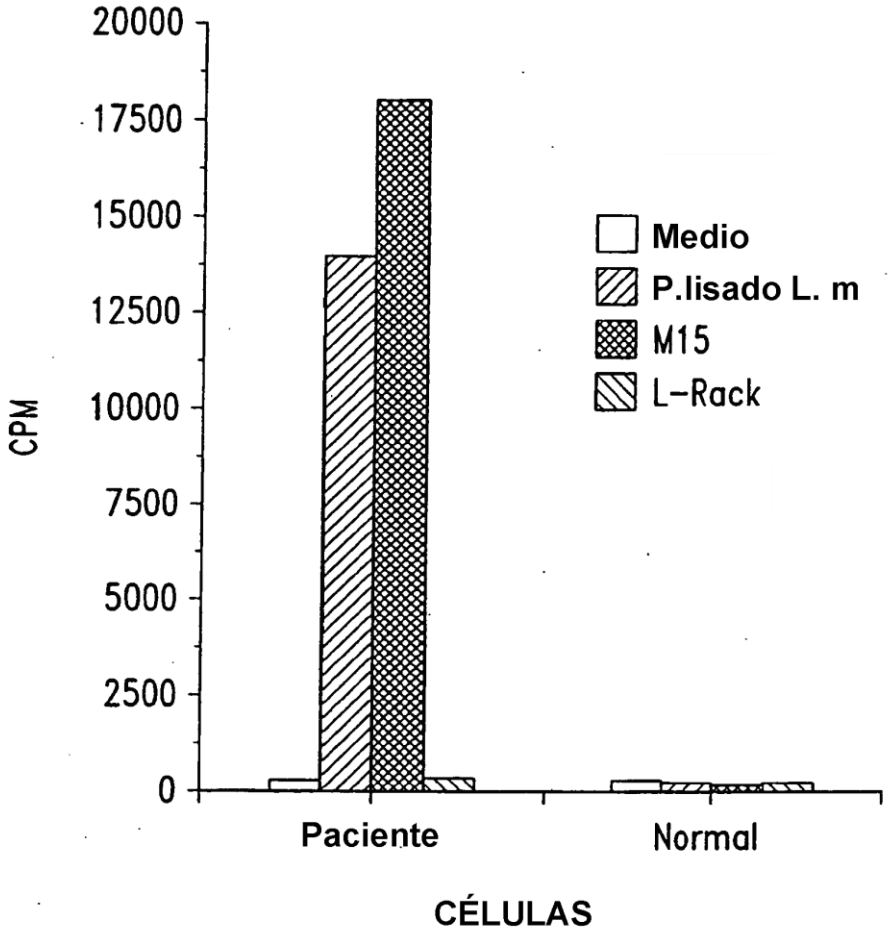

20000
17500
15000
12500
10000
7500
5000
2500
0
CPM
Medio
P.lisado L. m
M15
L-Rack
Paciente
Normal
CÉLULAS

Fig. 17

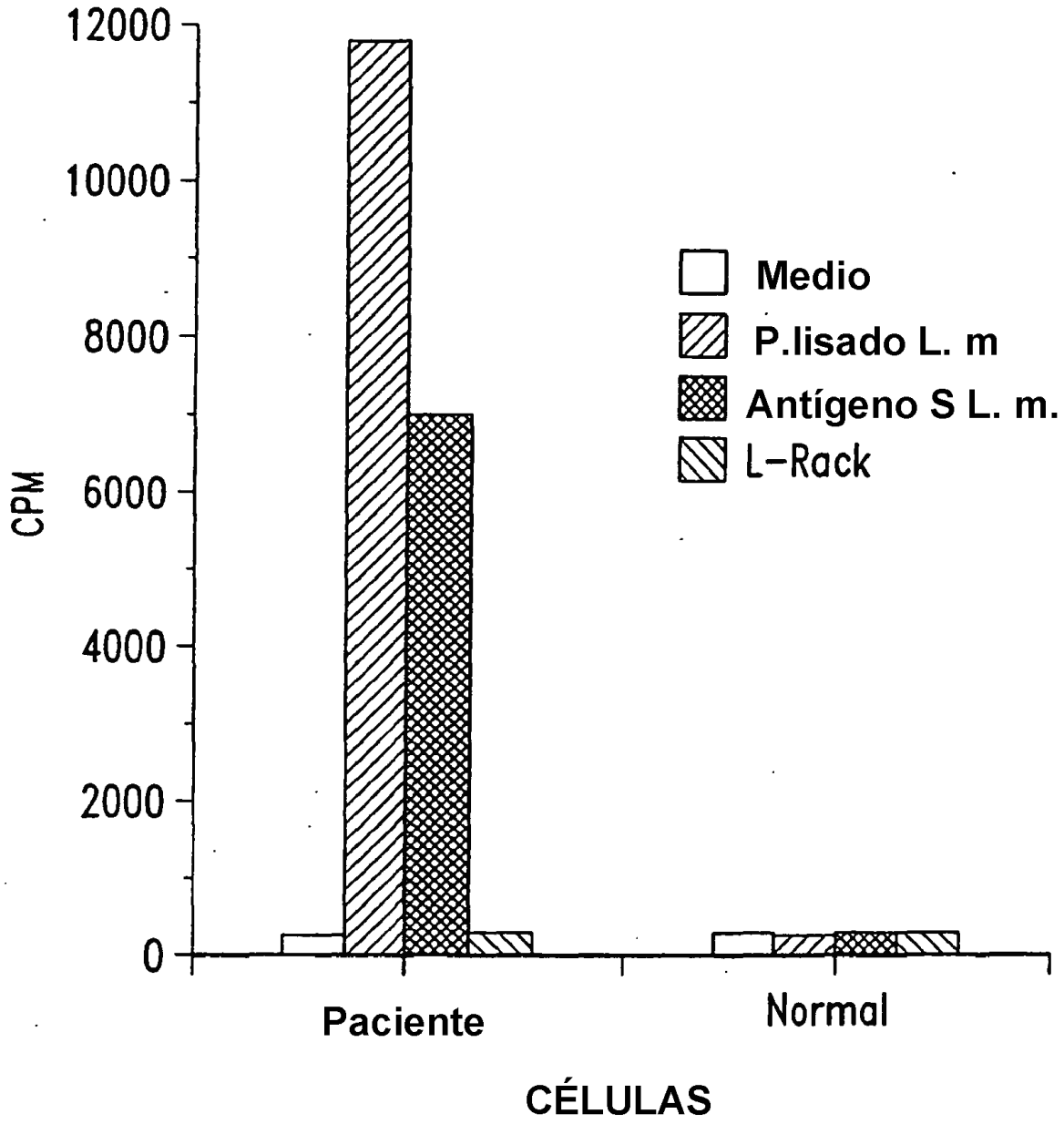

12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
CPM
Medio
P.lisado L. m
Antígeno S L. m.
L-Rack
Paciente
Normal
CÉLULAS

Fig. 18

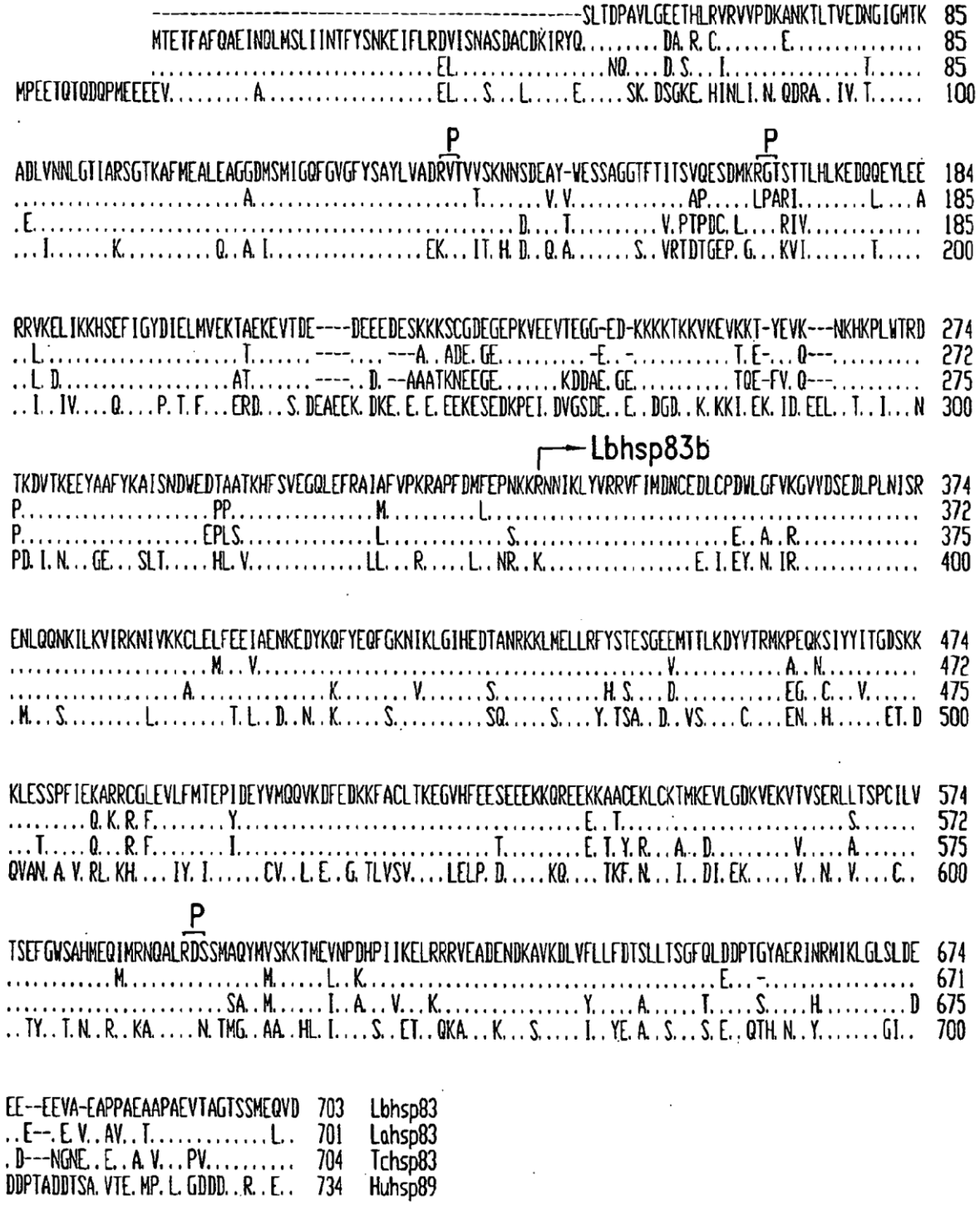


Fig. 19

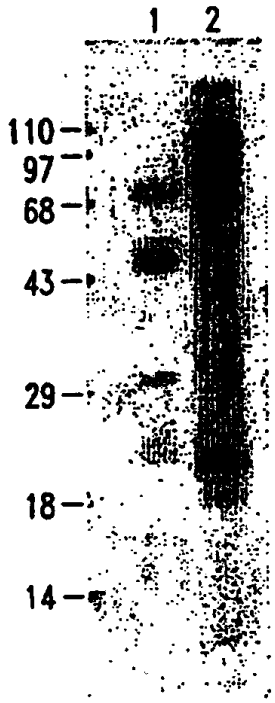


Fig. 20

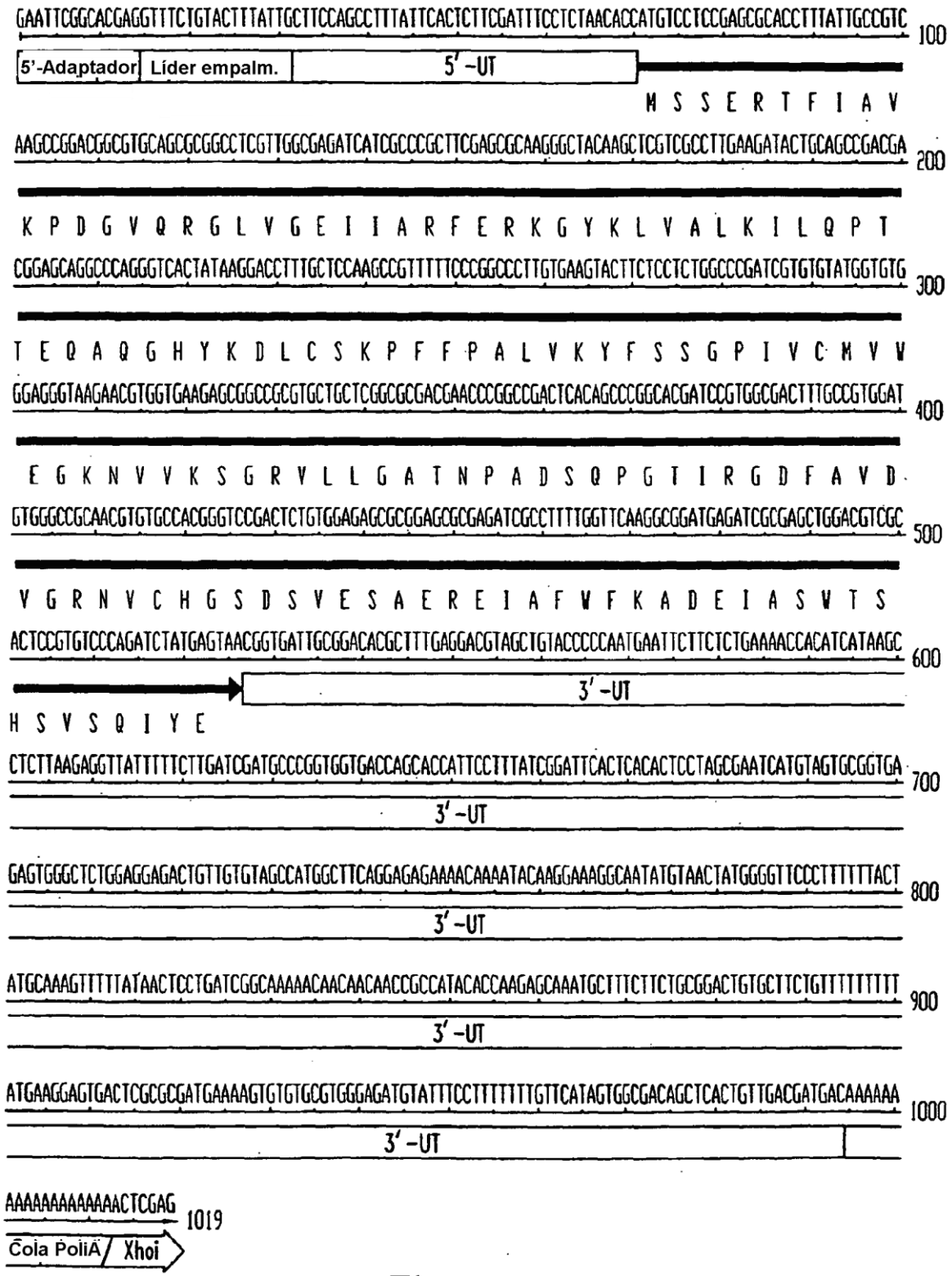

GAATTCGGCACGAGGTTTCTGTACTTTATTGCTTCCAGCCTTTATTCACTCTTCGATTTCCTCTAACACCATGTCCTCCGAGCGCACCTTTATTGCCGTC
100
5'-Adaptador
Líder empalm.
5'-UT
M S S E R T F I A V
AAGCCGGACGGCGTGCAGCGCGGCCTCGTTGGCGAGATCATCGCCCGCTTCGAGCGCAAGGGCTACAAGCTCGTCGCCTTGAAGATACTGCAGCCGACGA
200
K P D G V Q R G L V G E I I A R F E R K G Y K L V A L K I L Q P T
CGGAGCAGGCCCAGGGTCACTATAAGGACCTTTGCTCCAAGCCGTTTTTCCCGGCCCTTGTGAAGTACTTCTCCTCTGGCCCGATCGTGTGTATGGTGTG
300
T E Q A Q G H Y K D L C S K P F F P A L V K Y F S S G P I V C M V V
GGAGGGTAAGAACGTGGTGAAGAGCGGCCGCGTGCTGCTCGGCGCGACGAACCCGGCCGACTCACAGCCCGGCACGATCCGTGGCGACTTTGCCGTGGAT
400
E G K N V V K S G R V L L G A T N P A D S Q P G T I R G D F A V D
GTGGGCCGCAACGTGTGCCACGGGTCCGACTCTGTGGAGAGCGCGGAGCGCGAGATCGCCTTTTGGTTCAAGGCGGATGAGATCGCGAGCTGGACGTCGC
500
V G R N V C H G S D S V E S A E R E I A F W F K A D E I A S V T S
ACTCCGTGTCCCAGATCTATGAGTAACGGTGATTGCGGACACGCTTTGAGGACGTAGCTGTACCCCCAATGAATTCTTCTCTGAAAACCACATCATAAGC
600
3'-UT
H S V S Q I Y E
CTCTTAAGAGGTTATTTTTCTTGATCGATGCCCGGTGGTGACCAGCACCATTCCTTTATCGGATTCACTCACACTCCTAGCGAATCATGTAGTGCGGTGA
700
3'-UT
GAGTGGGCTCTGGAGGAGACTGTTGTGTAGCCATGGCTTCAGGAGAGAAAACAAAATACAAGGAAAGGCAATATGTAACTATGGGGTTCCCTTTTTTACT
800
3'-UT
ATGCAAAGTTTTTATAACTCCTGATCGGCAAAAACAACAACAACCGCCATACACCAAGAGCAAATGCTTTCTTCTGCGGACTGTGCTTCTGTTTTTTTTT
900
3'-UT
ATGAAGGAGTGACTCGCGCGATGAAAAGTGTGTGCGTGGGAGATGTATTTCCTTTTTTTGTTCATAGTGGCGACAGCTCACTGTTGACGATGACAAAAAA
1000
3'-UT
AAAAAAAAAAAACTCGAG
1019
Cola PoliA
XhoI

Fig. 21

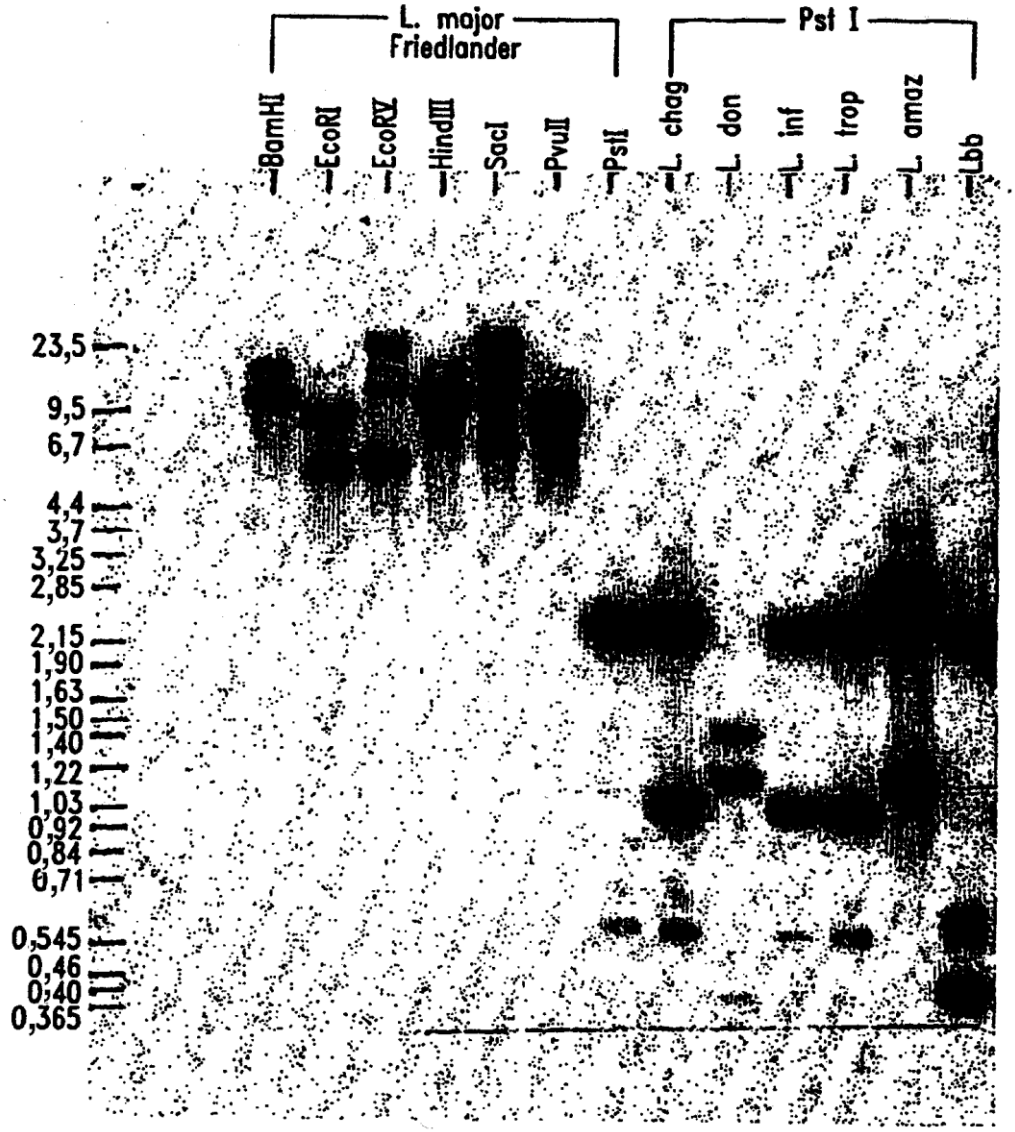

L. major Friedlander
Pst I
BamHI
EcoRI
EcoRV
HindIII
SacI
PvuII
PstI
L. chag
L. don
L. inf
L. trop
L. amaz
Lbb
23,5
9,5
6,7
4,4
3,7
3,25
2,85
2,15
1,90
1,63
1,50
1,40
1,22
1,03
0,92
0,84
6,71
0,545
0,46
0,40
0,365

Fig. 22

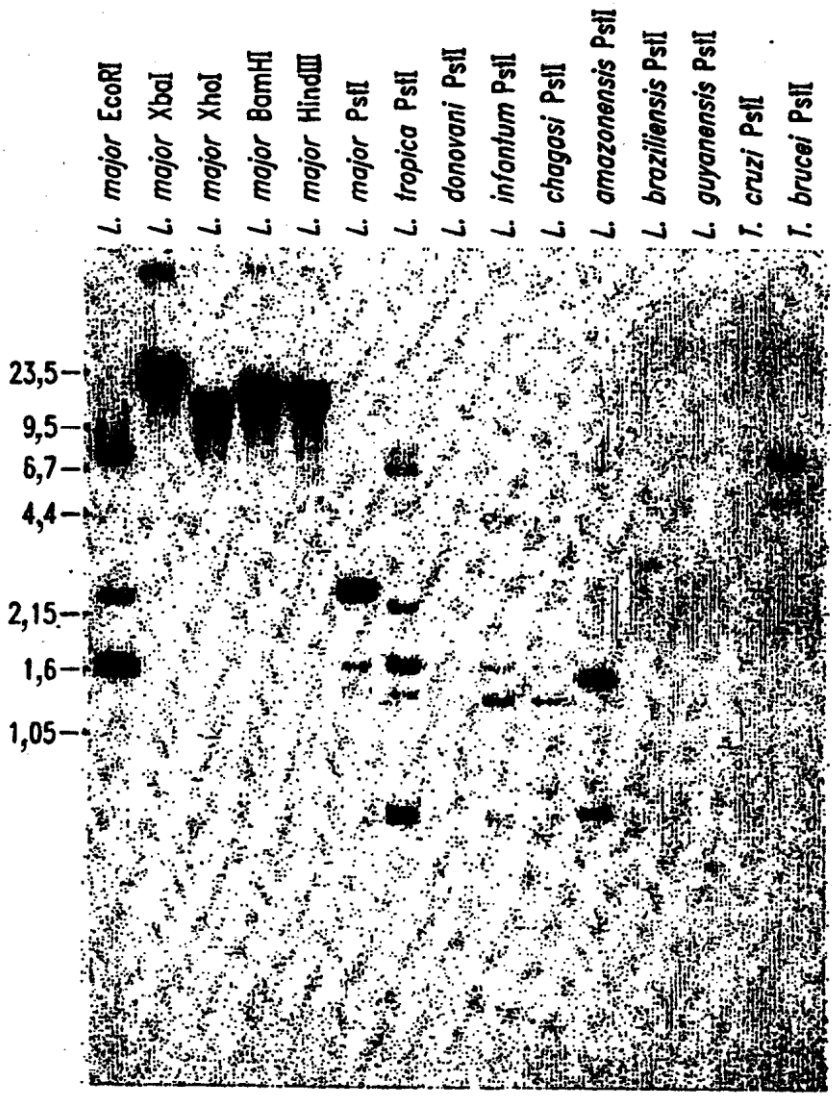

L. major EcoRI
L. major XbaI
L. major XhoI
L. major BamHI
L. major HindIII
L. major PstI
L. tropica PstI
L. donovani PstI
L. infantum PstI
L. chagasi PstI
L. amazonensis PstI
L. braziliensis PstI
L. guyanensis PstI
T. cruzi PstI
T. brucei PstI
23,5
9,5
6,7
4,4
2,15
1,6
1,05

Fig. 23

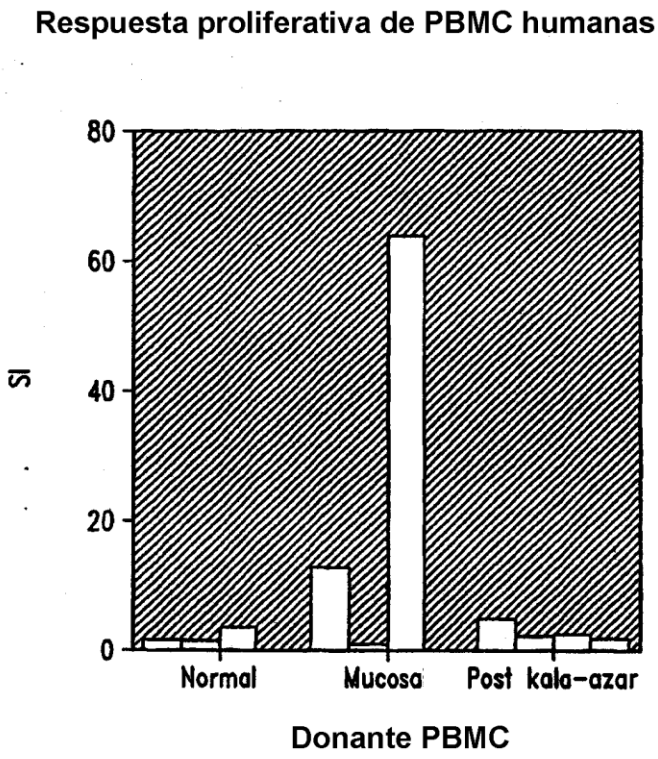

Respuesta proliferativa de PBMC humanas a MAPS
SI
80
60
40
20
0
Normal
Mucosa
Post kala-azar
Donante PBMC

Fig. 24

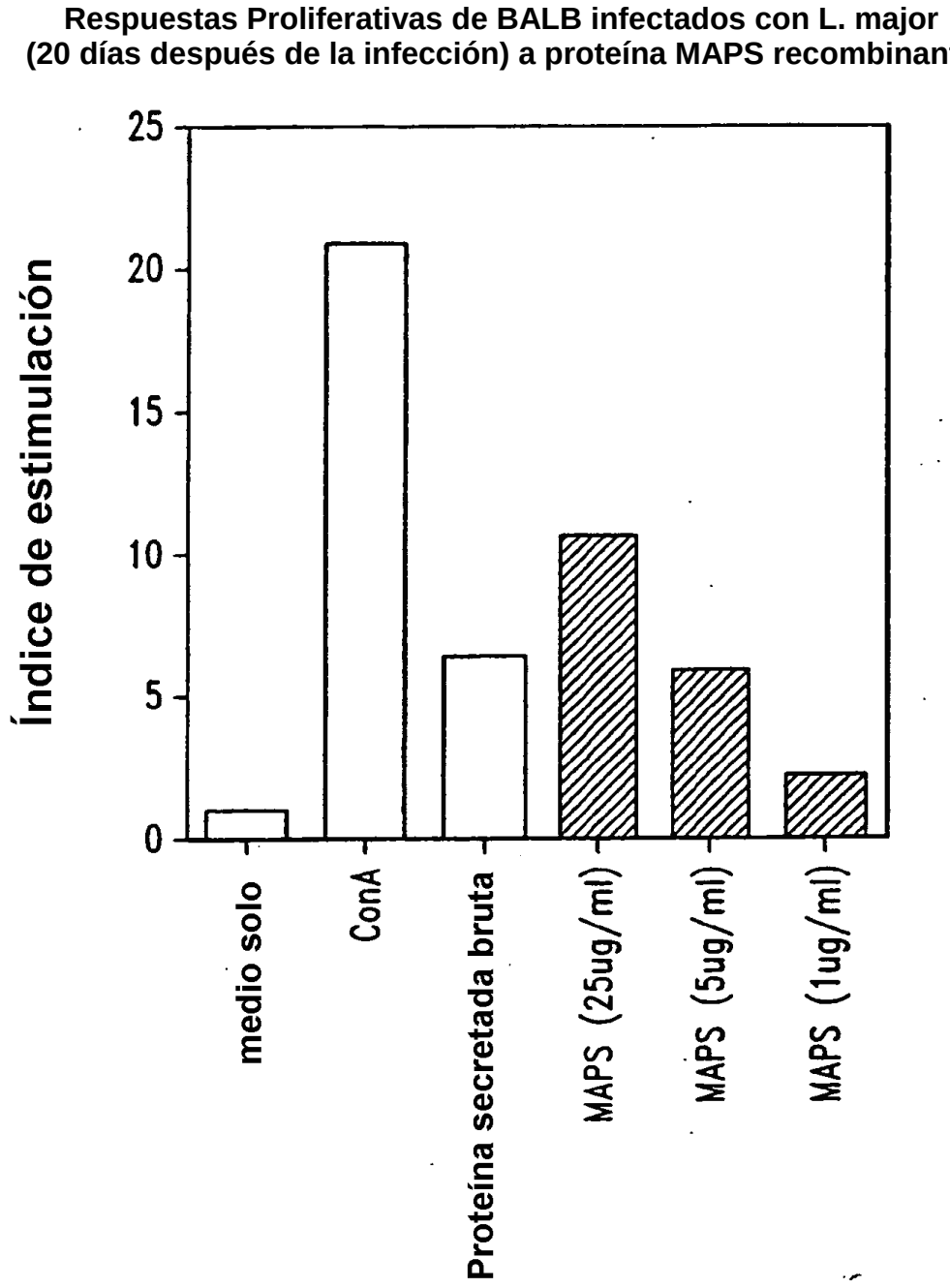

Respuestas Proliferativas de BALB infectados con L. major
(20 días después de la infección) a proteína MAPS recombinante
Índice de estimulación
25
20
15
10
5
0
medio solo
ConA
Proteína secretada bruta
MAPS (25ug/ml)
MAPS (5ug/ml)
MAPS (1ug/ml)

Fig. 25

Análisis ELISA de suero de pacientes humanos de leishmaniasis con título de anticuerpos específicos de MAPS (8/27/96)

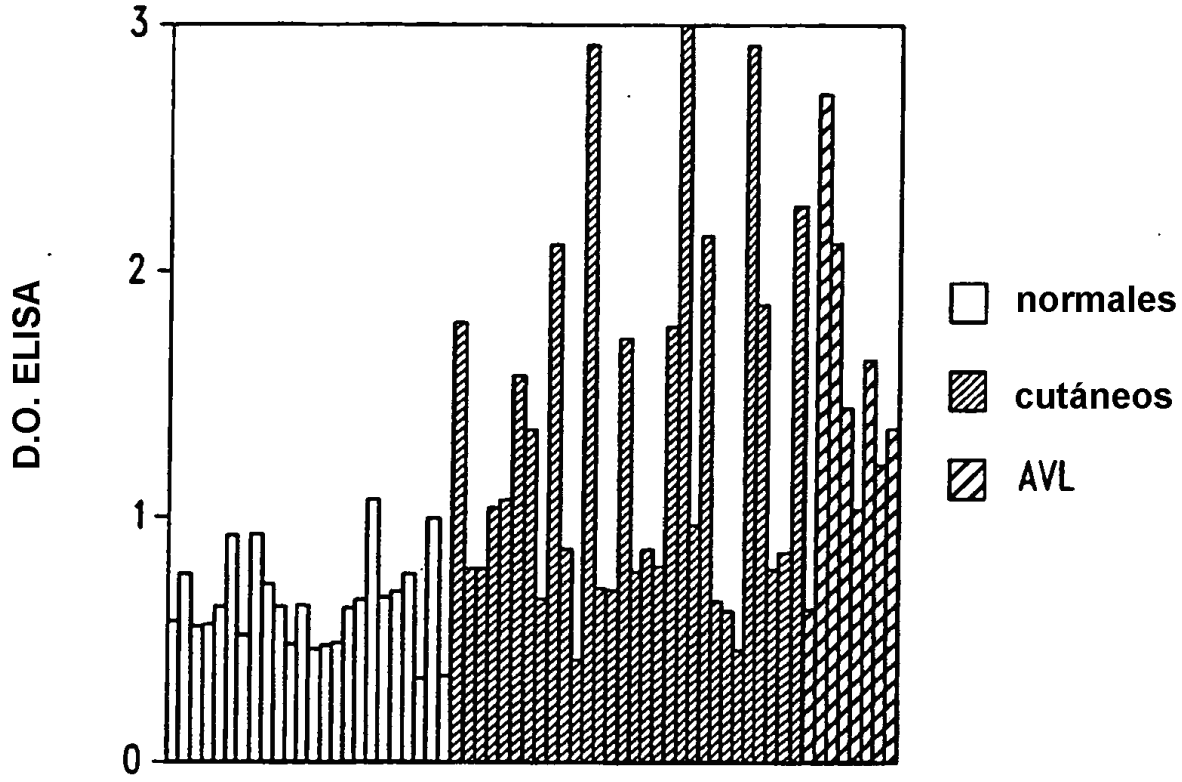


Fig. 26

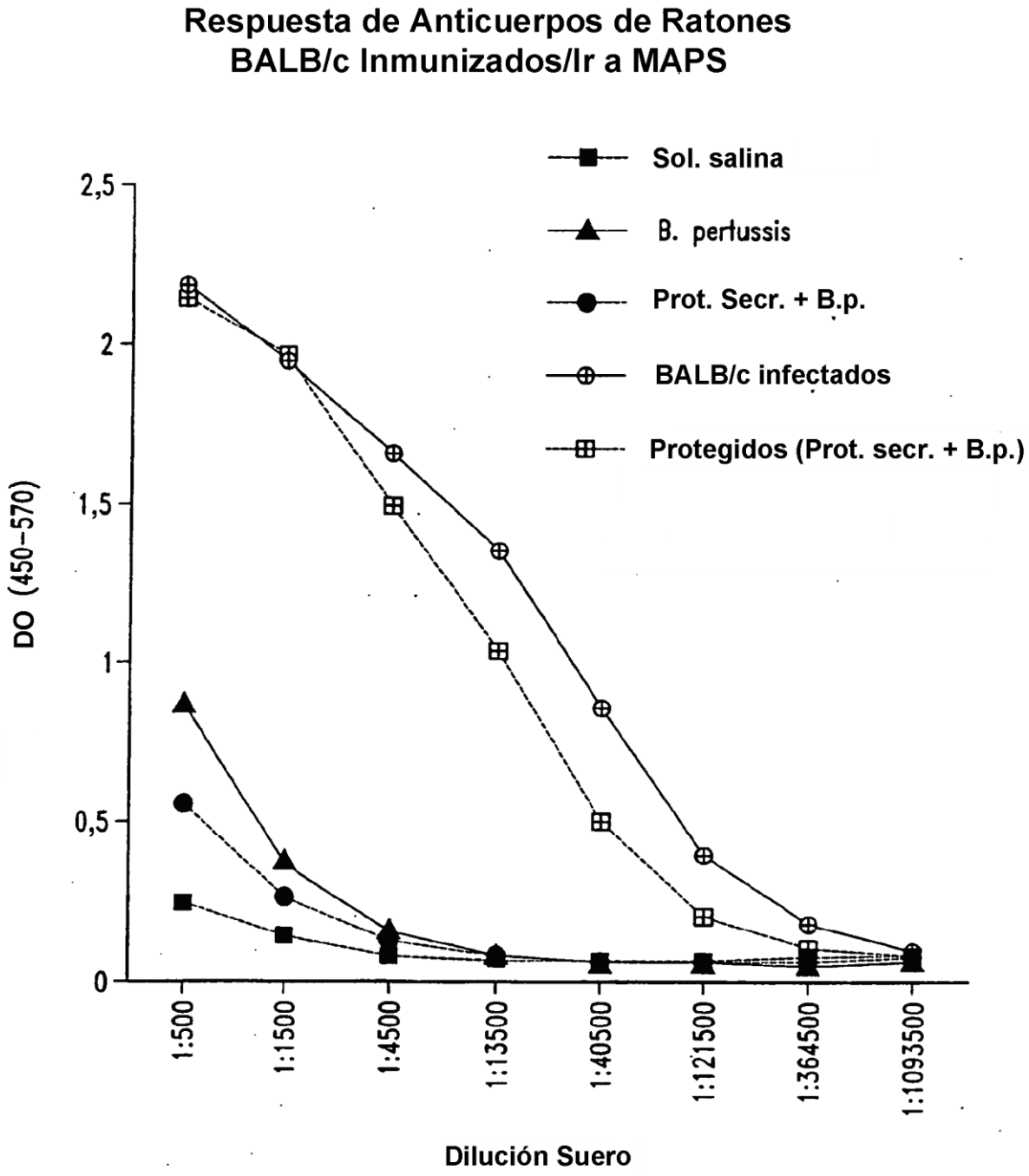

Respuesta de Anticuerpos de Ratones
BALB/c Inmunizados/Ir a MAPS
Sol. salina
B. pertussis
Prot. Secr. + B.p.
BALB/c infectados
Protegidos (Prot. secr. + B.p.)
DO (450-570)
2,5
2
1,5
1
0,5
0
1:500
1:1500
1:4500
1:13500
1:40500
1:121500
1:364500
1:1093500
Dilución Suero

Fig. 27

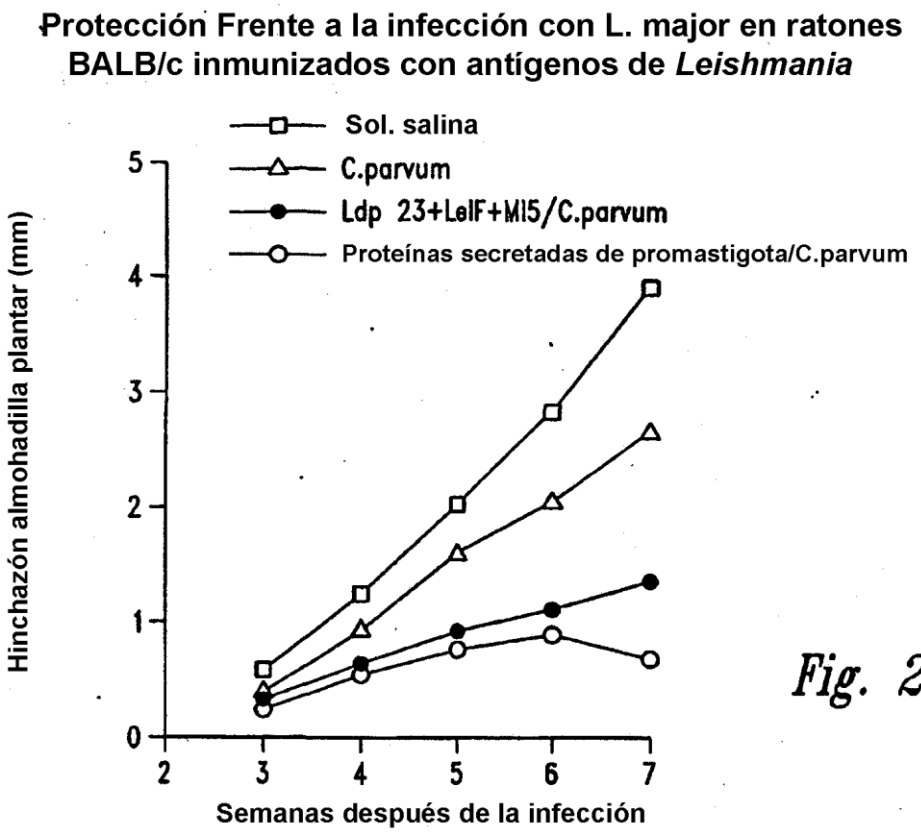

Protección Frente a la infección con L. major en ratones BALB/c inmunizados con antígenos de Leishmania
Sol. salina
C.parvum
Ldp 23+LelF+MI5/C.parvum
Proteínas secretadas de promastigota/C.parvum
Hinchazón almohadilla plantar (mm)
0
1
2
3
4
5
2
3
4
5
6
7
Semanas después de la infección

Fig. 28

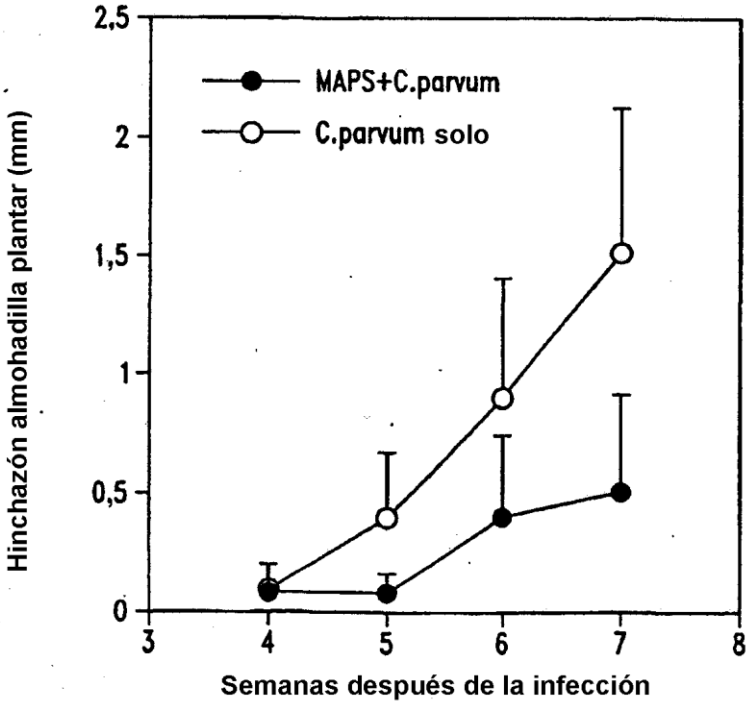

MAPS+C.parvum
C.parvum solo
Hinchazón almohadilla plantar (mm)
0
0,5
1
1,5
2
2,5
3
4
5
6
7
8
Semanas después de la infección

Fig. 29

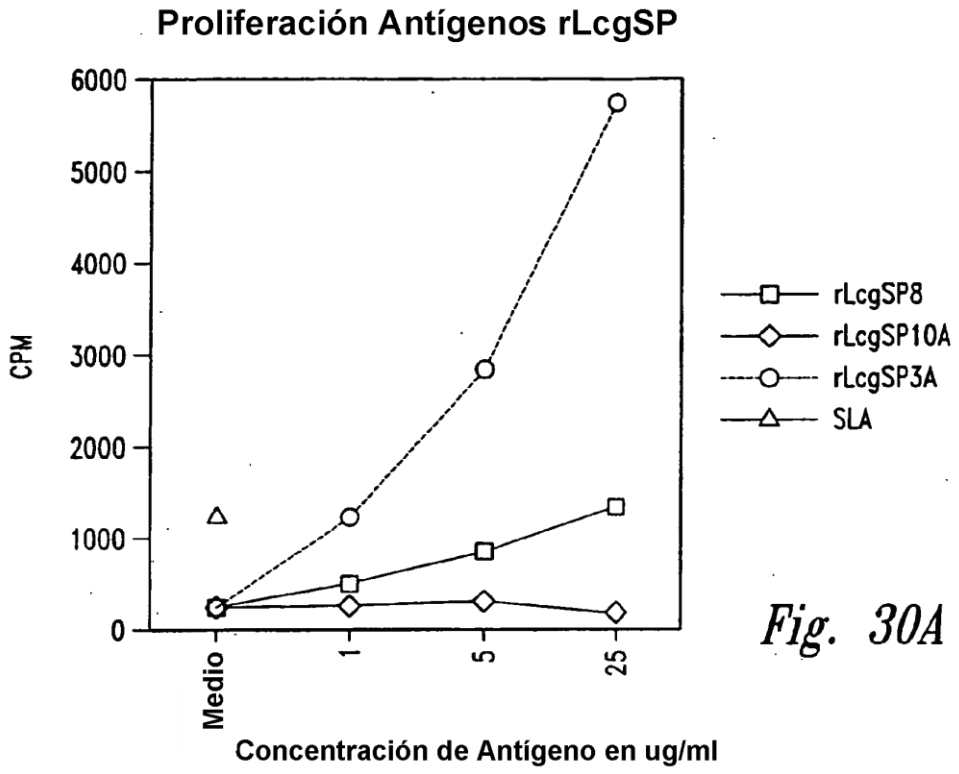


Fig. 30A

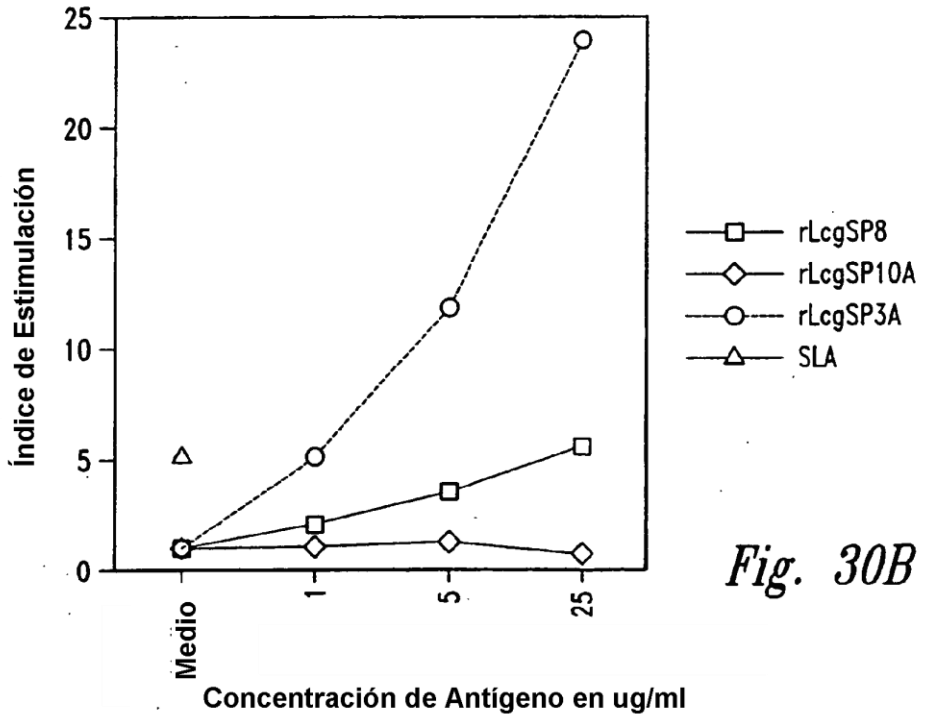


Fig. 30B

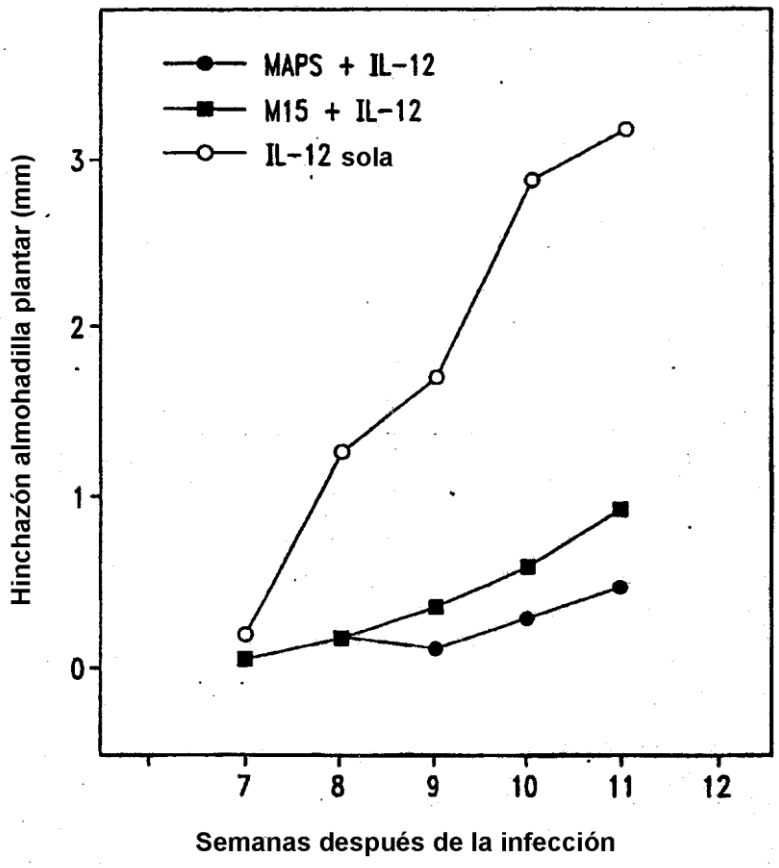

MAPS + IL-12
M15 + IL-12
IL-12 sola
Hinchazón almohadilla plantar (mm)
0
1
2
3
7
8
9
10
11
12
Semanas después de la infección

Fig. 31

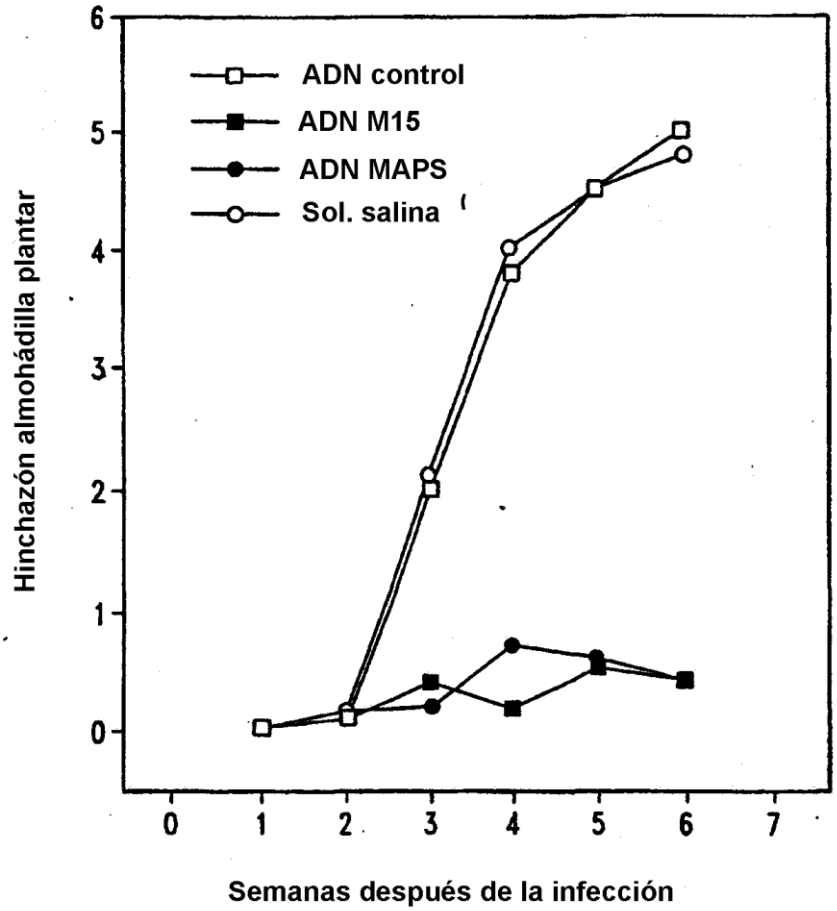

ADN control
ADN M15
ADN MAPS
Sol. salina
Hinchazón almohádilla plantar
Semanas después de la infección
0
1
2
3
4
5
6
7

Fig. 32

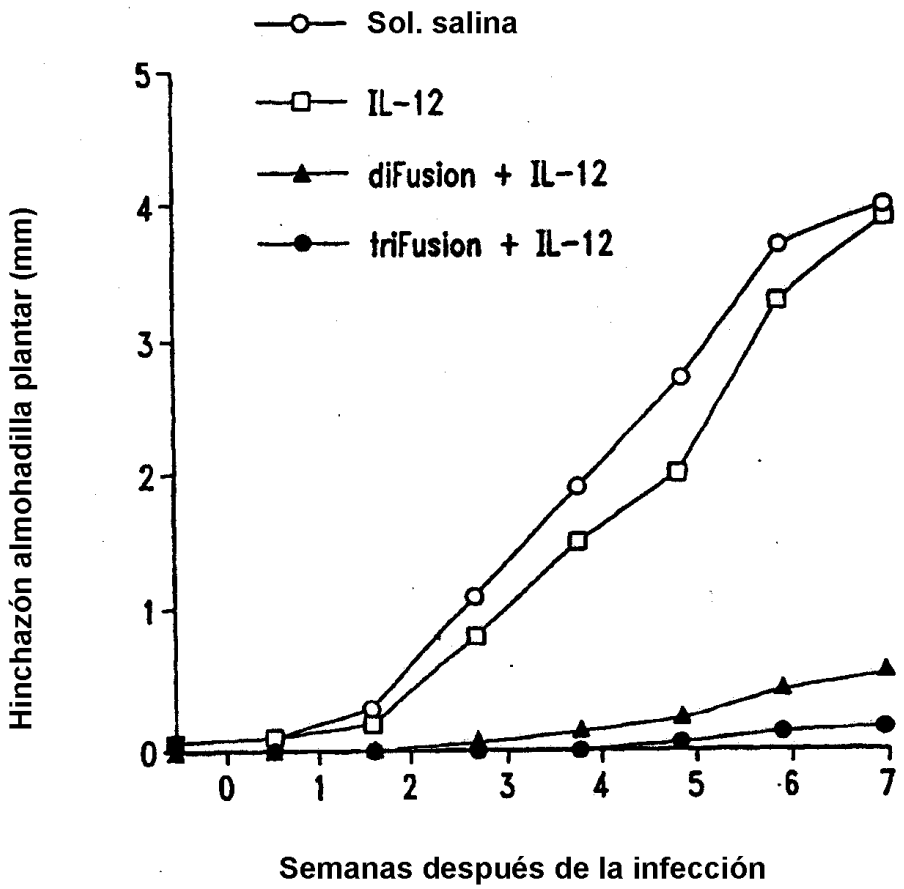

Sol. salina
IL-12
diFusion + IL-12
triFusion + IL-12
Hinchazón almohadilla plantar (mm)
0
1
2
3
4
5
0
1
2
3
4
5
6
7
Semanas después de la infección

Fig. 33

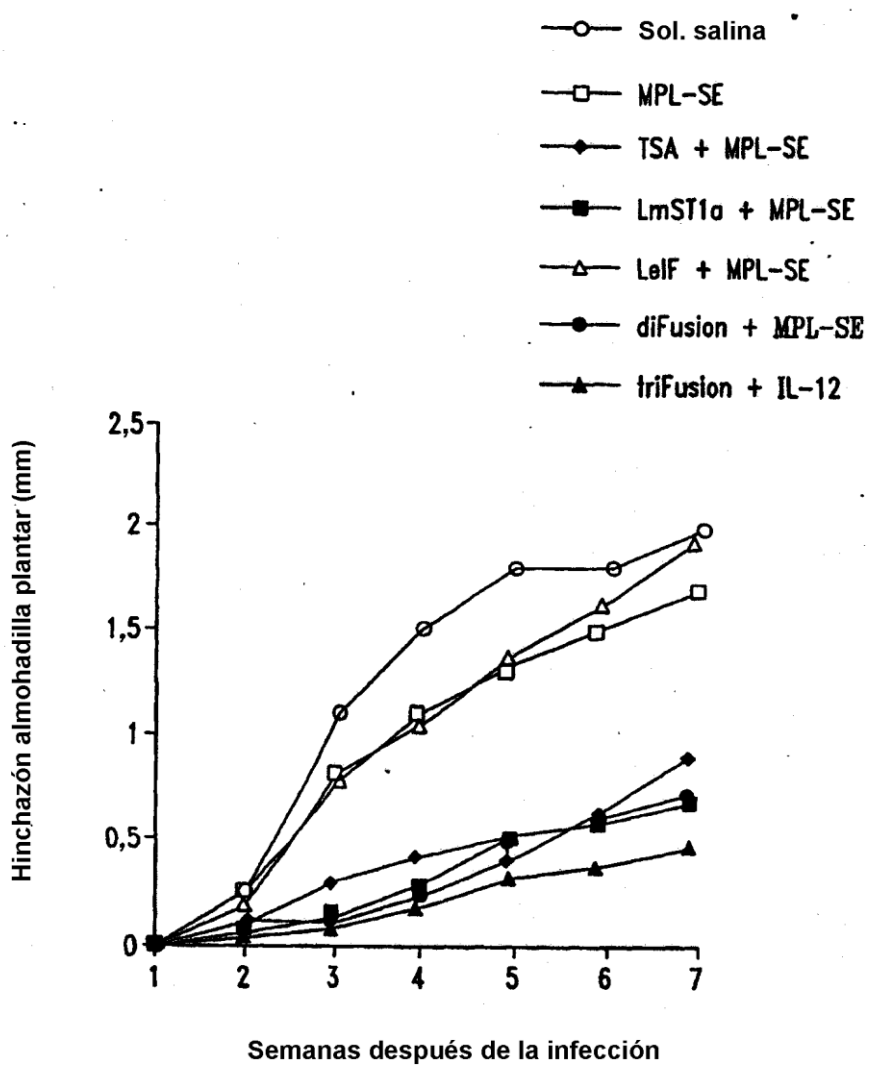

Sol. salina
MPL-SE
TSA + MPL-SE
LmST1α + MPL-SE
LeIF + MPL-SE
diFusion + MPL-SE
triFusion + IL-12
Hinchazón almohadilla plantar (mm)
2,5
2
1,5
1
0,5
0
1
2
3
4
5
6
7
Semanas después de la infección

Fig. 34