



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 345 046**

51 Int. Cl.:

C07K 14/44 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03780614 .8**

96 Fecha de presentación : **26.12.2003**

97 Número de publicación de la solicitud: **1711520**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **18.10.2006**

54 Título: **Polipéptidos para el diagnóstico y el tratamiento de la leishmaniosis.**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
14.09.2010

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
14.09.2010

73 Titular/es: **All India Institute of Medical Sciences
Division of Clinical Microbiology
Department of Laboratory Medicine
Ansari Nagar, New Delhi 110029, IN
DEPARTMENT OF BIOTECHNOLOGY**

72 Inventor/es: **Singh, Sarman y
Sivakumar, Ramu**

74 Agente: **Zuazo Araluze, Alexander**

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

Polipéptidos para el diagnóstico y el tratamiento de la leishmaniosis.

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a compuestos y métodos para la detección de anticuerpos anti-*Leishmania* en individuos que se sospecha que están infectados con el parásito protozoario del género *Leishmania*; especialmente, el agente infeccioso es una cepa de la India y es similar o está estrechamente relacionado con cepas de *Leishmania* de la India. Además, la presente invención proporciona un kit de diagnóstico que consiste en el polipéptido mostrado en SEQ ID NO: 6 para la detección de anticuerpos anti-*Leishmania* en individuos en los que se producen respuestas inmunitarias contra especies de cepas de la India y similares o estrechamente relacionadas con cepas de *Leishmania* de la India, y también son útiles como vacuna y agente terapéutico para prevenir y tratar la leishmaniosis. La presente invención proporciona además un kit de diagnóstico que consiste en un anticuerpo producido contra polipéptidos mostrados en SEQ ID NO: 6 para la detección de antígenos de *Leishmania*.

Antecedentes de la invención

La leishmaniosis, una enfermedad parasitaria transmitida por vectores, está provocada por protozoos intramacrófagos obligados. Se caracteriza por su diversidad y complejidad. Se presenta por sí misma con una amplia gama de formas clínicas. Sin embargo, hay 4 formas clínicas principales. La leishmaniosis visceral (LV), también conocida como *kala azar*, es la forma más grave de la enfermedad que, si no se trata, tiene una tasa de mortalidad de casi el 100%. La leishmaniosis cutánea (LC) produce úlceras en la piel en las partes expuestas del cuerpo, tales como la cara, los brazos y las piernas. El número de úlceras puede variar desde 1 hasta tantas como 200 en algunos casos, provocando discapacidad grave y dejando al paciente cicatrices permanentes. La tercera forma es la leishmaniosis mucocutánea (LMC), o *espundia*. Puede conducir a una destrucción extensa y desfigurante de las membranas mucosas de las cavidades de la nariz, la boca y la garganta y puede implicar incluso al cartílago. La forma cutánea puede conducir a la forma diseminada, conocida como leishmaniosis cutánea difusa (LCD). La leishmaniosis está provocada por un total de aproximadamente 21 especies, que se transmiten por aproximadamente 30 especies de moscas de arena *phlebotomine* [Herwaldt BL., 1999].

Actualmente, la leishmaniosis es endémica en 88 países de los cinco continentes, África, Asia, Europa, Norteamérica y Suramérica, y un total de 350 millones de personas están en riesgo de infección. Se estima que 12 millones de personas en todo el mundo están afectadas por leishmaniosis; esta cifra incluye casos con enfermedad manifiesta y aquéllos sin síntomas evidentes. De los 1,5-2 millones de nuevos casos que se estima que se producen anualmente, sólo 600000 se declaran oficialmente. De los 500000 nuevos casos de LV que se producen anualmente, el 90% son en cinco países en desarrollo: Bangladesh, Brasil, India, Nepal y Sudán. Aproximadamente el 90% de todos los casos de LMC se producen en Bolivia, Brasil y Perú y el 90% de todos los casos de LC se producen en Afganistán, Brasil, Irán, Perú, Arabia Saudí y Siria, con 1-1,5 millones de nuevos casos notificados anualmente en todo el mundo. La distribución geográfica de la leishmaniosis está limitada por la distribución de la mosca de arena, su susceptibilidad a climas fríos, su tendencia a tomar sangre de seres humano o animales sólo y su capacidad para sustentar el desarrollo interno de especies específicas de *Leishmania* [Desjeux P 2001].

Desde 1993, las regiones que son endémicas de *Leishmania* se han expandido significativamente, acompañado por un aumento brusco en el número de casos registrados de la enfermedad. La propagación geográfica se debe a factores relacionados principalmente con el desarrollo. Estos incluyen la masiva migración del medio rural al urbano y los proyectos agroindustriales que llevan a residentes urbanos no inmunes a zonas rurales endémicas. Proyectos con impacto medioambiental causados por el hombre, como presas, sistemas de irrigación y pozos, así como la deforestación, también contribuyen a la propagación de la leishmaniosis. El SIDA y otros estados inmunosupresores aumentan el riesgo de que personas infectadas con *Leishmania* desarrollen enfermedad visceral [Desjeux P 2001, Paredes R *et al.*, 1997].

La LV está provocada principalmente por *L. donovani* en el subcontinente indio y en África, *Leishmania infantum* en la región mediterránea y *Leishmania chagasi* en el nuevo mundo; de estas especies, *Leishmania chagasi* y *Leishmania infantum* están estrechamente relacionadas. Aunque todas las especies anteriores provocan LV, son genéticamente diferentes entre sí. Los datos obtenidos por Cupolillo E *et al.*, [1994] usando zimotaxonomía numérica mostraron que *L. chagasi*, la especie visceral del nuevo mundo, es similar a *L. infantum* del viejo mundo. El zimodemo, el serodemo y las comparaciones cuantitativas de los patrones de fragmentos de ADN nuclear indican todos que *L. chagasi* y *L. infantum* están estrechamente relacionadas y pueden representar la misma especie. Además, el estudio de Beverley S.M *et al.*, [1987] basado en los patrones de fragmentos de restricción de ADN nuclear revela que *L. chagasi* y *L. infantum* son similares y están tan estrechamente relacionados entre sí como dos individuos al azar de la misma población y que *L. donovani* es diferente de estas dos especies. En otro estudio usando análisis de secuencia de ADN repetitivo por Piarroux R *et al.*, [1995] se observó que, entre las *Leishmania* que provocan LV, *L. donovani* se aislaba de focos en los que los seres humanos son el principal reservorio y se agrupaba en una rama independiente y en cambio, *L. infantum* y *L. chagasi* son parásitos caninos que raramente infectan a seres humanos y por tanto son diferentes. Un reciente estudio por Mauricio I.L *et al.*, [1999] usando tres enfoques diferentes a diferentes niveles de resolución para explorar la información genética de especies de *Leishmania* revela una cantidad sustancial de diversidad dentro

del complejo de *L. donovani*. Además, la RAPD había agrupado las cepas de *L. donovani* según el origen geográfico, específicamente la India y Kenia, mostrando una divergencia sustancial dentro del taxón.

La diversidad genética no sólo es común para *L. donovani*, incluso en *L. major*, que provoca leishmaniosis cutánea, cepas aisladas de la misma zona geográfica muestran polimorfismos de tamaño del cromosoma menores en sus cariotipos moleculares mientras que cepas de diferentes zonas geográficas muestran diferencias más significativas, lo que sugiere que los genomas de especies de *Leishmania* son bastante plásticos y que se producen transposiciones cromosómicas durante la evolución de diversas especies [Samaras N *et al.*, 1987]. Actualmente, está en marcha un proyecto de mapeo genómico en *L. major* patrocinado por la OMS. Aunque se ha argumentado que el mapa genómico de una cepa sería aplicable a otra, hay muy pocas pruebas que corroboren esta afirmación. De hecho, se sabe que diferencias en el número de copias de genes y la organización difieren entre *L. donovani*, *L. chagasi*, *L. major* y otras especies. Además, es difícil conciliar las grandes diferencias en los síntomas clínicos provocados por diferentes especies con idéntico genotipo [Ghosh S.S., *et al.*, 1998]. Por estos motivos, es necesario caracterizar genes importantes, que tienen potencial para ser un candidato de diagnóstico, vacuna o terapéutico de regiones geográficas diferentes. La asignación de la especie de parásito basándose sólo en la ubicación geográfica o el sitio de infección no es satisfactoria. Por consiguiente, la clasificación y el diagnóstico correctos del aislado de *Leishmania* patógena es esencial para determinar el pronóstico clínico y un enfoque terapéutico específico de especie [Marfurt J., *et al.*, 2003]. Un posible gen de este tipo estudiado ampliamente a través de diferentes especies de regiones geográficas diferentes es Gp63, una proteasa de zinc anclada a glicolípidos de 63 kDa de tamaño [Webb J.R., *et al.*, 1991; Steinkraus HB *et al.*, 1993; Roberts S C *et al.*, 1993].

En la India, la LV es un grave problema en Bihar, Bengala occidental y Uttar Pradesh oriental, donde hay una notificación menor de la real de kala-azar (KA) y leishmaniosis dérmica post kala-azar en mujeres y niños de 0-9 años de edad. Las epidemias recientes en 1992 de LV mataron a más de 100.000 personas en la India y Sudán. La fumigación con DDT ayudó al control de KA en la India, sin embargo, hay informes de que el vector *Phlebotomus argentipes* desarrolló resistencia. Además, la linfadenopatía, una característica que se presenta principalmente en la India eleva la posibilidad de un nuevo vector o una variante de la enfermedad [Bora D., 1999].

La leishmaniosis dérmica poskala-azar (LDPK) es una secuela de KA en la India y Sudán; la enfermedad se desarrolla de meses a años después de que el paciente se recupere de KA. Las lesiones cutáneas caracterizan la enfermedad y manifiestan una gran variabilidad, oscilando desde máculas hipopigmentadas hasta pápulas eritematosas y desde nódulos hasta placas. Como en la lepra, el amplio espectro clínico de LDPK refleja la respuesta inmunitaria del individuo frente al organismo *Leishmania*. Las lesiones pueden ser numerosas y persistir durante décadas. Los parásitos aislados de las lesiones son idénticos a los que provocan la enfermedad visceral original.

Los hallazgos clínicos y epidemiológicos en leishmaniosis no son patognómicos y estos pueden imitar varios estados endémicos tales como malaria, tuberculosis, sífilis e infecciones fúngicas. Por tanto, se requiere un diagnóstico de laboratorio para confirmar la sospecha clínica. Las herramientas de diagnóstico usadas para cada síndrome de *Leishmania*, a saber, forma visceral, cutánea y mucocutánea, varían, pero el método de referencia en cada caso sigue siendo la manifestación y el aislamiento del parásito del tejido apropiado [Singh S *et al.*, 2003].

Los síntomas y signos clínicos no son suficientes para diferenciar la LV de otros estados similares tales como malaria, síndrome de esplenomegalia tropical, esquistosomiasis o cirrosis con hipertensión portal, tripanosomiasis africana, tuberculosis miliar, brucelosis, fiebre tifoidea, endocarditis bacteriana, histoplasmosis, malnutrición, linfoma y leucemia. Por tanto, se requieren otros métodos de diagnóstico [Herwaldt BL, 1999; Davidson RN, 1998]. Entre estos, la técnica más específica y convencional es el aislamiento o la manifestación parasitológica del agente causante. La médula obtenida a partir de punción de la cresta iliaca o esternal es un método mucho más seguro pero doloroso. Los aspirados se extienden sobre un portaobjetos de vidrio y se tiñen con tinción de Romanowsky para manifestar las formas de amastigote del parásito. Sin embargo, en cultivo puede dar resultados positivos en hasta el 80% de los casos. La punción de ganglios linfáticos da resultados positivos en el 60% de los casos. Se extrae líquido de cualquier ganglio linfático agrandado y se somete tanto a examen directo como a cultivo para proporcionar la mejor posibilidad de diagnóstico [Williams, J. E, 1995; Manson-Bahr PEC, 1987]. El aislamiento primario de *L. donovani* se hace sobre medio Novy-MacNeal-Nicolle (NNN) sólido que tiene el 20-30% de sangre de conejo o medio de insectos de Schneider líquido complementado con suero de ternero fetal al 10% v/v (FCS). Pueden usarse también otros medios de crecimiento adecuados particularmente para mantener los subcultivos de los promastigotes usando FCS u otros complementos incluyendo orina humana [Singh S *et al.*, 2000]. La manifestación de los parásitos en el bazo y el hígado es uno de los métodos más precisos disponibles para determinar las infecciones por *Leishmania*. El noventa por ciento de los casos activos muestran parásitos en aspirados esplénicos y hepáticos. Debe usarse la aguja más pequeña posible, preferiblemente de calibre 21 (0,8 mm) para minimizar el riesgo de complicaciones tales como hemorragia del bazo [Williams, J. E, 1995]. Parte del aspirado esplénico puede usarse para preparar frotis para examen microscópico directo y el resto debe cultivarse. El material de biopsia hepática es menos probable que manifieste parásitos en el examen directo o en el cultivo; sin embargo, el examen histológico mostrará amastigotes en células de Kupffer en el sistema portal.

Se han publicado informes ocasionales de hallazgos de parásitos de *Leishmania* en sangre de pacientes con Kala-azar de Kenia y la India. Se centrifuga sangre en anticoagulante a 2000 g durante 10 min. y se retira células de la capa leucocítica y se usan para preparar frotis y cultivos inoculados. Los amastigotes pueden encontrarse en y alrededor de células de macrófagos. El volumen usado en la inoculación del cultivo es importante, 1-3 gotas en medio NNN o de Schneider han proporcionado resultados satisfactorios [Manson-Bahr PEC, 1987].

Los métodos microscópicos convencionales son invasivos y dolorosos conllevando riesgo de infecciones iatrogénicas y hemorragias mortales. Aunque la manifestación de la forma de amastigote del parásito en los tejidos está usándose desde su descubrimiento como enfermedad parasitaria en 1903, es menos sensible y no puede detectar infecciones subclínicas y ocultas. La forma subclínica y latente de la infección se ha convertido en un problema importante en los últimos años, dado que estas pueden estallar debido a una inmunosupresión tal como una infección por VIH y la infección puede transmitirse a través de trasplantes de órganos. El diagnóstico serológico se basa en la presencia de una respuesta humoral específica como en casos de leishmaniosis visceral o una respuesta inmunitaria mediada por células en casos de leishmaniosis cutánea y mucocutánea, provocada por el sistema inmunitario contra el patógeno causante. Hay gamas de métodos serológicos disponibles para el diagnóstico de LV que varían en precisión y especificidad. Estos incluían pruebas específicas y no específicas. Con la investigación en curso están haciéndose disponibles continuamente mejores métodos más nuevos.

La prueba de gel de formol es la prueba serológica más antigua y tiene la ventaja de ser barata y sencilla de realizar. Se mezcla suero obtenido a partir de aproximadamente 5 ml de sangre con una gota de formaldehído al 30%. Se muestra una reacción positiva si la mezcla solidifica y forma un precipitado opaco blanco en el plazo de 20 minutos. No puede detectarse una prueba positiva hasta 3 meses tras la infección y se vuelve negativa 6 meses tras la cura. La prueba no es específica puesto que se basa en la detección de niveles elevados de inmunoglobulinas IgG y IgM que también están elevados en otras infecciones tales como tripanosomiasis africana, malaria y esquistosomiasis etc., [WHO expert committee report, 1991]. Han estado en uso varias otras pruebas basadas en este principio en el pasado pero se usan muy raramente en la actualidad [Singh S, 1999].

Hay varias pruebas serológicas específicas y todas tienen especificidad y sensibilidad variables para el diagnóstico de la enfermedad. Algunas de estas pruebas incluyen hemaglutinación indirecta (IHA), inmunoelectroforesis en contracorriente (CCIEP), inmunodifusión (ID) etc., aunque todas estas pruebas son engorrosas y carecen de sensibilidad y especificidad y por tanto no se usan comúnmente. Se describen a continuación algunas más comúnmente usadas.

1. *Prueba cutánea de leishmanina (LST)*: La hipersensibilidad retrasada es una característica importante de las formas cutáneas de leishmaniosis humana y puede medirse mediante la prueba de leishmanina, también conocida como la reacción de Montenegro. La leishmanina es una suspensión inactivada promastigotes completos ($0,5-1 \times 10^7/\text{ml}$) o alterados ($250 \mu\text{g}$ de proteína/ml) en solución salina de fenol libre de pirógenos. No se producen reacciones cruzadas con la enfermedad de Chagas, aunque se encuentran algunas reacciones cruzadas con casos de tuberculosis glandular y lepra lepromatosa. La prueba cutánea de leishmanina se usa como indicador de la prevalencia de leishmaniosis cutánea y mucocutánea en poblaciones humanas y animales y del éxito de cura de la leishmaniosis visceral [Singh S, 1999, Sassi A, *et al.*, 1999]. Durante la enfermedad de kala-azar activa, no habrá respuesta inmunitaria mediada por células o será insignificante. Sin embargo, el antígeno leishmanina no está disponible comercialmente y no se ha llevado a cabo ningún estudio de campo en la India.

2. *Prueba de anticuerpos fluorescentes indirecta (IFAT)*: La prueba de anticuerpos fluorescentes indirecta es una de las pruebas más sensibles disponible. La prueba se basa en la detección de anticuerpos, que se manifiestan en las fases muy tempranas de la infección y permanecen indetectables de seis a nueve meses tras la cura. Si los anticuerpos persisten en bajos títulos es una buena indicación de una probable recaída. Títulos por encima de 1/20 son significativos y por encima de 1/128 son diagnósticos [Williams, J. E, 1995]. Hay una posibilidad de una reacción cruzada con sueros tripanosomiales, sin embargo, esto puede superarse usando amastigotes de *Leishmania* como antígeno en lugar de los promastigotes [Gari-Toussaint M, *et al.*, 1994].

3. *Prueba de aglutinación*: La DAT es una prueba sumamente específica y sensible. Es barata y sencilla de realizar, lo que la hace ideal tanto para el uso de campo como en el laboratorio. El antígeno se prepara a partir de promastigotes de *L. donovani* y la prueba puede llevarse a cabo en plasma, suero, manchas de sangre y sangre completa. Durante mucho tiempo, la DAT permaneció como la prueba de diagnóstico de primera línea en países pobres en recursos. El método usa promastigotes completos, teñidos o bien como una suspensión o en una forma liofilizada. La forma liofilizada es termoestable y facilita el uso de la DAT en el campo. Sin embargo, la principal desventaja de la DAT es el tiempo de incubación relativamente largo de 18 h y la necesidad de diluciones en serie de la sangre o el suero [Schallig HD *et al.*, 2001]. Otra desventaja principal de la DAT es que no tiene valor predictivo para evaluar la cura parasitológica de la enfermedad, dado que la prueba puede seguir siendo positiva durante varios años tras la cura. Recientemente, Schoone *et al* [2001] han desarrollado una prueba de aglutinación-selección rápida para la detección rápida (<3 h) de anticuerpos anti-*Leishmania* en muestras de suero y en sangre recogida sobre papel de filtro. La FAST utiliza sólo una dilución de suero, conduciendo a resultados cualitativos. La FAST ofrece las ventajas de la DAT basadas en el antígeno liofilizado con respecto a la estabilidad del antígeno, la reproducibilidad, especificidad y sensibilidad.

4. *Inmunotransferencia*: Se ha intentado el serodiagnóstico usando inmunotransferencia y se ha notificado que es superior y específico de fase. Los diversos antígenos expresados durante el transcurso de la infección también pueden documentarse. También tiene una ventaja añadida de documentación permanente. Sin embargo, la técnica no es agradable para el usuario y está limitada sólo a laboratorios de investigación [Herwaldt BL., 1999; Singh S, 1999; Schallig HD *et al.*, 2001].

5. *Detección de antígenos*: La detección de antígenos en el suero del paciente es complicada por la presencia de un alto nivel de los anticuerpos, complejos inmunitarios circulantes, amiloide sérico, factor reumatoide y autoanticuerpos,

todos los cuales pueden enmascarar inmunológicamente determinantes antigénicos importantes o inhibir competitivamente la unión de antígeno libre. La prueba de detección de antígenos, en principio, proporcionaría mejores medios de diagnóstico de leishmaniosis. Dado que se espera que los niveles de antígenos se correlacionen ampliamente con la carga de parásitos, la detección de antígenos puede ser una alternativa ideal a la detección de anticuerpos en pacientes inmunocomprometidos, en los que la respuesta de anticuerpos es muy escasa. Aunque se han publicado algunos informes, no está disponible actualmente ningún sistema de detección de antígenos satisfactorio [Senaldi G *et al.*, 2001; Attar ZJ *et al.*, 2001]. Recientemente, se ha desarrollado una prueba de aglutinación de látex (KATEX) para la detección de antígenos de *Leishmania* en la orina de pacientes con LV. Los resultados obtenidos con KATEX usando muestras recogidas de diferentes focos de LV indican que las pruebas funcionan bien independientemente del origen geográfico de las muestras. La prueba tuvo un 100% de especificidad y una sensibilidad de entre el 68-100% [Attar ZJ *et al.*, 2001]. Si la prueba tiene aplicaciones para la detección de casos asintomáticos de LV y la monitorización de la terapia está todavía por confirmarse.

6. *Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA)*: El ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) es una herramienta valiosa en el serodiagnóstico de la leishmaniosis. La prueba es útil para aplicaciones de campo o de análisis de laboratorio. El ELISA puede realizarse fácilmente y es adaptable para su uso con antígeno definido o purificado. Los antígenos usados en el diseño de pruebas de inmunodiagnóstico para la leishmaniosis se han derivado tradicionalmente de promastigotes que se han cultivado *in vitro* o de proteínas recombinantes, la alteración del antígeno usado para el ELISA y la DAT a partir del promastigote completo o antígenos solubles frente a antígenos peptídicos y de *Leishmania* de potencial recombinante y más específicos han mejorado el diagnóstico de LV [Senaldi G *et al.*, 2001]. El inmunodiagnóstico se ve influido en gran medida por el antígeno usado. Se han notificado recientemente varias moléculas de antígeno [Martin SK *et al.*, 1998; Rajasekariah GH *et al.*, 2001]. Los antígenos excretorios, secretorios y metabólicos (Ld-ESM), liberados por promastigotes de *L. donovani* en un medio libre de proteína se usaron para el serodiagnóstico de LV mediante ELISA. Se ha encontrado que los Ld-ESM son específicos y sensibles al 100%, el valor predictivo positivo era del 99,99% y el valor predictivo negativo era del 95,45%. Sin embargo, se requiere una evaluación de múltiples sitios prospectiva y retrospectiva adicional para validar estos hallazgos [Schoone GJ *et al.*, 2001]. Últimamente, se ha desarrollado una variedad de antígenos recombinantes, recientemente se ha identificado un gen relacionado con el gen B de *L. major* que codifica para una proteína hidrófila expresada en la superficie tanto de promastigotes como de amastigotes de *L. major* caracterizada por un motivo de repetición de aminoácidos de 5,5 copias de una secuencia de 14 aminoácidos y se ha mostrado que se expresa en *L. donovani*. La proteína codificada por el homólogo del gen B de *L. donovani* contiene hasta 22 copias de un elemento repetitivo en el que 9 de 14 residuos están completamente conservados entre las dos especies. Se desarrolló un ELISA que usaba la secuencia peptídica repetitiva de GBP de *L. donovani* y GBP de *L. donovani* recombinante como ligando de fase sólida. Sin embargo, las limitaciones de este antígeno son que puede usarse para el serodiagnóstico de leishmaniosis visceral sólo en zonas endémicas para *L. donovani* pero no para zonas que son coendémicas para otras especies de *Leishmania* y la especificidad y sensibilidad no son muy altas [Jensen AT *et al.* 1999].

Raj *et al.*, [1999] han desarrollado otra proteína recombinante rORFF de origen de *L. infantum* para el diagnóstico de LV en la India. La proteína ORFF está codificada en el locus LD1 del cromosoma 35 de *L. infantum*, un ELISA con este antígeno demostró ser sensible con tan sólo 5 ng de rORFF cuando se realizó con diferentes grupos de pacientes como con LV confirmada, sospechosos de LV, controles normales endémicos tratados de manera intermitente y controles normales no endémicos. Además, se sometió el mismo grupo de pacientes a DAT usando promastigote completo y ELISA usando antígenos solubles totales. Se encontró que el ELISA usando rORFF era más sensible que los otros. Aunque este antígeno es sumamente sensible (del 95 al 100%) y específico (>90%) para LV, se encontró también que era positivo en el 40% de los casos de LC confirmada debida a *L. major* o *L. tropica*. Además, la prueba necesita evaluarse por otros y su utilidad para el diagnóstico de campo está todavía por estudiarse. En un estudio reciente realizado en LV mediterránea en la que *L. infantum* es el agente causante, se han comparado diez antígenos de *Leishmania* recombinantes y purificados usando un método de ELISA por Maalej *et al.*, [2003]. De estos antígenos recombinantes, rgp63, un antígeno de superficie principal de *Leishmania* que no está presente en *Trypanosoma cruzi* u otros cinetoplastidos y rGBP tenían un buen rendimiento pero no eran muy sensibles ni específicos para conseguir un diagnóstico fiable. Se sugiere que el uso de proteínas recombinantes de *L. infantum* en lugar de *L. major* había producido un mejor resultado.

Un antígeno recombinante desarrollado por Burns *et al.*, [1993] que pertenece a la familia cinesina de proteínas motoras, K39 recombinante (rK39), se ha demostrado que es específico para anticuerpos que surgen durante la LV provocada por miembros del complejo de *L. donovani*, que incluye *Leishmania chagasi* y *L. infantum*. Este antígeno, que es un miembro de la familia cinesina, codifica para una proteína con un epítipo repetitivo, que consiste en 39 residuos de aminoácido (K39), es sumamente sensible y predictiva de enfermedad aguda. Se han demostrado títulos de anticuerpos anti-rK39 altos en pacientes con LV pero no se demuestran anticuerpos anti-rK39 detectables en leishmaniosis cutánea o mucocutánea. Los títulos de anticuerpo frente a este antígeno se correlacionan directamente con la enfermedad activa y tienen un tremendo potencial como medio de monitorización de la quimioterapia y en la predicción de la recaída clínica [Burns JM Jr *et al.*, 1993; Singh S *et al.*, 1995; Badaro R *et al.*, 1996; Singh S *et al.*, 2002; Maalej IA *et al.*, 2003; patentes estadounidenses números 5.411.865 y 5.719.263 y documento WO 94/16331]. Además, el ELISA de rK39, tiene un alto valor predictivo para detectar LV en personas inmunocomprometidas, como pacientes con SIDA [Houghton RL *et al.*, 1998]. Este antígeno está ahora comercialmente disponible en forma de tiras de papel de nitrocelulosa impregnadas con antígeno adaptadas para su uso en condiciones de campo. Se ha encontrado que la prueba con tira de rK39 es útil para el diagnóstico de campo de kala-azar en la India [Sundar S *et al.*, 1998 y Sundar S *et al.*, 2002]; sin embargo, el mismo tenía una sensibilidad notablemente menor en Sudán [Zijlstra EE *et al.*,

2001] y el sur de Europa. Es importante enfatizar en este caso que aunque se ha mostrado que el gen de antígeno relacionado con cinesina está conservado en todas las especies viscerales, aunque el mismo no parece ser el caso, porque *L. donovani* es el agente causante de kala-azar en la India así como en Sudán, y en ambas zonas geográficas provocan LDPK como secuela a LV. Pero las observaciones de Zijlstra *et al.*, [2001] y Zijlstra *et al.*, [2003] de que las pruebas con tiras de rK39 son menos sensibles (sólo hasta el 67%) en Sudán e incluso en el sur de Europa (sólo hasta el 71,4%) [Jelinek T *et al.*, 1999] elevan la duda válida sobre la idoneidad universal de este antígeno. Una explicación ofrecida a menudo para esta sensibilidad variable es que la respuesta de anticuerpos provocada por diferentes grupos étnicos puede diferir notablemente [Sundar S *et al.*, 2002]. Alternativamente, también podría ser posible que el propio gen antigénico varíe notablemente de cepa a cepa y también en diferentes regiones geográficas o que exista una variante de este antígeno y evada la dilucidación inmunitaria como resultado de que la enfermedad permanece sin detectar en pocos casos cuando se usa la rK39 existente de *L. chagasi* para el diagnóstico. Además, de los 500.000 nuevos casos de LV, que se producen anualmente en todo el mundo, más del 90% se notifican en la India, Bangladesh, sur de Sudán y noreste de Brasil [Sundar S *et al.*, 2002].

La India alberga la mayoría de los casos de LV en el mundo, y el antígeno relacionado con cinesina no se caracterizó aún a partir de aislados de la India de *Leishmania donovani*. También es evidente que *L. chagasi* tiene un reservorio animal mientras que *L. donovani* no. Es posible que el gen difiera significativamente de *L. chagasi* y la caracterización de este gen explicará también las razones de la escasa sensibilidad de la prueba con tiras de rK39 en ciertas regiones geográficas. En un intento por resolver este problema, se ha clonado y caracterizado el gen de cinesina de diferentes cepas aisladas de dos individuos infectados por *L. donovani* que pertenecen a la misma región geográfica de la India. Una cepa, MHOM/IN/DD8, era la cepa de referencia de la OMS bien caracterizada para la India aislada en 1980 y la segunda cepa, MHOM/IN/KE16/1998, es un aislado clínico reciente de una paciente con Kala-azar de 10 años de edad de Muzaffarpur, Bihar, India. Esto explica claramente que es la variación al nivel genético la que puede haber producido una sensibilidad reducida en ciertas regiones geográficas. Si no se hubiese caracterizado este gen de cinesina de aislados de la India, esta información de variación al nivel genético nunca la habría conocido la comunidad científica. Esto es evidente a partir de los resultados del ELISA, puesto que los títulos medios para el antígeno de MHOM/IN/DD8 son considerablemente inferiores que para el de MHOM/IN/KE16/1998 y rK 39 de *L. chagasi*.

Los solicitantes realizaron una extensa investigación en la base de datos de patentes estadounidenses con diferentes palabras clave para estudiar el trabajo previo realizado sobre el antígeno de repetición inmunodominante K39 y el antígeno de 230 kD. Se tratan a continuación algunas patentes estadounidenses concedidas a Reed sobre el tema implicado y la singularidad del antígeno del solicitante.

La patente estadounidense número 5.411.865 concedida a Reed el 2 de mayo de 1995 enseña sobre el método de detección de anticuerpos anti-parásitos de *Leishmania*. El compuesto daba a conocer un método para detectar anticuerpos anti-parásitos de *Leishmania* frente a un antígeno de 230 kDa presente en *Leishmania chagasi* y *Leishmania donovani* que comprende obtener una muestra de un individuo, poner en contacto la muestra con un antígeno recombinante de región de repetición k39 que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 3, y detectar la presencia de anticuerpos anti-parásitos de *Leishmania* en la muestra que se unen al antígeno recombinante de región de repetición k39.

La patente estadounidense número 5.719.263 concedida a Reed el 17 de febrero 1998 enseña sobre el antígeno de 230 kD presente en especies de *Leishmania*. El compuesto dado a conocer es un antígeno de 230 kD aislado que está presente en *Leishmania chagasi* y *Leishmania donovani*, y polipéptidos aislados que comprenden uno o una pluralidad de antígenos de repetición k39. También se dan a conocer ADN que codifican para el antígeno de 230 kD y el antígeno de repetición k39, y composiciones de vacuna que comprenden los antígenos.

Se notifica que el antígeno de 230 kDa y el polipéptido aislado que comprende las repeticiones k39 dados a conocer anteriormente no son sensibles en ciertas zonas geográficas en las que LV es sumamente endémica y está provocada por *L. donovani*. Sin embargo, debe indicarse que las repeticiones k39 se han caracterizado sólo a partir de *L. chagasi* y no a partir de *L. donovani*. La carga principal en la leishmaniosis en todo el mundo está provocada por *L. donovani*. También es evidente a partir de los informes que las dos especies son genéticamente diferentes. Por tanto, los solicitantes clonaron y caracterizaron la región inmunodominante de repetición k39 a partir de aislados de la India de *Leishmania donovani*, que contribuye significativamente a la carga en LV global.

La presente invención del solicitante da a conocer un antígeno de repetición de 29 kDa y 26 kDa, que está presente en especies de *Leishmania*. Los compuestos dados a conocer son antígenos de 29 kD y 26 kD aislados, que se caracterizan a partir de aislados de la India de *Leishmania donovani*. Los antígenos notificados son completamente diferentes del antígeno de 230 kDa de *Leishmania chagasi*. El antígeno varía significativamente, más del 60% en su secuencia de aminoácidos pronosticada con respecto a la del antígeno de repetición K39 de *L. chagasi*. También se da a conocer ADN que codifica para el antígeno de 29 kD y 26 kD y composiciones terapéuticas y de vacuna que comprenden los antígenos.

La patente estadounidense número 5.912.166 concedida a Reed, *et al.*, el 15 de junio de 1999 enseña sobre compuestos y métodos para el diagnóstico de la infección por leishmaniosis. Los compuestos proporcionados incluyen polipéptidos que contienen al menos un epítipo del antígeno ribosómico ácido LcP0 de *Leishmania chagasi*, o una variante del mismo. Tales compuestos son útiles en una variedad de inmunoensayos para la detección de la infección por *Leishmania* y para identificar individuos con infecciones asintomáticas que es probable que evolucionen en leish-

maniosis visceral aguda. Los compuestos polipeptídicos son además útiles en vacunas y composiciones farmacéuticas para prevenir la leishmaniosis.

Sin embargo, la presente invención del solicitante no se ocupa del antígeno ribosómico ácido LcPO.

La patente estadounidense número 6.638.517 concedida a Reed, *et al.*, el 28 de octubre de 2003, antígenos de *Leishmania* para su uso en la terapia y el diagnóstico de leishmaniosis enseña composiciones y métodos para prevenir, tratar y detectar leishmaniosis y estimular respuestas inmunitarias en pacientes. Los compuestos proporcionados incluyen polipéptidos que contienen una parte inmunógena de uno o más antígenos de *Leishmania*, o una variante de los mismos. La patente también da a conocer vacunas y composiciones farmacéuticas que comprenden tales polipéptidos, o polinucleótidos que codifican para tales polipéptidos, y también se proporcionan y pueden usarse, por ejemplo, para la prevención y la terapia de leishmaniosis, así como la para detección de infección por *Leishmania*.

Los compuestos proporcionados en la patente anterior utilizan una secuencia de origen de *L. major* y un constructo de fusión de múltiples antígenos de *Leishmania*. Estos compuestos son en ningún modo similares al antígeno del solicitante.

El gen de antígeno relacionado con cinesina se ha clonado y caracterizado a partir de *L. chagasi*, una especie visceral sudamericana por Burns *et al.*, [1993], esto condujo al desarrollo del antígeno rK39, una proteína recombinante con repeticiones en tándem de 39 aminoácidos. Se notifica que este antígeno de una especie visceral del nuevo mundo, *L. chagasi*, no es sensible en algunas regiones sumamente endémicas para LV, Sudán y sur de Europa como lo es en algunas otras zonas geográficas, India, Bangladesh, Nepal etc., [Sundar *et al.*, 2002]. La India soporta la mayoría de la población con LV en la carga de leishmaniosis global. Por eso, es muy importante tener herramientas precisas y bien caracterizadas para el diagnóstico y otras medidas de control. Los solicitantes han caracterizado el antígeno relacionado con cinesina en el nivel de secuencia para estudiar si la secuencia es similar a la de *L. chagasi*, que está bien caracterizada y para descartar la posibilidad de que algunos casos de LV y LDPK permanezcan sin detectar en la India tales como los notificados en Sudán. Este estudio también arrojará luz sobre los motivos de la respuesta variada entre los grupos étnicos que albergan esta enfermedad frente al antígeno rK39 de Burns *et al.*, [1993]. En la presente invención se encontró que la secuencia del antígeno cinesina difiere significativamente de la de los informes publicados de *L. chagasi* de los que se deriva el rK39 de Burns *et al.* Esta invención también proporciona un método para la detección de anticuerpos anti-*Leishmania* usando los antígenos derivados de los aislados de la India de *L. donovani*.

El estudio era importante para analizar la respuesta al antígeno en los diversos grupos étnicos de la India. Es posible que los niveles de anticuerpo en las personas enfermas de la India puedan deberse a o bien que la cepas son diferentes o bien a que es posible que los diversos grupos étnicos respondan al antígeno de *Leishmania* de diferente manera.

Objetos de la invención

El principal objeto de esta invención es aislar, caracterizar y usar la región inmunodominante del gen de antígeno relacionado con cinesina a partir de aislado de la India de la cepa de *Leishmania donovani* MHOM/IN/KE16/1998.

Otro objeto de esta invención es identificar y realizar un análisis comparativo de secuencias tanto al nivel del ácido nucleico como de aminoácidos del aislado de la India con la de la región inmunodominante de cinesina de *L. chagasi*.

Todavía otro objeto es identificar las variaciones en la región de repetición inmunodominante de 39 aminoácidos del gen de cinesina aislado de la cepa de la India en comparación con la de otras secuencias notificadas.

Todavía otro objeto es producir un polipéptido que contiene una o más regiones de repetición de 39 aminoácidos a partir de la cepa de la India.

Todavía otro objeto es producir un polipéptido recombinante que contiene una o más regiones de repetición de 39 aminoácidos a partir de la cepa de la India.

Otro objeto de esta invención es proporcionar un método de detección de anticuerpos anti-*Leishmania* a partir de los pacientes infectados por *Leishmania* usando el polipéptido mencionado anteriormente.

Otro objeto de esta invención es proporcionar un kit que contiene el polipéptido del aislado de la India de *Leishmania donovani* para detectar anticuerpos anti-*Leishmania* en pacientes con LV y LDPK.

Todavía otro objeto de esta invención es producir anticuerpo producido contra el polipéptido tal como se muestra en SEQ ID NO: 6.

Todavía otro objeto de esta invención es proporcionar un método para la detección de antígenos de *Leishmania* usando el anticuerpo mencionado anteriormente.

Todavía otro objeto de esta invención es proporcionar un kit de diagnóstico que consiste en anticuerpo producido contra polipéptidos mostrados en SEQ ID NO: 6 para la detección de antígenos de *Leishmania*.

Sumario de la invención

Por consiguiente, la presente invención proporciona polipéptidos identificados como SEQ ID NO: 6, aislados de una cepa de la India de *Leishmania donovani* para el fin de detectar anticuerpos anti-*Leishmania* a partir de muestras infectadas recogidas de animales o seres humanos. La invención también proporciona un método de ELISA para detectar la infección anterior provocada por el parásito protozoario del género *Leishmania*. La invención proporciona además un kit de diagnóstico para detectar leishmaniosis (LV y LDPK) en muestras de sangre. La presente invención proporciona además un kit de diagnóstico que consiste en anticuerpo producido contra polipéptidos mostrados en SEQ ID NO: 6 para detectar antígenos de *Leishmania*.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1:

Clonación del producto de PCR de 563 pb en el vector pGEMTE (Promega) a partir de la cepa MHOM/IN/DD8. Carril 1: marcador de 1 kb de peso molecular (MBI Fermentas), carril 2: plásmido digerido con Eco R1 con inserto de 563 pb liberado, carril 3: pGEMTE no digerido con inserto, carril 4: plásmido digerido con Eco R1 con inserto de 563 pb liberado, carril 5: pGEMTE no digerido con inserto.

Figura 2:

Clonación del producto de PCR de 466 pb en el vector pGEMTE vector (Promega) a partir de la cepa MHOM/IN/KE16/1998. Carril 1: marcador de 1 kb de peso molecular (MBI Fermentas), carril 2: plásmido digerido con Eco R1 con inserto de 466 pb liberado, carril 3: pGEMTE no digerido con inserto, carril 4: plásmido digerido con Eco R1 con inserto de 466 pb liberado, carril 5: pGEMTE no digerido con inserto.

Figura 3:

Las búsquedas de BLAST de una secuencia de proteína prevista de la cepa de *L. donovani* MHOM/IN/DD8 (SEQ ID NO: 5) usando la división de patentes de la base de datos GenBank. Figura 3A a 3F, resultados de BLAST en la base de datos de patentes. Consulta: polipéptido de la cepa de *L. donovani* MHOM/IN/DD8 (SEQ ID NO: 5), objeto: secuencias patentadas de la patente estadounidense número; 5411865, 5719263, 5912166.

La figura 3A-C muestra la homología entre SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 1 de la patente estadounidense 5411865 que es la misma que la SEQ ID NO: 2 de la patente estadounidense 5719263.

La figura 3D-F muestra la homología entre SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 3 de la patente estadounidense 5912166.

Figura 4:

Alineación múltiple de secuencias Clustal W de la región de repetición inmunodominante al nivel de los nucleótidos para las secuencias SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4 con la de la región de repetición inmunodominante de *L. chagasi*. LCIMM: región de repetición inmunodominante para la especie *L. chagasi* (número de registro de Gen Bank L07879);

DDIMM (SEQ ID NO: 3) región de repetición inmunodominante para la especie *L. donovani* de la cepa de la India MHOM/IN/DD8; KEIMM: (SEQ ID NO: 4) región de repetición inmunodominante para la cepa de la India MHOM/IN/KE16/1998. [---: Representa huecos, las secuencias idénticas están sombreadas en negro].

Figura 5:

Alineación múltiple de secuencias Clustal W la región de repetición inmunodominante al nivel de los aminoácidos para las secuencias SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6 con la de la región de repetición inmunodominante de *L. chagasi*. LCIMM: región de repetición inmunodominante para la especie *L. chagasi*, (número de registro de Gen Bank L07879). La secuencia DDIMM (SEQ ID NO: 5) es la región de repetición inmunodominante para la especie *L. donovani* de la cepa de la India MHOM/IN/DD8, y KEIMM (SEQ ID NO: 6) es la región de repetición inmunodominante para la cepa de la India MHOM/IN/KE16/1998. [---: Representa huecos, las secuencias idénticas están sombreadas en negro y las secuencias similares están sombreadas en gris].

Figura 6:

Alineación múltiple de secuencias Clustal W de la región de repetición inmunodominante al nivel de los aminoácidos para la SEQ ID NO: 5 (DDIMM) con la de la región de repetición inmunodominante de *L. chagasi*. LCIMM representa la región de repetición inmunodominante para la especie *L. chagasi* (número de registro de Gen Bank L07879). [---: Representa huecos, las secuencias idénticas están sombreadas en negro y las secuencias similares están sombreadas en gris].

Figura 7:

Alineación múltiple de secuencias Clustal W de la región de repetición inmunodominante al nivel de los aminoácidos para la SEQ ID NO: 5 (DDIMM) y SEQ ID NO: 6 (KEIMM). [---: Representa huecos, las secuencias idénticas están sombreadas en negro y las secuencias similares están sombreadas en gris].

Figura 8:

Unidad de repetición de 39 aminoácidos inmunodominante con variación dentro de la repetición para la cepa MHOM/IN/DD8 de aislado de la India de *L. donovani*, mostrada en SEQ ID NO: 5. Se presenta la primera unidad de repetición de 39 aminoácidos y se indica la degeneración de diversas posiciones de aminoácido entre repeticiones.

Figura 9:

Unidad de repetición de 39 aminoácidos inmunodominante con variación dentro de la repetición para la cepa MHOM/IN/KE16/1998 de aislado de la India de *L. donovani*, mostrada en SEQ ID NO: 6. Se presenta la primera unidad de repetición de 39 aminoácidos y se indica la degeneración de diversas posiciones de aminoácido entre repeticiones.

Figura 10:

a) Las proteínas recombinantes con cola de 6X-His purificadas en Ni-NTA agarosa se resolvieron en SDS-PAGE al 12% y se tiñeron con azul brillante de Coomassie. Carril 1: marcador de peso molecular preteñido (MBI Fermentas, EE.UU.), carril 2: proteína purificada a partir de MHOM/IN/DD8 (~29 kDa), carril 3: proteína purificada a partir de MHOM/IN/KE16/1998 (~26 kDa).

b) Inmunotransferencia de tipo Western con anticuerpo anti-penta-His conjugado con HRP para la proteína purificada. Carril 1: marcador de peso molecular preteñido (MBI Fermentas, EE.UU.), carril 2: proteína purificada a partir de MHOM/IN/DD8 (~29 kDa), carril 3: proteína purificada a partir de MHOM/IN/KE16/1998 (~26 kDa).

[La proteína purificada a partir de MHOM/IN/KE16/1998 de ~26 kDa de peso molecular previsto tiene una movilidad aberrante en SDS-PAGE y migraba a un peso molecular superior ~32 kDa].

Figura 11:

a) Las proteínas recombinantes con cola de 6X-His purificadas en Ni-NTA agarosa se resolvieron en SDS-PAGE al 12% y se tiñeron con azul brillante de Coomassie. Carril 1: marcador de peso molecular preteñido (MBI Fermentas, EE.UU.), carril 2: proteína purificada a partir de MHOM/IN/DD8 (~29 kDa), carril 3: proteína purificada a partir de MHOM/IN/KE16/1998 (~26 kDa).

b) Inmunotransferencia de tipo Western con sueros de pacientes con KA para la proteína purificada. Carril 1: marcador de peso molecular preteñido (MBI Fermentas, EE.UU.), carril 2: proteína purificada a partir de MHOM/IN/DD8 (~29 kDa), carril 3: proteína purificada a partir de MHOM/IN/KE16/1998 (~26 kDa).

Figura 12:

a) Las proteínas recombinantes con cola de 6X-His purificadas en Ni-NTA agarosa se resolvieron en SDS-PAGE al 12% y se tiñeron con azul brillante de Coomassie. Carril 1: marcador de peso molecular preteñido (MBI Fermentas, EE.UU.), carril 2: proteína purificada a partir de MHOM/IN/DD8 (~29 kDa), carril 3: proteína purificada a partir de MHOM/IN/KE16/1998 (~26 kDa).

b) Inmunotransferencia de tipo Western de sueros de pacientes con LDPK para la proteína purificada. Carril 1: marcador de peso molecular preteñido (MBI Fermentas, EE.UU.), carril 2: proteína purificada a partir de MHOM/IN/DD8 (~29 kDa), carril 3: proteína purificada a partir de MHOM/IN/KE16/1998 (~26 kDa).

Figura 13:

a) Las proteínas recombinantes con cola de 6X-His purificadas en Ni-NTA agarosa se resolvieron en SDS-PAGE al 12% y se tiñeron con azul brillante de Coomassie. Carril 1: marcador de peso molecular preteñido (MBI Fermentas, EE.UU.), carril 2: proteína purificada a partir de MHOM/IN/DD8 (~29 kDa), carril 3: proteína purificada a partir de MHOM/IN/KE16/1998 (~26 kDa).

b) Inmunotransferencia de tipo Western con sueros de pacientes control sanos combinados (N=5) para la proteína purificada. Carril 1: marcador de peso molecular preteñido (MBI Fermentas, EE.UU.), carril 2: proteína purificada a partir de MHOM/IN/DD8 (~29 kDa), carril 3: proteína purificada a partir de MHOM/IN/KE16/1998 (~261 kDa).

Figura 14:

- a) La proteínas recombinantes con cola de 6X-His purificadas en Ni-NTA agarosa se resolvieron en SDS-PAGE al 12% y se tiñeron con azul brillante de Coomassie. Carril 1: marcador de peso molecular preteñido (MBI Fermentas, EE.UU.), carril 2: proteína purificada a partir de MHOM/IN/DD8 (~29 kDa), carril 3: proteína purificada a partir de MHOM/IN/KE16/1998 (~26 kDa).
- b) Inmunotransferencia de tipo Western sólo con anticuerpo secundario control para la proteína purificada. Carril 1: marcador de peso molecular preteñido (MBI Fermentas, EE.UU.), carril 2: proteína purificada a partir de MHOM/IN/DD8 (~291 kDa), carril 3: proteína purificada a partir de MHOM/IN/KE16/1998 (~26 kDa).

Figura 15:

La gráfica muestra el valor del título para diferentes grupos de sueros en el ELISA con polipéptido purificado (SEQ ID NO: 5) de origen de MHOM/IN/DD8. Se muestra el valor de DO medio con la desviación estándar y también se representa en la gráfica. Los diferentes grupos incluidos son los siguientes:

- 1) Muestras control sanas endémicas de individuos clínica y serológicamente negativos (para rK39) de una zona endémica en Bihar, India,
- 2) muestras de casos de LV y LDPK confirmados (casos de enfermedad) de una zona endémica en Bihar, India,
- 3) muestras de pacientes positivos para VHC,
- 4) muestras de pacientes positivos para VIH
- 5) muestras de pacientes positivos para TB,
- 6) muestras de pacientes positivos para HBs Ag,
- 7) se obtuvieron muestras control sanas no endémicas de individuos de una zona no endémica (Delhi) para LV.

Figura 16:

La gráfica muestra el valor del título para diferentes grupos de sueros en el ELISA con polipéptido purificado (SEQ ID NO: 6) de origen de MHOM/IN/DD8. Se muestra el valor de DO medio con la desviación estándar y también se representa en la gráfica. Los diferentes grupos incluidos son los siguientes:

- 1) Muestras control sanas endémicas de individuos clínica y serológicamente negativos (para rK39) de una zona endémica en Bihar, India,
- 2) muestras de casos de LV y LDPK confirmados (casos de enfermedad) de una zona endémica en Bihar, India,
- 3) muestras de pacientes positivos para TB,
- 4) muestras de pacientes positivos para VHC
- 5) muestras de pacientes positivos para VIH,
- 6) muestras de pacientes positivos para HBs Ag,
- 7) se obtuvieron muestras control sanas no endémicas de individuos de una zona no endémica (Delhi) para LV.

Breve descripción de las secuencias en la lista de secuencias

SEQ ID NO: 1 es la secuencia de nucleótidos del gen de antígeno relacionado con cinesina de longitud completa a partir del aislado de la India de la cepa de *L. donovani* MHOM/IN/DDB.

SEQ ID NO: 2 es la secuencia de nucleótidos del gen de antígeno relacionado con cinesina de longitud completa a partir del aislado de la India de la cepa de *L. donovani* MHOM/IN/KE16/1998.

SEQ ID NO: 3 es la secuencia de nucleótidos que codifica para el polipéptido de repetición de 39 aminoácidos inmunodominante a partir del aislado de la India de la cepa de *L. donovani* MHOM/IN/DD8

SEQ ID NO: 4 es la secuencia de nucleótidos que codifica para el polipéptido de repetición de 39 aminoácidos inmunodominante a partir del aislado de la India de la cepa de *L. donovani* MHOM/IN/KE16/1998.

ES 2 345 046 T3

SEQ ID NO: 5 es la secuencia de aminoácidos de un antígeno de la región de repetición de 39 aminoácidos a partir de un aislado de la cepa de *L. donovani* MHOM/IN/DD8

SEQ ID NO: 6 es la secuencia de aminoácidos de un antígeno de la región de repetición de 39 aminoácidos a partir de un aislado de la cepa de *L. donovani* MHOM/IN/KE16/1998

SEQ ID NO: 7 es el oligonucleótido sintético LKF 93

SEQ ID NO: 8 es el oligonucleótido sintético LKR1803

SEQ ID NO: 9 es el oligonucleótido sintético LKF 1527

SEQ ID NO: 10 es el oligonucleótido sintético LKF 2564

SEQ ID NO: 11 es el oligonucleótido sintético LKR 3266

Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona un antígeno recombinante desarrollado a partir de aislados de la India de *L. donovani*, que es una variante del antígeno relacionado con la cinesina recombinante existente (rK39) para diagnosticar LV en la India y otras zonas geográficas en las que *L. donovani* es el agente causante. Este antígeno recombinante de origen de la India varía en hasta un 60% en la secuencia de aminoácidos prevista en el epítipo de repetición inmunodominante con respecto a la del rK39. Recientemente se ha clonado el gen del antígeno relacionado con la cinesina y se ha caracterizado a partir de *L. chagasi*, una especie visceral americana, por Burns *et al.*; esto condujo al desarrollo del antígeno rK39, una proteína recombinante con repeticiones en tándem de 39 aminoácidos. Se notifica que este antígeno anterior [Burns *et al.*, 1993] a partir una especie visceral del nuevo mundo, *L. chagasi*, no es sensible en algunas regiones sumamente endémicas para LV, Sudán y el sur de Europa [Zijlstra, E. E., 2001; Jelinek T., 1999], como lo es en algunas otras zonas geográficas, India, Bangladesh, Nepal, etc. La India soporta la mayoría de la población con LV en la carga de leishmaniosis global. De ese modo, es muy importante tener herramientas precisas y bien caracterizadas para el diagnóstico y otras medidas de control en la India. Los solicitantes han caracterizado el antígeno relacionado con la cinesina a partir de dos cepas, concretamente, a) MHOM/IN/DD8, una cepa de referencia de la OMS originalmente obtenida a partir de pacientes con kala-azar de Bihar, India y b) MHOM/IN/KE16/1998, obtenida a partir de una paciente de 10 años de edad con kala-azar de Musafarpur, Bihar, India, de *L. donovani* a nivel de la secuencia para estudiar si la secuencia es similar a la de *L. chagasi* y para descartar la sospecha de que hay algunos casos que pasan desapercibidos tanto en la India como en Sudán. Además resulta muy importante saber si los diversos grupos étnicos responden de manera diferente al antígeno rK39 o si es la divergencia de secuencia en la región inmunodominante lo que provoca la diferencia de sensibilidad. En esta invención se encontró que la secuencia del antígeno/polipéptido de cinesina difiere significativamente de la de *L. chagasi* publicada de la que se derivó el rK39.

En la presente invención también se produjeron anticuerpos contra el antígeno/polipéptido de cinesina y se usaron para la detección de antígenos de *Leishmania*.

Inicialmente se aislaron parásitos como promastigotes en medio NNN a partir de muestras clínicas de pacientes con kala-azar y posteriormente se adaptaron para crecer a 25°C en medio 199 que contenía FCS inactivado por calor al 10%. Para el mantenimiento de rutina, se introdujeron de manera aséptica muestras de inóculo que contenía parásitos en tubos de cultivo con 4 ml de medio 199 complementado con FCS al 10%. Se colocaron los tubos en una incubadora enfriada a 25°C y se monitorizó el crecimiento a intervalos regulares mediante microscopía. Para el cultivo en masa del parásito, se introdujeron de manera aséptica muestras de inóculo que contenía parásitos en 200 ml de M199 que contenía FCS al 10% en un matraz de cultivo tisular de 500 ml y se incubaron en una incubadora enfriada a 25°C hasta la fase semilogarítmica (7-10 días). Entonces se recogieron los parásitos y se usaron para el aislamiento de ADN nuclear.

Se recogieron los parásitos en su fase semilogarítmica mediante centrifugación a 5000 rpm en una centrífuga refrigerada. Se aisló ADN nuclear de parásito siguiendo el protocolo convencional con modificaciones menores [Lu H.G. *et al.*, 1994]. Se lisaron aproximadamente $1-5 \times 10^9$ promastigotes en 10 volúmenes de tampón de lisis (NaCl, 100 mM, Tris-HCl, 10 mM (pH 8,0), EDTA 10 mM, proteinasa K/ml 100 µg, sarcosil al 1,5%) a 60°C durante 3 horas. Se sedimentaron las redes de ADN de cinetoplasto mediante centrifugación a 27.000 X g durante 1 hora y se resuspendieron en tampón TE (Tris-HCl (pH 8,0) 10 mM, EDTA (pH 8,0) 1 mM). Se aislaron los ADN nucleares a partir de los sobrenadantes que quedaban tras la sedimentación de los ADNk (ADN de cinetoplasto). Se incubaron estos sobrenadantes durante la noche para una digestión adicional de proteínas a 65°C. Se sometió el ADN nuclear a varios ciclos de extracciones con fenol/cloroformo añadiendo un volumen igual de mezcla de fenol/cloroformo, mezclando concienzudamente seguido por sedimentación mediante centrifugación a 5000 rpm durante 15 minutos. Se precipitó el ADN nuclear añadiendo 1/10 del volumen de acetato de sodio 3 M y 2 volúmenes de etanol al 100%, se mezcló bien y se incubó a -20°C durante 1 hora. Se sedimentó la mezcla mediante centrifugación a 5000 rpm durante 30 minutos a 4°C. Se lavó el sedimento con etanol al 70%, se secó y se resuspendió en tampón TE. Se midieron la concentración y la pureza del ADN tomando la DO a 260/280 nm. Se almacenó el ADN a -70°C hasta su uso.

ES 2 345 046 T3

Se realizó la PCR para la amplificación del antígeno relacionado con cinesina tal como sigue usando 50 ng del ADN nuclear aislado y usando los siguientes cebadores en diversas combinaciones para amplificar las partes solapantes en el gen de cinesina. Los cebadores se diseñaron basándose en los datos de secuencia de GenBank para el gen de cinesina (n.º de registro L07879). La secuencia del gen de cinesina disponible a partir de *L. chagasi* tiene 3319 pb de longitud y tiene un ORF desde la posición 454 con un supuesto codón de iniciación ATG y se extiende hasta la última base en la posición 3319. Este gen tiene una región no de repetición en 5' desde el codón de iniciación en la posición 2563 y un dominio de repetición inmunodominante conservado desde la base 2564 hasta el extremo 3'. El epítipo repetitivo de 39 aminoácidos es parte del gen de cinesina en el extremo 3' desde la posición de base 2564 hasta 3319. Este epítipo repetitivo tiene una repetición en tándem de 117 pb en 6,5 copias notificadas y se extiende hasta de 3 a 4 kb en el extremo 3'. Se consideraron los tramos cortos sumamente conservados de secuencias en diversas posiciones para el diseño de cebadores. Se consideró el gen completo de 3,33 kb de *L. chagasi* y se intentó amplificar el marco de lectura abierto (ORF) desde la posición 454 hasta 3319 pb. Centrándose principalmente en las repeticiones en tándem inmunodominantes de 117 pb de tamaño; sin embargo se intentó amplificar y caracterizar el ORF completo con el mayor número de repeticiones posible. Se diseñaron tres cebadores directos y dos inversos para amplificar este gen detallado tal como sigue; el cebador LKF93 (SEQ ID NO: 7) está en sentido 5' con respecto al codón de iniciación previsto en 455 pb y cubrió 362 pb en sentido 5' con respecto al inicio del ORF. El cebador LKF1527 (SEQ ID NO: 9) es otro cebador directo, que comienza desde la posición en la base 1527 desde la base uno, es decir, cubre 1073 bases desde el comienzo del ORF. El tercer cebador directo es LKF 2564 (SEQ ID NO: 10) que se pretende que amplifique las repeticiones en tándem inmunodominantes en combinación con el cebador inverso LKR3266 (SEQ ID NO: 11). El primer cebador inverso es LKR 1803 (SEQ ID NO: 8), que incluye una región solapante de 276 pb con la del segundo conjunto de cebadores con otro cebador inverso LKR3266 (SEQ ID NO: 11). Las secuencias de cebadores se facilitan en de SEQ ID NO: 7 a SEQ ID NO: 11. El primer conjunto de cebadores de PCR LKF 93 (SEQ ID NO:7) y LKR 1803 (SEQ ID NO:8) amplificó un fragmento de 1,71 kb desde la posición en la base 93 en el extremo 5' del gen de cinesina hasta la posición 1803 pb en la posición 3'. El segundo conjunto de cebadores de PCR LKF 1527 (SEQ ID NO: 9) y LKR 3266 (SEQ ID NO: 11) amplificó un fragmento de 1,15 kb con una repetición en tándem de 117 pb. Estos amplicones de PCR tenían nucleótidos solapantes de 276 pb en el extremo 5' con los del primer producto de PCR amplificado. El tercer conjunto de cebadores de PCR LKF 2564 (SEQ ID NO: 10) y LKR 3266 (SEQ ID NO: 11) amplificó la región de repetición en tándem inmunodominante 117. Este tercer conjunto de cebadores amplificó un fragmento de aproximadamente 470 pb de tamaño correspondiente a las cuatro repeticiones en tándem de 117 pb para MHOM/IN/KE16/1998 y el producto de aproximadamente 590 pb de tamaño correspondiente a cinco repeticiones en tándem inmunodominantes para la cepa MHOM/IN/DD8. Todos los productos de PCR se purificaron tal como se describe a continuación y se clonaron en un vector de clonación pGEMTE y se secuenciaron en un secuenciador de ADN automatizado.

Usando puntas de pipeta libres de aerosol y manteniendo por separado los productos previos y posteriores a la PCR, se evitó la contaminación transferida por amplicones. Todas las reacciones de PCR se realizaron usando protocolos convencionales (Sambrook *et al.*, 1989) con un conjunto de controles negativos.

40	Tampón Taq 10X	5,00 µl
	dNTP 10 mM	1,00 µl
	Cebador directo (25 µM)	1,00 µl
45	Cebador inverso (25 µM)	1,00 µl
	Taq ADN polimerasa (5 U/µl) (Promega, EE.UU.)	0,25 µl
50	ADN molde	2,00 µl
	Agua estéril para enrasar el volumen a	50,00 µl

Se mantuvieron los tubos en un termociclador (MJ Research, EE.UU.) y se incubaron a 95°C durante 5 minutos seguido por 35 ciclos de amplificación.

Se resolvieron los productos de PCR amplificados mediante electroforesis en gel de agarosa. Se visualizó el gel en un transiluminador ultravioleta (UVP) y se fotografiaron usando una cámara Polaroid.

Se clonó el gen de cinesina tras la amplificación mediante PCR en un vector de clonación TA tal como sigue. Se resolvió el ADN amplificado mediante PCR sobre gel de agarosa y se cortó la parte que contenía la banda de interés con un bisturí estéril. Se eluyó el ADN del gel usando el kit de elución en gel (Qiagen, Alemania) siguiendo el protocolo del fabricante. Se midió la concentración del ADN eluido mediante absorbancia a 260 nm en un espectrofotómetro.

Se ligó directamente el producto de PCR purificado en gel en un vector pGEMT-Easy. En un tubo de microcentrifuga de 1,52 ml se añadieron los siguientes componentes.

ES 2 345 046 T3

pGEM-T Easy	1,00 μ l
Tampón de ligamiento 10X	1,00 μ l
ADN (200 ng)	5,00 μ l
ADN ligasa T4 (2 U/ μ l)	1,00 μ l
Agua para enrasar el volumen a	10,00 μ l

Tras mezclar suavemente, se incubaron los tubos a 4°C durante la noche y se calentaron durante 10 minutos a 70°C. Se almacenaron las muestras a -20°C hasta la transformación.

Entonces se transformó la mezcla ligada mediante tratamiento de choque térmico. Se prepararon las células competentes usando el método de cloruro de calcio [Sambrook *et al.*, 1989]. Se inoculó una única colonia de *E. coli* en 5 ml de medio LB y se incubó a 37°C durante la noche con agitación (200 rpm). Al día siguiente se inoculó disolución madre reciente de 100 ml de medio LB con 1 ml del cultivo durante la noche y se incubó a 37°C con agitación continua hasta que la D.O. alcanzó 0,6 a 600 nm. Se enfrió el cultivo sobre hielo durante 30 minutos y se recogieron las células mediante centrifugación a 4000 g, 4°C durante 10 min. Se resuspendió el sedimento celular en un volumen de 1/10 de CaCl₂ 50 mM estéril filtrado enfriado con hielo y se mantuvo en hielo durante 30 min. Se sedimentaron las células y finalmente se resuspendieron en un volumen de 1/25 de CaCl₂ 50 mM enfriado con hielo (con un 20% V/V de glicerol esterilizado en autoclave) y o bien se almacenaron a -70°C en alícuotas de 200 μ l o bien se usaron inmediatamente para la transformación.

Se mezclaron suavemente aproximadamente 5 μ l de mezcla de ligamiento con células competentes (200 μ l) y se incubaron en hielo durante 30 min. Tras la incubación se colocaron las células en un baño de agua fijado a 42°C durante 90 segundos (choque térmico) y se transfirieron inmediatamente a hielo. Se añadieron 800 μ l de medio LB a las células y se mantuvieron a 37°C durante 90 minutos con agitación (150 rpm). Se sembraron en placa las células con 16 μ l de X-gal y 10 μ l de IPTG 1 M sobre placas de agar LB que contenían 50 μ g/ml de ampicilina. Se incubaron las placas a 37°C durante 12-16 horas. Se seleccionaron las colonias blancas y se comprobaron para detectar el inserto.

Para la selección, se aisló el plásmido mediante el método de ebullición rápida [Holmes y Quigley, 1981]. Se recogieron las colonias con un mondadientes estéril y se inocularon en 5 ml de medio reciente. Se sedimentaron los cultivos que se hicieron crecer durante la noche y se resuspendieron las células en 500 μ l de tampón STET (sacarosa al 8% (w/v), Tris-HCl, (pH 8,0), 50 mM, EDTA Na₂, (pH 8,0) 50 mM, Triton-X 100 al 5% (p/v)) seguido por lisis con 40 μ l de lisozima. Se agitó la mezcla con vórtex y se incubó en un baño de agua en ebullición durante 90 segundos. Se eliminaron los residuos bacterianos y el ADN cromosómico mediante centrifugación a 12000 g durante 10 minutos. Se mezcló el sobrenadante con 400 μ l de isopropanol y 200 μ l de acetato de amonio 7,5 M. Se sedimentó el ADN de plásmido mediante centrifugación. Se resuspendió el sedimento seco en 100 μ l de agua estéril, se mezcló con 50 μ l de acetato de amonio 7,5 M y se incubó en hielo durante 30 minutos. Se centrifugaron las muestras a 4°C durante 10 minutos y se precipitó ADN de plásmido con etanol. Se lavó dos veces el sedimento de ADN puro obtenido tras la centrifugación con etanol al 70% seco y disuelto en 50 μ l de agua estéril.

Se realizó el análisis de restricción del plásmido recombinante usando sitios de enzima de restricción apropiados que flanquean al sitio de clonación múltiple de los vectores. Se fijó la reacción tal como sigue:

ADN de plásmido	8,00 μ l (2 μ g)
Tampón de reacción 10X	2,00 μ l
ARNasa A (10 mg/ml)	5,00 μ l
Enzima de restricción	5 unidades
Agua estéril para enrasar el volumen a	20,00 μ l

Se incubó la reacción a 37°C durante 6-8 horas y se analizaron los productos sobre gel de agarosa al 1,5% junto con marcadores de peso molecular convencionales. Se usaron los clones positivos que contenían el inserto según se detectó mediante la digestión de restricción para la secuenciación y se conservaron como disolución madre en glicerol.

Toda la secuenciación se realizó mediante el método de terminación de cadena [Sanger *et al.*, 1977] en un secuenciador de ADN automatizado, ABI Prism versión 7.0. Se analizaron las secuencias usando diversos software tales como DNASIS, Lasergene: edit; Megalign etc. (DNA star Inc.), Clustal W (alineación múltiple de diversos archivos de secuencias). Se alinearon todas las secuencias obtenidas para formar un tramo continuo usando Seqman II (paquete Lasergene). Junto con esto, se buscó la secuencia para determinar la homología usando la opción BLAST [Altschul *et al.*, 1997] de diversos sitios web.

La secuencia de cinesina de longitud completa obtenida tras ensamblar la secuencia se presentó en la SEQ ID NO: 1 para la cepa MHOM/IN/DD8, se encontró que tenía 3016 pb de longitud con un marco de lectura abierto de 2670 pb. Se encontró que la longitud de la secuencia para la cepa MHOM/IN/KE16/1998 era de 2937 pb con un marco de lectura abierto largo de 2577 pb (SEQ ID NO: 2). El análisis de secuencia reveló que el tamaño del producto de PCR que amplificaba la región inmunodominante era de 563 pb para la cepa MHOM/IN/DD8 (figura 1) correspondiente a 4,8 repeticiones en tándem de 117 pb correspondientes a 4,8 unidades de repeticiones de 39 aminoácidos y 466 pb para la cepa MHOM/IN/KE16/1998 (figura 2) correspondientes a 4 repeticiones en tándem de 117 pb (4 unidades de repeticiones de 39 aminoácidos).

Además, el análisis de secuencia muestra una variación significativa tanto a nivel del ADN como en la secuencia de aminoácidos prevista respecto a la de la secuencia de *L. chagasi*. La cepa MHOM/IN/DD8 muestra una enorme variación respecto a la de *L. chagasi* así como respecto a la cepa MHOM/IN/KE16/1998. La búsqueda en BLAST de la secuencia de proteína prevista de la cepa MHOM/IN/DD8 (SEQ ID NO: 5) usando la división de patentes y no redundante de la base de datos GenBank sólo revela hasta un 38% de identidad con la de *L. chagasi* publicada y las patentes estadounidenses números i) US 5411865 y ii) US 5912166, respectivamente, figura 3.

La alineación múltiple de secuencias Clustal W de la región de repetición inmunodominante a nivel de los nucleótidos para las cepas de *L. donovani* MHOM/IN/DD8 y MHOM/IN/KE16/1998 (SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4) con la de la región de repetición inmunodominante de *L. chagasi* se realizó y presentó en la figura 4. Las identidades se muestran con sombreado oscuro. La alineación múltiple de secuencias de la región de repetición inmunodominante a nivel de los aminoácidos entre *L. donovani* (SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6) y *L. chagasi* se presenta en la figura 5. La alineación múltiple de secuencias de la región de repetición inmunodominante a nivel de los aminoácidos para la cepa de *L. donovani* MHOM/IN/DD8 (SEQ ID NO: 5) con la de la región de repetición inmunodominante de *L. chagasi* se presenta en la figura 6. Las alineaciones de secuencias de la región de repetición inmunodominante a nivel de los aminoácidos para las dos cepas de *L. donovani* MHOM/IN/DD8 y MHOM/IN/KE16/1998 (SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6) se presentan en la figura 7. La unidad inmunodominante de repeticiones de 39 aminoácidos con variación dentro de la repetición para los aislados de la India de *L. donovani*, cepas MHOM/IN/DD8 y MHOM/IN/KE16/1998 (SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6), se presentan en la figura 8 y la figura 9. El análisis de secuencia revela que los aminoácidos varían enormemente teniendo muchas sustituciones tanto conservadas como variables en muchas posiciones en la secuencia de 39 aminoácidos notificada para *L. chagasi*. Al menos cinco aminoácidos para *L. donovani* son diferentes de los de *L. chagasi* en las posiciones 18, 27, 29, 32 y 38 indicadas por "*" en la tabla 1 a continuación.

Tras analizar las secuencias *in silico* se encontró una variación significativa en la secuencia de aminoácidos en la región inmunodominante de la cepa MHOM/IN/DD8 con la de *L. chagasi*. Entonces, para confirmar si la variación de secuencia provoca algún efecto sobre el rendimiento del antígeno para detectar anticuerpos anti-*Leishmania*, se expresó la región inmunodominante a partir de los dos aislados de la India de *Leishmania donovani* en el vector de expresión de *E. coli* pRSET (Invitrogen) como proteína con etiqueta de 6X-His. Se expresaron diversas combinaciones de la repetición inmunodominante como una, dos, tres, cuatro, 4,8 unidades y una repetición con los 889 nucleótidos en sentido 5' con respecto al dominio inmunodominante. Se encontró que los péptidos recombinantes con cuatro y 4,8 unidades de repetición tenían una especificidad y sensibilidad superiores. Por tanto, el trabajo se centró en polipéptidos que contenían 4,0 y 4,8 unidades de repetición de 39 aminoácidos.

Se digirió completamente el vector de expresión de *E. coli* pRSET C (Invitrogen, Países Bajos) con las enzimas de restricción PstI y NcoI a 37°C durante la noche. Se fraccionó el plásmido digerido en gel de agarosa para eliminar el fragmento de relleno. Se cortó la banda de plásmido y se eluyó mediante el sistema de elución en gel de Qiagen y se almacenó a -20°C hasta su uso adicional.

Se liberó el inserto a partir del plásmido pGEM-TE recombinante que portaba las repeticiones en tándem inmunodominantes (pGEM-TEasy/DD8/LKF2564 y pGEM-TEasy/KE16/LKF2564) digiriéndolo con PstI y NcoI. Se cortaron los insertos del gel, se eluyeron mediante el sistema de elución en gel de Qiagen y se ligaron en marco en el vector pRSET C digerido con PstI y NcoI y se transformaron en células competentes BL21 mediante el protocolo convencional [Sambrook *et al.*, 1989]. Se seleccionaron los clones sobre las placas de ampicilina y se aisló ADN de plásmido y se digirió con PstI y NcoI para comprobar adicionalmente para detectar el inserto. Se seleccionaron los clones que liberaban el inserto para la inducción de proteínas.

TABLA 1

Posición de aminoácido	MHOM/IN/DD8 (SEQ ID NO: 5)	MHOM/IN/KE16/1998 (SEQ ID NO: 6)	<i>L. chagasi</i> (Reed USPTO: 5.411.865)
1	K, L, A y S	L	L
2	E	E	E
3	Q, G, V, A	Q	Q

ES 2 345 046 T3

4	Q, R	Q, R	Q
5	L, A	L	L
6	R, A	R	R
7	D, E	D, E	D, E
8	S, L	S	S
9	E, A	E	E
10	T, R, G y A	E, A	E, A
11	R, K, V y Q	R, H	R
12	A, L	A	A
13	A, E, K	A	A
14	E, A y S	E	E
15	L, T, A	L	L
16	K, A	M, K y A	A
17	A, S	R, A y S	S
18*	E, A y V	K, Q	Q
19	L, K	L	L
20	E, N, T y S	E	E
21	A, L, y S	A, S	A, S
22	T, V y M	T	T
23	A, E	A	A, T
24	A, Q	A	A
25	A, D y E	A	A
26	K, R	K	K
27*	T, E	S, T	M, S
28	S, R y N	S	S
29*	V, T	A	A
30	E, R	E	R
31	Q, A	Q	Q
32*	E, T y A	D	D
33	R, L	R	R
34	E	E	E
35	K, E y Q	N	N, Q
36	T, R y Q	T	T
37	R, L	R	R

ES 2 345 046 T3

38*	T, R	A	A
39	A, I, E y L	T, A	T, A

5

Entonces, se inoculó una única colonia de *E. coli* recombinante (BL 21) que contenía el inserto en 2 ml de SOB que contenía ampicilina (50 µg/ml) y se incubó durante la noche a 37°C con agitación (225 rpm). Al día siguiente, se inocularon 25 ml de SOB con el cultivo durante la noche y se dejó que crecieran a 37°C con agitación hasta una DO₆₀₀ de 0,6. Se extrajo una alícuota de 1 ml de células, se centrifugó y se congeló a -20°C. Se añadió al cultivo IPTG hasta una concentración final de 1 mM y se incubó a 37°C con agitación. Se realizó un perfil temporal de la expresión para determinar el tiempo de inducción óptimo para una expresión máxima de la proteína tomando una alícuota de células a 1, 2, 3, 4 y 5 horas tras la inducción con IPTG y se analizó mediante SDS-PAGE e inmunotransferencia de tipo Western. Además, para determinar la solubilidad de la proteína, se inoculó una única colonia de *E. coli* recombinante (BL 21) que contenía el inserto en 2 ml de SOB que contenía ampicilina (50 µg/ml) y se incubó durante la noche a 37°C con agitación (225 rpm). Al día siguiente, se inocularon 25 ml de SOB con el cultivo durante la noche y se dejó que crecieran a 37°C con agitación hasta una DO₆₀₀ de 0,6. Se retiró una alícuota de 1 ml de células, se centrifugó y se congeló a -20°C. Se añadió al cultivo IPTG hasta una concentración final de 1 mM y se incubó a 37°C con agitación durante 4 horas adicionales. Se recogieron las células mediante centrifugación a 4000xg durante 20 minutos y se resuspendió el sedimento en tampón de lisis para su purificación en condiciones nativas (Qiagen, Alemania) y se sometió a lisis mediante sonicación, 6 x 10 s con pausas de 10 s a 200-300 W. Se centrifugó el lisado en una centrífuga refrigerada durante 10 minutos a 10.000xg. Se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo y se resuspendió el sedimento en tampón de lisis y se conservó en hielo. Se mezclaron por separado el sedimento y el sobrenadante con tampones de muestra para SDS-PAGE 2 X y se analizaron usando SDS-PAGE al 12% e inmunotransferencia de tipo Western. Los resultados muestran que la proteína puede detectarse en la fracción soluble y por tanto puede purificarse en condiciones nativas.

Se inocularon los clones que producían un máximo de proteína en 20 ml de SOB que contenía ampicilina 100 µg/ml y se hicieron crecer durante la noche a 37°C con agitación vigorosa. Al día siguiente, se inoculó 1 litro de SOB con cultivo durante la noche no inducido 1:50 y se dejó que creciera a 37°C con agitación hasta que se alcanzó una DO₆₀₀ de 0,6. Se tomó una alícuota de 5 ml de cultivo inmediatamente antes de la inducción. Se indujeron las células añadiendo IPTG hasta una concentración final de 1 mM y se continuó la incubación a 37°C durante 4 horas. Se recogieron las células mediante centrifugación a 4000xg durante 20 minutos y se almacenaron a -20°C hasta la purificación.

Se purificó la proteína recombinante usando una columna de Ni-NTA agarosa (Qiagen, Alemania) en condiciones nativas siguiendo el protocolo del fabricante. Se descongelaron los sedimentos celulares durante 15 minutos en hielo y se resuspendieron en tampón de lisis a 5 ml por gramo de peso en húmedo. A esto se le añadió lisozima a 1 mg/ml y se incubó durante 30 minutos en hielo y se sonicó en hielo usando seis ráfagas de 10 s a 200-300 W con un periodo de espera de 10 s entre cada ráfaga. Se centrifugó el lisado a 10.000x g durante 30 minutos a 4°C para sedimentar el residuo celular. Se conservó el sobrenadante. Se tomó una alícuota de 50 µl de sobrenadante y se almacenó a -20°C para el análisis posterior. Se añadió 1 ml de la suspensión de Ni-NTA al 50% a 4 ml de lisado aclarado y se mezcló suavemente mediante agitación (200 rpm en un agitador rotativo) a 4°C durante 60 minutos. Se cargó la mezcla de lisado-Ni-NTA en una columna con la salida de fondo tapada. Se recogió la fracción no retenida tras retirar la tapa del fondo y se lavó la columna dos veces con 4 ml de tampón de lavado y se recogieron las fracciones para su análisis por SDS-PAGE. Se eluyó la proteína 4 veces con 0,5 ml de tampón de elución y se recogió el eluato en 4 tubos y se analizó mediante SDS-PAGE. Se encontró que la expresión de la proteína tras la purificación era de 4 mg/litro.

Para el análisis de la proteína expresada, se usó una miniunidad de electroforesis en gel (Bangalore Genei, India). Se llevó a cabo la SDS-PAGE según protocolos definidos [Laemmli, 1970]. Se preparó un gel de resolución al 10% mezclando los siguientes componentes: 2,66 ml de agua, 1,562 ml de acrilamida al 30%, 1,250 ml de Tris-HCl 1,5 M, 50 µl de APS al 10%, TEMED al 10%. La parte superior del gel fue de ~400 µl de butanol saturado en agua y se dejó que se polimerizara. Tras la polimerización, se eliminó el butanol mediante drenaje y se lavó con agua destilada. Entonces, se vertieron cuidadosamente 2 ml de mezcla de gel concentrador (1,25 ml agua, 250 µl de acrilamida al 30%, 500 µl de Tris-HCl 0,5 M, 30 µl de APS al 10% y 5 µl de TEMED) evitando las burbujas de aire en la parte superior del gel de resolución. Se insertó el peine en la parte de gel concentrador y se dejó para su polimerización. Tras la polimerización se lavaron los pocillos con una cantidad en exceso de agua. Se aplicaron las muestras a los pocillos definidos en el gel concentrador y se llevó a cabo la electroforesis a una tensión constante (60 V para el gel concentrador y 100 V para el gel de resolución). Se corrieron marcadores de proteínas moleculares patrón (MBI) y control (proteína vector) junto con las muestras. Entonces se tiñó el gel completado con tinción azul brillante de Coomassie, se eliminó la tinción y se visualizó frente a luz blanca.

La proteína purificada a partir de la cepa MHOM/IN/DD8 migró a un tamaño de 29 kDa en correlación con el peso molecular previsto y el peso molecular previsto de la cepa MHOM/IN/KE16/1998 era de 26 kDa pero la proteína purificada a partir de esta cepa tenía una movilidad en PAGE aberrante y migraba a un peso molecular superior de ~32 kDa (figura 10a). Los antígenos notificados eran totalmente diferentes del antígeno de 230 kDa de *Leishmania chagasi*. El antígeno varía significativamente, más de un 60% en su secuencia de aminoácidos prevista con respecto al antígeno de repeticiones K39 de *L. chagasi*. También se dan a conocer ADN que codifican para el antígeno de 29 kD y de 26 kD y composiciones terapéuticas y de vacuna que comprenden los antígenos.

Se usaron polipéptidos recombinantes purificados a partir de las cepas MHOM/IN/DD8 y MHOM/IN/KE16/1998 para la inmunización en conejos. Se emulsionaron 100 microgramos de cada polipéptido con un volumen igual de adyuvante completo de Freund (Sigma, EE.UU.). Se inyectó la mezcla por vía intradérmica en múltiples sitios. Se administraron tres dosis de refuerzo de la misma cantidad de antígeno emulsionado con adyuvante incompleto de Freund a intervalos de 30 días. Antes de la primera inmunización, se recogió suero preinmunitario y se sometió a prueba en inmunotransferencias de tipo Western. Se recogió sangre de manera aséptica de los animales inmunizados 12 días tras el último refuerzo, se separaron los sueros y se almacenaron a -70°C hasta su uso.

Se resolvió la proteína expresada en *E. coli* en SDS-PAGE al 12% seguido por electrotransferencia a membrana de nitrocelulosa [Towbin *et al.*, 1976]. Se llevó a cabo la transferencia usando tampón de transferencia (3,08 g de base de Tris, 14,66 g de glicina, 200 ml de metanol, agua hasta el volumen final de 1000 ml) en una unidad de transferencia en semiseco de Bio-Rad. Para la transferencia, se aplicaron 15 V y se dejó correr durante 45 minutos a temperatura ambiente. Tras la transferencia, se colocó la membrana en una disolución de bloqueo que contenía BSA al 2,5% en solución salina tamponada con fosfato (PBS, 8,00 g de NaCl, 0,20 g de KCl, 1,44 g NaH₂PO₄, 0,24 g de KH₂PO₄, pH 7,4). Se lavó tres veces la membrana bloqueada, con PBS que contenía Tween-20 al 0,02% (PBS-T). Se incubó la membrana con suero de paciente con kala-azar (diluido 1:200 con PBS) durante 1 hora a 25°C. Además, se lavó 4 veces con PBS-T y se incubó en anticuerpos anti-IgG humana diluidos 1:4000, conjugados con fosfatasa alcalina durante 45 minutos a temperatura ambiente. Tras varios lavados con PBS, se reveló la membrana mediante la adición de BCIP-NBT (Amresco, EE.UU.).

En primer lugar se corrieron los antígenos purificados en SDS-PAGE y después se sometieron a inmunotransferencia con anticuerpo anti-penta-his conjugado con HRP (figura 10a y 10b). Para estudiar la antigenicidad de las proteínas purificadas, se llevó a cabo SDS-PAGE seguido por inmunotransferencia con sueros de pacientes con kala-azar (figuras 11a y 11b) y se realizó la inmunotransferencia con sueros de pacientes con LDPK (figuras 12a y 12b) seguido por inmunotransferencia de tipo Western con sueros de individuos sanos combinados (n=5) como control y se presentan en las figuras 13a y 13b. Además, se realizó la inmunotransferencia sólo con anticuerpo secundario anti-ser humano marcado con AP tal como se muestran en las figuras 14a y 14b. Los resultados de la inmunotransferencia y el análisis de secuencia revelan que los productos recombinantes de *L. donovani* son específicos a pesar de tener un epítipo diferente.

Tras la estimación de la proteína mediante el método de BCA (Sigma) se tomó el antígeno purificado para su evaluación mediante ELISA. Se normalizó inicialmente el ELISA para diferentes parámetros con controles de reactivos y suero apropiados. Se eligió el ELISA a 50 ng/pocillo y diluciones 1:100 de sueros como óptimos y se usaron las mismas condiciones para el ELISA con dos antígenos de *L. donovani*, a saber MHOM/IN/DD8 y MHOM/IN/KE16/1998. En cada placa se incluyeron un control positivo (parasitológica y serológicamente positivo para rK39) y un control negativo con sueros de una región no endémica distinta con control de reactivo. Se recubrieron las placas tal como sigue; se recubrieron placas de microtitulación de poliestireno con 96 pocillos de fondo plano con antígeno siguiendo el protocolo convencional con modificaciones menores [Singh S *et al.*, 1995] añadiendo 50 ng de antígeno de cinesina purificado en 200 µl de tampón bicarbonato 0,1 M, pH 9,2. Se cubrieron las placas y se incubaron durante la noche a 4°C. Entonces se retiró la disolución de antígeno y se lavaron las placas 3 veces con PBST (PBS con Tween 20 al 0,05%). Entonces se bloquearon los pocillos con 200 µl de BSA al 1% durante 1 hora, se lavaron 3 veces con PBST. Se secaron las placas a temperatura ambiente, se sellaron y se almacenaron a 4°C hasta su uso. Se incubaron las placas sensibilizadas durante 2 horas con 50 µl de suero de paciente diluido desde 1:100 hasta el punto final con PBST. Se lavaron de nuevo los pocillos con PBST y se incubaron con 50 µl de anticuerpo de cabra anti-IgG humana conjugado con fosfatasa alcalina a una dilución de 10⁻³ durante otras 2 horas, seguido por lavado 3 veces con PBST. Tras la incubación durante 30 minutos a 37°C con 50 µl de fosfato de p-nitrofenilo en tampón de dietilamina, se detuvo la reacción con 50 µl de NaOH 3 N. Se midió la densidad óptica de cada pocillo a 450 nm en un lector de placas Tririus. Los títulos de anticuerpos frente a la proteína recombinante de MHOM/IN/DD8 (SEQ ID NO: 5) fueron considerablemente inferiores a los de MHOM/IN/KE16/1998 (SEQ ID NO: 6) para el mismo grupo de muestras. Los estudios preliminares con 72 controles sanos endémicos y 80 no endémicos, 92 sueros positivos para tuberculosis, 32 positivos para VIH, 31 positivos para VHC y 27 positivos para HbsAg no mostraron reactividad cruzada. Sin embargo, los casos previamente confirmados positivos para rK39 de 10 sueros de LV y 10 de LDPK mostraron altos títulos de anticuerpos con ambos antígenos a una concentración de 50 ng/pocillo. Los datos muestran que estos dos antígenos bien caracterizados de las cepas de la India serán sumamente útiles para el diagnóstico de kala-azar en la India.

La figura 15 representa el valor de título medio de diferentes muestras sometidas a ELISA usando antígeno purificado de origen de MHOM/IN/DD8 y la figura 16 muestra el valor de título medio de diferentes conjuntos de muestras para el antígeno purificado de origen de MHOM/IN/KE16/1998.

Detección de antígeno de *Leishmania* usando anticuerpo

Se usaron polipéptidos recombinantes purificados de las cepas de SEQ ID NO: 5 y de SEQ ID NO: 6 para la inmunización en conejos. Se emulsionaron 100 microgramos de cada polipéptido con un volumen igual de adyuvante completo de Freund (Sigma, EE.UU.). Se inyectó la mezcla por vía intradérmica en múltiples sitios. Se administraron tres dosis de refuerzo de la misma cantidad de antígeno emulsionado con adyuvante incompleto de Freund a intervalos de 30 días. Antes de la primera inmunización, se recogió suero preinmunitario y se sometió a prueba en inmunotransferencias de tipo Western. Se recogió sangre de manera aséptica de los animales inmunizados 12 días tras el último

refuerzo, se separaron los sueros y se purificó mediante afinidad el anticuerpo presente en los sueros y se almacenó a 4°C hasta su uso.

Se recubrieron placas de microtitulación de poliestireno con 96 pocillos diluyendo el anticuerpo almacenado a 4°C con tampón de recubrimiento (pH 9,2) [1,59 g de carbonato de sodio (Na_2CO_3), 2,93 g de bicarbonato de sodio (NaHCO_3), 0,20 g de azida de sodio (NaN_3), disuelto en 900 ml de H_2O , ajustándose el pH hasta 9,6 con HCl y enrasándose a 1 l] y se añadieron 200 μl a cada pocillo de una placa de microtitulación. Se incubaron las placas a 37°C durante 4 h y se lavaron con PBS-Tween, tres veces. Se secaron las placas dándole pequeños golpes de forma invertida sobre papel delgado. Entonces se usó el anticuerpo recubierto sobre el soporte sólido para la detección del antígeno de *Leishmania*, este método se denomina ELISA de tipo sándwich o de doble anticuerpo, y se realizó tal como sigue. A cada pocillo se le añadieron alícuotas de 200 μl de la muestra de prueba y se incubaron durante 4 horas a 37°C, se lavaron las placas tres veces con PBST y después se incubaron con conjugado de anticuerpo y se incubaron a 37°C durante 2 horas, se lavaron tres veces con PBST y se añadieron alícuotas de 200 μl de sustrato a cada pocillo y se incubaron a temperatura ambiente durante 60 min. Se midió la densidad óptica de cada pocillo a 405 nm en un lector de placas Triterius®. El ELISA de tipo sándwich mide la cantidad de antígeno entre dos capas de anticuerpos. El antígeno de *Leishmania* que va a medirse contiene al menos dos sitios antigénicos, que pueden unirse al anticuerpo, ya que al menos dos anticuerpos actúan en el sándwich. De modo que los ensayos de tipo sándwich están limitados a la cuantificación de antígenos multivalentes tales como proteínas o polisacáridos. El ELISA de tipo sándwich para la cuantificación de antígenos es especialmente valioso cuando la concentración de antígenos es baja y/o están contenidos en altas concentraciones de proteína contaminante.

Los siguientes ejemplos ilustran la invención, que no deben interpretarse como que limitan el alcance de la invención.

25 Ejemplo 1

Este ejemplo ilustra la clonación de la región de repetición inmunodominante de cinesina a partir de aislados de la India de *L. donovani*. Se siguió una estrategia de clonación de PCR usando un conjunto de cebadores LKF 2564 y LKR 3266 (SEQ ID NO: 10 y SEQ ID NO: 11, respectivamente) para amplificar la región de repetición en tándem 117 inmunodominante. Este conjunto de cebadores amplificó un fragmento de aproximadamente 470 pb de tamaño, correspondiente a las cuatro repeticiones en tándem de 117 pb de la cepa de *L. donovani* MHOM/IN/KE16/1998 y correspondiendo el producto de aproximadamente 590 pb de tamaño a cinco repeticiones en tándem de la cepa de *L. donovani* MHOM/IN/DD8. Tras la amplificación mediante PCR se clonó el gen de la cinesina en un vector de clonación TA tal como sigue. Se resolvieron los ADN amplificados mediante PCR sobre gel de agarosa y se cortó la parte que contenía la banda de interés con un bisturí estéril. Se eluyó el ADN a partir del gel usando un kit de elución en gel (Qiagen, Alemania) siguiendo el protocolo del fabricante. Se midió la concentración del ADN eluido mediante absorbancia a 260 nm en un espectrofotómetro.

El producto de interés de PCR purificado en gel se ligó directamente en un vector pGEMT-Easy (Promega, EE.UU.). En un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml se añadieron los siguientes componentes.

pGEM-T Easy (100 ng/ μl)	1,00 μl
tampón de ligamiento 10X	1,00 μl
ADN (200 ng)	5,00 μl
ADN ligasa de T4 (2 U/ μl)	1,00 μl
Agua para enrasar a	10,00 μl

Tras mezclar suavemente, se incubaron los tubos a 4°C durante la noche y se calentaron durante 10 minutos a 70°C. Se almacenaron las muestras a -20°C hasta la transformación. Entonces se transformó la mezcla ligada mediante tratamiento de choque térmico. Se prepararon las células competentes usando el método de cloruro de calcio [Sambrook *et al.*, 1989]. Se inoculó una única colonia de *E. coli* en 5 ml de medio LB y se incubó a 37°C durante la noche con agitación (200 rpm). Al día siguiente se inoculó una disolución madre reciente de 100 ml de medio LB con 1 ml del cultivo durante la noche y se incubó a 37°C con agitación continua hasta que la D.O. alcanzó 0,6 a 600 nm. Se enfrió bruscamente el cultivo en hielo durante 30 minutos y se recogieron las células mediante centrifugación a 4000 g, 4°C durante 10 min. Se resuspendió el sedimento celular en un volumen 1/10 de CaCl_2 50 mM estéril filtrado enfriado con hielo y se mantuvo en hielo durante 30 min. Se sedimentaron las células y se resuspendieron finalmente en un volumen 1/25 de CaCl_2 50 mM enfriado con hielo (con un 20% V/V de glicerol sometido a autoclave) y o bien se almacenaron a -70°C en alícuotas de 200 μl o bien se usaron inmediatamente para su transformación.

Se mezclaron suavemente 5 μl aproximadamente de mezcla de ligamiento con células competentes (200 μl) y se incubaron en hielo durante 30 min. Tras la incubación se colocaron las células en un baño de agua fijado a 42°C durante 90 segundos (choque térmico) e inmediatamente se transfirieron a hielo. Se añadieron 800 μl de medio LB a

las células y se mantuvieron a 37°C durante 90 minutos con agitación (150 rpm). Se sembraron las células con 16 µl de X-gal y 10 µl de IPTG 1 M en placas de LB-agar que contenían 50 µg/ml de ampicilina. Se incubaron las placas a 37°C durante 12-16 horas. Se seleccionaron las colonias blancas y se comprobaron para detectar el inserto. Se caracterizaron adicionalmente los clones recombinantes mediante mapeo de restricción y secuenciación. Toda la secuenciación se realizó mediante el método de terminación de cadena [Sanger *et al.*, 1977] en un secuenciador de ADN automatizado, ABI Prism versión 7.0. Se analizaron las secuencias usando diversos software tales como DNASIS, Lasergene: edit; Megalign etc. (DNA star Inc.), Clustal W (alineación múltiple de diversos archivos de secuencias). Se alinearon todas las secuencias obtenidas para formar un tramo continuo usando Seqman II (paquete Lasergene).

Junto con esto, se buscó la secuencia para determinar la homología usando la opción BLAST [Altschul *et al.*, 1997] de diversos sitios web.

La secuencia de cinesina de longitud completa obtenida tras ensamblar la secuencia se presentó en SEQ ID NO: 1 para la cepa MHOM/IN/DD8, se encontró que tenía 3016 pb de longitud con un marco de lectura abierto de 2670 pb. Se encontró que la longitud de la secuencia para la cepa MHOM/IN/KE16/1998 era de 2937 pb con un marco de lectura abierto largo de 2577 pb (SEQ ID NO: 2). El análisis de secuencia reveló que el tamaño del producto de PCR que amplificaba la región inmunodominante era de 563 pb para la cepa MHOM/IN/DD8 (figura 1) correspondiente a 4,8 repeticiones en tándem de 117 pb, y de 466 pb para la cepa MHOM/IN/KE16/1998 (figura 2) correspondiente a 4 repeticiones en tándem de 117 pb.

Además, el análisis de secuencia muestra una variación significativa tanto a nivel del ADN como en la secuencia de aminoácidos prevista a partir de la secuencia de *L. chagasi* notificada (GenBank, n.º de registro L07879). La cepa MHOM/IN/DD8 muestra una variación significativa con respecto a la de *L. chagasi* así como con respecto a la de la cepa MHOM/IN/KE16/1998. La búsqueda en BLAST de la secuencia de proteína prevista de la cepa MHOM/IN/DD8 (SEQ ID NO: 5) usando la división de patentes y no redundante de la base de datos GenBank sólo revela una identidad de hasta el 38% con la de *L. chagasi* publicada y las patentes estadounidenses n.ºs i) US 5411865 y ii) US 5912166, respectivamente, figura 3.

Se realizó la alineación múltiple de secuencias Clustal W de la región de repetición inmunodominante a nivel de los nucleótidos para las cepas de *L. donovani* MHOM/IN/DD8 y MHOM/IN/KE16/1998 (SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4) con la de la región de repetición inmunodominante de *L. chagasi* (GenBank, n.º de registro L07879) y se presenta en la figura 4. Las identidades se muestran con sombreado oscuro. La alineación múltiple de secuencias de la región de repetición inmunodominante a nivel de los aminoácidos entre *L. donovani* (SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6) y *L. chagasi* se presenta en la figura 5. La alineación múltiple de secuencias de la región de repetición inmunodominante a nivel de los aminoácidos para la cepa de *L. donovani* MHOM/IN/DD8 (SEQ ID NO: 5) con la de la región de repetición inmunodominante de *L. chagasi* se presenta en la figura 6. Las alineaciones de secuencias de la región de repetición inmunodominante a nivel de los aminoácidos para las dos cepas de *L. donovani* MHOM/IN/DD8 y MHOM/IN/KE16/1998 (SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6) se presentan en la figura 7. La unidad inmunodominante de repeticiones de 39 aminoácidos con variación dentro de la repetición para los aislados de la India de *L. donovani*, cepas MHOM/IN/DD8 y MHOM/IN/KE16/1998 (SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6), se presentan en la figura 8 y la figura 9. El análisis de secuencia revela que los aminoácidos varían significativamente teniendo muchas sustituciones. Estas sustituciones se conservan o son variables en muchas posiciones en la región de repetición de 39 aminoácidos notificada para *L. chagasi*. Al menos cinco aminoácidos para *L. donovani* son diferentes a los de *L. chagasi* en las posiciones 18, 27, 29, 32 y 38 indicadas por "*" en la tabla 1.

Ejemplo 2

Este ejemplo ilustra la reactividad de sueros de pacientes para reconocer los antígenos de *L. donovani* recombinantes. Se liberó el inserto del plásmido pGEM-TE recombinante que portaba las repeticiones en tándem inmunodominantes (pGEMTEasy/DD8/LKF2564 y pGEM-TEasy/KE16/LKF2564) digiriéndolo con PstI y NcoI. Se cortaron los insertos del gel, se eluyeron mediante el sistema de elución en gel Qiagen y se ligaron en marco en el vector pRSET C digerido con PstI y NcoI y se transformaron en células competentes BL21 mediante el protocolo convencional [Sambrook *et al.*, 1989]. Se seleccionaron los clones sobre las placas de ampicilina y se aisló ADN de plásmido y se digirió con PstI y NcoI para comprobar el inserto. Se seleccionaron los clones que liberaban el inserto para la expresión de la proteína. Se inocularon los clones que producían un máximo de la proteína en 20 ml de medio SOB que contenía ampicilina 100 µg/ml y se hicieron crecer durante la noche a 37°C con agitación vigorosa. Al día siguiente, se inoculó 1 litro de medio SOB con cultivo durante la noche no inducido 1:50 y se dejó crecer a 37°C con agitación hasta que se alcanzó una DO₆₀₀ de 0,6. Se tomó una alícuota de 5 ml de cultivo inmediatamente antes de la inducción. Se indujeron las células añadiendo IPTG hasta una concentración final de 1 mM y se continuó la incubación a 37°C durante 4 horas. Se recogieron las células mediante centrifugación a 4000xg durante 20 minutos y se almacenaron a -20°C hasta la purificación. Se purificó el polipéptido recombinante usando una columna de Ni-NTA agarosa (Qiagen, Alemania) en condiciones nativas siguiendo el protocolo del fabricante. La proteína purificada a partir de la cepa MHOM/IN/DD8 migró a un tamaño de 29 kDa (figura 10a, carril 2) que se correlaciona con el peso molecular previsto. En primer lugar se corrieron los antígenos purificados en SDS-PAGE (figuras 10a, 11a, 12a y 13a) y después se realizaron los sometidos a inmunotransferencia con anticuerpo anti-penta-his conjugado con HRP (figura 10b), sueros de pacientes con kala-azar (figura 11b), sueros de pacientes con LDPK (figura 12b) seguido por inmunotransferencia de tipo Western con sueros de individuos sanos combinados (n=5) (figura 13b), sólo con anticuerpo secundario anti-ser humano

marcado con AP (figura 14b). Los resultados de la inmunotransferencia y el análisis de secuencia revelan que los antígenos recombinantes de *L. donovani* son específicos a pesar de tener un epítipo diferente.

Ejemplo 3

Este ejemplo ilustra la reactividad de sueros de pacientes para reconocer los antígenos de *L. donovani*. Se realizó la estimación de proteínas mediante el método de BCA (Sigma, EE.UU.) y se usaron los antígenos purificados para ELISA. El ELISA se normalizó inicialmente para diferentes parámetros con controles de reactivos y suero apropiados. Se eligieron el ELISA a 50 ng/pocillo y diluciones 1:100 de sueros como óptimos y se usaron las mismas condiciones para el ELISA con dos polipéptidos recombinantes de *L. donovani*, a saber MHOM/IN/DD8 (SEQ ID NO: 5) y MHOM/IN/KE16/1998 (SEQ ID NO: 6). En cada placa se incluyeron un control positivo (parasitológica y serológicamente positivo para rK39) y un control negativo con sueros de una región no endémica y otro con control de reactivos. Se recubrieron las placas tal como sigue; se recubrieron placas de microtitulación de poliestireno con 96 pocillos de fondo plano con antígeno siguiendo el protocolo notificado por Singh S *et al.*, con modificaciones menores, añadiendo 50 ng de antígeno de cinesina purificado en 200 μ l de tampón bicarbonato 0,1 M, pH 9,2. Se cubrieron las placas y se incubaron durante la noche a 4°C. Entonces se retiró la disolución de antígeno y se lavaron las placas 3 veces con PBST (PBS con Tween 20 al 0,05%). Entonces se bloquearon los pocillos con 200 μ l de BSA al 1% durante 1 hora, se lavaron 3 veces con PBST. Se secaron las placas a temperatura ambiente, se sellaron y se almacenaron a 4°C hasta su uso. Se incubaron las placas sensibilizadas durante 2 horas con 50 μ l de suero de paciente diluido desde 1:100 hasta el punto final con PBST. Se lavaron los pocillos tres veces con PBST y se incubaron con 50 μ l de anticuerpo de cabra anti-IgG humana conjugado con fosfatasa alcalina a una dilución de 10^{-3} durante otras 2 horas, seguido por lavado 3 veces con PBST. Tras la incubación durante 30 minutos a 37°C con 50 μ l de fosfato de p-nitrofenilo en tampón de dietilamina, se detuvo la reacción con 50 μ l de NaOH 3 N. Se midió la densidad óptica de cada pocillo a 450 nm en un lector de placas Tririus®. Los títulos de anticuerpos frente a la proteína recombinante de MHOM/IN/DD8 (SEQ ID NO: 5) fueron considerablemente inferiores a los de MHOM/IN/KE16/1998 (SEQ ID NO: 6) para el mismo grupo de muestras. El estudio preliminar se llevó a cabo con sueros de 72 controles sanos endémicos y 80 no endémicos, 92 individuos sueros positivos para tuberculosis, 32 positivos para VIH, 31 positivos para VHC y 27 positivos para HbsAg. Estos resultados de ELISA mostraron una especificidad del 100% sin reactividad cruzada. Sin embargo, el ELISA llevado a cabo para sueros de pacientes con LV (N=10) y LDPK (N=10) confirmados con antígeno rK39 de *L. chagasi* (Burns *et al.*, 1993), antígeno de *L. donovani* de las cepas MHOM/IN/DD8 (SEQ ID NO: 5) y MHOM/IN/KE16/1998 (SEQ ID NO: 6) muestra un alto título de anticuerpos para los tres antígenos a una concentración de 50 ng/pocillo. Los datos muestran que estos dos antígenos bien caracterizados a partir de las cepas de la India son sumamente específicos y sensibles para el diagnóstico de kala-azar en la India. En un estudio realizado con más muestras se encontró que se detectaba un número considerable de casos que no podían diagnosticarse mediante rK39 de *L. chagasi* mediante estos dos polipéptidos recombinantes de *L. donovani*. Esto revela que los polipéptidos recombinantes recién aislados a partir de cepas de la India de *L. donovani* son más específicos para el diagnóstico de LV y LDPK en la India y por tanto pueden usarse ampliamente para el diagnóstico de esta enfermedad.

Sin embargo, en la figura 15 y la figura 16 sólo se presentan los datos pertenecientes a 10 muestras positivas y otras muestras de control. La figura 15 representa el valor de título medio de diferentes muestras sometidas a ELISA usando antígeno purificado de origen de MHOM/IN/DD8 y la figura 16 muestra el valor de título medio de un conjunto diferente de muestras para el antígeno purificado de origen de MHOM/IN/KE16/1998.

Ejemplo 4

Este ejemplo enseña la obtención de anticuerpos frente a los polipéptidos SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 6 a partir de un animal y su uso en la detección de anticuerpo frente a *Leishmania* tal como sigue;

1. Se usaron polipéptidos recombinantes purificados del grupo que contiene SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6 para la inmunización en conejos. Se emulsionaron 100 microgramos del polipéptido con un volumen igual de adyuvante completo de Freund (Sigma, EE.UU.).

2. Se inyectó la mezcla por vía intradérmica en múltiples sitios.

3. Se administraron tres dosis de refuerzo de la misma cantidad de antígeno emulsionado con adyuvante incompleto de Freund a intervalos de 30 días. Antes de la primera inmunización, se recogió suero preinmunitario y se sometió a prueba en inmunotransferencias de tipo Western.

4. Se recogió sangre de manera aséptica de los animales inmunizados 12 días tras el último refuerzo, se separaron los sueros y se purificó mediante afinidad el anticuerpo anti-anticuerpo presente en los sueros y se almacenó a 4°C hasta su uso.

5. En primer lugar se diluyó el anticuerpo con tampón bicarbonato 0,1 M, pH 9,2 y después se añadieron 200 μ l a cada pocillo de la placa de microtitulación.

6. Se cubrió la placa recubierta con anticuerpo con parafina y se incubó en la sala fría durante la noche en una caja de humedad que contenía una toallita de papel húmeda o a humedad y temperatura ambiente durante dos horas.

7. Se vacía la placa y se bloquean los sitios no ocupados con 100 μ l de tampón de bloqueo que contiene tampón fosfato 100 mM, pH 7,2, BSA al 1%, Tween-20 al 0,5% y timerosol al 0,02% durante 30 min. a temperatura ambiente.

8. Se vacía la placa y se lava tres veces con tampón de lavado (tampón fosfato 100 mM, NaCl 150 mM, BSA al 0,2% y Tween 20 al 0,05%).

9. En primer lugar se diluye la disolución de antígeno con tampón de antígeno (tampón fosfato 100 mM, NaCl 150 mM) y después se añade a la placa en un volumen de 50 μ l por pocillo. Se incuba la placa a temperatura ambiente durante de 45 min. a una hora.

10. Se vacía de nuevo la placa y se lava tres veces con tampón de lavado.

11. Se diluye de manera apropiada el anticuerpo frente al antígeno marcado con enzima, con tampón bicarbonato 0,1 M, pH 9,2 y después se añaden 50 μ l a cada pocillo y se incuba a temperatura ambiente durante 30 min.

12. Se vacía de nuevo la placa y se lava tres veces con tampón de lavado.

13. Se añade el sistema de revelado con color y se miden las intensidades del color.

Ventajas

- La caracterización del antígeno relacionado con cinesina a nivel de la secuencia ha revelado las similitudes y diferencias para el antígeno de cinesina entre dos especies, *L. donovani* y *L. chagasi*.
- Queda claro a partir de esta invención que la repetición inmunodominante de antígeno relacionado con cinesina aislado a partir de cepas de la India es diferente de las secuencias notificadas anteriormente de otras especies de *Leishmania*.
- Este estudio reveló que las cepas de la India son bastante diferentes de las cepas y especies notificadas anteriormente de otras regiones geográficas.
- El estudio también reveló que la variación de la secuencia de aminoácidos entre las unidades de repetición de las cepas de la India es más alta que la de las secuencias notificadas anteriormente.
- Esta invención condujo al aislamiento de polipéptido, que tiene una secuencia diferente de la de la secuencia de polipéptido notificada anteriormente.
- Esta invención condujo al desarrollo de un método para la detección de anticuerpos anti-*Leishmania* basándose en los antígenos recién hallado a partir de aislados de la India de *L. donovani*.
- Esta invención condujo al kit de detección de leishmaniosis para la detección de LV debida a especies de *L. donovani* de la India y otras especies similares que no se habrían detectado mediante el polipéptido K39.

Bibliografía

1. Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A.A., Zhang, Z., Miller, W. and Lipman, D. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs, *J. Nucleic Acids Res.* 25: 3389-3402.
2. Attar ZJ, Chance ML, el-Safi S, Carney J, Azazy A, El-Hadi M, Dourado C, Hommel M. 2001. Latex agglutination test for the detection of urinary antigens in visceral leishmaniasis. *Acta Trop.* 78 (1): 11-6.
3. Badaro, R., D. Benson, M. C. Eulalio, M. Freire, S. Cunha, E. M. Netto, D. Pedral-Sampaio, C. Madureira, J. M. Burns, R. L. Houghton, J. R. David, and S. G. Reed. 1996. rK39: a cloned antigen for *Leishmania chagasi* that predicts active visceral leishmaniasis. *J. Infect. Dis.* 173: 758-761.
4. Beverley SM, Ismach RB, Pratt DM. 1987. Evolution of the genus *Leishmania* as revealed by comparisons of nuclear DNA restriction fragment patterns. *Proc Natl Acad Sci USA*, 84 (2): 484-8.
5. Bora D. 1999. Epidemiology of visceral leishmaniasis in India. *Natl Med J India.* 12 (2): 62-8.
6. Burns JM Jr, Shreffler WG, Benson DR, Ghalib HW, Badaro R, Reed SG. 1993. Molecular characterization of a kinesin-related antigen of *Leishmania chagasi* that detects specific antibody in African and American visceral leishmaniasis. *Proc Natl Acad Sci, USA.* 90 (2): 775-9.

7. **Cupolillo E, Grimaldi G Jr, Momen H.** 1994. A general classification of New World Leishmania using numerical zymotaxonomy. *Am J Trop Med Hyg.* 50 (3): 296-311
8. **Davidson RN.** 1998. Practical guide for the treatment of leishmaniasis. *Drugs.* 56 (6): 1009-18.
9. **Desjeux P.** 2001. The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 95 (3): 239-43.
10. **Gari-Toussaint, M., Lelievre, A., Marty, P., Le-Fichoux, Y.** 1994. Contribution of serological tests to the diagnosis of visceral leishmaniasis in patients infected with the human immunodeficiency virus. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 88 (3): 301-2
11. **Ghosh SS, Mukerjee S and Adhya S.** 1998. Chromosome profile of Leishmania donovani: Interstrain and interspecific variations. *J. Biosci.,* 23: 3; 247-254.
12. **Herwaldt BL.** 1999. Leishmaniasis. *Lancet.* 354 (9185): 1191-9.
13. **Holmes, D.S and Quigley, M.A.** 1981. A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal. Biochem.* 114, 193-197.
14. **Houghton RL, Petrescu M, Benson DR, Skeiky YA, Scalone A, Badaro R, Reed SG, Gradoni L.** 1998. A cloned antigen (recombinant K39) of Leishmania chagasi diagnostic for visceral leishmaniasis in human immunodeficiency virus type 1 patients and a prognostic indicator for monitoring patients undergoing drug therapy. *J Infect Dis.* 177 (5): 1339-44.
15. **Jelinek T, Eichenlaub S and Loscher T.** 1999. Sensitivity and specificity of a rapid immunochromatographic test for diagnosis of visceral leishmaniasis. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 18: 669-670.
16. **Jensen AT, Gasim S, Moller T, Ismail A, Gaafar A, Kemp M, el Hassan AM, Kharazmi A, Alce TM, Smith DF, Theander TG.** 1999. Serodiagnosis of Leishmania donovani infections: assessment of enzyme-linked immunosorbent assays using recombinant L. donovani gene B protein (GBP) and a peptide sequence of L. donovani GBP. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 93 (2): 157-60.
17. **Laemmli, U.K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of Bacteriophage T4. *Nature.* 227, 680-685.
18. **Maalej IA, Chenik M, Louzir H, Ben Salah A, Bahloul C, Amri F, Dellagi K.** 2003. Comparative evaluation of ELISAs based on ten recombinant or purified Leishmania antigens for the serodiagnosis of mediterranean visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg;* 68 (3): 312-20.
19. **Manson-Bahr PEC.** Diagnosis. 1987. In the Leishmaniasis in Biology and Medicine, vol. 2, Clinical Aspects and Control. W Peters & R Killick-Kendrick (eds). New York, *Academic Press Inc.:* p. 709-729
20. **Marfurt J, Niederwieser I, Makia ND, Beck HP, Felger I.** 2003. Diagnostic genotyping of Old and New World Leishmania species by PCR-RFLP. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 46 (2): 115-24.
21. **Martin SK, Thuita-Harun L, Adoyo-Adoyo M, Wasunna KM.** 1998. A diagnostic ELISA for visceral leishmaniasis, based on antigen from media conditioned by Leishmania donovani promastigotes. *Ann Trop Med Parasitol.* 92 (5): 571-7.
22. **Mauricio IL, Howard MK, Stothard JR, Miles MA.** 1999. Genomic diversity in the Leishmania donovani complex. *Parasitology.* 119 (3): 237-46.
23. **Paredes R, Laguna F, Clotet B.** 1997. Leishmaniasis in HIV-infected persons: a review. *J Int Assoc Physicians AIDS Care.* 3 (6): 22-39.
24. **Piarroux R, Fontes M, Perasso R, Gambarelli F, Joblet C, Dumon H, Quilici M.** 1995. Phylogenetic relationships between Old World Leishmania strains revealed by analysis of a repetitive DNA sequence. *Mol Biochem Parasitol.* 73 (1-2): 249-52.
25. **Raj VS, Ghosh A, Dole VS, Madhubala R, Myler PJ, Stuart KD.** 1999. Serodiagnosis of leishmaniasis with recombinant ORFF antigen. *Am J Trop Med Hyg.* 61 (3): 482-7.
26. **Rajasekariah GH, Ryan JR, Hillier SR, Yi LP, Stiteler JM, Cui L, Smithyman AM, Martin SK.** 2001. Optimisation of an ELISA for the serodiagnosis of visceral leishmaniasis using in vitro derived promastigote antigens. *J Immunol Methods.* 252 (1-2): 105-19.

27. **Roberts SC, Swihart KG, Agey MW, Ramamoorthy R, Wilson ME, Donelson JE.** 1993. Sequence diversity and organization of the msp gene family encoding gp63 of *Leishmania chagasi*. *Mol Biochem Parasitol.* 62 (2): 157-71.
- 5 28. **Samaras N, Spithill TW.** 1987. Molecular karyotype of five species of *Leishmania* and analysis of gene locations and chromosomal rearrangements. *Mol Biochem Parasitol.* 25 (3): 279-91.
29. **Sambrook. J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T.** 1989. Molecular cloning, A laboratory Manual. 2 ed. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, U.S.A.
- 10 30. **Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R.** 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 74, 5463-5467.
31. **Santos-Gomes G, Gomes-Pereira S, Campino L, Araujo MD, Abranches P.** 2000. Performance of immunoblotting in diagnosis of visceral Leishmaniasis in human immunodeficiency virus-*Leishmania* sp.-coinfected patients. *J Clin Microbiol.* 38 (1): 175-8.
- 15 32. **Sassi A, Louzir H, Ben Salah A, Mokni M, Ben Osman A, Dellagi K.** 1999. Leishmanin skin test lymphoproliferative responses and cytokine production after symptomatic or asymptomatic *Leishmania* major infection in Tunisia. *Clin Exp Immunol.* 116 (1): 127-32
33. **Schallig HD, Schoone GJ, Kroon CC, Hailu A, Chappuis F, Veeken H.** 2001. Development and application of "simple" diagnostic tools for visceral leishmaniasis. *Med Microbiol Immunol (Berl).* 190 (1-2): 69-71.
- 25 34. **Schoone GJ, Hailu A, Kroon CC, Nieuwenhuys JL, Schallig HD, Oskam L.** 2001. A fast agglutination-screening test (FAST) for the detection of anti-*Leishmania* antibodies. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 95 (4), 400-1.
- 35 35. **Senaldi G, Xiao-su H, Hoessli D.C, Bordier C.** 2001. Serological diagnosis of visceral leishmaniasis by a dotenzyme immunoassay for the detection of a *Leishmania donovani*-related circulating antigen. *J Immunol Methods.* 193: 9-15.
- 30 36. **Singh S and Sivakumar R.** 2003. Recent advances in the diagnosis of leishmaniasis. *J. Postgrad. Med.* 49 (1): 55-60.
37. **Singh S, Gilman-Sachs A, Chang KP, Reed SG.** 1995. Diagnostic and prognostic value of K39 recombinant antigen in Indian leishmaniasis. *J Parasitol.* 81 (6): 1000-3.
38. **Singh S, Kumari V, Singh N.** 2002. Predicting kala-azar disease manifestations in asymptomatic patients with latent *Leishmania donovani* infection by detection of antibody against recombinant K39 antigen. *Clin Diagn Lab Immunol.* 9 (3): 568-72.
- 40 39. **Singh S, Mohapatra DP, Sivakumar R.** 2000. Successful replacement of foetal calf serum with human urine for *in vitro* culture of *Leishmanin donovani*. *J Commun Dis.* 32 (4): 289-94.
- 45 40. **Singh S.** 1999. Diagnostic and Prognostic markers of anti-kala-azar therapy and vaccination. IN: Proceeding of V Round Table Conference Series. No. 5. Gupta S & Sood OP (Ed). *Ranbaxy Science Foundation, New Delhi.* pp 95-114.
41. **Steinkraus HB, Greer JM, Stephenson DC, Langer PJ.** 1993. Sequence heterogeneity and polymorphic gene arrangements of the *Leishmanin guyanensis* gp63 genes. *Mol Biochem Parasitol.* 62 (2): 173-85.
- 50 42. **Sundar S, Rai M.** 2002. Laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis. *Clin Diagn Lab Immunol.* 9 (5): 951-8.
- 55 43. **Sundar, S, Reed S. G, Singh V. P, Kumar P. C. K and Murray H. W.** 1998. Rapid accurate field diagnosis of visceral leishmaniasis. *Lancet* 351: 563-565.
44. La patente estadounidense n.º 5.411.865 de Reed del 2 de mayo de 1995
- 60 45. La patente estadounidense n.º 5.719.263 de Reed del 17 de febrero de 1998
46. La patente estadounidense n.º 6.638.517 de Reed, *et al.*, del 28 de octubre de 2003
47. La patente estadounidense n.º 5.912.166 de Reed, *et al.*, del 15 de junio de 1999
- 65 48. **Towbin, H., Staehlin, T. and Gordan, J.** 1976. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 76, 4350-4354.

49. **Webb JR, Button LL, McMaster WR.** 1991. Heterogeneity of the genes encoding the major surface glycoprotein of *Leishmania donovani*. *Mol Biochem Parasitol.* 48 (2): 173-84.

50. WHO expert committee report. Control of the Leishmaniasis. 1991. *Technical Report Series* 793.

51. **Williams, J. E.** 1995. *Leishmania and Trypanosoma. In medical parasitology. A practical approach.* **Gillespie, S. H., Hawkey. P. M.,** Eds. London, Oxford University Press.

52. **Zijlstra EE, Nur Y, Desjeux P, Khalil EA, El-Hassan AM, Groen J.** 2001. Diagnosing visceral leishmaniasis with the recombinant K39 strip test: experience from the Sudan. *Trop Med Int Health.* 6 (2): 108-13.

53. **Zijlstra EE, Musa AM, Khalil EAG, El Hassan IM and El Hassan AM,** 2003, *The Lancet Infectious Diseases* 3 (2): 87-98.

REIVINDICACIONES

1. Polipéptido aislado tal como se menciona en SEQ ID NO: 6, que comprende una región inmunógena de un antígeno de *Leishmania*, conteniendo dicho polipéptido una o más regiones de repetición de 39 aminoácidos.

2. Secuencia de ADN aislada tal como se menciona en SEQ ID NO: 4 que codifica para un polipéptido tal como se menciona en SEQ ID NO: 6 según la reivindicación 1.

3. Método de detección de anticuerpos anti-*Leishmania* en una muestra, comprendiendo dicho método:

- a) proporcionar un portador o soporte sólido, unido con un polipéptido de SEQ ID NO: 6 según la reivindicación 1;
- b) unir los anticuerpos anti-*Leishmania* de dicha muestra al polipéptido unido a un portador o al soporte sólido;
- c) añadir al contenido de la etapa (b) un anticuerpo secundario anti-ser humano o una proteína conjugado con una enzima o un marcador; y
- d) detectar los anticuerpos anti-*Leishmania* en dicha muestra.

4. Método según la reivindicación 3, en el que la muestra se selecciona de un grupo que consiste en sangre completa, suero, plasma y otro fluido corporal.

5. Método según la reivindicación 4, en el que la muestra se selecciona de un animal o un mamífero incluyendo seres humanos.

6. Método según la reivindicación 3, en el que dicho soporte sólido se selecciona de un grupo que consiste en material de nitrocelulosa, nailon, partículas de látex, polipropileno y poliestireno.

7. Método según la reivindicación 3, en el que dicho portador es una partícula de oro.

8. Método según la reivindicación 3, en el que el anticuerpo secundario anti-ser humano se selecciona de las clases de anticuerpos de IgG, IgM, IgA, IgE y sus subclases.

9. Método según la reivindicación 3, en el que la proteína se selecciona de un grupo que consiste en proteína A y proteína G.

10. Método según la reivindicación 3, en el que la enzima se selecciona del grupo que consiste en fosfatasa alcalina, peroxidasa de rábano, β -galactosidasa, ureasa, xantina oxidasa, glucosa oxidasa y penicilinas.

11. Método según la reivindicación 3, en el que dicho marcador se selecciona de un grupo que consiste en un resto de radioisótopo, biotina, cromóforo, fluoróforo y quimioluminiscente.

12. Método según la reivindicación 3, en el que dicha etapa de detección de anticuerpos anti-*Leishmania* se selecciona del grupo que consiste en detección de fluorescencia, detección de quimioluminiscencia, detección de absorbanza de luz o detección de radioisótopos.

13. Kit de diagnóstico para detectar anticuerpos anti-*Leishmania* que comprende un polipéptido según la reivindicación 1, un anticuerpo secundario anti-ser humano o una proteína, en el que dicho anticuerpo secundario anti-ser humano o la proteína está conjugado con una enzima o un marcador, y reactivos convencionales para detectar dichos anticuerpos.

14. Kit según la reivindicación 13, en el que dicho polipéptido está unido a un portador o soporte sólido.

15. Kit según la reivindicación 13, en el que el soporte sólido se selecciona del grupo que consiste en material de nitrocelulosa, nailon, partículas de látex, polipropileno y poliestireno.

16. Kit según la reivindicación 13, en el que el portador es una partícula de oro.

17. Kit según la reivindicación 13, en el que el anticuerpo secundario anti-ser humano se selecciona de las clases de anticuerpos de IgG, IgM, IgA, IgE y sus subclases.

18. Kit según la reivindicación 13, en el que la proteína se selecciona de un grupo que consiste en proteína A y proteína G.

19. Kit según la reivindicación 13, en el que dicho marcador se selecciona de un grupo que consiste en un resto de enzima, radioisótopo, biotina, cromóforo, fluoróforo y quimioluminiscente.

20. Kit según la reivindicación 13, en el que la enzima se selecciona del grupo que consiste en fosfatasa alcalina, peroxidasa de rábano, β -galactosidasa, ureasa, xantina oxidasa, glucosa oxidasa y penicilinas.

21. Método de obtención de anticuerpos frente al polipéptido de la reivindicación 1, comprendiendo dicho método inyectar el polipéptido a animales, recoger los anticuerpos producidos contra el polipéptido y purificar dichos anticuerpos.

22. Método según la reivindicación 21, en el que el animal se selecciona de un grupo que consiste en ratones, conejo, caballo, cabra, oveja, cobaya, cerdo, bovinos, rata, pollo y hámsteres.

23. Método de detección de antígenos de *Leishmania* en una muestra usando los anticuerpos obtenidos según la reivindicación 21, comprendiendo dicho método:

- a) unir una parte del anticuerpo a un portador o soporte sólido;
- b) añadir la muestra que contiene antígenos de *Leishmania* al anticuerpo unido al portador o soporte sólido;
- c) añadir al contenido de la etapa (b) otra parte de anticuerpo que está conjugada con una enzima o un marcador; y
- d) detectar los antígenos de *Leishmania* en dicha muestra.

24. Método según la reivindicación 23, en el que la muestra se selecciona del grupo que consiste en sangre completa, médula ósea, aspirado esplénico, biopsia cutánea, biopsia de otros tejidos y frotis de secciones.

25. Método según la reivindicación 24, en el que la muestra se selecciona de un animal o un mamífero incluyendo seres humanos.

26. Método según la reivindicación 23, en el que dicho soporte sólido se selecciona del grupo que consiste en material de nitrocelulosa, nailon, partículas de látex, polipropileno, vidrio y poliestireno.

27. Método según la reivindicación 23, en el que dicho portador es una partícula de oro.

28. Método según la reivindicación 23, en el que la enzima se selecciona del grupo que consiste en fosfatasa alcalina, peroxidasa del rábano, β -galactosidasa, ureasa, xantina oxidasa, glucosa oxidasa y penicilinas.

29. Método según la reivindicación 23, en el que dicho marcador se selecciona de un grupo que consiste en resto de radioisótopo, biotina, cromóforo, fluoróforo y quimioluminiscente.

30. Método según la reivindicación 23, en el que dicha etapa de detección de antígenos de *Leishmania* se selecciona del grupo que consiste en detección de fluorescencia, detección de quimioluminiscencia, detección de absorbancia de luz o detección de radioisótopos.

31. Kit de diagnóstico para detectar antígenos de *Leishmania* que comprende anticuerpo frente a un polipéptido según la reivindicación 1 unido a un portador o soporte sólido, anticuerpo conjugado con una enzima o un marcador y reactivos convencionales para detectar antígenos de *Leishmania*.

32. Kit de diagnóstico según la reivindicación 31, en el que dicho soporte sólido se selecciona del grupo que consiste en material de nitrocelulosa, nailon, partículas de látex, polipropileno, vidrio y poliestireno.

33. Kit de diagnóstico según la reivindicación 31, en el que dicho portador es una partícula de oro.

34. Kit de diagnóstico según la reivindicación 31, en el que la enzima se selecciona del grupo que consiste en fosfatasa alcalina, peroxidasa de rábano, β -galactosidasa, ureasa, xantina oxidasa, glucosa oxidasa y penicilinas.

35. Kit de diagnóstico según la reivindicación 31, en el que dicho marcador se selecciona de un grupo que consiste en un resto de radioisótopo, biotina, cromóforo, fluoróforo y quimioluminiscente.

Figura 1

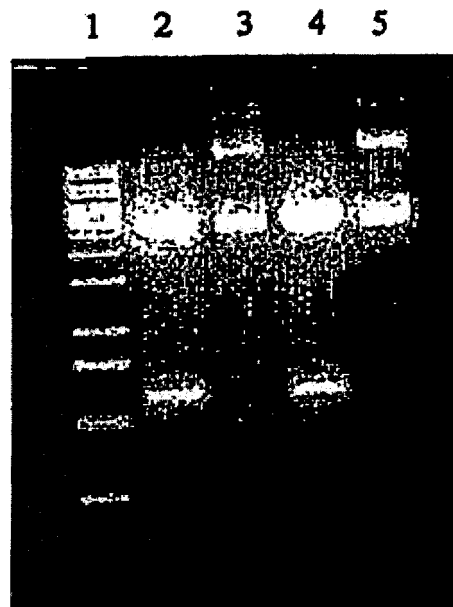


Figura 2

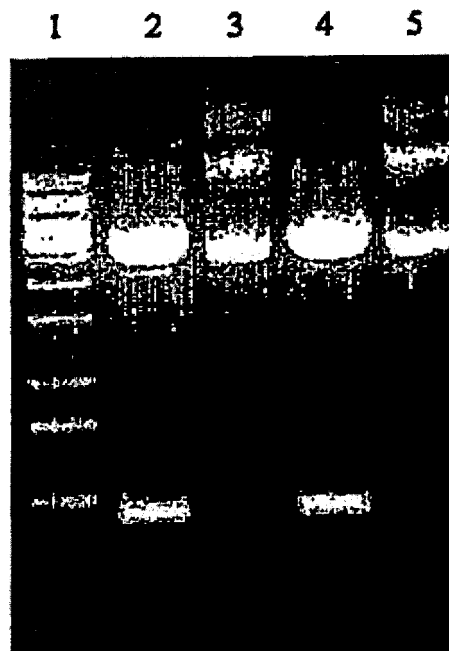


Figura 3A

Consulta: 40 EGRAAEELARKLEATASAKNLVEQDXXXXXXXXXXXXXXXXXIAEVRAAEELAGVLEATAAAKTAV 99
 E RAAELA +LEATA+AK+ EQD +E RAAELA LEATAAAK +
 Objeto: 712 EERAAELASQLEATAAAKSSAEQDRENTATLEQQLRESEARAELASQLEATAAAKMSA 771

Consulta: 100 EQERERTRAAALXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXKTSVEQXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX 159
 EQ+RE TRA L K S EQ
 Objeto: 772 EQDRENTATLEQQLRDSEERAAELASQLESTTAAKMSAEQDRESTRATLEQQLRDSEER 831

Consulta: 160 XXXXXXXXKSTAAVKSAMEQDRENTAT 187
 +ST A K + EQDRE+TRAT
 Objeto: 832 AAELASQLESTTAAKMSAEQDRESTRAT 859

Figura 3B

Consulta: 29 EQEREKTRTALE-----GRAAEELARKLEATASAKNLVEQDXXXXXXXXXXXXXIAEVR 81
 EQ+RE TR LE RAAELA +LEATA+AK EQD +E R
 Objeto: 733 EQDRENTATLEQQLRESEARAELASQLEATAAAKMSAEQDRENTATLEQQLRDSEER 792

Consulta: 82 AAELAGVLEATAAAKTAVEQERERTRAAALXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXKTSVEQX 141
 AAELA LE+T AAK + EQ+RE TRA L K S EQ
 Objeto: 793 AAELASQLESTTAAKMSAEQDRESTRATLEQQLRDSEERAAELASQLESTTAAKMSAEQD 852

Consulta: 142 XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXKSTAAVKSAMEQDRENTAT 187
 +ST A K + EQDRE+TRAT
 Objeto: 853 RESTRATLEQQLRESEERAAELASQLESTTAAKMSAEQDRESTRAT 898

Figura 3C

Consulta: 29 EQEREKTRTALEG-----RAAELARKLEATASAKNLVEQDXXXXXXXXXXXXXIAEVR 81
EQ+RE TR LE RAAELA +LE+T +AK EQD +E R
Objeto: 772 EQDRENTATLEQQLRDSEERAAELASQLESTTAAKMSABQDRESTRATLEQQLRDSEER 831

Consulta: 82 AAELAGVLEATAAAKTAVEQERERTRAALXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXKTSVEQX 141
AAELA LE+T AAK + EQ+RE TRA L K S EQ
Objeto: 832 AAELASQLESTTAAKMSAEQDRESTRATLEQQLRESEERAAELASQLESTTAAKMSABQD 891

Consulta: 142 XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXKSTAAVKSAMEQDRENTA 186
++TAA KS+ EQDRENTA
Objeto: 892 RESTRATLEQQLRDSEERAAELASQLEATAAAKSSAEQDRENTA 936

Figura 3D

Consulta: 40 EGRAAELARKLEATASAKNLVEQDXXXXXXXXXXXXXIAEVRRAAELAGVLEATAAAKTAV 99
E RAAELA +LEATA+AK+ EQD +E RAAELA LEATAAAK +
Objeto: 712 EERAAELASQLEATAAAKSSAEQDRENTATLEQQLRESEERAAELASQLEATAAAKMSA 771

Consulta: 100 EQERERTRAALXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXKTSVEQXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX 159
EQ+RE TRA L K S EQ
Objeto: 772 EQDRENTATLEQQLRDSEERAAELASQLESTTAAKMSAEQDRESTRATLEQQLRDSEER 831

Consulta: 160 XXXXXXXXKSTAAVKSAMEQDRENTAT 187
+ST A K + EQDRE+TRAT
Objeto: 832 AAELASQLESTTAAKMSAEQDRESTRAT 859

Figura 3E

Consulta: 29 EQEREKTRTALE-----GRAELARKLEATASAKNLVEQDXXXXXXXXXXXXXIAEVR 81
 EQ+RE TR LE RAAELA +LEATA+AK EQD +E R
 Objeto: 733 EQDRENTTRATLEQQLRESEARAELASQLEATAAAKMSAEQDRENTTRATLEQQLRDSEER 792

Consulta: 82 AAELAGVLEATAAAKTAVEQERERTRAAALXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXKTSVEQX 141
 AAELA LE+T AAK + EQ+RE TRA L K S EQ
 Objeto: 793 AAELASQLESTTAAKMSAEQDRESTRATLEQQLRDSEERAELASQLESTTAAKMSAEQD 852

Consulta: 142 XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXKSTA AVKSAMEQDRENTTRAT 187
 +ST A K + EQDRE+TRAT
 Objeto: 853 RESTRATLEQQLRESEERAELASQLESTTAAKMSAEQDRESTRAT 898

Figura 3F

Consulta: 29 EQEREKTRTALEG-----RAELARKLEATASAKNLVEQDXXXXXXXXXXXXXIAEVR 81
 EQ+RE TR LE RAAELA +LE+T +AK EQD +E R
 Objeto: 772 EQDRENTTRATLEQQLRDSEERAELASQLESTTAAKMSAEQDRESTRATLEQQLRDSEER 831

Consulta: 82 AAELAGVLEATAAAKTAVEQERERTRAAALXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXKTSVEQX 141
 AAELA LE+T AAK + EQ+RE TRA L K S EQ
 Objeto: 832 AAELASQLESTTAAKMSAEQDRESTRATLEQQLRESEERAELASQLESTTAAKMSAEQD 891

Consulta: 142 XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXKSTA AVKSAMEQDRENTTRA 186
 ++TAA KS+ EQDRENTTRA
 Objeto: 892 RESTRATLEQQLRDSEERAELASQLEATAAAKSSAEQDRENTTRA 936

Figura 4

```

LCIMM 121 GAGCAGCAGCTTCGCGAATCCGAGGCGCGCGCTGCGGAGCTGGCGAGCCAGCTGGAGGCC 180
KEIMM 1 ----- 1
DDIMM 1 GAGCAGCAGCTTCGCGAATCCGAGGCGCGCGCTGCGGAGCTGAAAGCCGAGCTGGAGGCC 60

LCIMM 181 ACTGCTGCTGCGAAGATGTCAGCGAGCAGGACCGCGAGAACACGAGGGCCACGCTAGAG 240
KEIMM 1 -----GAG 3
DDIMM 61 ACTGCTGCTGCGAAGACGTCGGTGGAGCAGGAGCGTGAGAAGAC-----GAG 107

LCIMM 241 CAGCAGCTTCGCGACTCCGAGGAGCGCGCTGCGGAGCTGGCGAGCCAGCTGGAGCTCCACT 300
KEIMM 4 CAGCAGCTTCGCGACTCCGAGGAGCGCGCTGCGGAGCTGATGCGAAGTATAGAGCCGACT 63
DDIMM 108 GA-CGSCCTCTG-----GAGGCGCGCGCTGCGGAGCTGGCTCCAGACCGGAGCCGACT 159

LCIMM 301 ACTGCTGCGAAGATGTCAGCGAGCAGGACCGCGAGAGCACGAGGGCCACGCTAGAGCG 360
KEIMM 64 GCTGCTGCGAAGTCCGTCGCGAGCAGGACCGCGAGAACACGAGGGCCACGCTGAGAGCG 123
DDIMM 160 GCTTCTGCGAAGATTTGCTAGAGCAGGACCGCGAGAGGACGAGGGCCACCTTCCAGGAA 219

LCIMM 361 GAGCTTCGCGACTCCGAGGAGCGCGCTGCGGAGCTGGCGAGCCAGCTGGAGTCCACTACT 420
KEIMM 124 GAGCTTCGCGAATCCGAGGAGCACGCTGCGGAGCTGAAGGCCAGCTGGAGTCCACTGCT 183
DDIMM 220 GAGCTTCGCTATTGCTGAGGTGCGCGCTGCGGAGCTGGCAGGAGTGGTGGAGGCCACTGCT 279

LCIMM 421 GCTGCGAAGATGTCAGCGGAGCAGGACCGCGAGAGCACGAGGGCCACGCTAGAGCAGGAG 480
KEIMM 184 GCTGCGAAGACGTCGCGGAGCAGGACCGCGAGAACACGAGGGCCCGCTGGAGCAGGAG 243
DDIMM 280 GCTGCGAAGACCGCGGTGAGCAGGACCGTGAGAGCACGAGGGCCCGCTTGGAGCAGGAG 339

LCIMM 481 CTTCGCGAATCCGAGGAGCGCGCTGCGGAGCTGGCGAGCCAGCTGGAGTCCACTACTGCT 540
KEIMM 244 CTTCGCGAATCCGAGGAGCGCGCTGCGGAGCTGGCGAGCCAGCTGGAGGCCACTGCTGCT 303
DDIMM 340 CTTCGCGAATCCGAGGAGCGCGCTGCGGAGCTGGCTGCGCAGCTGGAGGCCGCTGCTGCT 399

LCIMM 541 GCGAAGATGTCAGCGGAGCAGGACCGCGAGAGCACGAGGGCCACGCTAGAGCAGCAGCT 600
KEIMM 304 GCGAAGTCTGTCGCGGAGCAGGACCGCGAGAACACGAGGGCCACGCTAGAGCAGCAGCT 363
DDIMM 400 GCGAAGACSTCGGTGGAGCAGGACCGTGAGAACACGAGGGCCACCTTGCAGCAGCGCTG 459

LCIMM 601 CCTGACTCCGAGGAGCGCGCTGCGGAGCTGGCGAGCCAGCTGGAGGCCACTGCTGCTCG 660
KEIMM 364 CGCGAATCCGAGGCGCGCGCTGCGGAGCTGCGGAGTGAAGTGGAGTCCACTGCTGCTCG 423
DDIMM 460 CGGCTCGCTGAGGTCCGCGCTGCGGAGCTGGCGAGCGCGCTGAAGACCACTGCTGCTGTT 519

LCIMM 661 AAGTGTCTCGCGGAGCAGGACCGCGAGAACACGAGGGCCCGCTGGAGCAGCAGCTTCGT 720
KEIMM 424 AAGTGTCTCGCGGAGCAGGACCGCGAGAACACGAGGGCCACG----- 465
DDIMM 520 AAGTCCGCGATGAGCAGGACCGCGAGAACACGAGGGCCACG----- 561

```

Figura 5

```

LCIMM 1  LEQQLRESEERAAELASQLEATAAAKSSAEQDRENTRATLEQQLRESEERAAELASQLEA 60
KEIMM 1  -EQQLRDSEERAAELMRKLEATAAAKSSAEQDRENTRATLEQQLRESEERAAELASQLES 59
DDIMM 1  -EQQLRESEERAAELKAELEATAAAKTSVEQERENTRTALEG-----RAAELARKLEA 52

LCIMM 61  TAAAKMSAEQDRENTRATLEQQLRDSEERAAELASQLESTTAAKMSAEQDRESTRATLEQ 120
KEIMM 60  TAAAKTSAEQDRENTRAALEQQLRDSEERAAELASQLEATAAAKSSAEQDRENTRATLEQ 119
DDIMM 53  TASAKNLVEQDRENTRATLEERLRLAEVRAAELAGVLEATAAAKTVEQERENTRAALEQ 112

LCIMM 121  QLRDSEERAAELASQLESTTAAKMSAEQDRESTRATLEQQLRESEERAAELASQLESTTA 180
KEIMM 120  QLRSEERAAELASQLESTTAAKSSAEQDRENTRAT----- 155
DDIMM 113  QLRSEERAAELASQLEATAAAKTVEQERENTRATLEERLRLAEVRAAELARLKSTAA 172

LCIMM 181  AKMSAEQDRESTRATLEQQLRDSEERAAELASQLEATAAAKSSAEQDRENTRAALEQQLR 240
KEIMM 155  ----- 155
DDIMM 173  VKSAMEQDRENTRAT----- 187

```

Figura 6

```

LCIMM 1  LEQQLRESEERAAELASQLEATAAAKSSAEQDRENTRATLEQQLRESEERAAELASQLEA 60
DDIMM 1  -----EQQLRESEERAAELKAELEA 20

LCIMM 61  TAAAKMSAEQDRENTRATLEQQLRDSEERAAELASQLESTTAAKMSAEQDRESTRATLEQ 120
DDIMM 21  TAAAKTSVEQERENTRTALEG-----RAAELARKLEATAAKNLVEQDRENTRATLEQ 73

LCIMM 121  QLRDSEERAAELASQLESTTAAKMSAEQDRESTRATLEQQLRESEERAAELASQLESTTA 180
DDIMM 74  RLRLAEVRAAELAGVLEATAAAKTVEQERENTRAALEQQLRESEERAAELASQLEATAAA 133

LCIMM 181  AKMSAEQDRESTRATLEQQLRDSEERAAELASQLEATAAAKSSAEQDRENTRAALEQQLR 240
DDIMM 134  AKTSVEQERENTRATLEERLRLAEVRAAELARLKSTAAVKSAMEQDRENTRAT----- 187

```


Figura 7

```

KEIMM 1  EQQLRDSEERRAAELMRKLEATAAAKSSAEQ----- 30
DDIMM 1  EQQLRESEERRAAELKAELEATAAAKTSVEQEREKTRTALEGRAAEELARKLEATASAKNLV 60

KEIMM 30  --DRENRATLEEQQLRESEERRAAELKAELEATAAAKTSVEQEREKTRTALEGRAAEELARKLEATASAKNLV 88
DDIMM 61  EQDRENRATLEERLRLEAEVRAAEAGVLEETAAAKTAVEQEREKTRTALEEQQLRESEERR 120

KEIMM 89  AAELASQLEATAAAKSSAEQDRENRATLEEQQLRESEERRAAELASQLEATAAAKSSAEQ 148
DDIMM 121 AAELASQLEATAAAKTSVEQEREKTRATLEERLRLEAEVRAAEELARLKSTAAVKSAEQ 180

KEIMM 149 RENTRAT 155
DDIMM 181 RENTRAT 187

```

Figura 8

1	10	20	30	39
KEQQLRDSEERRAAELKAELEATAAAKTSVEQEREKTRTA				
LGRAAEELARKLEATASAKNLVEQDRENRATLEERLRLE				
AVGVKSAVTSMEANAQQE				
SAAQSL				

Figura 9

1	10	20	30	39
LEQQLRDSEERRAAELMRKLEATAAAKSSAEQDRENRAT				
REANKAQSTAS				

Figura 10

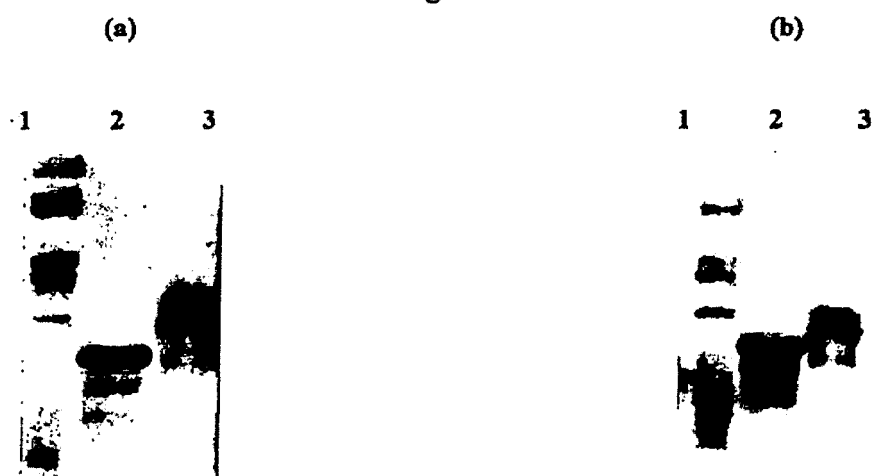


Figura 11



Figura 12



Figura 13



Figura 14

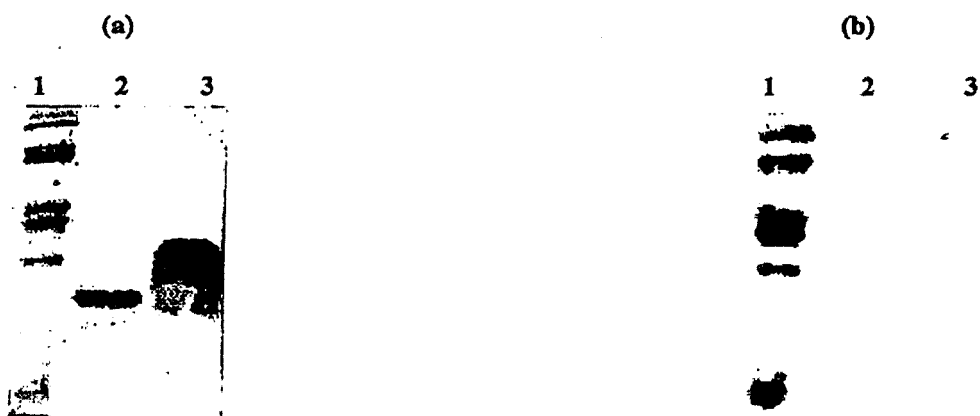
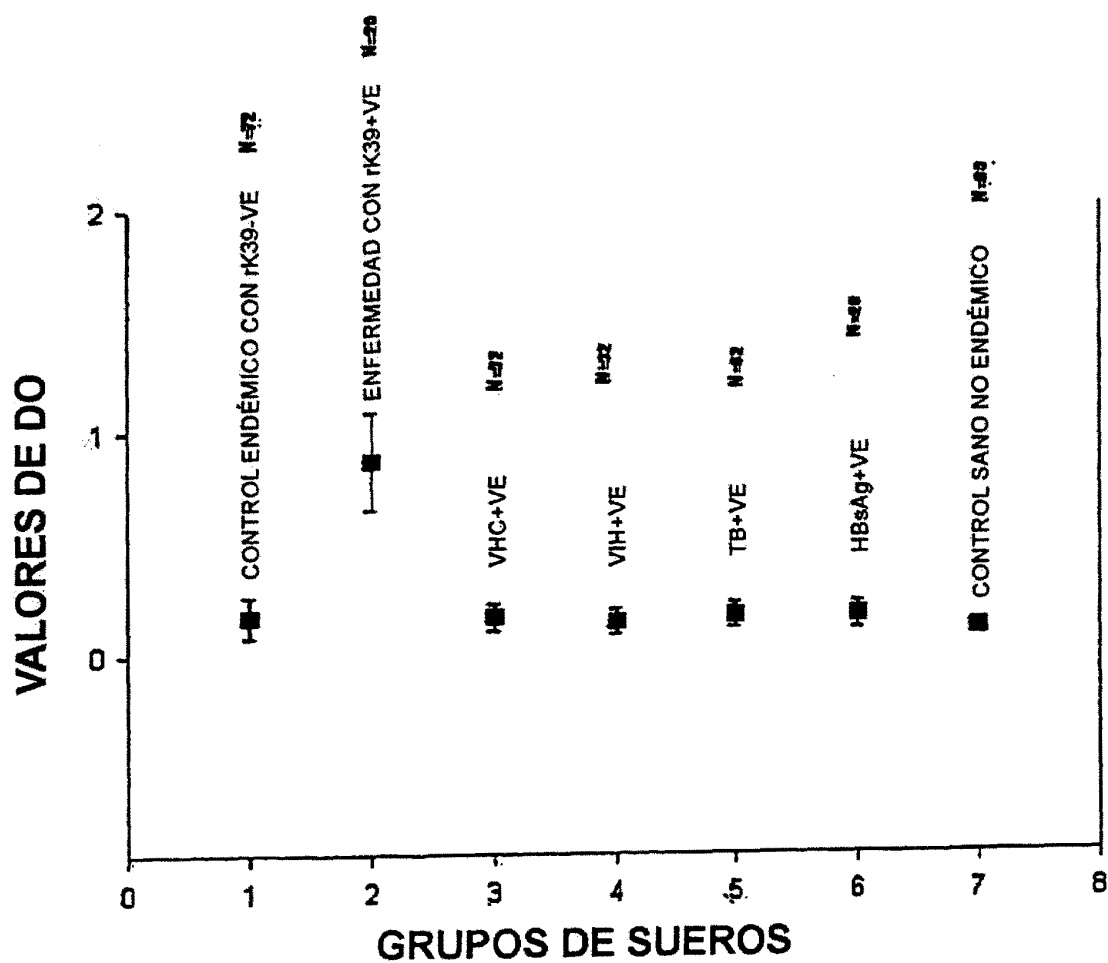
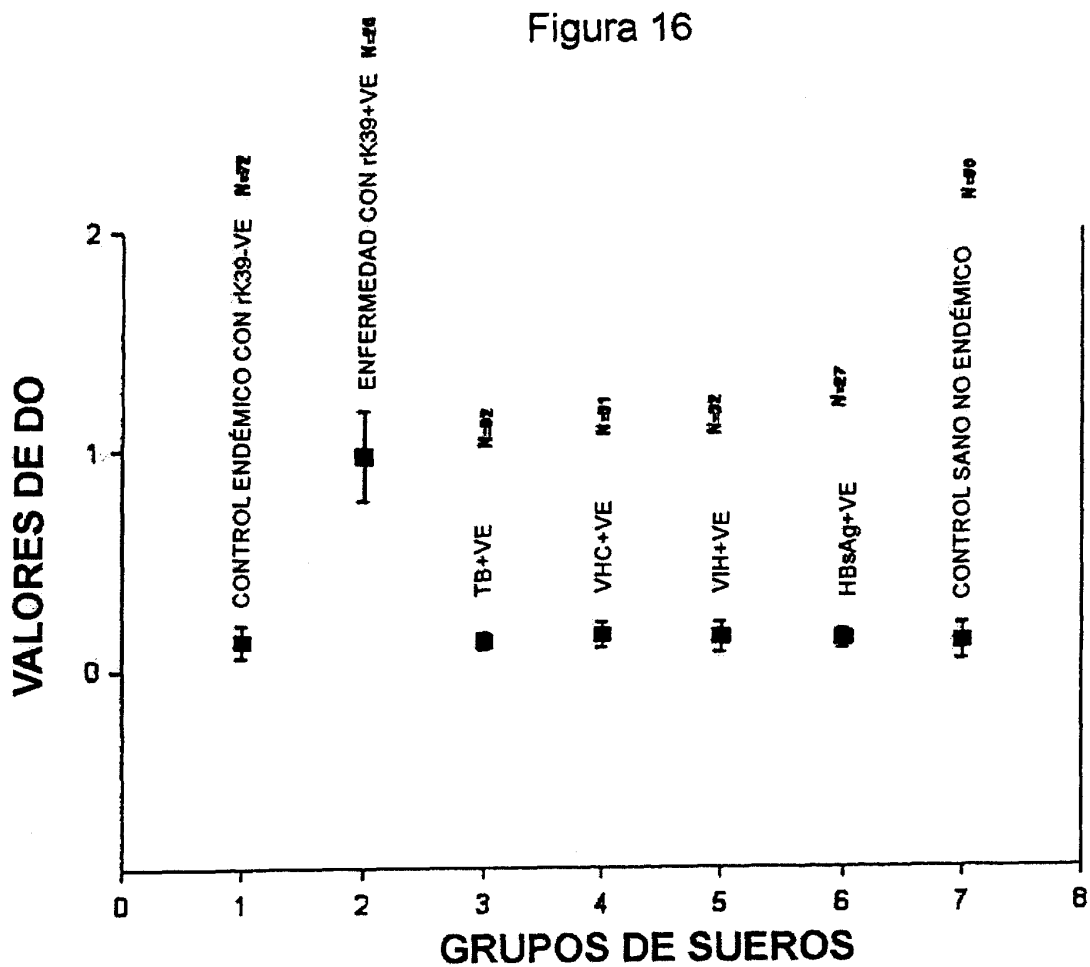


Figura 15



Media	0,1670	0,8665	0,1634	0,1396	0,1663	0,1636	0,1080
D. E.	0,0882	0,2182	0,0598	0,0584	0,0534	0,0615	0,0295

Figura 16



Media	0,1290	0,9730	0,1300	0,1545	0,1456	0,1363	0,1219
D. E.	0,0716	0,2096	0,0419	0,0548	0,0705	0,0456	0,0796

ES 2 345 046 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> All India Institute de Medical sciences
Singh, Sarman

<120> Polipéptidos para el diagnóstico y la terapia de la leishmaniosis

<130> PCT002SS

<160> 11

<170> PatentIn versión 3.1

<210> 1

<211> 3016

<212> ADN

<213> *Leishmania donovani*

<400> 1

```

cggcgcgctcg gtgtctttga ttccactgat caccgcctcg ccatatgctc atcgtgggtcc      60
aacgcgaccc ccctcccca aaggcaagcg agacgtatcg accatgccgt ctgcccgcac      120
ctgtgcttaa caagcgagcc aggtgtccct tccgcagctc cgaatctttc gcgtggcgcc      180
acacactgta tgagcgtcac tacccttgta tacctcagac cacttcccgc cgccccctta      240
cccttctaca cgcctacaca cacatatgta tacatgaaca tctctcagca cacaacgcac      300
acatactgtg accggtatta ctgcaccaac gtctacctct tccacgatgc acccttctac      360
tgtgcggcgt gaggcggagc ggggtgaagggt gtcggtgcgc gtgcgcccc tcaacgaccg      420
tgaaaacaat actgccgaag gggcgaaagt caccgtcgcg gcgaaacagg cggcgggcgt      480
ggtaaccgtc aagttcatgg gaggcaccag caacagctgc ccgcccaggt cgggggctgc      540
gaggcgggta acgcaggact tccagttcga ccacgtgttc tgggtctctgg agacgccgga      600
cgcggtgtggc gcgacccctg cgacgcaggc agacgtgttc cggacgatcg ggtacccgct      660
gggtgcagcac gcgttcgacg ggttcaactc gtgcctgttt gcgtacgggc agacggggag      720
cgggaagacg tacacgatga tgggtgcgga cgtgagcgcg cttagcggtg agggcagcgg      780
cgtgacgccg cggatctgcc tggagatctt tgcgcggaag gcgagcgtgg aggcacaggg      840
gcactcgcgg tggattgtgg agcccgggta cgtggagggtg tacaacgagc gcgtgtcgga      900

```

ES 2 345 046 T3

	cctgcttggg aagcgggaaga agggcgcgaa gggcgggcatc gaggaggtgt acgtggacgt	960
	gcgcgagcac ccgagccgcg gcgtgttcct ggaggggag cggctggtgg aggttgggag	1020
5	cctggacgat gttgtgcggc tgatcgaggc cggcaacagc gtgcggcaca cggcctcgac	1080
	gaagatgaac gaccggagca gccgtagcca cgcgatcatc atgctgctgc tgcgcgagga	1140
	gcggacgatg acgacgaagg gcggagagac gatccgtact gccggcaaga gcagccgcat	1200
10	gaaccttgtg gaccttgccg ggtctgagcg cgtggcgagc tcgcagggtg agggacagca	1260
	gttcaaggag gcgacgcaca tcaacctgtc gctgacgacg ctcgggctgt tgatcgacgt	1320
	gctcgccgac atggcaacga agggcgcgaa aacacagtac agcgttccgc cgttccgcga	1380
15	ctcgaagctg acgttcatcc tgaaggactc gcttggcggg aactcgaaga cgttcatggt	1440
	tgcgactgtg agcccgagcg cgctgaacta cgaggagacg ctgagcacgc tgcggtacgc	1500
	gtcgcgcgcg cgcgacattg tgaacgttgc gcaggtgaac gaggaccgc gcgcgcgtcg	1560
20	gatccgcgag ctggaggagc agatggagga catgcggcag gcgatggctg gcggtgaccc	1620
	cgcgtacgtg tctgagctga agaagaagct tgcgctgctg gagtgcgagg cgcagaagtg	1680
	tgcggcgagc ctgcaggcgc tagagcggga gcgggagcac aaccagggtc aggagcggct	1740
25	gctgcgcgcc acggaggcgg agaagagcga gctggagtcg cgtgcggctg cgctgcagga	1800
	ggagatgacc gcgacgcgac agcaggcaga caagatgcag gcgctaaacc ttcggctgaa	1860
	ggaagagcag gcgcgcaagg agcgagagct actgaaagag atggcgaaaga aggacgccgc	1920
30	gctctcgaag gttcggcggc gcaaggatgc cgagatcgca agcgagcgcg agaagttgga	1980
	gtcgaccgtg gcgcagcttg agcgtgaaca gcgcgagcgc gaggtcgctc tggacgcatt	2040
	gcagacgcac cagagaaagc tgcaggaagc gctcgagagc tctgagcgga cagccgcgga	2100
35	aagggaaccag cttctgcagc agcttacaga gcttcagtct gagcgtgcgc agctatcaca	2160
	ggttgtcagc gaccgcgagc ggctgacccg cgacttgagc cgtattcagt ccgagtacgg	2220
	ggaaacggag ctgcgcgag acgcggcgct gtgcgccgca caggagatgg aggcgcgcta	2280
40	tcacgctgct gtgtttcacc tgcaaagcgt cctggagctc gcaaccgagt gggaggatgc	2340
	gctccgcgag cgtgcgcttg cagagcgtga cgaagccgct gcagctgaac ttgatgccgc	2400
	agcttctact tctgaaaacg cacgggaaag cacttccaag ctgctaacca gcgttgagca	2460
45	gcagcttcgt gaatccgagg cgcgcgctgc ggagctgaaa gccgagctgg aggccactgc	2520
	tgctgcgaag acgtcgggtg agcaggagcg tgagaagacg aggacggctc tggaggggag	2580
	cgctgcggag ctggctcgca aactggaggc gactgttct gcgaagaatt tggtagagca	2640
50	ggaccgcgag aggacgagg ccaccttgga ggaacgactt cgtattgctg aggtgcgcgc	2700
	tgcggagctg gcaggagtgc tggaggccac tgctgctgcg aagacggcgg tggagcagga	2760
	gcgtgagagg acgagggccg ccttggagca gcagctccgc gaatccgagg cgcgcgctgc	2820
55	ggagctggct gcgcagctgg aagccgctgc tgcggcgaa acgtcgggtg agcaggagcg	2880
	tgagaacacg agggccacct tggaggagcg gttgcggctc gctgaggtcc gcgctgcgga	2940
60	gctggcagcg cggctaaaga gcactgctgc tgttaagtcc gcgatggagc aggaccgcga	3000
	gaacacgagg gccacg	3016

65 <210> 2
 <211> 2937
 <212> ADN

ES 2 345 046 T3

<213> *Leishmania donovani*

<400> 2

5	cggcgcgtcg gtgtctttga ttgcacagct caccgcctcg ccatattttc gtcgtggcca	60
	cgcgaccccc cgaccttccc ctccctccgcc cccaaagaca agccagacat accgaccatg	120
	ccgtctgccc gcgtctctgc ttaccaagcg cgccacgcac cccttcctcg gccctgaatc	180
10	tttcgcgcgg cgccatacat tgcatgcacg tctactagcc tgtacacctt acacctcctc	240
	ttgcccaccc ctttccccctt ctacacgcct aactacacac acacacatat atatataata	300
	agcgtcaac gcacacatac tgtggccagt attactgcac caacgtctgc ctcttccagg	360
15	atgcaccctt ccaactgtgcg gcgtgaggcg gagcgggtga aggtgtcggg gcgcgtgcgc	420
	ccccaaacg aacgtgaaaa caatgccccg gaagggacga aagtgaccgt tgcggcgaaa	480
	caggcggccg ccgtggtgac ggtcaagggt ctgggaggca gcaacaacag cggcgccgcc	540
20	gagtcgatgg ggactgcaag gcgggtagcg caggactttc agttcgacca cgtgttctgg	600
	tctgtggaga cgccggacgc gtgcggcgcg acccccgcga cgcaggcaga cgtgttccgg	660
	acgatcgggt acccgctggg gcagcacgcg ttcgacgggt tcaactcgtg cttgtttgcg	720
25	tacgggcaga caggggagcg gaagatgtac acgatgatgg gcgcggacgt gagcgcgctt	780
	agtggtgagg gcaacggcgt gacgccgcgg atctgcctgg agatctttgc gcggaaggcg	840
	agcgtggagg cgcaggggca ctgcgggtgg atcgtggagc tgggggtacgt ggagggtgtac	900
30	aacgagcgcg tgtcggacct gcttgggaag cggagaagg gtgtgaaggg cggcggcgag	960
	gagggtgtacg tggacgtgcg cgagcacccg agccgcggcg tgttcctgga ggggcagcgg	1020
	ctgggtggagg ttgggagcct ggacgatgtt gtgcggctga tcgagatcgg caacggcgtg	1080
35	cggcacaccg cttcaacgaa gatgaacgac cggagcagcc ggagccacgc gatcatcatg	1140
	ctgctgctgc gcgaggagcg gacgatgacg acgaagagcg gggagacgat ccgtactgcc	1200
	ggcaagagca gccgcatgaa ccttgtggac cttgcggggt ctaagcgcgt ggcgcagtcg	1260
40	cagggtggagg ggcagcagtt caaggaggcg acgcacatca acctgtcgtg gacgacgctc	1320
	gggcgcgtga tcgacgtgct cgcgacatg gcgacgaagg gtgcgaaggc gcagtacagc	1380
	gttgcgcccgt tccgcgactc gaagctgacg ttcatcctga aggactcgtg tggcgggaac	1440
45	tcgaagacgt tcatgatcgc gactgtgagc ccgagcgcgc tgaactacga ggagacgctg	1500

50

55

60

65

ES 2 345 046 T3

agcacgctgc ggtacgcgtc gcgcgcgcgc gačattgtga atgttgcgca ggtgaacgag 1560
 gacccgcgcg cacggcggat ccgcgagctg gaggagcaga tggaggacat gcggcaggcg 1620
 5 atggctggcg gcgaccccg cgtacgtgtcg gagctgaaga agaagcttgc gctgctggag 1680
 tcggaggcgc agaagcgtgc ggcggacctg caggcgctgg agagggagcg ggagcacaac 1740
 caggctgcagg agcggctgct gcgcgcgcgc gaggcgagga agagcgagct ggagtgcgct 1800
 10 gcggctgcgc tgcaggagga gatgaccgcg actcgacggc aggcggacaa gatgcaggcg 1860
 ctgaacctgc ggctgaagga agagcaggcg cgcaaggagc gcgagctgct gaaagagatg 1920
 gcgaagaagg acgccgcgct ctcaagggtt cggcaacgca aagacgccga gatagcaagc 1980
 15 gagcgcgaga agctggagtc gaccgtggcg cagctggagc gtgagcagcg cgagcgcgag 2040
 gtggctctgg acgcattgca gacgcaccag agaaagctgc aggaagcgct cgagagctct 2100
 gagcggacag ccgcggaaaag ggaccagctg ctgcagcagc taacagagct tcagtctgag 2160
 20 cgtacgcagc tatcacaggt tgtgaccgac cgcgagcggc ttacacgcga cttgcagcgt 2220
 attcagtacg agtacgggga aaccgagctc gcgcgagacg tggcgtgtg cgcgcgcgag 2280
 gagatggagg cgcgctacca cgctgctgtg ttccacctgc aaacgctcct ggagctcgca 2340
 25 accgagtggg aggacgcact ccgcgagcgt gcgcttgagc agcgtgacga agccgctgca 2400
 gccgaacttg atgccgcagc ctctacttcc caaaacgcac gtgaaagcgc ctgcgagcgg 2460
 ctaaccagcc ttgagcagca gcttcgtgac tccgaggagc gcgctgcgga gctgatgcgg 2520
 30 aagttagagg cgactgctgc tgcgaagtcg tcggcggagc aggaccgcga gaacacgagg 2580
 gccacgttgg agcagcagct tcgcgaatcc gaggagcacg ctgcggagct gaaggccag 2640
 ctggagtcca ctgctgctgc gaagacgtcg gcggagcagg accgcgagaa cacgagggcc 2700
 35 gcgttggagc agcggcttcg cgaatccgag gagcgcgctg cggagctggc gagccagctg 2760
 gaggccactg ctgctgcgaa gtcgtcggcg gagcaggacc gcgagaacac gagggccacg 2820
 ctagagcagc agcttcgcga atccgaggcg cgcgctgcgg agctggcgag tcagctggag 2880
 40 tccactgctg ctgcgaagtc gtcggcggag caggaccgcg agaacacgag ggccacg 2937

<210> 3

<211> 563

<212> ADN

<213> *Leishmania donovani*

<400> 3

50 tcgtggccct cgtgttctcg cggctcctgct ccacgcgga cttaacagca gcagtgtctt 60
 ttagccgcgc tgccagctcc gcagcgcgga cctcagcgag ccgcaaccgc tcctccaagg 120
 55 tggccctcgt gttctcacgc tcctgctcca ccgacgtctt cgcgcgagca gcggcttcca 180
 gctgcgcagc cagctccgca gcgcgcgcct cggattcgcg gagctgctgc tccaaggcgg 240

60

65

ES 2 345 046 T3

ccctcgtcct ctcacgctcc tgetccaccg ccgtcttcgc agcagcagtg gcctccagca 300
 ctctgcccag ctccgcagcg cgcacctcag caatacgaag tcgttcctcc aaggtggccc 360
 5 tcgtcctctc gcggtcctgc tctaccaaatt tcttcgcaga agcagtcgcc tccagtttgc 420
 gagccagctc cgcagcgcgc ccctccagag ccgtcctcgt cttctcacgc tcctgctcca 480
 ccgacgtctt cgcagcagca gtggcctcca gctcggcttt cagctccgca gcgcgcgtct 540
 10 cggagtcacg aagctgctgc tca 563

<210> 4

<211> 466

15 <212> ADN

<213> *Leishmania donovani*

<400> 4

20 gagcagcagc ttcgtgactc cgaggagcgc gctgcggagc tgatgcggaa gttagaggcg 60
 actgctgctg cgaagtcgtc ggcggagcag gaccgcgaga acacgagggc cgcgttggag 120
 cagcagcttc gcgaatccga ggagcacgct gcggagctga aggccagct ggagtccact 180
 25 gctgctgcga agacgtcggc ggagcaggac cgcgagaaca cgagggccgc gttggagcag 240
 cggcttcgcg aatccgagga gcgcgctgcg gagctggcga gccagctgga ggccactgct 300
 gctgcgaagt cgtcggcgga gcaggaccgc gagaacacga gggccacgct agagcagcag 360
 30 cttcgcgaat ccgaggcgcg cgctgcggag ctggcgagtc agctggagtc cactgctgct 420
 gcgaagtcgt cggcggagca ggaccgcgag aacacgaggg ccacga 466

<210> 5

<211> 187

<212> PRT

<213> *Leishmania donovani*

40

<400> 5

Glu Gln Gln Leu Arg Glu Ser Glu Ala Arg Ala Ala Glu Leu Lys Ala
 1 5 10 15
 45 Glu Leu Glu Ala Thr Ala Ala Ala Lys Thr Ser Val Glu Gln Glu Arg
 20 25 30
 50 Glu Lys Thr Arg Thr Ala Leu Glu Gly Arg Ala Ala Glu Leu Ala Arg
 35 40 45
 55 Lys Leu Glu Ala Thr Ala Ser Ala Lys Asn Leu Val Glu Gln Asp Arg

60

65

ES 2 345 046 T3

	50	55	60
5	Glu Arg Thr Arg Ala Thr Leu Glu Glu Arg Leu Arg Ile Ala Glu Val 65 70 75 80		
10	Arg Ala Ala Glu Leu Ala Gly Val Leu Glu Ala Thr Ala Ala Ala Lys 85 90 95		
15	Thr Ala Val Glu Gln Glu Arg Glu Arg Thr Arg Ala Ala Leu Glu Gln 100 105 110		
20	Gln Leu Arg Glu Ser Glu Ala Arg Ala Ala Glu Leu Ala Ala Gln Leu 115 120 125		
25	Glu Ala Ala Ala Ala Ala Lys Thr Ser Val Glu Gln Glu Arg Glu Asn 130 135 140		
30	Thr Arg Ala Thr Leu Glu Glu Arg Leu Arg Leu Ala Glu Val Arg Ala 145 150 155 160		
35	Ala Glu Leu Ala Ala Arg Leu Lys Ser Thr Ala Ala Val Lys Ser Ala 165 170 175		
40	Met Glu Gln Asp Arg Glu Asn Thr Arg Ala Thr 180 185		
45	<210> 6 <211> 155 <212> PRT <213> <i>Leishmania donovani</i>		
50	Glu Gln Gln Leu Arg Asp Ser Glu Glu Arg Ala Ala Glu Leu Met Arg 1 5 10 15		
55	Lys Leu Glu Ala Thr Ala Ala Ala Lys Ser Ser Ala Glu Gln Asp Arg 20 25 30		
60	Glu Asn Thr Arg Ala Thr Leu Glu Gln Gln Leu Arg Glu Ser Glu Glu 35 40 45		
65	His Ala Ala Glu Leu Lys Ala Gln Leu Glu Ser Thr Ala Ala Ala Lys 50 55 60		
	Thr ser Ala Glu Gln Asp Arg Glu Asn Thr Arg Ala Ala Leu Glu Gln 65 70 75 80		

ES 2 345 046 T3

Arg Leu Arg Glu Ser Glu Glu Arg Ala Ala Glu Leu Ala Ser Gln Leu
 85 90 95
 5 Glu Ala Thr Ala Ala Ala Lys Ser Ser Ala Glu Gln Asp Arg Glu Asn
 100 105 110
 Thr Arg Ala Thr Leu Glu Gln Gln Leu Arg Glu Ser Glu Ala Arg Ala
 115 120 125
 10 Ala Glu Leu Ala Ser Gln Leu Glu Ser Thr Ala Ala Ala Lys Ser Ser
 130 135 140
 15 Ala Glu Gln Asp Arg Glu Asn Thr Arg Ala Thr
 145 150 155
 <210> 7
 <211> 21
 20 <212> ADN
 <213> sintético
 <400> 7
 25 **cggcgcgtcg gtgtcttga t** 21
 <210> 8
 <211> 20
 30 <212> ADN
 <213> sintético
 <400> 8
 35 **aggtcgccg cacgttctg** 20
 <210> 9
 <211> 22
 40 <212> ADN
 <213> sintético
 <400> 9
 45 **gcgggaactc gaagacgttc at** 22
 <210> 10
 <211> 21
 50 <212> ADN
 <213> sintético
 <400> 10
 55 **gagcagcagc ttcgtgactc c** 21
 <210> 11
 <211> 20
 60 <212> ADN
 <213> sintético
 <400> 11
 65 **cgtggccctc gtgttctcgc** 20