



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 297 025**

51 Int. Cl.:
C07K 14/44 (2006.01)
A61K 39/008 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **02785499 .1**
86 Fecha de presentación : **13.09.2002**
87 Número de publicación de la solicitud: **1425301**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **09.06.2004**

54 Título: **Mezcla vacunal terapéutica destinada a prevenir y tratar afecciones en mamíferos.**

30 Prioridad: **14.09.2001 FR 01 11942**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.05.2008

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.05.2008

73 Titular/es: **Oridan, Inc.**
701 Renner Road
Wilmington, Delaware 19810, US

72 Inventor/es: **Papierok, Gérard y**
Vincens, Serge

74 Agente: **Sugrañes Moliné, Pedro**

ES 2 297 025 T3

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

DESCRIPCIÓN

Mezcla vacunal terapéutica destinada a prevenir y tratar afecciones en mamíferos.

5 Mezcla vacunal terapéutica destinada a la prevención y el tratamiento de afecciones en mamíferos, y en particular en el hombre, los cánidos, los félicos y los équidos, cuya inmunidad protectora depende de la estimulación de los linfocitos T de tipo Th1, y particularmente de un estado de hipersensibilidad de tipo retardada.

10 Mezcla destinada igualmente al diagnóstico de la inmunidad de mediación celular dependiente de los linfocitos T de tipo Th1 utilizando diversos procedimientos “*in vivo*” e “*in vitro*”.

15 En el transcurso de la respuesta inmunitaria, el linfocito T constituye una fuente importante de citocinas. Su producción es inducida tras la estimulación de forma específica en presencia de antígenos, o no específica en presencia de mitógenos (concanavalina A, fitohemaglutinina).

Si se ha establecido claramente que los linfocitos T, y entre ellos sobre todo los linfocitos CD4+, representan la fuente principal de citocinas, las subpoblaciones T implicadas en este fenómeno son diversas y parecen variar en función del estímulo.

20 De forma muy esquemática, las respuestas inmunitarias se pueden dividir en dos grandes categorías cualitativamente distintas: las respuestas humorales, en las que interviene la producción de anticuerpos por parte de los linfocitos B, y las respuestas celulares (reacción de hipersensibilidad retardada, reacciones citotóxicas) para las cuales las células efectoras son los linfocitos T. Parece que en la mayoría de los modelos experimentales y de las situaciones clínicas estudiadas, las citocinas de origen linfocítico son producidas esencialmente por las células T auxiliares CD4+ (o colaboradoras) cuyo papel es modular o regular la inmunidad humoral y celular, y que reconocen el antígeno en asociación con las moléculas de clase II del complejo mayor de histocompatibilidad. En 1985 surgió un concepto mayor cuando T. Mosmann y R. Coffman propusieron que los linfocitos T CD4+ que expresan funciones auxiliares eran de hecho heterogéneos. Así, gracias al estudio de clones linfocíticos T CD4+ de ratón, cultivados a largo plazo, estos autores han descrito la existencia de dos subpoblaciones mayores que se pueden distinguir gracias a su perfil de secreción de citocinas, a saber, las células Th1 (de T *helper* de tipo 1) y las células Th2 (de T *helper* de tipo 2).

Tomemos como ejemplo la leishmaniosis, que es una infección parasitaria endémica, de hecho epidémica, de regiones tropicales y subtropicales del mundo. Las leishmanias, protozoos flagelados de la familia *Trypanosomatidae* y del género *Leishmania*, son los agentes patógenos responsables de estas enfermedades.

35 Los numerosos estudios que se apoyan en las respuestas inmunitarias durante el transcurso de leishmaniosis murinas experimentales han conducido a la demostración del papel preponderante de la inmunidad celular y de la existencia de una dualidad en la respuesta inmunológica. Fundamentalmente existen dos tipos de respuestas frente a las leishmanias: una calificada de “sensibilidad”, y otra de “resistencia”. Es a través de las linfocinas que secretan, que las diferentes subpoblaciones de linfocitos T (CD4+) limitan o exacerban la infección. Así, se ha demostrado que la subpoblación de linfocitos T auxiliares de tipo Th1 (productores de interferón γ y de interleucina 2) era capaz de eliminar las formas amastigotas intracelulares mediante la activación de los macrófagos (Reiner, S. L., y col., Annu Rev Immunol, 1995, 13, 151-177. Revisión). Por el contrario, la subpoblación de linfocitos T auxiliares de tipo Th2 (productores de interleucina 4) es responsable de la exacerbación de la enfermedad.

45 En el hombre algunos hechos son de naturaleza comparable. En el perro (hospedador natural “reservorio” receptivo al ciclo evolutivo de *L. infantum*), la dualidad de la respuesta inmunológica es probable. Sólo un estudio dirigido por Pinelli y col. (Infect. Immun., 62: 229, 1994) sobre animales infectados de forma experimental y natural con *L. infantum*, ha permitido mostrar que la ausencia de síntomas en el perro (estado clínico encontrado con frecuencia) se acompaña de la ausencia de una respuesta humoral y del desarrollo de una inmunidad celular de tipo Th1 con una reacción de hipersensibilidad de tipo retardada positiva y unos elevados niveles de interleucina 2 y de TNF- α circulante en los líquidos biológicos.

55 Un buen candidato vacunal se debe corresponder por tanto con uno o varios antígeno(s) parasitario(s) fuertemente inmunógeno(s) capaces bien de bloquear la diferenciación de los linfocitos Th2 (Gurunathan, S., y col., J. Exp Med, 6 de octubre de 1997, 186, 1137-1147) (modo de intervención comparable a los tratamientos de “desensibilización”, realizados habitualmente en los casos de alergia), o bien de favorecer la aparición de linfocitos Th1 que aseguren la puesta en práctica de una inmunidad protectora.

60 Considerar la vacunación contra las leishmanias es todavía hoy en día problemático. Las tentativas son numerosas, pero los resultados son débiles y/o contradictorios. Podemos mencionar la utilización de parásitos vivos, de parásitos irradiados y de parásitos muertos completos (Moreau, Y., y col., 1994, Médecine et Armées, 22, 1, 89-93) que han dado niveles de protección variable en los ratones y en el hombre.

65 Lohman y col. (1990), Proceedings of the National Academy of Science USA 87: 8393-8397, se refieren a la clonación y a la secuenciación del gen que codifica para la proteína natural GP42/M2 de la forma promastigota de *Leishmania amazonensis*, y realzan el interés de esta proteína para futuros estudios vacunales debido a su implicación en la inmunización contra las leishmaniosis, particularmente de forma cutánea, en modelos experimentales murinos.

ES 2 297 025 T3

En los años 80 se utilizaron en perros extractos purificados de antígenos parasitarios que inducían una exacerbación de la enfermedad: fracción LIF2 y vacuna anti-idiotípica del equipo del Dr. Montjour (CHAUVY, J., "Essais d'immunothérapie sur une population canine en zone d'endémie leishmanienne" tesis n° 36. 1993-OGUNKOLADE B. W. y col., Vet Parasitol.), GP63 o lipofosfoglucono (MOREAU, Y. y col., Médecine et Armées, 1994, 22,1, 89-93) no han dado un resultado satisfactorio. Actualmente se están ensayando varias moléculas y se está a la espera de un resultado final. Citemos la proteína de *heat shock* HSP83 de *Leishmania major* que estimula la vía Th1 y la proteína DP72 (JAFFE, C., y col., J of Immunol, 1990, 144, 699-706). No obstante, ninguno de los actuales protocolos de inmunización permite obtener un nivel suficiente de protección ni es, en todo caso, reproducible.

10 A día de hoy no se ha realizado ningún trabajo con péptidos sintéticos.

La presente invención consiste en una mezcla inmunomoduladora que utiliza uno o dos péptidos con un coadyuvante que induce bien una inmunoestimulación del sistema linfocitario T de tipo Th1 de forma reproducible, o bien una inmunomodulación de una respuesta de tipo Th2 hacia la de tipo Th1.

15 Es importante subrayar dos hechos esenciales. En primer lugar, las células Th1 y Th2 ejercen, a través de ciertas citocinas que producen, un efecto de contrarregulación recíproca, lo que explica por qué en la mayoría de los casos se observa una alternancia de respuestas de mediación celular y humoral. Así, las respuestas inmunitarias que privilegian una reacción de los linfocitos T de tipo Th1, es decir, con organismos que inducen una inmunidad dependiente de los linfocitos T, están frecuentemente asociadas a una respuesta humoral débil; este es el caso, por ejemplo, de las infecciones por micobacterias.

20 Por el contrario, una respuesta que privilegia la producción de anticuerpos se asociará más a menudo bien a la participación de los linfocitos T de tipo Th2 o bien a un déficit relativo de la inmunidad celular específica; este es el caso de la leishmaniosis visceral. Un segundo aspecto fundamental, los linfocitos plenamente diferenciados en células de tipo Th1 y Th2 no preexisten en el hospedador sin tratamiento previo no sensibilizado. En el transcurso de una respuesta inmunitaria fisiológica tras la que, con mucha frecuencia, los antígenos son eliminados rápidamente, las células CD4⁺ activadas, en vez de expresarse bien por un fenotipo de tipo Th1 o bien por un fenotipo de tipo Th2, secretan habitualmente citocinas específicas de tipo Th1 y Th2. Esto es lo que explica que, en el hombre, la demostración de la existencia de una dicotomía Th1/Th2 ha requerido el estudio de una red de citocinas a partir de linfocitos que no son de sujetos normales inmunizados normalmente, sino de pacientes que presentan enfermedades crónicas tales como infecciones parasitarias, alergias o enfermedades autoinmunes.

35 La polarización de las respuestas inmunitarias hacia un fenotipo Th1 o Th2 se ha asociado a numerosas situaciones patológicas.

40 Para las infecciones por *Leishmania*, *Trypanozoma*, *Candida* y otros organismos intracelulares tales como *Mycobacterium* y *Listeria*, una respuesta de Th1 se correlaciona con la resistencia al patógeno. Por otro lado, ciertas afecciones tales como las dermatitis atópicas caninas, las alergias y el asma, conducen a la exacerbación de una respuesta de tipo Th2. El recurso a los inmunoestimulantes, que permiten el paso de una respuesta Th2 a una respuesta Th1, y por tanto el paso de un estado de hipersensibilidad inmediata a un estado de hipersensibilidad de tipo retardada, debería inducir una recuperación.

45 Tomemos como ejemplo el asma, por el que la comunidad médica se inquieta ante el creciente número de individuos que lo padecen: alrededor de 200 millones de personas en el mundo, y según la OMS, 180.000 fallecidas en 1997. En Francia, 2.000 personas mueren por asma cada año.

El asma es un estado inflamatorio crónico de las vías respiratorias en el que intervienen numerosas células del sistema inmunitario.

50 La enfermedad se hace crónica a causa de la acumulación casi permanente de mediadores de inflamación, así como el reclutamiento casi incesante de polinucleares eosinófilos destructores: estas células se acumulan en la mucosa bronquial y liberan proteínas básicas que destruyen el epitelio bronquial. Los daños que causan estas proteínas básicas implican una hiperactividad de los bronquios: las terminaciones nerviosas que inervan los bronquios quedan al descubierto y ya no están protegidas frente a las agresiones exteriores.

Recordemos que los linfocitos T activados liberan sobre todo interleucina 4, que desencadena la producción de inmunoglobulinas E. Ésta "orientación alérgica" aún denominada vía Th2, se opone a las reacciones antinfeciosas de la vía Th1: en el marco de la lucha contra una bacteria (el bacilo de la tuberculosis, por ejemplo), los linfocitos T activados liberan interleucina 2 e interferón γ . El interferón γ activa las células presentadoras del antígeno quienes, a su vez, producen interleucina 12. Así, la interleucina 4 orienta las reacciones inmunitarias hacia las reacciones alérgicas, mientras que el interferón γ parece promover las reacciones de tipo defensivo.

65 Ahora bien, esta orientación del sistema inmunitario estaría impresa muy pronto, en cualquier niño pequeño. En un lactante expuesto a un agente patógeno, el sistema inmunitario se orienta hacia la vía defensiva: aquí son los linfocitos T productores de interleucina 2 e interferón γ los que son activados los primeros y los que le quedarán. Estos niños tendrán menos riesgos alérgicos.

ES 2 297 025 T3

Por el contrario, los lactantes criados en un medio aséptico presentan el riesgo de ser enfrentados a un entorno rico en alérgenos y pobre en microorganismos patógenos.

Si éste es el caso, el sistema inmunitario aún inmaduro va a activar los linfocitos T que segregan interleucina 4, confiriendo al sistema inmunitario una orientación alérgica, la cual favorece el asma. Esta hipótesis, surgida de los trabajos de Tim Mosman y Robert Coffann, del instituto de biología molecular y celular DNAX, en Palo Alto, explicaría el aumento de la prevalencia de la enfermedad asmática en los países industrializados.

Una reorientación de las reacciones inmunitarias de personas sensibles, limitando la vía alérgica Th2 de la respuesta inmunitaria hacia una activación de la vía Th1, sería una posibilidad de tratamiento del asma.

Podemos extender este fenómeno a otras formas de hipersensibilidad inmediata.

La hipersensibilidad inmediata es la forma de alergia más frecuente, y es el resultado de la síntesis de inmunoglobulinas E (IgE), anticuerpos específicos de los alérgenos del entorno. Estas inmunoglobulinas E se fijan sobre células, de las que los mastocitos son los elementos clave. El contacto del alérgeno y las inmunoglobulinas E activa los mastocitos, que liberan los mediadores de inflamación: es la desgranulación de los mastocitos. Agrupamos bajo el nombre de anafilaxia y de enfermedades atópicas a todas las manifestaciones clínicas relacionadas con los fenómenos de hipersensibilidad inmediata que resultan de la producción de inmunoglobulinas, las principales culpables de la alergia. No obstante, la anafilaxia se corresponde con un mecanismo fisiopatológico independiente de cualquier factor hereditario (es, por ejemplo el choque anafiláctico debido a los venenos de himenópteros), mientras que la atopia traduce una aptitud genética particular para producir un exceso de inmunoglobulinas E dirigidas contra diversas sustancias naturales del entorno atmosférico (los pólenes, los mohos, los contaminantes), doméstico (los acáridos, las cucarachas, los mamíferos) o profesional, y también contra los alimentos; da como resultado alergias respiratorias (asma, rinitis), cutáneas (urticarias, eczema atópico), oftálmicas y digestivas.

En estas patologías deben mencionarse dos puntos:

- 1- los acontecimientos en cascada desencadenados por la fijación del complejo alérgeno - IgE sobre diferentes poblaciones celulares, y particularmente sobre los mastocitos;
- 2- el papel de las citocinas, quienes mediante la síntesis de las IgE, participan en la fase de sensibilización, por un lado, y en la de perennización de la reacción alérgica, por otro.

Hoy en día, los tratamientos que refrenan los síndromes de origen alérgico forman parte del arsenal antiinflamatorio (antihistamínicos y corticoides). El lugar preponderante adquirido por las citocinas en los mecanismos fundamentales de hipersensibilidad inmediata abre perspectivas para nuevas terapias dirigidas: especialmente esperamos hacer bascular el equilibrio Th1/Th2 a favor de la vía Th1 y modular la señalización celular inducida por las citocinas cuando se fijan sobre los receptores situados en los linfocitos, pero también en los mastocitos y en los eosinófilos.

La presente invención es relativa a una mezcla vacunal que comprende 2 péptidos denominados A16E y A16G, específicos del parásito *Leishmania*, asociados a un coadyuvante. La invención concierne igualmente a la utilización de dichos péptidos y de dicho coadyuvante como reactivos de diagnóstico *in vitro* e *in vivo*, y como reactivos que inducen una estimulación de los linfocitos T de tipo Th1 que asegura una inhibición del desarrollo de los linfocitos de tipo Th2, especialmente para la prevención y el tratamiento de las afecciones relacionadas con un estado de hipersensibilidad inmediata, por lo tanto, un estado inmunitario de tipo Th2.

Los dos péptidos A16E y A16G presentan las siguientes secuencias de aminoácidos:

A16E: (16 aminoácidos):

A-A-R-S-A-R-S-R-E-G-Y-S-L-T-D-E

A16G: (16 aminoácidos):

A-A-S-S-T-P-S-P-G-S-G-C-E-V-D-G

En el compuesto peptídico A16E, L puede sustituirse indiferentemente por I, y S por C. En el compuesto peptídico A16G, C puede sustituirse indiferentemente por S, y S por C.

La mezcla según la invención puede incluirse igualmente en cualquier polipéptido.

Los péptidos obtenidos sintéticamente se construyen en *octopus* o se hacen inmunógenos mediante uniones a portadores (grandes moléculas de tipo KLH), y son administrados a los mamíferos en presencia de un coadyuvante, preferiblemente el dipéptido de muramilo (MDP): esta mezcla constituye el complejo peptídico vacunal terapéutico.

ES 2 297 025 T3

Preferentemente, la proporción proteína/coadyuvante está comprendida entre 1/0,1 y 1/16.

En el caso de una infección por leishmanias, los estudios realizados en el perro han permitido determinar la dosis vacunal óptima de 100 μg de dipéptido de muramilo por 50 μg de proteínas inyectadas. Se observa, no obstante, un inicio de la respuesta desde los 30 μg de proteínas inyectadas.

El mecanismo de acción específico del complejo peptídico obtenido según la invención es verificado con la ayuda de procedimientos clásicos que permiten la dosificación de los péptidos, su identificación y con la ayuda de procedimientos más específicos que demuestran que el innovador complejo peptídico actúa bien por inmunestimulación del sistema linfocitario de tipo Th1, o bien mediante la inmunomodulación de un tipo Th2 hacia un tipo Th1.

Para cada mamífero estudiado (el perro, por ejemplo) se realiza un análisis serológico con los péptidos A16E y/o A16G.

Se realiza un examen parasitológico a partir de cada muestra tomada directamente del candidato estudiado, un perro, por ejemplo.

Se realiza un frotis sobre lámina a partir de la punción de médula ósea. Este frotis, una vez fijado con metanol, se tiñe con May Grümwald Giemsa y se observa al microscopio de inmersión (x 1.000).

Las muestras de médula ósea se cultivan en medio de cultivo bifásico NNN (Novy y Mac Neal, 1904, 4. Infect. Dis., 1: 1-30) del cual constituye la fase líquida RPMI 1640 con un 20% de suero bovino fetal descomplementado añadido. Cada cuatro a seis días se realizan transplantes a ciegas. Los cultivos se observan regularmente bajo el microscopio fotónico (x 400) durante 20 min.

Las parasitemias se cuantifican como sigue:

+/-: formas alargadas refringentes inmóviles

+: de 1 a 5 formas promastigotas móviles/campo

++: > 5 formas promastigotas móviles/campo

+++ : cultivo a confluencia

Puesta en evidencia de la implicación de una inmunidad celular de tipo Th1:

las formas promastigotas de las leishmanias se cultivan en medios de cultivo estándar. Los parásitos se recogen al final de la fase exponencial (6-7 días). El remanente parasitario se lava tres veces mediante centrifugación (2500 g, 15 min, 4°C) en tampón de PBS.

Tras haber verificado la viabilidad de los parásitos con la ayuda de un colorante vital (azul de trypan), se inactiva una suspensión que contiene 2×10^8 parásitos por ml con tampón de PBS que contiene un 0,01% de tiomersal (Pinelli y col., 1994, Infect. Immun. 62: 229-235). Esto constituye las leishmaninas para la prueba de intradermorreacción (IDR).

A continuación se realiza el estudio de la respuesta inmunitaria de tipo Th1 sobre perros.

Los perros se colocan en decúbito lateral y se realiza una rasuración delicada y no irritante sobre la zona torácica de alrededor de 5 cm por 10 cm por detrás del codo. Se delimitan cuatro círculos de 10 mm de diámetro con la ayuda de un fieltro.

En el centro de los círculos se inyectan 0,1 ml de disolución mediante una inyección intradérmica. Dos círculos reciben la disolución de leishmaninas y los otros dos círculos reciben la disolución salina de tiomersal como controles negativos. La lectura de la intradermorreacción (IDR) se realiza 48 horas más tarde mediante una regleta alergológica.

La prueba se considera positiva si la media observada de dos diámetros de endurecimiento es igual o superior a 5 mm. La observación de un eritema sin endurecimiento se considerará como una prueba negativa (Pinelli y col., 1994, Infect. Immun., 62: 229-335; Marty y col., 1994, trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., 88, 658-659).

Las IDR pueden realizarse igualmente con una disolución de péptidos A16E y A16G o de sus derivados y de MDP, por ejemplo, en unas proporciones de 10 μg de péptidos por 20 μg de MDP.

La presente invención concierne por tanto igualmente a un producto de diagnóstico *in vivo* que pone en evidencia a un estado de hipersensibilidad retardada inmunitaria de tipo Th1 mediante la utilización de péptidos A16E y A16G y sus derivados en intradermorreacción en mamíferos.

ES 2 297 025 T3

Igualmente se puede proceder a administrar monóxido de nitrógeno (NO) para conocer la actividad destructiva de los monocitos de las Leishmanias. La síntesis de NO por parte de los monocitos es, en efecto, un signo de destrucción de las leishmanias por los monocitos que hayan sido activados por las citocinas de tipo interferón γ (IFN γ).

5 El NO posee una elevada reactividad química. En presencia de agua y de oxígeno, esta molécula se oxida rápidamente de forma estequiométrica formando así nitritos (NO₂⁻) según la reacción: $4 \text{NO}^0 + \text{O}_2 + 2 \text{H}_2\text{O} \rightarrow 4 \text{NO}_2^- + 4 \text{H}^+$.

Los nitritos se acumulan en el medio y son fácilmente detectables químicamente mediante el método de Griess.

10 A 50 μl de sobrenadante de cultivos de monocitos que se van a ensayar se añaden 60 μl de Griess B (N-(1-naftil) etilendiamina al 0,3%). La reacción colorimétrica se desarrolla al abrigo de la luz durante 2 minutos. Las densidades ópticas obtenidas a 540 nm se corrigen sustrayendo las DO obtenidas de los pocillos que contienen sólo medio de cultivo.

15 Los valores obtenidos se trasladan a una curva estándar (DO = f(NO₂⁻)) realizada a partir de concentraciones conocidas de NO₂⁻.

20 Para esta prueba, los monocitos y los linfocitos se aíslan a partir de sangre venosa de los perros. Los monocitos se cultivan durante 3 días a razón de 10⁵ células por pocillo en las cámaras de cultivo (Labtek) en un medio RPMI 1640 completo (que contiene 25 mM de HEPES; 2 mM de L-glutamina, 100 U de penicilina por ml), a 37°C en una atmósfera húmeda que contiene un 5% de CO₂. Después de 3 días de cultivo, los macrófagos se lavan con medio RPMI completo, y se añade medio fresco. Las células se incuban solas, en presencia de 5 μg de péptidos, o en presencia de linfocitos autólogos.

25 Cuando son utilizados, los linfocitos cultivados por separado se lavan, se cuentan y se añaden a los macrófagos en la proporción de 2 linfocitos por macrófago.

Igualmente se realiza una prueba de proliferación linfocitaria.

30 Las células mononucleares de la sangre periférica (PBMC) de los perros se separan bajo un gradiente de Ficoll (densidad 1,078) mediante centrifugación a 800 g durante 20 min a temperatura ambiente. Estas células se cultivan en placas de 96 pocillos a una concentración de 2×10^5 células por pocillo en presencia de 2 μg por ml de concanavalina A (Sigma), de 5 μg por ml de ESP (excreción - secreción promastigotes) o de 20 ml de sobrenadantes de cultivo recogidos en fase estacionaria del crecimiento de los promastigotes (SP) por pocillo, y en ausencia de cualquier aditivo, en un volumen de 200 μl de medio RPMI 1640 que contiene un 5% de suero bovino fetal descomplementado, 2 mM de L-glutamina, 100 U de penicilina por ml, 100 mg de estreptomina por ml. Las concentraciones óptimas de antígenos y de mitógenos han sido determinadas en experimentos previos. Las PBMC se incuban durante 72 horas en una atmósfera húmeda a 37°C en presencia de un 5% de CO₂, y después durante 20 horas con 0,5 μCi de ³H-timidina.

35 Las células se recogen sobre filtro y se determina la incorporación de la radiactividad mediante recuento en líquido de centelleo (contador β). Todas las pruebas se realizan por triplicado.

40 También se utiliza un procedimiento inmunohistoquímico más rápido y más sensible que utiliza la BrdU (5-bromo-2'-desoxiuridina), un análogo estructural de la timidina, para medir la proliferación celular (BrdU, kit III de detección de la proliferación celular, Boehringer Mannheim, Alemania). En nuestros experimentos, la BrdU se añade durante 18 horas después de 72 horas de incubación. Las células que han incorporado la BrdU en su ADN son fácilmente detectables en presencia de un anticuerpo monoclonal dirigido contra la BrdU.

45 Las respuestas proliferativas se expresan en índices de estimulación, que representan la proporción de la media de proliferación tras la estimulación con respecto a la media de proliferación en ausencia de antígeno.

50 También se ha estimado la proliferación linfocitaria mediante lecturas visuales en el microscopio fotónico (-: negativo; +/-: ligera proliferación; +: pequeña proliferación en menos de 5 puntos por campo microscópico; ++: proliferación media en más de 5 puntos; +++: fuerte proliferación).

55 Paralelamente al estudio de activación específica de los linfocitos T de tipo Th1 mediante intradermoreacción, administración de NO (el NO es sintetizado por los monocitos activados por las citocinas de las células T de tipo Th1) y proliferación linfocitaria, se efectúa un seguimiento serológico mediante inmunofluorescencia clásica utilizando láminas recubiertas por los promastigotes (método de referencia sérologico para la leishmaniosis canina).

60 Para el desarrollo de los estudios han sido útiles otras técnicas particulares.

Método de la prueba infecciosa

65 La prueba infecciosa consiste en inyectar por vía intravenosa 10⁶ promastigotes en fase metacíclica tratados con complemento de perro sano y 5×10^6 macrófagos peritoneales de perro sano infectados *in vitro* por amastigotes.

ES 2 297 025 T3

Los promastigotes y los macrófagos infectados se diluyen en suero fisiológico estéril hasta un volumen final de 1,5 ml. Esta mezcla se realiza justo antes de la inyección.

Detección de las inmunoglobulinas de isotipo IgG2 de perro, específicas de los péptidos A16E y A16G:

Esta detección se realiza mediante el método ELISA según la técnica de microtitulación de Kweider y col. (J. Immunol, 1987, 138, 299) utilizando un conjugado anti-IgG2. Para este método, los péptidos son biotinilados antes del recubrimiento en microplaca. Esta unión a moléculas grandes del tipo de la biotina tiene especialmente como efecto hacer a los péptidos A16E o A16G o a sus derivados más antigénicos.

Los péptidos también pueden unirse al glutaraldehído o asociarse a esqueletos de polilisina (presentación de tipo OCTOPUS, por ejemplo).

El carácter innovador del complejo peptídico según la invención no reside únicamente en la inducción de una respuesta celular específica de tipo Th1, sino también en la producción de bajas cantidades de inmunoglobulina de isotipo IgG particulares, tales como la IgG2 en perros. Estas IgG particulares son detectables mediante diversos procedimientos *in vitro*, por ejemplo: ELISA, INMUNOTRANSFERENCIA DOT, INMUNOTRANSFERENCIA WESTERN, INMUNOCROMATOGRAFÍA, LÁTEX y cualquier otro procedimiento *in vitro* en el que intervenga un sistema de conjugado u otros sistemas de visualización de la reacción Ag - Ac. Puede utilizarse, por ejemplo, un sistema ELISA sobre un soporte plástico, y un sistema de INMUNOTRANSFERENCIA WESTERN sobre membranas de nitrocelulosa u otros polímeros en los que intervenga un conjugado enzimático. Igualmente pueden utilizarse soportes de látex. Los péptidos A16E, A16G y sus derivados pueden conjugarse igualmente, por ejemplo, con radioisótopos, con moléculas fluorescentes, con moléculas luminiscentes o con partículas de color.

En efecto, ciertos trabajos preliminares en el hombre (KAWANO, P. y col., Parasite Immunol, 1995, 17, 451-458) y en el perro (NIETO C. G. y col., Vet Immunol and Immunopathology, 199, 67, 117-130) demuestran que los isotipos de IgG serían marcadores de la dicotomía inmunitaria Th1/Th2. De forma más precisa, un perro afectado por leishmaniosis con signos clínicos evidentes presenta una elevada tasa de anticuerpos, principalmente del isotipo IgG1, mientras que un perro asintomático presenta anticuerpos específicos del isotipo IgG2. Los perros que hayan recibido nuestro complejo peptídico presentan unas bajas tasas de IgG2 específicas de los péptidos A16E y/o A16G, lo que es coherente con la expansión preferente de los linfocitos T de tipo Th1.

La detección de la presencia de isotipos de IgG particulares específicos de los péptidos A16E y A16G permite particularmente:

- evidenciar una respuesta humoral dependiente de los linfocitos Th1 y, por tanto, evidenciar un estado inmunitario de tipo Th1
- evidenciar un estado de hipersensibilidad retardada,
- seguir la respuesta inmune en los mamíferos vacunados o tratados,
- seguir la eficacia de un tratamiento quimioterapéutico e/o inmunoterapéutico.

La mezcla que comprende los péptidos A16E y A16G y el coadyuvante, según la invención, puede administrarse de diversas formas. No obstante, se administra de forma preferente mediante cuatro vías:

- mediante inyección subcutánea
- mediante inyección intradérmica
- mediante inyección intramuscular
- por vía oral

Pueden emplearse otras vías de administración, tal como la vía parenteral o la intravenosa.

De forma general, una vacuna se presenta en forma de un inyectable formado por una fracción liofilizada que se reconstituye en una fracción líquida o diluyente. Las dosis utilizadas para la prevención y la inmunoterapia son diferentes según la vía de inyección:

- por vía subcutánea e intramuscular:
 - inyección de una dosis (50 μ g de péptidos y 100 μ g de coadyuvante) en perros de cualquier raza y sexo para un efecto preventivo
 - inyección de media dosis (25 μ g de péptidos y 50 μ g de coadyuvante) para la inmunoterapia de perros con leishmaniosis.

ES 2 297 025 T3

- por vía intradérmica:
 - inyección de media dosis en perros con leishmaniosis para un efecto preventivo
 - inyección de un cuarto de dosis en los perros con leishmaniosis para un efecto terapéutico.

Los procedimientos de inyección se retoman en los ejemplos de inmunoterapia y de vacunación.

Resultados en inmunoterapia

Según especialistas como PINELLI (PINELLI, E. y col., Infect Immun, 1994, 62: 229-235) los perros con leishmaniosis correspondiente a la activación del sistema linfocitario de tipo Th2 presentan una respuesta elevada en anticuerpos.

Esta producción incrementada en anticuerpos se corresponde con una hiperproteinemia e induce la aparición de inmunocomplejos que implican una afección renal (aumento de la creatinina y de la urea sanguíneas).

Por tanto, hemos intentado modular hacia un estado Th1 administrando a perros indudablemente afectados de leishmaniosis, por vía intradérmica, dosis de los complejos peptídicos. Antes y después del tratamiento se realiza un seguimiento del estado inmunitario, así como una observación clínica.

Ejemplo 1

Perra MANON

Una perra de raza Epagneul bretón de 4 años, perteneciente al Sr. P., presenta numerosas lesiones cutáneas acompañadas de un estado de fatiga general y un aspecto delgado, evocando en conjunto una leishmaniosis canina. El veterinario, el Dr. LM, diagnostica una leishmaniosis. Este diagnóstico es confirmado mediante la observación directa al microscopio de leishmanias a partir de un calco cutáneo y un análisis serológico que, mediante inmunofluorescencia, da un título positivo para leishmaniosis a 1/3200.

El análisis del estado inmunitario antes de cualquier infección permite afirmar que el perro está efectivamente en un estado inmunitario de tipo Th2, con un título en anticuerpos elevado, así como pruebas de IDR y aplicaciones de NO negativas. Nosotros instauramos una inmunoterapia que consiste en efectuar, por vía intradérmica, dos inyecciones de 25 µg de péptidos (½ A16E, ½ A16G) y 100 µg del coadyuvante dipéptido de muramilo, separando entre sí cada inyección 3 semanas.

Una semana después de la segunda inyección, la perra MANON recobra el apetito y una cierta vitalidad. El Dr. LM comienza a observar una ligera mejora cutánea.

Un mes después de la última infección, MANON ha recobrado un aspecto clínico normal, especialmente con un aumento de peso de 1 kg y una desaparición del 80% de todas las lesiones cutáneas. El análisis del estado inmunitario permite confirmar un bajo título en anticuerpos anti-leishmania, que desciende hasta 1/400 mediante inmunofluorescencia. Paralelamente, se positivaron la IDR (IDR realizada con leishmaninas e igualmente con los péptidos A16E y A16G), la administración de NO y la proliferación linfoblástica. Además, después del tratamiento, la perra MANON presenta IgG2 específicas de los 2 péptidos, IgG2 determinadas mediante los métodos ELISA e inmunotransferencia Western. Estas IgG2 específicas estaban ausentes antes de cualquier tratamiento. Una búsqueda de los parásitos mediante el cultivo en medio NNN resulta negativa. Ocho meses después del tratamiento, la perrita MANON ya no presenta ninguna modificación. Los análisis biológicos permiten afirmar que MANON está todavía en un estado inmunitario Th1.

Ejemplo 2

Perro PEPPONE

Un perro de raza Griffon, PEPPONE, de 5 años, perteneciente al Sr. B., presenta los signos clínicos específicos de la leishmaniosis. Según el Dr. GH, presencia de numerosas escamas brillantes, alopecia periocular derecha, lesiones ulcerosas en los dos codos anteriores y un marcado estado de fatiga. Los análisis biológicos confirman el diagnóstico clínico, especialmente con una serología de leishmaniosis positiva a 1/400 por inmunofluorescencia. Se instaura una inmunoterapia consistente en realizar, por vía intradérmica, 3 inyecciones de 25 µg del compuesto vacunal peptídico (½ A16E, ½ A16G) y 100 µg del coadyuvante dipéptido de muramilo, separando entre sí cada inyección 10 días. El análisis del estado inmunitario antes de cualquier inyección demuestra que el perro PEPPONE desarrolla un sistema inmunitario de tipo Th2 con una parasitemia fuertemente positiva a partir de la médula ósea.

Un mes después de la última infección, los signos clínicos de leishmaniosis de PEPPONE retroceden, particularmente con una cicatrización de las lesiones ulcerosas, una importante desaparición de las escamas, así como una alopecia periocular casi inexistente. La serología presenta todavía un título en inmunofluorescencia igual a 1/400. Por el contrario, el análisis de la respuesta celular permite afirmar que PEPPONE presenta un estado Th1 activo con una

ES 2 297 025 T3

IDR (IDR realizada con leishmaninas e igualmente con los péptidos A16E y A16G), una administración de NO y una proliferación linfoblástica positivas.

Paralelamente, se negativa la parasitemia (cultivo de médula ósea en medio NNN).

A nivel humoral, el perro PEPPONE presenta IgG2 específicas de los péptidos A16E y A16G tras el tratamiento, IgG2 determinadas mediante ELISA e inmunotransferencia Western.

La presente invención consiste por tanto en una mezcla terapéutica que induce el paso de un estado inmunitario de tipo Th2, con una importante producción de anticuerpos que exagera las manifestaciones clínicas, hacia un estado inmunitario de tipo Th1, que implica la curación.

La mezcla formada por los dos péptidos A16E y A16G y el coadyuvante dipéptido de muramilo constituye un complejo terapéutico.

Resultados de la vacunación

Con el fin de evaluar la eficacia de la mezcla vacunal según la invención, se prueba el compuesto vacunal sobre 5 perros completamente sanos. Estos 5 perros presentan una serología negativa para leishmaniosis, una parasitemia negativa, así como unas pruebas de respuesta celular específica ante leishmania completamente negativas. Además, ninguno de los 5 presenta IgG2 específicos de uno o de los dos péptidos A16E y/o A16G.

Estos cinco perros viven en un ambiente exento de flebotomos. Definiremos 3 grupos de perros:

1- grupo de control (placebo)

- control negativo: perra LILI de raza Pointer, sexo hembra, edad: 3 años
- control sólo con coadyuvante: perra MIMI de raza Epagneul Bretón, sexo hembra, edad: 6 años

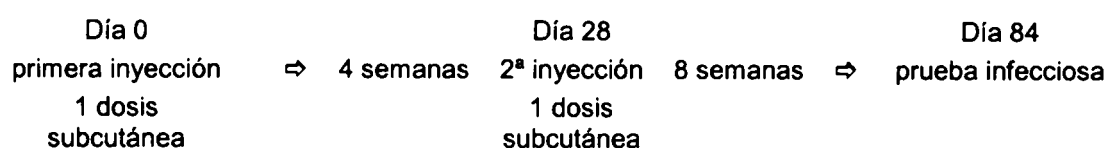
2- grupo de perros vacunados con los péptidos individuales (50 μg) y coadyuvante dipéptido de muramilo (100 μg).

- perra MAMA de raza Braco de Weymar, sexo hembra, edad: 2 años y medio => péptido A16E
- perro NUNU de raza Pointer, sexo macho, edad: 2 años y medio => péptido A16G

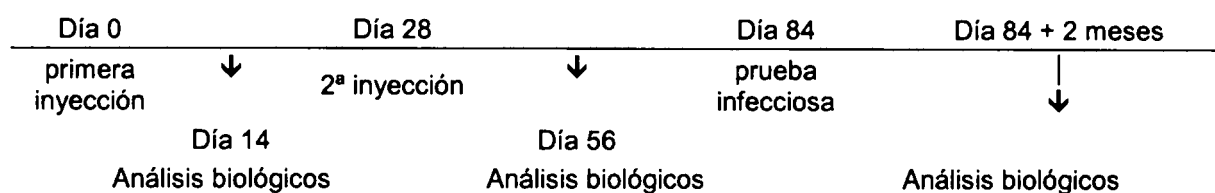
3- grupo de perros vacunados con los péptidos A16E y A16G (25 μg de cada péptido) y coadyuvante dipéptido de muramilo (100 μg).

- perro LEON de raza Español Bretón, sexo macho, edad: 4 años.

El esquema de inyección vacunal es el siguiente:



Se efectúa un seguimiento clínico de los 5 perros cada dos semanas. Los análisis biológicos se esquematizan de la siguiente forma:



Los análisis biológicos consistan en:

- análisis bioquímicos: urea, creatinas, transaminasas
- análisis hematológicos: recuento, fórmula

ES 2 297 025 T3

- serología de leishmaniosis: inmunofluorescencia cuantitativa anti-leishmania, determinación mediante ELISA de las IgG2 específicas de los péptidos A16E y/o A16G
- pruebas de respuesta celular: IDR (intradermorreacción) realizada con leishmaninas e igualmente con los péptidos A16E y A16G, administración de NO y proliferación linfoblástica.

A estos análisis hay que añadir la búsqueda de las leishmanias mediante la observación directa al microscopio, y el cultivo en medio NNN a partir de médula ósea tras la prueba infecciosa.

10 Resultados

Seguimiento clínico

Ninguna manifestación clínica importante aparece a lo largo de todo este estudio. Hay que mencionar un leve adelgazamiento y la aparición de algunas escamas en la perrita LILI, 4 meses después de la prueba infecciosa.

Seguimiento biológico

1- los parámetros bioquímicos y hematológicos permanecen normales a lo largo de todo este estudio.

2- serología de leishmaniosis y parasitemia:

Antes de cualquier inyección, los 5 perros presentan unas serologías y unas parasitemias negativas. La tabla, a continuación, muestra las respuestas serológicas obtenidas a partir de nuestros experimentos y el seguimiento de la parasitemia (análisis efectuados 2 meses y 12 meses después de la prueba infecciosa).

	SEROLOGÍA			PARASITEMIA (en punción de médula ósea)	
	Perros	IF cuantitativa	ELISA IgG2	Examen directo	Cultivo en medio NNN
Perros de control	LILI	-	-	+	+
	MIMI	-	-	+	++
Perros inmunizados	MAMA (A16E)	-	+ (0.700)	-	-
	NUNU (A16G)	-	+ (0.520)	-	-
	LEON (A16E + A16G)	-	+ (0.780)	-	-

Leyenda:
 IF: inmunofluorescencia (considerada positiva si el título es $\geq 1/100$)
 ELISA: corte en 0,300 de DO (densidad óptica)
 Parasitemia: cultivos en medio NNN:
 - = ausencia
 ++ = más de 5 formas promastigotas móviles/campo

Sólo los perros de inmunizados presentan anticuerpos específicos del isotipo IgG2 (ELISA para los péptidos correspondientes) así como unas parasitemias negativas. Hay que mencionar una ligera aparición de anticuerpos totales (1/200 en IF) en todos los perros después de la prueba infecciosa.

Sólo los perros de control (LILI y MIMI) presentan unas parasitemias positivas, así como una ausencia de anticuerpos específicos IgG2 anti-péptidos.

• Respuesta de mediación celular

Antes de cualquier infección, los 5 perros presentan una respuesta de mediación celular ante *Leishmania infantum* completamente negativa. Según la siguiente tabla, sólo los perros inmunizados presentan pruebas de proliferación linfoblástica, unas IDR positivas relacionadas con la producción de NO por parte de los monocitos.

La siguiente tabla muestra las respuestas obtenidas de tipo celular (análisis realizados 2 meses después de la prueba infecciosa).

ES 2 297 025 T3

	PERROS	Leishmaninas	IDR A16E	A16G	Administración de NO (en μM)	Prueba de proliferación linfoblástica	
5	Perros de control	LILI	+	-	-	0,3	- 1,1 (3)
		MIMI	-	-	-	0,2	- 1,2 (3,1)
10	Perros inmunizados	MAMA (A16E)	+	+	límite	2,6	+ 2,1 (3,1)
		NUNU (A16G)	+	límite	+	2,8	++ 3,1 (3,6)
		LEON (A16E + A16G)	+	+	+	4,2	+++ 3,7 (3,8)
Leyenda: • IDR: la prueba de intradermorreacción se considera positiva (+) si el endurecimiento es ≥ 5 mm 48 h después de la de inyección intradérmica. • Administración de NO • Prueba de proliferación linfoblástica: los resultados se expresan mediante lectura en microscopio fotónico y en índice de estimulación (entre paréntesis, índice de estimulación + concanavalina A).							

A partir de este análisis, los compuestos peptídicos con el coadyuvante inducen una inmunidad de mediación celular de tipo Th1 protectora, a la que hay que añadir una inducción de anticuerpos de isotipo IgG2. La mezcla de los dos péptidos a una concentración igual da una respuesta celular más acentuada (índice de NO sintetizado por los monocitos activados elevado).

La mezcla compuesta por los dos péptidos A16E y A16G y el coadyuvante en dipéptido de muramilo constituye un complejo vacunal.

REIVINDICACIONES

5 1. Mezcla vacunal terapéutica destinada a la prevención o al tratamiento de afecciones en mamíferos, y en particular en el hombre, los cánidos, los félidos y los équidos, cuya inmunidad protectora depende de la estimulación de los linfocitos T de tipo Th1, y particularmente de un estado de hipersensibilidad retardada, **caracterizada** porque contiene:

- un péptido con la siguiente secuencia de aminoácidos (A16E - ID. SEC. N° 1):

10 A-A-R-S-A-R-S-R-E-G-Y-S-L-T-D-E

secuencia en la que L puede ser sustituido por I, y S por C

- y un péptido con la siguiente secuencia de aminoácidos (A16G - ID. SEC. N° 79):

15 A-A-S-S-T-P-S-P-G-S-G-C-E-V-D-G

20 secuencia en la que C puede ser sustituido por S, y S por C

- y un coadyuvante que induce preferiblemente una respuesta de mediación celular.

25 2. Mezcla vacunal terapéutica según la reivindicación 1, **caracterizada** porque las secuencias A16E y A16G están asociadas preferiblemente a la misma concentración.

30 3. Mezcla vacunal terapéutica según la reivindicación 1 ó 2 **caracterizada** porque el coadyuvante es dipéptido de muramilo.

35 4. Mezcla vacunal terapéutica según la reivindicación 3 **caracterizada** porque el dipéptido de muramilo está asociado a los péptidos A16E o A16G en una proporción en peso de péptido con respecto al coadyuvante desde 1/0,1 hasta 1/6.

5. Mezcla vacunal terapéutica según la reivindicación 3 ó 4 **caracterizada** porque el dipéptido de muramilo está asociado a los péptidos A16E o A16G en una proporción de 50 µg de proteínas por 100 µg de dipéptido de muramilo.

40 6. Mezcla vacunal terapéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, **caracterizada** porque los péptidos A16E o A16G se construyen en *octopus* a o se unen a grandes moléculas del tipo de KLH o lípidos, o se incluyen en liposomas para hacerlos inmunógenos.

45 7. Mezcla vacunal terapéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, preparada de tal forma que pueda ser administrada por diferentes vías: cutánea, intradérmica, intramuscular, intravenosa, parenteral y oral.

8. Utilización de la mezcla vacunal según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para la elaboración de un medicamento o de una vacuna o de un reactivo de diagnóstico *in vivo* o *in vitro* para la inducción o el diagnóstico en un mamífero de una activación de la inmunidad de mediación celular dependiente de los linfocitos T de tipo Th1.

50 9. Utilización de la mezcla vacunal según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para la elaboración de un medicamento o de una vacuna o de un reactivo de diagnóstico *in vivo* o *in vitro* para la inducción o el diagnóstico en un mamífero del paso de un estado inmunitario de tipo Th2 hacia un estado inmunitario de tipo Th1.

55 10. Utilización de la mezcla vacunal según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para la elaboración de un medicamento o de una vacuna o de un reactivo de diagnóstico *in vivo* o *in vitro* para la inducción o el diagnóstico en un mamífero de isotipos de anticuerpos específicos, tal como las IgG2 en el perro, de la inmunidad de mediación celular dependiente de los linfocitos T de tipo Th1.

60 11. Kit de diagnóstico *in vitro* que comprende la mezcla vacunal según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 **caracterizado** porque los péptidos A16E y A16G se unen a moléculas grandes del tipo de la biotina o la polilisina para hacerlos más antigénicos.

65 12. Kit de diagnóstico *in vitro* que comprende la mezcla vacunal según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 **caracterizado** porque los péptidos A16E y A16G están unidos mediante glutaraldehído.

13. Kit de diagnóstico *in vitro* según la reivindicación 11 ó 12, **caracterizado** porque los péptidos A16E y A16G están unidos a un soporte sólido.

ES 2 297 025 T3

14. Kit de diagnóstico *in vitro* según la reivindicación 13, **caracterizado** porque los péptidos A16E y A16G están unidos a membranas de nitrocelulosa o a otros polímeros, soportes de látex y diversos materiales plásticos (polímero).

5 15. Kit de diagnóstico *in vitro* según una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 14 **caracterizado** porque los péptidos A16E y A16G están conjugados con radioisótopos, con moléculas fluorescentes, con moléculas luminiscentes, con enzimas o con partículas de color.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 297 025 T3

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> ORIDAN INC.
- 5 <120> Complejo peptídico vacunal terapéutico destinado a la prevención y al tratamiento de afecciones en los mamíferos
- <130> B118 12EUR 3
- 10 <140> EP02785499.1
<141> 2002-09-13
- 15 <150> PCT/FR0203134
<151> 2002-09-13
- <160> 156
- 20 <170> PatentIn version 3.1
- <210> 1
- 25 <211> 16
<212> PRT
<213> *Leishmania sp.*
- 30 <220>
<221> misc_feature
<223> S puede ser reemplazado por C y L por I
- 35 <400> 1
- | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Ala | Ala | Arg | Ser | Ala | Arg | Ser | Arg | Glu | Gly | Tyr | Ser | Leu | Thr | Asp | Glu |
| 1 | | | 5 | | | | | 10 | | | | | | 15 | |
- 40 <210> 2
<211> 15
<212> PRT
- 45 <213> *Leishmania sp.*
- <220>
<221> MISC_FEATURE
- 50 <223> S puede ser reemplazado por C y L por I
- <400> 2
- | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Ala | Ala | Arg | Ser | Ala | Arg | Ser | Arg | Glu | Gly | Tyr | Ser | Leu | Thr | Asp |
| 1 | | | 5 | | | | | 10 | | | | | | 15 |
- <210> 3
- 60 <211> 15
<212> PRT
<213> *Leishmania sp.*
- 65 <220>
<221> MISC_FEATURE
<223> S puede ser reemplazado por C y L por I

ES 2 297 025 T3

<400> 3

Ala Arg Ser Ala Arg Ser Arg Glu Gly Tyr Ser Leu Thr Asp Glu
1 5 10 15

5

<210> 4

<211> 14

10 <212> PRT

<213> *Leishmania sp.*

<220>

15 <221> MISC_FEATURE

<223> S puede ser reemplazado por C y L por I

<400> 4

20

Ala Ala Arg Ser Ala Arg Ser Arg Glu Gly Tyr Ser Leu Thr
1 5 10

<210> 5

25

<211> 14

<212> PRT

<213> *Leishmania sp.*

30

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> S puede ser reemplazado por C y L por I

35

<400> 5

Ala Arg Ser Ala Arg Ser Arg Glu Gly Tyr Ser Leu Thr Asp
1 5 10

40

<210> 6

<211> 14

45 <212> PRT

<213> *Leishmania sp.*

<220>

50 <221> MISC_FEATURE

<223> S puede ser reemplazado por C y L por I

<400> 6

55

Arg Ser Ala Arg Ser Arg Glu Gly Tyr Ser Leu Thr Asp Glu
1 5 10

<210> 7

60

<211> 13

<212> PRT

<213> *Leishmania sp.*

65

<220>

<221> MISC_FEATURE

ES 2 297 025 T3

<223> S puede ser reemplazado por C y L por I

<400> 7

5 Ala Ala Arg Ser Ala Arg Ser Arg Glu Gly Tyr Ser Leu
1 5 10

<210> 8

10 <211> 13
<212> PRT
<213> *Leishmania sp.*

15 <220>
<221> MISC_FEATURE
<223> S puede ser reemplazado por C y L por I

20 <400> 8

Ala Arg Ser Ala Arg Ser Arg Glu Gly Tyr Ser Leu Thr
1 5 10

25 <210> 9
<211> 13
<212> PRT

30 <213> *Leishmania sp.*

<220>
<221> MISC_FEATURE

35 <223> S puede ser reemplazado por C y L por I

<400> 9

40 Arg Ser Ala Arg Ser Arg Glu Gly Tyr Ser Leu Thr Asp
1 5 10

<210> 10

45 <211> 13
<212> PRT
<213> *Leishmania sp.*

50 <220>
<221> MISC_FEATURE
<223> S puede ser reemplazado por C y L por I

55 <400> 10

Ser Ala Arg Ser Arg Glu Gly Tyr Ser Leu Thr Asp Glu
1 5 10

60 <210> 11
<211> 12
<212> PRT

65 <213> *Leishmania sp.*

ES 2 297 025 T3

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> S puede ser reemplazado por C

5

<400> 11

Ala Ala Arg Ser Ala Arg Ser Arg Glu Gly Tyr Ser
1 5 10

10

<210> 12

<211> 12

15

<212> PRT

<213> *Leishmania sp.*

<220>

20

<221> MISC_FEATURE

<223> S puede ser reemplazado por C y L por I

<400> 12

25

Ala Arg Ser Ala Arg Ser Arg Glu Gly Tyr Ser Leu
1 5 10

30

<210> 13

<211> 12

<212> PRT

<213> *Leishmania sp.*

35

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> S puede ser reemplazado por C y L por I

40

<400> 13

Arg Ser Ala Arg Ser Arg Glu Gly Tyr Ser Leu Thr
1 5 10

45

<210> 14

<211> 12

50

<212> PRT

<213> *Leishmania sp.*

<220>

55

<221> MISC_FEATURE

<223> S puede ser reemplazado por C y L por I

<400> 14

60

Ser Ala Arg Ser Arg Glu Gly Tyr Ser Leu Thr Asp
1 5 10

65

<210> 15

<211> 12

<212> PRT

ES 2 297 025 T3

<213> *Leishmania sp.*

<220>

5 <221> MISC_FEATURE
<223> S puede ser reemplazado por C y L por I

<400> 15

10 Ala Arg Ser Arg Glu Gly Tyr Ser Leu Thr Asp Glu
1 5 10

<210> 16

15 <211> 11
<212> PRT
<213> *Leishmania sp.*

20 <220>
<221> MISC_FEATURE
<223> C puede ser reemplazado por S

25 <220>
<221> MISC_FEATURE
<223> S puede ser reemplazado por C

30 <400> 16

Ala Ala Arg Ser Ala Arg Ser Arg Glu Gly Tyr
1 5 10

35 <210> 17
<211> 11
<212> PRT
<213> *Leishmania sp.*

<220>

45 <221> MISC_FEATURE
<223> C puede ser reemplazado por S

<400> 17

50 Ala Arg Ser Ala Arg Ser Arg Glu Gly Tyr Ser
1 5 10

<210> 18

55 <211> 11
<212> PRT
<213> *Leishmania sp.*

60 <220>
<221> MISC_FEATURE
<223> S puede ser reemplazado por C y L por I

65

ES 2 297 025 T3

<400> 18

Arg Ser Ala Arg Ser Arg Glu Gly Tyr Ser Leu
1 5 10

5

<210> 19

<211> 11

10 <212> PRT

<213> *Leishmania sp.*

<220>

15 <221> MISC_FEATURE

<223> S puede ser reemplazado por C y L por I

<400> 19

20 Ser Ala Arg Ser Arg Glu Gly Tyr Ser Leu Thr
1 5 10

<210> 20

25 <211> 11

<212> PRT

<213> *Leishmania sp.*

30

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> S puede ser reemplazado por C y L por I

35

<400> 20

Ala Arg Ser Arg Glu Gly Tyr Ser Leu Thr Asp
1 5 10

40

<210> 21

<211> 11

45 <212> PRT

<213> *Leishmania sp.*

<220>

50 <221> MISC_FEATURE

<223> S puede ser reemplazado por C y L por I

<400> 21

55 Arg Ser Arg Glu Gly Tyr Ser Leu Thr Asp Glu
1 5 10

<210> 22

60 <211> 10

<212> PRT

<213> *Leishmania sp.*

65

<220>

<221> MISC_FEATURE

ES 2 297 025 T3

<223> S puede ser reemplazado por C

<400> 22

5 Ala Ala Arg Ser Ala Arg Ser Arg Glu Gly
1 5 10

<210> 23

10 <211> 10
<212> PRT
<213> *Leishmania sp.*

15 <220>
<221> MISC_FEATURE
<223> S puede ser reemplazado por C

20 <400> 23

Ala Arg Ser Ala Arg Ser Arg Glu Gly Tyr
1 5 10

25 <210> 24
<211> 10
<212> PRT

30 <213> *Leishmania sp.*

<220>
<221> MISC_FEATURE

35 <223> S puede ser reemplazado por C

<400> 24

40 Arg Ser Ala Arg Ser Arg Glu Gly Tyr Ser
1 5 10

<210> 25

45 <211> 10
<212> PRT
<213> *Leishmania sp.*

50 <220>
<221> MISC_FEATURE
<223> S puede ser reemplazado por C y L por I

55 <400> 25

Ser Ala Arg Ser Arg Glu Gly Tyr Ser Leu
1 5 10

60 <210> 26
<211> 10
<212> PRT

65 <213> *Leishmania sp.*

ES 2 297 025 T3

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> S puede ser reemplazado por C y L por I

5

<400> 26

Ala Arg Ser Arg Glu Gly Tyr Ser Leu Thr
1 5 10

10

<210> 27

<211> 10

15

<212> PRT

<213> *Leishmania sp.*

<220>

20

<221> MISC_FEATURE

<223> S puede ser reemplazado por C y L por I

<400> 27

25

Arg Ser Arg Glu Gly Tyr Ser Leu Thr Asp
1 5 10

30

<210> 28

<211> 10

<212> PRT

<213> *Leishmania sp.*

35

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> S puede ser reemplazado por C y L por I

40

<400> 28

Ser Arg Glu Gly Tyr Ser Leu Thr Asp Glu
1 5 10

45

<210> 29

<211> 9

50

<212> PRT

<213> *Leishmania sp.*

<220>

55

<221> MISC_FEATURE

<223> S puede ser reemplazado por C

<400> 29

60

Ala Ala Arg Ser Ala Arg Ser Arg Glu
1 5

65

<210> 30

<211> 9

<212> PRT

ES 2 297 025 T3

<213> *Leishmania sp.*

<220>

5 <221> MISC_FEATURE
<223> S puede ser reemplazado por C

<400> 30

10 Ala Arg Ser Ala Arg Ser Arg Glu Gly
1 5

<210> 31

15 <211> 9
<212> PRT
<213> *Leishmania sp.*

20 <220>
<221> MISC_FEATURE
<223> S puede ser reemplazado por C

25 <400> 31

Arg Ser Ala Arg Ser Arg Glu Gly Tyr
1 5

30 <210> 32
<211> 9
<212> PRT

35 <213> *Leishmania sp.*

<220>

40 <221> MISC_FEATURE
<223> S puede ser reemplazado por C

<400> 32

45 Ser Ala Arg Ser Arg Glu Gly Tyr Ser
1 5

<210> 33

50 <211> 9
<212> PRT
<213> *Leishmania sp.*

55 <220>
<221> MISC_FEATURE
<223> S puede ser reemplazado por C y L por I

60 <400> 33

Ala Arg Ser Arg Glu Gly Tyr Ser Leu
1 5

65 <210> 34

ES 2 297 025 T3

<211> 9
<212> PRT
<213> *Leishmania sp.*

5
<220>
<221> MISC_FEATURE
<223> S puede ser reemplazado por C y L por I

10
<400> 34
Arg Ser Arg Glu Gly Tyr Ser Leu Thr
1 5

15
<210> 35
<211> 9
<212> PRT
<213> *Leishmania sp.*

<220>
25 <221> MISC_FEATURE
<223> S puede ser reemplazado por C y L por I

<400> 35
30 Ser Arg Glu Gly Tyr Ser Leu Thr Asp
1 5

35 <210> 36
<211> 9
<212> PRT
<213> *Leishmania sp.*

40
<220>
<221> MISC_FEATURE
<223> S puede ser reemplazado por C y L por I

45
<400> 36
Arg Glu Gly Tyr Ser Leu Thr Asp Glu
1 5

50
<210> 37
<211> 8
<212> PRT
<213> *Leishmania sp.*

<220>
60 <221> MISC_FEATURE
<223> S puede ser reemplazado por C

<400> 37
65 Ala Ala Arg Ser Ala Arg Ser Arg
1 5

ES 2 297 025 T3

<210> 38
<211> 8
<212> PRT
5 <213> *Leishmania sp.*

<220>
<221> MISC_FEATURE
10 <223> S puede ser reemplazado por C

<400> 38
15 Ala Arg Ser Ala Arg Ser Arg Glu
1 5

<210> 39
20 <211> 8
<212> PRT
<213> *Leishmania sp.*

25 <220>
<221> MISC_FEATURE
<223> S puede ser reemplazado por C

30 <400> 39
Arg Ser Ala Arg Ser Arg Glu Gly
1 5

35 <210> 40
<211> 8
<212> PRT
40 <213> *Leishmania sp.*

<220>
<221> MISC_FEATURE
45 <223> S puede ser reemplazado por C

<400> 40
50 Ser Ala Arg Ser Arg Glu Gly Tyr
1 5

<210> 41
55 <211> 8
<212> PRT
<213> *Leishmania sp.*

60 <220>
<221> MISC_FEATURE
<223> S puede ser reemplazado por C

65

ES 2 297 025 T3

<400> 41

Ala Arg Ser Arg Glu Gly Tyr Ser
1 5

5

<210> 42

<211> 8

10 <212> PRT

<213> *Leishmania sp.*

<220>

15 <221> MISC_FEATURE

<223> S puede ser reemplazado por C y L por I

<400> 42

20

Arg Ser Arg Glu Gly Tyr Ser Leu
1 5

<210> 43

25

<211> 8

<212> PRT

<213> *Leishmania sp.*

30

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> S puede ser reemplazado por C y L por I

35

<400> 43

Ser Arg Glu Gly Tyr Ser Leu Thr
1 5

40

<210> 44

<211> 8

<212> PRT

45

<213> *Leishmania sp.*

<220>

50 <221> MISC_FEATURE

<223> S puede ser reemplazado por C y L por I

<400> 44

55

Arg Glu Gly Tyr Ser Leu Thr Asp
1 5

<210> 45

60

<211> 8

<212> PRT

<213> *Leishmania sp.*

65

<220>

<221> MISC_FEATURE

ES 2 297 025 T3

<223> S puede ser reemplazado por C y L por I

<400> 45

5 Glu Gly Tyr Ser Leu Thr Asp Glu
 1 5

<210> 46

10 <211> 7

<212> PRT

<213> *Leishmania sp.*

15 <220>

<221> MISC_FEATURE

<223> S puede ser reemplazado por C

20 <400> 46

 Ala Ala Arg Ser Ala Arg Ser
 1 5

25

<210> 47

<211> 7

<212> PRT

30 <213> *Leishmania sp.*

<220>

35 <221> MISC_FEATURE

<223> S puede ser reemplazado por C

<400> 47

40 Ala Arg Ser Ala Arg Ser Arg
 1 5

<210> 48

45 <211> 7

<212> PRT

<213> *Leishmania sp.*

50 <220>

<221> MISC_FEATURE

<223> S puede ser reemplazado por C

55 <400> 48

 Arg Ser Ala Arg Ser Arg Glu
 1 5

60

<210> 49

<211> 7

<212> PRT

65 <213> *Leishmania sp.*

ES 2 297 025 T3

<220>
<221> MISC_FEATURE
<223> S puede ser reemplazado por C
5
<400> 49
Ser Ala Arg Ser Arg Glu Gly
1 5
10
<210> 50
<211> 7
15 <212> PRT
<213> *Leishmania sp.*
<220>
20 <221> MISC_FEATURE
<223> S puede ser reemplazado por C
<400> 50
25 Ala Arg Ser Arg Glu Gly Tyr
1 5
30 <210> 51
<211> 7
<212> PRT
<213> *Leishmania sp.*
35 <220>
<221> MISC_FEATURE
<223> S puede ser reemplazado por C
40 <400> 51
Arg Ser Arg Glu Gly Tyr Ser
1 5
45 <210> 52
<211> 7
<212> PRT
50 <213> *Leishmania sp.*
<220>
55 <221> MISC_FEATURE
<223> S puede ser reemplazado por C y L por I
<400> 52
60 Ser Arg Glu Gly Tyr Ser Leu
1 5
65 <210> 53
<211> 7
<212> PRT

ES 2 297 025 T3

<213> *Leishmania sp.*

<220>

5 <221> MISC_FEATURE
<223> S puede ser reemplazado por C y L por I

<400> 53

10 Arg Glu Gly Tyr Ser Leu Thr
1 5

<210> 54

15 <211> 7
<212> PRT
<213> *Leishmania sp.*

20 <220>
<221> MISC_FEATURE
<223> S puede ser reemplazado por C y L por I

25 <400> 54

Glu Gly Tyr Ser Leu Thr Asp
1 5

30 <210> 55
<211> 7
<212> PRT

35 <213> *Leishmania sp.*

<220>

40 <221> MISC_FEATURE
<223> S puede ser reemplazado por C y L por I

<400> 55

45 Gly Tyr Ser Leu Thr Asp Glu
1 5

<210> 56

50 <211> 6
<212> PRT
<213> *Leishmania sp.*

55 <220>
<221> MISC_FEATURE
<223> S puede ser reemplazado por C

60 <400> 56

Ala Ala Arg Ser Ala Arg
1 5

65 <210> 57

ES 2 297 025 T3

<211> 6
<212> PRT
<213> *Leishmania sp.*
5
<220>
<221> MISC_FEATURE
<223> S puede ser reemplazado por C
10
<400> 57
Ala Arg Ser Ala Arg Ser
1 5
15
<210> 58
<211> 6
20 <212> PRT
<213> *Leishmania sp.*
<220>
25 <221> MISC_FEATURE
<223> S puede ser reemplazado por C
<400> 58
30 Arg Ser Ala Arg Ser Arg
1 5
35 <210> 59
<211> 6
<212> PRT
<213> *Leishmania sp.*
40 <220>
<221> MISC_FEATURE
<223> S puede ser reemplazado por C
45 <400> 59
Ser Ala Arg Ser Arg Glu
1 5
50 <210> 60
<211> 6
55 <212> PRT
<213> *Leishmania sp.*
<220>
60 <221> MISC_FEATURE
<223> S puede ser reemplazado por C
<400> 60
65 Ala Arg Ser Arg Glu Gly
1 5

ES 2 297 025 T3

- <210> 61
<211> 6
<212> PRT
5 <213> *Leishmania sp.*
- <220>
<221> MISC_FEATURE
10 <223> S puede ser reemplazado por C
- <400> 61
15 Arg Ser Arg Glu Gly Tyr
1 5
- <210> 62
20 <211> 6
<212> PRT
<213> *Leishmania sp.*
- 25 <220>
<221> MISC_FEATURE
<223> S puede ser reemplazado por C
- 30 <400> 62
Ser Arg Glu Gly Tyr Ser
1 5
- 35 <210> 63
<211> 6
<212> PRT
40 <213> *Leishmania sp.*
- <220>
<221> MISC_FEATURE
45 <223> S puede ser reemplazado por C y L por I
- <400> 63
50 Arg Glu Gly Tyr Ser Leu
1 5
- <210> 64
55 <211> 6
<212> PRT
<213> *Leishmania sp.*
- 60 <220>
<221> MISC_FEATURE
<223> S puede ser reemplazado por C y L por I
- 65

ES 2 297 025 T3

<400> 64

Glu Gly Tyr Ser Leu Thr
1 5

5

<210> 65

<211> 6

10 <212> PRT

<213> *Leishmania sp.*

<220>

15 <221> MISC_FEATURE

<223> S puede ser reemplazado por C y L por I

<400> 65

20

Gly Tyr Ser Leu Thr Asp
1 5

<210> 66

25

<211> 6

<212> PRT

<213> *Leishmania sp.*

30

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> S puede ser reemplazado por C y L por I

35

<400> 66

Tyr Ser Leu Thr Asp Glu
1 5

40

<210> 67

<211> 5

45 <212> PRT

<213> *Leishmania sp.*

<220>

50 <221> MISC_FEATURE

<223> S puede ser reemplazado por C

<400> 67

55

Ala Ala Arg Ser Ala
1 5

<210> 68

60

<211> 5

<212> PRT

<213> *Leishmania sp.*

65

<220>

<221> MISC_FEATURE

ES 2 297 025 T3

<223> S puede ser reemplazado por C

<400> 68

5 Ala Arg Ser Ala Arg
1 5

<210> 69

10 <211> 5
<212> PRT
<213> *Leishmania sp.*

15 <220>
<221> MISC_FEATURE
<223> S puede ser reemplazado por C

20 <400> 69

Arg Ser Ala Arg Ser
1 5

25 <210> 70
<211> 5
<212> PRT

30 <213> *Leishmania sp.*

<220>
<221> MISC_FEATURE

35 <223> S puede ser reemplazado por R

<400> 70

40 Ser Ala Arg Ser Arg
1 5

<210> 71

45 <211> 5
<212> PRT
<213> *Leishmania sp.*

50 <220>
<221> MISC_FEATURE
<223> S puede ser reemplazado por C

55 <400> 71

Ala Arg Ser Arg Glu
1 5

60 <210> 72
<211> 5
<212> PRT

65 <213> *Leishmania sp.*

ES 2 297 025 T3

<220>
<221> MISC_FEATURE
<223> S puede ser reemplazado por C
5
<400> 72
Arg Ser Arg Glu Gly
1 5
10
<210> 73
<211> 5
15 <212> PRT
<213> *Leishmania sp.*
<220>
20 <221> MISC_FEATURE
<223> S puede ser reemplazado por C
<400> 73
25 Ser Arg Glu Gly Tyr
1 5
30 <210> 74
<211> 5
<212> PRT
<213> *Leishmania sp.*
35 <220>
<221> MISC_FEATURE
<223> S puede ser reemplazado por C
40 <400> 74
Arg Glu Gly Tyr Ser
1 5
45 <210> 75
<211> 5
<212> PRT
50 <213> *Leishmania sp.*
<220>
55 <221> MISC_FEATURE
<223> S puede ser reemplazado por C y L por I
<400> 75
60 Glu Gly Tyr Ser Leu
1 5
65 <210> 76
<211> 5
<212> PRT

ES 2 297 025 T3

<213> *Leishmania sp.*

<220>

5 <221> MISC_FEATURE
<223> S puede ser reemplazado por C y L por I

<400> 76

10 Gly Tyr Ser Leu Thr
1 5

<210> 77

15 <211> 5
<212> PRT
<213> *Leishmania sp.*

20 <220>
<221> MISC_FEATURE
<223> S puede ser reemplazado por C y L por I

25 <400> 77

Tyr Ser Leu Thr Asp
1 5

30 <210> 78
<211> 5
<212> PRT
<213> *Leishmania sp.*

<220>

40 <221> MISC_FEATURE
<223> S puede ser reemplazado por C y L por I

<400> 78

45 Ser Leu Thr Asp Glu
1 5

<210> 79

50 <211> 16
<212> PRT
<213> *Leishmania sp.*

55 <220>
<221> misc_feature
<223> C puede ser reemplazado por S, y S por C

60 <400> 79

Ala Ala Ser Ser Thr Pro Ser Pro Gly Ser Gly Cys Glu Val Asp Gly
1 5 10 15

65 <210> 80

ES 2 297 025 T3

<211> 15
 <212> PRT
 <213> *Leishmania sp.*
 5
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> C puede ser reemplazado por S y S por C
 10
 <400> 80
 Ala Ala Ser Ser Thr Pro Ser Pro Gly Ser Gly Cys Glu Val Asp
 15 1 5 10 15
 <210> 81
 <211> 15
 20 <212> PRT
 <213> *Leishmania sp.*
 <220>
 25 <221> MISC_FEATURE
 <223> C puede ser reemplazado por S y S por C
 <400> 81
 30 Ala Ser Ser Thr Pro Ser Pro Gly Ser Gly Cys Glu Val Asp Gly
 1 5 10 15
 <210> 82
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> *Leishmania sp.*
 40 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> C puede ser reemplazado por S y S por C
 45 <400> 82
 Ala Ala Ser Ser Thr Pro Ser Pro Gly Ser Gly Cys Glu Val
 50 1 5 10
 <210> 83
 <211> 14
 55 <212> PRT
 <213> *Leishmania sp.*
 <220>
 60 <221> MISC_FEATURE
 <223> C puede ser reemplazado por S y S por C
 <400> 83
 65 Ala Ser Ser Thr Pro Ser Pro Gly Ser Gly Cys Glu Val Asp
 1 5 10

ES 2 297 025 T3

<210> 84
<211> 14
<212> PRT
5 <213> *Leishmania sp.*

<220>
<221> MISC_FEATURE
10 <223> C puede ser reemplazado por S y S por C

<400> 84
15 Ser Ser Thr Pro Ser Pro Gly Ser Gly Cys Glu Val Asp Gly
1 5 10

<210> 85
20 <211> 13
<212> PRT
<213> *Leishmania sp.*

25 <220>
<221> MISC_FEATURE
<223> C puede ser reemplazado por S y S por C

30 <400> 85
Ala Ala Ser Ser Thr Pro Ser Pro Gly Ser Gly Cys Glu
1 5 10

35 <210> 86
<211> 13
<212> PRT
40 <213> *Leishmania sp.*

<220>
<221> MISC_FEATURE
45 <223> C puede ser reemplazado por S y S por C

<400> 86
50 Ala Ser Ser Thr Pro Ser Pro Gly Ser Gly Cys Glu Val
1 5 10

<210> 87
55 <211> 13
<212> PRT
<213> *Leishmania sp.*

60 <220>
<221> MISC_FEATURE
<223> C puede ser reemplazado por S y S por C

65

ES 2 297 025 T3

<400> 87

Ser Ser Thr Pro Ser Pro Gly Ser Gly Cys Glu Val Asp
1 5 10

5

<210> 88

<211> 13

10 <212> PRT

<213> *Leishmania sp.*

<220>

15 <221> MISC_FEATURE

<223> C puede ser reemplazado por S y S por C

<400> 88

20 Ser Thr Pro Ser Pro Gly Ser Gly Cys Glu Val Asp Gly
1 5 10

25 <210> 89

<211> 12

<212> PRT

<213> *Leishmania sp.*

30

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> C puede ser reemplazado por S y S por C

35

<400> 89

Ala Ala Ser Ser Thr Pro Ser Pro Gly Ser Gly Cys
1 5 10

40

<210> 90

<211> 12

45 <212> PRT

<213> *Leishmania sp.*

<220>

50 <221> MISC_FEATURE

<223> C puede ser reemplazado por S y S por C

<400> 90

55 Ala Ser Ser Thr Pro Ser Pro Gly Ser Gly Cys Glu
1 5 10

60 <210> 91

<211> 12

<212> PRT

<213> *Leishmania sp.*

65

<220>

<221> MISC_FEATURE

ES 2 297 025 T3

<223> C puede ser reemplazado por S y S por C

<400> 91

5 Ser Ser Thr Pro Ser Pro Gly Ser Gly Cys Glu Val
 1 5 10

<210> 92

10 <211> 12

<212> PRT

<213> *Leishmania sp.*

15 <220>

<221> MISC_FEATURE

<223> C puede ser reemplazado por S y S por C

20 <400> 92

 Ser Thr Pro Ser Pro Gly Ser Gly Cys Glu Val Asp
 1 5 10

25 <210> 93

<211> 12

<212> PRT

30 <213> *Leishmania sp.*

<220>

<221> MISC_FEATURE

35 <223> C puede ser reemplazado por S y S por C

<400> 93

40 Thr Pro Ser Pro Gly Ser Gly Cys Glu Val Asp Gly
 1 5 10

<210> 94

45 <211> 11

<212> PRT

<213> *Leishmania sp.*

50 <220>

<221> MISC_FEATURE

<223> S puede ser reemplazado por C

55 <400> 94

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

60 <210> 95

<211> 11

<212> PRT

65 <213> *Leishmania sp.*

ES 2 297 025 T3

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> C puede ser reemplazado por S y S por C
 5
 <400> 95
 Ala Ser Ser Thr Pro Ser Pro Gly Ser Gly Cys
 1 5 10
 10
 <210> 96
 <211> 11
 15 <212> PRT
 <213> *Leishmania sp.*

 <220>
 20 <221> MISC_FEATURE
 <223> C puede ser reemplazado por S y S por C

 <400> 96
 25 Ser Ser Thr Pro Ser Pro Gly Ser Gly Cys Glu
 1 5 10

 30 <210> 97
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Leishmania sp.*
 35
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> C puede ser reemplazado por S y S por C
 40
 <400> 97
 Ser Thr Pro Ser Pro Gly Ser Gly Cys Glu Val
 1 5 10
 45
 <210> 98
 <211> 11
 50 <212> PRT
 <213> *Leishmania sp.*

 <220>
 55 <221> MISC_FEATURE
 <223> C puede ser reemplazado por S y S por C

 <400> 98
 60 Thr Pro Ser Pro Gly Ser Gly Cys Glu Val Asp
 1 5 10

 65 <210> 99
 <211> 11
 <212> PRT

ES 2 297 025 T3

<213> *Leishmania sp.*

<220>

5 <221> MISC_FEATURE
<223> C puede ser reemplazado por S y S por C

<400> 99

10 Pro Ser Pro Gly Ser Gly Cys Glu Val Asp Gly
1 5 10

<210> 100

15 <211> 10
<212> PRT
<213> *Leishmania sp.*

20 <220>
<221> MISC_FEATURE
<223> S puede ser reemplazado por C

25 <400> 100

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

30 <210> 101
<211> 10
<212> PRT

35 <213> *Leishmania sp.*

<220>

40 <221> MISC_FEATURE
<223> S puede ser reemplazado por C

<400> 101

45 Ala Ser Ser Thr Pro Ser Pro Gly Ser Gly
1 5 10

<210> 102

50 <211> 10
<212> PRT
<213> *Leishmania sp.*

55 <220>
<221> MISC_FEATURE
<223> C puede ser reemplazado por S y S por C

60 <400> 102

Ser Ser Thr Pro Ser Pro Gly Ser Gly Cys
1 5 10

65 <210> 103

ES 2 297 025 T3

<211> 10
 <212> PRT
 <213> *Leishmania sp.*
 5
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> C puede ser reemplazado por S y S por C
 10
 <400> 103
 Ser Thr Pro Ser Pro Gly Ser Gly Cys Glu
 1 5 10
 15
 <210> 104
 <211> 10
 20 <212> PRT
 <213> *Leishmania sp.*
 <220>
 25 <221> MISC_FEATURE
 <223> C puede ser reemplazado por S y S por C
 <400> 104
 30 Thr Pro Ser Pro Gly Ser Gly Cys Glu Val
 1 5 10
 35 <210> 105
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Leishmania sp.*
 40 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> C puede ser reemplazado por S y S por C
 45 <400> 105
 Pro Ser Pro Gly Ser Gly Cys Glu Val Asp
 1 5 10
 50 <210> 106
 <211> 10
 55 <212> PRT
 <213> *Leishmania sp.*
 <220>
 60 <221> MISC_FEATURE
 <223> C puede ser reemplazado por S y S por C
 <400> 106
 65 Ser Pro Gly Ser Gly Cys Glu Val Asp Gly
 1 5 10

ES 2 297 025 T3

<210> 107
<211> 9
<212> PRT
5 <213> *Leishmania sp.*

<220>
<221> MISC_FEATURE
10 <223> S puede ser reemplazado por C

<400> 107
15 Ala Ala Ser Ser Thr Pro Ser Pro Gly
1 5

<210> 108
20 <211> 9
<212> PRT
<213> *Leishmania sp.*

25 <220>
<221> MISC_FEATURE
<223> S puede ser reemplazado por C

30 <400> 108
Ala Ser Ser Thr Pro Ser Pro Gly Ser
1 5

35 <210> 109
<211> 9
<212> PRT
40 <213> *Leishmania sp.*

<220>
<221> MISC_FEATURE
45 <223> S puede ser reemplazado por C

<400> 109
50 Ser Ser Thr Pro Ser Pro Gly Ser Gly
1 5

<210> 110
55 <211> 9
<212> PRT
<213> *Leishmania sp.*

60 <220>
<221> MISC_FEATURE
<223> C puede ser reemplazado por S y S por C

65

ES 2 297 025 T3

<400> 110

Ser Thr Pro Ser Pro Gly Ser Gly Cys
1 5

5

<210> 111

<211> 9

10 <212> PRT

<213> *Leishmania sp.*

<220>

15 <221> MISC_FEATURE

<223> C puede ser reemplazado por S y S por C

<400> 111

20 Thr Pro Ser Pro Gly Ser Gly Cys Glu
1 5

<210> 112

25 <211> 9

<212> PRT

<213> *Leishmania sp.*

30

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> C puede ser reemplazado por S y S por C

35

<400> 112

Pro Ser Pro Gly Ser Gly Cys Glu Val
1 5

40

<210> 113

<211> 9

45 <212> PRT

<213> *Leishmania sp.*

<220>

50 <221> MISC_FEATURE

<223> C puede ser reemplazado por S y S por C

<400> 113

55 Ser Pro Gly Ser Gly Cys Glu Val Asp
1 5

<210> 114

60 <211> 9

<212> PRT

<213> *Leishmania sp.*

65

<220>

<221> MISC_FEATURE

ES 2 297 025 T3

<223> C puede ser reemplazado por S y S por C

<400> 114

5 Pro Gly Ser Gly Cys Glu Val Asp Gly
 1 5

<210> 115

10 <211> 8
<212> PRT
<213> *Leishmania sp.*

15 <220>
<221> MISC_FEATURE
<223> S puede ser reemplazado por C

20 <400> 115

 Ala Ala Ser Ser Thr Pro Ser Pro
 1 5

25 <210> 116
<211> 8
<212> PRT
<213> *Leishmania sp.*

30 <220>
<221> MISC_FEATURE
<223> S puede ser reemplazado por C

35 <400> 116

40 Ala Ser Ser Thr Pro Ser Pro Gly
 1 5

<210> 117

45 <211> 8
<212> PRT
<213> *Leishmania sp.*

50 <220>
<221> MISC_FEATURE
<223> S puede ser reemplazado por C

55 <400> 117

 Ser Ser Thr Pro Ser Pro Gly Ser
 1 5

60 <210> 118
<211> 8
<212> PRT
<213> *Leishmania sp.*

65

ES 2 297 025 T3

<220>
<221> MISC_FEATURE
<223> S puede ser reemplazado por C
5
<400> 118
Ser Thr Pro Ser Pro Gly Ser Gly
1 5
10
<210> 119
<211> 8
15 <212> PRT
<213> *Leishmania sp.*
<220>
20 <221> MISC_FEATURE
<223> C puede ser reemplazado por S y S por C
<400> 119
25 Thr Pro Ser Pro Gly Ser Gly Cys
1 5
30 <210> 120
<211> 8
<212> PRT
<213> *Leishmania sp.*
35 <220>
<221> MISC_FEATURE
<223> C puede ser reemplazado por S y S por C
40 <400> 120
Pro Ser Pro Gly Ser Gly Cys Glu
1 5
45 <210> 121
<211> 8
<212> PRT
50 <213> *Leishmania sp.*
<220>
55 <221> MISC_FEATURE
<223> C puede ser reemplazado por S y S por C
<400> 121
60 Ser Pro Gly Ser Gly Cys Glu Val
1 5
65 <210> 122
<211> 8
<212> PRT

ES 2 297 025 T3

<213> *Leishmania sp.*

<220>

5 <221> MISC_FEATURE
<223> C puede ser reemplazado por S y S por C

<400> 122

10 Pro Gly Ser Gly Cys Glu Val Asp
1 5

<210> 123

15 <211> 8
<212> PRT
<213> *Leishmania sp.*

20 <220>
<221> MISC_FEATURE
<223> C puede ser reemplazado por S y S por C

25 <400> 123

Gly Ser Gly Cys Glu Val Asp Gly
1 5

30 <210> 124
<211> 7
<212> PRT

35 <213> *Leishmania sp.*

<220>

40 <221> MISC_FEATURE
<223> S puede ser reemplazado por C

<400> 124

45 Ala Ala Ser Ser Thr Pro Ser
1 5

<210> 125

50 <211> 7
<212> PRT
<213> *Leishmania sp.*

55 <220>
<221> MISC_FEATURE
<223> S puede ser reemplazado por C

60 <400> 125

Ala Ser Ser Thr Pro Ser Pro
1 5

65 <210> 126

ES 2 297 025 T3

<211> 7
<212> PRT
<213> *Leishmania sp.*

5
<220>
<221> MISC_FEATURE
<223> S puede ser reemplazado por C

10
<400> 126

15
Ser Ser Thr Pro Ser Pro Gly
1 5

<210> 127
<211> 7
<212> PRT
<213> *Leishmania sp.*

20
<220>
<221> MISC_FEATURE
<223> S puede ser reemplazado por C

25
<400> 127

30
Ser Thr Pro Ser Pro Gly Ser
1 5

35
<210> 128
<211> 7
<212> PRT
<213> *Leishmania sp.*

40
<220>
<221> MISC_FEATURE
<223> S puede ser reemplazado por C

45
<400> 128

50
Thr Pro Ser Pro Gly Ser Gly
1 5

<210> 129
<211> 7
<212> PRT
<213> *Leishmania sp.*

55
<220>
<221> MISC_FEATURE
<223> S puede ser reemplazado por C y C por S

60
<400> 129

65
Pro Ser Pro Gly Ser Gly Cys
1 5

ES 2 297 025 T3

<210> 130
<211> 7
<212> PRT
5 <213> *Leishmania sp.*

<220>
<221> MISC_FEATURE
10 <223> S puede ser reemplazado por C y C por S

<400> 130
15 Ser Pro Gly Ser Gly Cys Glu
1 5

<210> 131
20 <211> 7
<212> PRT
<213> *Leishmania sp.*

25 <220>
<221> MISC_FEATURE
<223> S puede ser reemplazado por C y C por S

30 <400> 131
Pro Gly Ser Gly Cys Glu Val
1 5

35 <210> 132
<211> 7
<212> PRT
40 <213> *Leishmania sp.*

<220>
<221> MISC_FEATURE
45 <223> S puede ser reemplazado por C y C por S

<400> 132
50 Gly Ser Gly Cys Glu Val Asp
1 5

<210> 133
55 <211> 7
<212> PRT
<213> *Leishmania sp.*

60 <220>
<221> MISC_FEATURE
<223> S puede ser reemplazado por C y C por S

65

ES 2 297 025 T3

<400> 133
Ser Gly Cys Glu Val Asp Gly
1 5
5
<210> 134
<211> 6
<212> PRT
10 <213> *Leishmania sp.*

<220>
15 <221> MISC_FEATURE
<223> S puede ser reemplazado por C

<400> 134
20 Ala Ala Ser Ser Thr Pro
1 5

<210> 135
25 <211> 6
<212> PRT
<213> *Leishmania sp.*

30 <220>
<221> MISC_FEATURE
<223> S puede ser reemplazado por C
35 <400> 135

Ala Ser Ser Thr Pro Ser
1 5
40
<210> 136
<211> 6
<212> PRT
45 <213> *Leishmania sp.*

<220>
50 <221> MISC_FEATURE
<223> S puede ser reemplazado por C

<400> 136
55 Ser Ser Thr Pro Ser Pro
1 5

<210> 137
60 <211> 6
<212> PRT
<213> *Leishmania sp.*

65 <220>
<221> MISC_FEATURE

ES 2 297 025 T3

<223> S puede ser reemplazado por C

<400> 137

5 Ser Thr Pro Ser Pro Gly
 1 5

<210> 138

10 <211> 6
<212> PRT
<213> *Leishmania sp.*

15 <220>
<221> MISC_FEATURE
<223> S puede ser reemplazado por C

20 <400> 138

 Thr Pro Ser Pro Gly Ser
 1 5

25 <210> 139
<211> 6
<212> PRT

30 <213> *Leishmania sp.*

<220>
<221> MISC_FEATURE

35 <223> S puede ser reemplazado por C

<400> 139

40 Pro Ser Pro Gly Ser Gly
 1 5

<210> 140

45 <211> 6
<212> PRT
<213> *Leishmania sp.*

50 <220>
<221> MISC_FEATURE
<223> S puede ser reemplazado por C y C por S

55 <400> 140

 Ser Pro Gly Ser Gly Cys
 1 5

60 <210> 141
<211> 6
<212> PRT

65 <213> *Leishmania sp.*

ES 2 297 025 T3

<220>
<221> MISC_FEATURE
<223> S puede ser reemplazado por C y C por S
5
<400> 141
Pro Gly Ser Gly Cys Glu
1 5
10
<210> 142
<211> 6
15 <212> PRT
<213> *Leishmania sp.*
<220>
20 <221> MISC_FEATURE
<223> S puede ser reemplazado por C y C por S
<400> 142
25 Gly Ser Gly Cys Glu Val
1 5
30 <210> 143
<211> 6
<212> PRT
<213> *Leishmania sp.*
35 <220>
<221> MISC_FEATURE
<223> S puede ser reemplazado por C y C por S
40 <400> 143
Ser Gly Cys Glu Val Asp
1 5
45 <210> 144
<211> 6
<212> PRT
50 <213> *Leishmania sp.*
<220>
55 <221> MISC_FEATURE
<223> C puede ser reemplazado por S
<400> 144
60 Gly Cys Glu Val Asp Gly
1 5
65 <210> 145
<211> 5
<212> PRT

ES 2 297 025 T3

<213> *Leishmania sp.*

<220>

5 <221> MISC_FEATURE
<223> S puede ser reemplazado por C

<400> 145

10 Ala Ala Ser Ser Thr
1 5

<210> 146

15 <211> 5
<212> PRT
<213> *Leishmania sp.*

20 <220>
<221> MISC_FEATURE
<223> S puede ser reemplazado por C

25 <400> 146

Ala Ser Ser Thr Pro
1 5

30 <210> 147
<211> 5
<212> PRT

35 <213> *Leishmania sp.*

<220>

40 <221> MISC_FEATURE
<223> S puede ser reemplazado por C

<400> 147

45 Ser Ser Thr Pro Ser
1 5

<210> 148

50 <211> 5
<212> PRT
<213> *Leishmania sp.*

55 <220>
<221> MISC_FEATURE
<223> S puede ser reemplazado por C

60 <400> 148

Ser Thr Pro Ser Pro
1 5

65 <210> 149

ES 2 297 025 T3

<211> 5
<212> PRT
<213> *Leishmania sp.*
5
<220>
<221> MISC_FEATURE
<223> S puede ser reemplazado por C
10
<400> 149
 Thr Pro Ser Pro Gly
 1 5
15
<210> 150
<211> 5
20 <212> PRT
<213> *Leishmania sp.*

<220>
25 <221> MISC_FEATURE
<223> S puede ser reemplazado por C

<400> 150
30
 Pro Ser Pro Gly Ser
 1 5

35 <210> 151
<211> 5
<212> PRT
<213> *Leishmania sp.*
40
<220>
<221> MISC_FEATURE
<223> S puede ser reemplazado por C
45
<400> 151
 Ser Pro Gly Ser Gly
 1 5
50

<210> 152
<211> 5
55 <212> PRT
<213> *Leishmania sp.*

<220>
60 <221> MISC_FEATURE
<223> S puede ser reemplazado por C, y C por S

<400> 152
65
 Pro Gly Ser Gly Cys
 1 5

ES 2 297 025 T3

- <210> 153
<211> 5
<212> PRT
5 <213> *Leishmania sp.*
- <220>
<221> MISC_FEATURE
10 <223> S puede ser reemplazado por C, y C por S
- <400> 153
15 Gly Ser Gly Cys Glu
1 5
- <210> 154
20 <211> 5
<212> PRT
<213> *Leishmania sp.*
- 25 <220>
<221> MISC_FEATURE
<223> S puede ser reemplazado por C, y C por S
- 30 <400> 154
Ser Gly Cys Glu Val
1 5
- 35 <210> 155
<211> 5
<212> PRT
40 <213> *Leishmania sp.*
- <220>
<221> MISC_FEATURE
45 <223> C puede ser reemplazado por S
- <400> 155
50 Gly Cys Glu Val Asp
1 5
- <210> 156
55 <211> 5
<212> PRT
<213> *Leishmania sp.*
- 60 <220>
<221> MISC_FEATURE
<223> C puede ser reemplazado por S
- 65

ES 2 297 025 T3

<400> 156

Cys Glu Val Asp Gly
1 5

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65