

República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) **PI 1003744-6 A2**

(22) Data de Depósito: 08/06/2010
(43) Data da Publicação: 14/02/2012
(RPI 2145)



(51) *Int.Cl.:*
C12N 15/30
C12N 15/52
G01N 33/535

(54) Título: E-NTPDASES RECOMBINANTES, USO NA PRODUÇÃO DE KIT DE DIAGNÓSTICO PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS NAS LEISHMANIOSES CAUSADAS POR ESPÉCIES DO GÊNERO LEISHMANIA

(73) Titular(es): Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais - FAPEMIG, Universidade Federal de Ouro Preto, Universidade Federal de Viçosa

(72) Inventor(es): Antonio Phelipe Carlette Zóboli, Juliana Lopes Rangel Fietto, Márcia Rogéria de Almeida Lamêgo, Ronny Francisco de Souza

(57) Resumo: E-NTPDases RECOMBINANTES, USO NA PRODUÇÃO DE KIT DE DIAGNÓSTICO PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS NAS LEISHMANIOSES CAUSADAS POR ESPÉCIES DO GÊNERO Leishmania. Esta invenção refere-se às proteínas da família E-NTPDases recombinantes que podem ser usadas como antígenos em kits de diagnósticos das leishmanioses animais e humanas. As proteínas da família das E-NTPDases recombinantes obtidas poderão ser empregadas na produção de Kits de diagnósticos para a detecção de anticorpos nas leishmanioses, usando testes do tipo imunológicos. Estes testes podem ser aplicados em detecção de indivíduos soropositivos, em programas de controle de leishmanioses ou no diagnóstico laboratorial das leishmanioses. Estas proteínas também poderão ser usadas em ensaios prognósticos e vacinais, no desenho racional de quimioterápicos para o tratamento das leishmanioses e no desenvolvimento de anticorpos monoclonais a serem usados no diagnóstico, prognóstico ou terapia das leishmanioses.

**“E-NTPDases RECOMBINANTES, USO NA PRODUÇÃO DE KIT DE
DIAGNÓSTICO PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS NAS LEISHMANIOSES
CAUSADAS POR ESPÉCIES DO GÊNERO *Leishmania*”**

Campo de Aplicação da Invenção

5 As proteínas da família das E-NTPDases recombinantes obtidas, objeto de pedido de patente, serão empregadas na produção de Kits de diagnósticos para a detecção de anticorpos nas leishmanioses, testes estes do tipo imunológicos. Estes testes podem ser aplicados em detecção de indivíduos soropositivos em programas de controle epidemiológico a campo das leishmanioses ou no diagnóstico laboratorial das
10 leishmanioses. Estas proteínas também poderão ser usadas em ensaios prognósticos, vacinais, na produção de anticorpos monoclonais e no desenho racional de drogas para a quimioterapia das leishmanioses.

Estado da Técnica

15 Sabe-se que as Leishmanioses compreendem um conjunto de enfermidades cujos agentes etiológicos são espécies do gênero *Leishmania*, que são protistas pertencentes à família Trypanosomatidae. A transmissão se dá através da picada do flebotómio fêmea. Dependendo da espécie de *Leishmania* envolvida na infecção e do tipo de hospedeiro, a leishmaniose pode ser dividida classicamente em duas formas clínicas: visceral e tegumentar ou cutânea. A forma visceral se não tratada costuma ser fatal, já as formas
20 cutâneas, apesar de raramente evoluírem para a fatalidade são mutilantes e desagradáveis especialmente quando da existência de múltiplas lesões. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS/WHO) (WHO, 2009, http://whqlibdoc.who.int/hq/2007/WHO_CDS_NTD_IDM_2007.3_eng.pdf) a leishmaniose é uma doença de caráter zoonótico que acomete o homem, uma variedade de
25 animais silvestres e domésticos. É uma doença endêmica em 88 países distribuídos em quatro continentes. Mais de 90% dos casos de Leishmaniose cutânea ocorrem no Irã, Afeganistão, Síria, Arábia Saudita, Brasil e Peru e mais de 90% dos casos da forma visceral ocorrem em Bangladesh, Brasil, Índia e Sudão. Ainda segundo a OMS (WHO, 2009, http://whqlibdoc.who.int/hq/2007/WHO_CDS_NTD_IDM_2007.3_eng.pdf) o número de
30 casos de leishmaniose cutânea (LC) vem crescendo no Brasil nos últimos anos (1988:

21.800 casos; 1999: 30.550 casos; 2000: 35.000 casos). Fato este relacionado ao desenvolvimento econômico e à mudança de hábitos e ambientais que expõem mais a população aos vetores da doença. Um dos principais reservatórios atualmente descrito é o cão, que por sua proximidade com o homem participa ativamente do processo de manutenção da leishmaniose.

A leishmaniose canina tem se tornado foco de vários estudos visto a importância do cão como animal doméstico e a sua relevância como reservatório da doença. Porém o cão não é simplesmente um reservatório de parasitos, pois o mesmo também apresenta a patologia associada à infecção tanto na forma cutânea quanto visceral.

Uma das principais ações empregadas no controle da leishmaniose canina ainda é a eliminação do cão infectado devido ao insucesso da antimonioterapia. Atualmente o tratamento de cães está proibido visto que não há eficácia completa comprovada com as drogas disponíveis.

Na prática clínica, diante da suspeita de infecção os cães passam por vários testes diagnósticos que são muitas vezes contraditórios e nem sempre tem uma correlação com o estado da doença no cão, dificultando o prognóstico e conseqüente tratamento. Este tipo de constatação levou ao desenvolvimento de técnicas mais específicas baseadas na amplificação de regiões de DNA do parasito por Reação em Cadeia pela Polimerase-PCR (Francino, O., Altet, L., Sanchez-Robert, E., Rodriguez, A., Solano-Gallego, L., Alberola, J., Ferrer, L., Sanchez, A., Roura, X., *Veterinary Parasitology* 137: 214–221, 2006). Apesar de usualmente demonstrar alta eficiência, o ensaio de PCR tem a desvantagem de ter alto custo e falhas em relação à extração de DNA. O diagnóstico da doença em cães tem sido muito estudado, porém ainda hoje não há um método diagnóstico considerado como padrão e cada laboratório utiliza um método próprio de escolha (Da Silva E. S., Van Der Meide W. F., Schoone G. J., Gontijo C. M. F., Schallig H. D. F. H., Brazil R. P., *Veterinary Research Communications* 30: 637-643, 2006). Diante disto novos métodos diagnósticos alternativos, mais eficientes, discriminatórios e rápidos são necessários.

A abordagem de proteínas recombinantes para serem usadas no diagnóstico tem sido o foco de muitos pesquisadores (S. Farajnia, B. Darbani, H. Babaei, M. H. Alimohammadian, F. Mahboudi And A.M. Gavgani, *Parasitology* 135, 1035–1041, 2008; Renato Porrozzi, Marcos V. Santos da Costa, Antonio Teva, Aloísio Falqueto, Adelson L. Ferreira, Claudiney dos Santos, Ana Paula Fernandes, Ricardo T. Gazzinelli, Antonio

Campos-Neto and Gabriel Grimaldi, Jr., *Clinical And Vaccine Immunology* 14: 544–548, 2007).

As E-NTPDases são uma família específica de ecto-nucleotidases, proteínas que são descritas de maneira geral, como proteínas de membrana ecto localizadas ou solúveis (secretadas) que tem como função primária a degradação de nucleotídeos, principalmente extracelulares, tri e difosfatados (Zimmermann, H., Beaudoin, A. R., Bollen, M., Belgium, Shaker Publishing; 1–9. 1999.)

O interesse nestas enzimas se baseia em dados obtidos na literatura que sugerem a participação de ecto-nucleotidases, entre outras coisas, na virulência, infectividade e aquisição de purinas em parasitos (Barrêdo-Pinho, M., Peres-Sampaio, C. E., Chrispim, P. P. M., Belmont-Firpo, R., Lemos, A. P., Martiny, A., Vannier-Santos, M. A., Meyer-Fernandes, J. R. A *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 391:16–24, 2001). Recentemente, estudando a infecção experimental de camundongos C57BL/6 com *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis*, ambas causadoras de leishmaniose tegumentar, verificou-se que os animais foram capazes de controlar a infecção por *L. (V.) braziliensis*, mas não por *L. (L.) amazonensis*. A diferença de resposta à infecção foi relacionada a um estado anérgico observado nos animais infectados por *L. (L.) amazonensis* (Maioli, T. U., Erica, T., Arantes, R. M. E., Fietto, J. L. R., Afonso, L. C. C., *Parasitol Res* 94: 207-212, 2004). Além disto, foi verificado que as células intactas de *L. (L.) amazonensis* foram capazes de hidrolisar uma maior quantidade de nucleotídeos extracelulares de adenosina. Considerando que o ATP extracelular é uma molécula pró-inflamatória e que um dos produtos de sua degradação, a adenosina possui efeito imunossupressor, esta diferença poderia então levar a um efeito antiinflamatório e imunossupressor, como o observado (Maioli, T. U, Erica, T., Arantes, R. M. E., Fietto, J. L. R., Afonso, L. C. C., *Parasitol Res* 94: 207-212, 2004). Esta foi a primeira evidência da participação de ecto-nucleotidases de um parasita no controle da resposta imunológica do hospedeiro.

Na busca feita junto ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial - INPI foram encontradas solicitações de patentes nas áreas de imunoterapia e imunodiagnóstico, porém nenhuma destas patentes utiliza produtos relacionados ao objeto desta patente. Nesta busca foi encontrado o documento de patente PI 9406509, que refere-se a “COMPOSTOS, PROCESSO, SUA PREPARAÇÃO, USO DOS MESMOS, COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS E PROCESSO PARA PROFILAXIA E PARA TRATAMENTO TERAPÊUTICO DE MALÁRIA E DOENÇAS CAUSADAS POR LEISHMANIA,

TOXOPLASMA GONDII, PNEUMOCY”, onde se descreve o pirrol-amidínicos de fórmula geral e os sais farmacêuticamente aceitáveis dos mesmos, processos para a preparação e composições farmacêuticas contendo-os úteis como antivirótico e antiparasítico. Este documento versa então sobre o uso de formulações farmacêuticas derivadas de compostos pirrol-amidinicos para tratamento e prevenção das leishmanioses. O objeto do pedido de patente em questão é diferente da patente descrita, pois utiliza proteína recombinante para ser usada em diagnóstico, prognóstico, desenvolvimento de anticorpos monoclonais, vacinação e desenvolvimento de quimioterápicos para as leishmanioses. Não há inter-relação entre os mesmos. Porém é importante salientar que no caso de doenças infecciosas é desejável que se tenham métodos alternativos de diagnóstico, prevenção e tratamento visto que existe uma diversidade muito grande de resposta a quimioterapia e vacinação das populações dos hospedeiros, bem como diferentes susceptibilidades a drogas e produção de resposta imune protetora em relação aos parasitos.

Outro depósito encontrado foi o de nº PI 9807332 que trata de “ANTÍGENOS DE LEISHMANIA PARA UTILIZAÇÃO NA TERAPIA E DIAGNÓSTICO DE LEISHMANIOSE” onde são demonstradas composições e processos para prevenir, tratar e detectar leishmaniose e estimular respostas imunes em pacientes. A presente invenção não tem sobreposição com esta patente, embora ambas visem aplicações em comum. Os antígenos apresentados na patente PI 9807332 são distintos das proteínas antigênicas desta patente. A aplicação em mesma área se justifica como descrito no item anterior, além disto, a própria patente em questão salienta a necessidade de desenvolvimento de alternativas no diagnóstico, tratamento e profilaxia das leishmanioses que são causadas por mais de 20 espécies diferentes de *Leishmania*.

O depósito de nº 2133236A1 feito no banco da Espanha refere-se a “GEN QUIMÉRICO FORMADO POR LAS SECUENCIAS DE DNA QUE CODIFICAN LOS DETERMINANTES ANTIGÊNICOS DE CUATRO PROTEÍNAS DE *L. infantum*, APLICABLE PARA EL DIAGNÓSTICO SEROLOGICO DE LEISHMANIOSIS CANINA Y PROTEÍNA OBTENIDA” onde se descreve os determinantes antigênicos de quatro proteínas de *L. infantum* (LiP2a, LiP2b, LiP2A, LiP0), que foram aplicadas em diagnóstico de Leishmaniose. Os objetos desta patente são proteínas distintas daquelas que estão sendo patenteadas neste processo, portanto como justificado anteriormente apesar da aplicação poder ser a mesma os antígenos são diferentes. No caso das Leishmanioses,

como dito anteriormente, é importante que se tenham proteínas alternativas para serem usadas em diagnóstico, profilaxia e tratamento, visto que existe grande diversidade de parasitos e hospedeiros.

É um primeiro objetivo da presente invenção, fornecer as proteínas da família das E-NTPDases recombinantes de três espécies de *Leishmania* (*Leishmania major*,
5 *Leishmania braziliensis*, *Leishmania infantum*) homóloga à sua proteína natural, para ser utilizada como antígeno em kits de diagnóstico das leishmanioses.

É objetivo também da presente invenção usar as ditas proteínas e suas variantes, modificadas em suas sequências de aminoácidos, que conservem suas propriedades
10 antigênicas, para o uso em diagnóstico, compostos vacinais, desenvolvimento de anticorpos, marcadores de prognóstico e no desenho racional de drogas inibidoras das E-NTPDases que possam ser usadas na quimioterapia das leishmanioses.

O desenvolvimento de compostos antigênicos capazes de aumentar a eficiência no diagnóstico e efetivação como agente vacinal tem sido busca no âmbito geral da pesquisa
15 em leishmaniose. A proteína GDPase recombinante, conforme visto na Figura 5, aponta como um potente antígeno. O antígeno quando utilizado em diagnóstico em teste de ELISA, foi capaz de discriminar de maneira satisfatória soros de cães contaminados com *Trypanossoma cruzi* dos contaminados com *Leishmania sp.* Desse modo o investimento neste antígeno recombinante como alvo para produção de kit de diagnóstico, bem como
20 para as outras aplicações é muito promissor.

Descrição da Invenção

O primeiro objetivo da presente invenção é alcançado através das proteínas da família das E-NTPDases expressas de forma recombinante, sendo as sequências SEQ. ID. N° 1, SEQ. ID. N° 2, SEQ. ID. N° 3, SEQ. ID. N° 4, SEQ. ID. N° 5, SEQ. ID. N° 6, SEQ.
25 ID. N° 7, SEQ. ID. N° 8, SEQ. ID. N° 9, SEQ. ID. N° 10, SEQ. ID. N° 11 e SEQ. ID. N° 12 utilizadas como antígeno.

O segundo objetivo da presente invenção é usar as ditas proteínas e suas variantes, modificadas em suas sequências de aminoácidos, que conservem suas propriedades antigênicas, para o uso em diagnóstico, compostos vacinal, marcador de prognóstico,
30 produção de anticorpos monoclonais e desenvolvimento de quimioterápicos para as leishmanioses.

A presente invenção será, a seguir, detalhadamente descrita.

Figura 1.1 – ilustra o esquema do vetor de expressão pET 21b para sistema de expressão em *Escherichia coli* e do cassete de expressão de DNA.

Figura 1.2 - ilustra o inserto de DNA, no caso o gene gi_[15487213], que foi clonado entre os sítios de restrição BamHI e Sall.

5 Figura 2.1 – ilustra a comparação das sequências das E-NTPDases de espécies do gênero *Leishmania*. As regiões marcadas com quadros amarelos representam as regiões conservadas das E-NTPDases.

Figura 2.2 – idem a Figura 2.1, continuação.

Figura 3 – a parte A ilustra uma foto de gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 10%,
10 mostrando proteínas de um lisado de *E. coli* BL21 (DE3) transfectadas com plasmídeo contendo o gene da GDPase de *Leishmania major* expresso em diferentes tempos. A primeira coluna mostra uma proteína NTPDase recombinante de *Trypanossoma cruzi*. As próximas 8 linhas mostram os produtos dos lisados de bactérias após 2 a 4 h de indução com IPTG nas concentrações de 1 mM, 0,8 mM, 0,6 mM, 0,4 mM, 0,3 mM, 0,2 mM, 0,1
15 mM e sem indução respectivamente. Os números correspondem aos mostrados por marcador de massa molecular (kDa). A parte B ilustra um resultado de Western blot mostrando a proteína GDPase de *Leishmania major* do lisado de *E. coli* reagindo com anticorpos do soro de coelhos imunizados com a NTPDase recombinante de *T. cruzi*. As linhas de 1 a 8 mostram a reação da proteína GDPase com o soro de coelhos imunizados
20 com NTPDase de *T. cruzi*. A linha 9 mostra ausência de bandas quando não havia indução da proteína GDPase recombinante. A seta indica a reação da proteína com os anticorpos mostrando uma banda de aproximadamente 78 kDa.

Figura 4 – Ilustra uma foto de gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 10% mostrando a proteína GDPase de *Leishmania major* expressa em *E. coli* BL21 (DE3) após a
25 purificação por cromatografia de afinidade em coluna de Níquel-agarose. A proteína GDPase recombinante de *Leishmania major* pode ser observada nas colunas 10 e 11, após ter sido recuperada em tampão contendo 80 mM e 160 mM imidazol respectivamente. Os números correspondem aos mostrados por marcador de massa molecular (kDa). A proteína GDPase recombinante de *Leishmania major* possui 78,2 kDa.

30 Figura 5 – gráfico que ilustra o resultado de diagnóstico imunológico por ELISA em que se utilizou como antígeno a proteína GDPase recombinante de *Leishmania major* purificada nas concentrações de 1,5, 3, 4,5 e 30 µg/ml e como controle foi utilizado o

extrato total de *Leishmania* sp. lisada na concentração de 3 µg/ml, referenciadas pelos números 1, 2, 3, 4 e 5 respectivamente. Foram testados 8 soros de cães domésticos (*Canis familiaris*) na diluição de 1: 80. Sendo 3 soros de cães sabidamente positivos para *Leishmania* sp. (L+), 3 soros de cães sabidamente negativos para infecção por *Leishmania* sp. (L-) e 2 soros de cães sabidamente positivos para infecção por *T. cruzi*.

Figura 6 – gráfico que ilustra o resultado de diagnóstico imunológico por ELISA utilizando como antígeno a proteína GDPase recombinante de *Leishmania major* na concentração 1,5 µg/ml. Foram utilizadas 169 amostras de soros de cães, sendo 117 sabidamente positivas e 52 sabidamente negativas.

10 Descrição Detalhada da Invenção

A presente invenção se refere às proteínas da família E-NTPDase recombinantes de *Leishmania major*, *Leishmania braziliensis* e *Leishmania infantum*, obtidas a partir da sequência nucleotídica dos genes codificantes destas proteínas com modificações destinadas a aplicações antigênicas, as quais após etapas de preparação de primers para amplificação dos genes alvos, amplificação dos genes codificantes dessas proteínas e clonagem em vetor de expressão, é finalmente expressa e posteriormente purificada por cromatografia de afinidade por Níquel. As ditas proteínas recombinantes assim purificadas podem ser usadas de forma satisfatória no imunodiagnóstico por ELISA e Western-blot, como demonstrado pelo uso da isoforma recombinante GDPase de *L. major* aplicada ao diagnóstico da Leishmaniose canina.

A presente invenção se refere às proteínas da família E-NTPDases recombinantes identificadas como SEQ. ID. Nº 1, SEQ. ID. Nº 2, SEQ. ID. Nº 3, SEQ. ID. Nº 4, SEQ. ID. Nº 5, SEQ. ID. Nº 6, SEQ. ID. Nº 7, SEQ. ID. Nº 8, SEQ. ID. Nº 9, SEQ. ID. Nº 10, SEQ. ID. Nº 11 e SEQ. ID. Nº 12 as quais poderão ser utilizadas como antígenos em diagnóstico das leishmanioses.

A SEQ. ID. Nº 2 derivada do gene codificante da GDPase de *L. major*, apresenta uma identidade de aminoácidos de 93,74% em relação à proteína GDPase natural de *Leishmania major* quando se compara a mesma com relação aos trechos disponíveis no GenBank de 690 aminoácidos predita pelo acesso [gi_|15487213|](#). Adicionalmente a GDPase de *L. infantum* (SEQ ID. Nº 6) e *L. braziliensis* (SEQ ID. Nº 4) apresentam identidade de 84,49% e 65,75% respectivamente em relação à GDPase recombinante de *L. major*, conforme visualizado na Tabela 1. Esta alta identidade mostra que são proteínas similares, da mesma família. Esta similaridade é suficiente para haver reatividade

imunológica cruzada sendo possível utilizar todas estas variantes nas mesmas aplicações descritas para a GDPase, ou seja, diagnóstico, prognóstico e vacinação para as leishmanioses. O mesmo ocorre para as variantes denominadas nucleosídeo difosfatases (NTPDases, descritas como SEQ ID. N° 8, SEQ ID. N° 10 e SEQ ID. N° 12), que apesar de apresentarem menor identidade comparativamente (Tabela 1) apresentam domínios conservados, conforme mostrado nas Figuras 2.1 e 2.2. Sendo assim, as NTPDases recombinantes também são objetos deste pedido de patente e poderão ser usadas nas mesmas aplicações, ou seja, no diagnóstico, prognóstico, vacinação, desenvolvimento de monoclonais e quimioterápicos para as leishmanioses.

Tabela 1 - Relação de Similaridade e Identidade da sequência de aminoácidos da proteína GDPase de *L. major* recombinante modificada com as demais sequências de aminoácidos das E-NTPDases de diferentes espécies de *Leishmania*.

		1	2	3	4	5	6	7
Proteína GDPase recombinante	1		93,74	84,49	65,75	23,09	23,09	22,13
<i>L. major</i> GDPase	2	674		90,10	67,86	24,49	24,49	23,48
<i>L. infantum</i> GDPase	3	610	610		69,15	23,67	23,52	22,94
<i>L. braziliensis</i> GDPase	4	478	473	482		22,22	22,22	21,52
<i>L. major</i> NTPDase	5	169	169	164	158		92,00	77,88
<i>L. infantum</i> NTPDase	6	169	169	163	158	391		79,29
<i>L. braziliensis</i> NTPDase	7	162	162	159	153	331	337	

Números de 1 a 7 na horizontal representam as respectivas proteínas da vertical. Onde os números se cruzam fornece a identidade no quadrante de cima e similaridade no de baixo.

O gene natural das GDPase de *Leishmania major*, *Leishmania braziliensis* e *Leishmania infantum* estão disponíveis no GenBank sob os acessos gi_|15487213|, XP_001562788, XP_001463665 respectivamente. O gene de *Leishmania major* possui uma sequência de 2073 nucleotídeos que codifica uma proteína de 690 aminoácidos. O gene de *Leishmania braziliensis* possui uma sequência de 2076 nucleotídeos que codifica uma proteína de 691 aminoácidos. O gene de *Leishmania infantum* possui uma sequência de 2034 nucleotídeos que codifica uma proteína de 677 aminoácidos. As sequências de nucleotídeos recombinantes em relação às naturais apresentam modificações na porção

aminoterminal e carboxiterminal. À porção aminoterminal foram adicionados 42 pares de bases. Na porção carboxiterminal foi removido os três últimos nucleotídeos (códon de parada) e adicionado 45 pares de base. As proteínas recombinantes preditas de *Leishmania major*, *Leishmania braziliensis* e *Leishmania infantum*, possuem 719, 720 e 706 aminoácidos respectivamente (SEQ. ID N° 2, SEQ. ID N° 4 e SEQ. ID N° 6).

O gene natural das NTPDase de *Leishmania major*, *Leishmania braziliensis* e *Leishmania infantum* estão disponíveis no GenBank sob os acessos XP_001681917, XP_001562178, XM_001464304 respectivamente. Ambas as espécies possuem uma sequência de 1278 nucleotídeos que codifica 425 aminoácidos. A sequência de nucleotídeos recombinantes em relação ao natural apresenta modificações na porção aminoterminal e carboxiterminal. À porção aminoterminal foram adicionados 42 pares de bases. Na porção carboxiterminal foram removidos os três últimos nucleotídeos (códon de parada) e adicionados 45 pares de base, exceto em *Leishmania major* que foram adicionados somente 39 pares de base. Esta diferença se deve ao uso de diferentes sítios de restrição usados no processo de clonagem gênica. As proteínas recombinantes preditas de *Leishmania major*, *Leishmania braziliensis* e *Leishmania infantum*, possuem 452, 454 e 454 aminoácidos respectivamente (SEQ. ID N° 8, SEQ. ID N° 10 e SEQ. ID N° 12).

A presente invenção ainda se refere ao uso da proteína GDPase recombinante em kit de diagnóstico para as leishmanioses causadas por espécies do gênero *Leishmania*, compreendendo as E-NTPDases recombinantes, tal como mencionado acima, que são capazes de interagir com anticorpos específicos em amostras de soros ou sangue ou outros líquidos ou amostras de indivíduos sendo capazes de indicarem a infecção nestes indivíduos humanos ou animais.

A seguir serão descritos experimentos de demonstração que permitirão ilustrar a potencialidade da presente invenção. Resumidamente estes experimentos se baseiam em amostra contendo *Leishmania major* que foi submetida à extração de seu material genômico para isolamento do gene específico codificante da GDPase. Posteriormente a isso, foi feito a amplificação do gene específico por PCR sendo esse clonado em vetor de clonagem e expressão, o qual foi utilizado na transformação de células de *Escherichia coli* que passaram a expressar a proteína GDPase recombinante do protozoário. A proteína GDPase de *Leishmania major*, após purificação foi utilizada como antígeno em testes de ELISA em soros de cães visando à pesquisa de anticorpos da classe IgG contra espécies do gênero *Leishmania*. Esta proteína GDPase recombinante de *Leishmania major*,

produzida em larga quantidade, poderá ser amplamente distribuída a laboratórios por todo país e desta forma, contribuir de forma relevante para o diagnóstico sorológico das leishmanioses no Brasil ou no exterior, ou ainda ser usada em kits e aplicações imunológicas vacinais e de produção de anticorpos. Todos os processos descritos neste documento se estendem também as outras isoformas das E-NTPDases das outras espécies de *Leishmania* descritas nas seqüências SEQ. ID. Nº 3, SEQ. ID. Nº 4, SEQ. ID. Nº 5, SEQ. ID. Nº 6, SEQ. ID. Nº 7, SEQ. ID. Nº 8, SEQ. ID. Nº 9, SEQ. ID. Nº 10, SEQ. ID. Nº 11 e SEQ. ID. Nº 12 as quais poderão ser também utilizadas como antígenos em diagnóstico das leishmanioses.

10 Experimentos De Demonstração

Isolamento e Clonagem da região codificante da GDPase de *Leishmania major*

A cepa utilizada para extração genômica foi a MHOM/IL/80/Friedlin de *Leishmania major*. Para a extração de DNA genômico (DNAG) aproximadamente 1×10^8 células foram recolhidas por centrifugação a $13.000 \times g$ por 2 a 3 min, descartando o sobrenadante foi adicionado 500 a 700 μL de fenol equilibrado ao “pellet” e deixado a temperatura ambiente (T. A.) por 5 a 10 min. Em seguida foi adicionado de 200 a 400 μL de 10 mM Tris (pH 8,0) estéril e homogeneizado no vortex. O homogeneizado foi submetido à centrifugação a $13.000 \times g$ por 10 a 12 min e recuperado a fase aquosa sem a interface. A essa foi adicionada de 200 a 400 μL de uma mistura de fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (25:24:1) e homogeneizada no vortex. O homogeneizado foi submetido à centrifugação a $13.000 \times g$ por 10 a 12 min e recuperada a fase aquosa sem a interface. A essa foi adicionada de 200 a 400 μL de clorofórmio e homogeneizado no vortex. Sendo posteriormente centrifugada a $13.000 \times g$ por 10 a 12 min e recuperada a fase aquosa como descrito anteriormente. Em seguida, foi adicionado 1/10 do volume de uma solução de 3 M de acetato de sódio (pH 5,2) e dois volumes de etanol 100% gelado homogeneizando sem vortexar. O homogeneizado foi deixado precipitando por 2 a 3 h no freezer -80°C , sendo posteriormente centrifugado a $13.000 \times g$ por 20 a 30 min a 4°C . O sobrenadante foi descartado, adicionando ao precipitado de 250 a 500 μL de etanol 70% gelado e a amostra foi centrifugada a $13.000 \times g$ por 5 a 10 min a 4°C . O sobrenadante foi descartado e o “pellet” colocado para secar com a tampa do frasco aberta. Posteriormente o “pellet” de DNA seco foi suspenso em 50 a 60 μL de 10 mM Tris (pH 8,0) estéril. O DNA genômico foi estocado a -20°C e utilizado para isolamento da região codificante do

gene da GDPase (gi_|15487213|) contendo 2073 pares de bases por reação da polimerase em cadeia (PCR).

Para tanto foram utilizados o oligonucleotídeo direto 5'CGGGATCCCATGCCAATGACTGACG3' que anela no genoma de *Leishmania major* e insere um sítio de restrição para BamH I na extremidade 5' para inserção posterior no vetor de expressão em bactéria pET-21b e oligonucleotídeo reverso 5'GCGTCGACGGTAAGAGAGAGGAGTGA3', que cria um sítio para Sal I no final da região codificante. Para amplificação do gene foi usado um aparelho termociclador (Programmable Thermal Controller-PTC-100TM). A reação foi realizada em um volume total de aproximadamente 50 µL, utilizando 4 µL do DNAg; 5,0 µL de tampão 1,5 mM MgSO₄ (fornecido pelo fabricante da Taq DNA Polimerase); 2,4 µL do mix de 2,5mM dNTPs (dCTP, dTTP, dGTP, dATP); 2 µL dos oligonucleotídeos em uma concentração de 20 pmol/µL; 0,5 µL de Taq DNA Polimerase e água ultrapura estéril qsp. O programa utilizado consistiu em 33 ciclos: 94 °C por 4 min; 94 °C por 30 seg; 50 °C por 1 min; 72 °C por 1 min; 72 °C por 5 min; 4 °C até retirada dos tubos. Os produtos finais das reações de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1% em 1X TAE (1 mM EDTA; 40 mM Tris-Acetato; em água deionizada) e corado em solução de brometo de etídio (Sambrook J., Fritsch E. F. and Maniatis T., 1989), para a verificação da formação de uma banda majoritária correspondente ao tamanho do amplicon alvo com aproximadamente 2,1 kb. A eletroforese foi feita a aproximadamente 80 V, utilizando como tampão de corrida TAE. A banda de cerca de 2,1 kb foi purificada do gel de agarose utilizando o Kit "PureLinkTM Quick Gel Extraction" (InvitrogenTM) conforme instruções do fabricante. Foi utilizado o sistema TOPO (InvitrogenTM) para a subclonagem inicial do gene.

A banda do amplicon foi suspensa em um volume total de aproximadamente 20 µL de água ultra-pura estéril e 5 a 10 µL desta solução foi usada na ligação feita a aproximadamente 16 °C por 10 a 12 h, de acordo com manual do fabricante (TOPO® TA Cloning® Kit for subcloning - Invitrogen). A mistura de ligação (~6 µL) contendo vetor TOPO + amplicon da GDPase, foi adicionada a aproximadamente 100 µL de solução contendo bactérias *E. coli* TOP 10F', previamente tornadas competentes (Sambrook J., Fritsch E. F. and Maniatis T., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989). A mistura foi incubada em gelo por 45 a 60 min, submetida a choque térmico (42 °C) por 1 a 5 min e colocada novamente no gelo. Adicionaram-se 1 a 5 mL de LB-Líquido (1% triptona, 0,5 % extrato de levedura, 1% NaCl, pH 7.5) seguido de incubação a 37 °C por 40 min com

agitação de 180 rpm em Shaker TE-420. O volume total dessa mistura foi dividido em três alíquotas e plaqueado em meio sólido LB-Agar (1% triptona, 0,5 % extrato de levedura, 1% NaCl, 1,5% select Agar pH 7.5) contendo ampicilina (5 a 10 mg/mL⁻¹) e incubadas por 12 a 14 h a 37 °C.

5 Os clones resistentes a ampicilina foram recuperados e utilizados para confirmação da presença do plasmídeo contendo o gene de interesse por PCR e análise de restrição (utilizando *BamH* I e *Sal* I) a partir do plasmídeo extraído por minipreparação plasmidial de acordo com (Sambrook J., Fritsch E. F. and Maniatis T., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989). Um dos clones isolados e confirmado foi então submetido a
10 sequenciamento automático parcial usando iniciadores flanqueadores da região de clonagem em aparelho Mega-Bace de acordo com instruções do fabricante. Os clones que continham a construção foram estocados em meio LB-líquido em tubos de microcentrífuga com 20% de glicerol e mantidos a -80 °C.

Extração do DNA plasmidial

15 O DNA plasmidial (DNAP) foi extraído pelo método da lise alcalina (Sambrook J., Fritsch E. F. and Maniatis T., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) como descrito a seguir. Para isso, os clones positivos da transformação com o vetor TOPO, foram crescidos em tubos de rosca individuais contendo 3 mL de LB e 30 µL de ampicilina (5 a 10 mg/mL⁻¹) por 12 a 14 h a 37 °C em 180 a 200 rpm. Após o crescimento um volume de
20 1,5 mL de cada cultura foi transferido para tubos de microcentrífuga, e as células foram coletadas por centrifugação (Centrífuga 5415C- EPPENDORF) a 12000 x g por 1 a 5 min. O sedimento celular foi lavado com 0,5 a 1 mL de STE (0,1 NaCl, 10 mM Tris.Cl, 1 mM EDTA, pH 8.0) para retirada de inibidores de endonucleases. Após a centrifugação foram adicionados de 200 a 300 µL da solução I (25 mM Tris.Cl pH 8.0, 10 mM de EDTA e
25 5mM de D-Glicose) gelada e suspenso vagarosa e completamente o “pellet”. Em seguida foram adicionados de 200 a 300 µL da solução II (NaOH 0,2M, SDS 1%) preparada na hora, e os tubos foram invertidos lentamente por 6 a 10 vezes e mantidos no gelo por 5 a 10 min. Após isso, 150 a 300 µL da solução III (3 M Kac, 2 M Hac pH 8.0) gelada foram adicionados e os tubos foram invertidos lentamente 6 a 10 vezes e mantidos no gelo por 5
30 min. Em seguida os tubos foram centrifugados por 12000 x g por 5 a 10 min e transferidos os sobrenadantes para outros tubos novos onde foram adicionados 5 µL de RNase A (10 µg/uL) e mantidos os tubos a 37 °C em banho-maria por 30 a 50 min.

A cada tubo foram adicionados 550 a 700 μ L de fenol: clorofórmio (1:1), e os tubos foram invertidos lentamente por cerca de 5 a 10 vezes e centrifugados a 12000 x g por 5 a 10 min. Esse procedimento se repetiu mais uma vez. A fase aquosa foi transferida para tubos novos. Em seguida adicionou-se 550 a 700 μ L de clorofórmio e foi realizada
 5 nova centrifugação a 12000 x g por 5 a 10 min. A fase superior foi transferida para novos tubos, onde foram adicionados 550 a 700 μ L de isopropanol gelado. Os tubos foram invertidos lentamente e mantidos a -70 °C por 10 a 20 min. Em seguida as amostras foram centrifugadas a 12000 x g por 5 a 10 min, o sobrenadante foi descartado e os tubos foram colocados para secar por 30 a 50 min sobre papel toalha. O precipitado foi lavado com 200
 10 a 400 μ L de etanol 70% gelado e centrifugado a 12000 x g por 5 a 10 min. O sobrenadante foi descartado e os tubos foram colocados para secar por 30 a 50 min. Após estar secos, o DNA plasmidial foi suspenso em 20 a 30 μ L de H₂O deionizada. Os clones foram selecionados por análise de restrição utilizando *BamH* I e *Sal* I e confirmados por sequenciamento parcial.

15 **Transferência da região codificante da proteína GDPase recombinante para vetor de expressão em sistema procarioto pET-21b**

O vetor de amplificação TOPO contendo o gene, foi submetido à digestão com *BamH* I e *Sal* I. Após a digestão, a mistura do vetor TOPO foi submetida à eletroforese em gel de agarose 1%.

20 O inserto relativo à região codificante completa da GDPase foi purificado com kit “PureLink™ Quick Gel Extraction” (Invitrogen™) e ligado, de forma análoga a descrita na subclonagem em TOPO, no vetor pET-21b previamente digerido com as mesmas enzimas e purificado também pelo mesmo kit. A Figura 1.2 mostra um esquema da construção pET-21b-GDPase.

25 Bactérias *E. coli* TOP 10F', previamente tornadas competentes como descrito acima, foram transformadas com o produto de ligação e foram incubadas em meio líquido LB conforme descrito acima (isolamento do clone contendo o TOPO). A seleção dos clones foi feita por análise de restrição e sequenciamento. Os clones positivos foram estocados em tubos de microcentrifuga, contendo 15 a 30 % de glicerol, e mantidos a
 30 temperatura de -70 °C.

Expressão da proteína GDPase recombinante e análise em gel de SDS

A expressão total das proteínas recombinantes foi feita, em média escala, em 250 mL de LB. O cassete de expressão do vetor pET-21b, destacando os sítios de clonagem e sequência de 6 resíduos de histidina na porção carboxi-terminal da proteína recombinante, está esquematizado na Figura 1.2.

5 Bactérias competentes, da linhagem *E. coli* BL21(DE-3), foram transformadas com a construção pET-21b-GDPase, de modo análogo ao realizado com vetor TOPO. O gene gi_15487213 codifica um RNAm para a produção de uma proteína de 78,2 kDa cuja sequência de aminoácidos predita está descrita na SEQ. ID. N° 2.

10 Um total de 45 nucleotídeos extra, correspondentes a 15 aminoácidos a mais na extremidade carboxi-terminal da proteína recombinante foram adicionados à proteína final pela ligação do gene alvo com o vetor pET-21b, que codifica 9 aminoácidos de ligação entre a proteína GDPase e a cauda de hexa-histidina mais 6 de histidinas. Na porção aminoterminal um total de 14 aminoácidos foram inseridos.

15 Em seguida, realizou-se um pré-inoculo em 5 a 7 mL de meio líquido LB contendo 50 µL de ampicilina (5 a 10 mg/mL⁻¹) a partir do clone preservado em glicerol. Este pré-inoculo foi incubado por 16 a 20 h a 37 °C sob agitação. Uma alíquota de 2,5 a 5 mL de cultura foi coletada e inoculada em um volume total de 250 mL de LB-líquido contendo 2,5 mL de ampicilina (5 a 10 mg/mL⁻¹). Essa mistura foi incubada a 37 °C sob agitação e o crescimento celular foi acompanhado pela leitura de sua DO₆₀₀ (densidade ótica). Para 20 indução da proteína recombinante modificada usou-se IPTG (isopropyl β-D-thiogalactopyranoside). No momento em que a DO₆₀₀ atingiu cerca de 0,6 a 0,8, foram adicionados aos tubos de cada clone aproximadamente 0,3 mM de IPTG. A incubação prosseguiu por 2 a 4 h a 37 °C sob agitação.

25 Após a indução a cultura foi centrifugada 3000 x g e o sedimento obtido foi mantido no gelo por 15 a 30 min e suspenso em tampão de lise (50 mM Tris (pH 8.0), 300 mM NaCl, em água destilada), na proporção de 3 a 5 mL por grama de sedimento, contendo 30 a 50 µL de PMSF (100 mg/mL), 50 a 100 µL de aprotinina (1 mg/mL), 50 a 100 µL de pepstatina (1 mg/mL). Em seguida foi adicionado 1 a 5 mg/mL de lisozima e manteve-se no gelo por 30 a 50 min.

30 Procedeu-se então o rompimento final das células por sonicação por 6 a 10 vezes por 10 a 20 segundos na potência 200 W com intervalo de 10 a 20 segundos no gelo entre cada sonicação. Em seguida adicionou-se 0,1% Triton e o material foi centrifugado por 30 a 50 min a 20400 x g a 4 °C, sendo armazenado tanto o “pellet” (fração insolúvel) quanto

o sobrenadante (fração solúvel) a - 20 °C para posterior purificação da proteína recombinante.

Para determinar a melhor concentração do IPTG a ser usada como padrão para expressão da proteína recombinante, as colônias foram inoculadas em 4 mL de meio líquido LB contendo 40 µL de ampicilina (5 a 10 mg/mL⁻¹) e incubadas a 37 °C por 12 a 14 h sob agitação. Uma alíquota de 250 a 500 µL de cultura foi coletada e diluída para um volume total de 5 a 10 mL em 11 tubos. Essa mistura foi incubada a 37 °C sob agitação e o crescimento celular foi acompanhado pela leitura de sua DO₆₀₀.

Quando a cultura atingiu DO₆₀₀ de aproximadamente 0,6 a 0,8, aliquoteou-se 1 a 5 mL da cultura (controle não induzido), em seguida foram adicionados aos outros tubos, IPTG na concentração seriada de 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,7; 0,8; 0,9 e 1 mM. A incubação prosseguiu por 2 a 4 h a 37 °C sob agitação. Ao final deste tempo 1 mL de cada cultura foi coletado (controles induzidos) e feita a leitura de DO₆₀₀. As amostras (controles induzidos e não induzido) foram centrifugadas, o sobrenadante descartado e o sedimento bacteriano misturado com tampão de amostra de SDS-PAGE (62,5 mM Tris.HCl pH 6,8, 10% SDS, 0,01% azul de bromofenol (ABF), 10% glicerol e 20 mM de β-mercaptoetanol). As amostras foram aquecidas a 100 °C por 5 a 10 min. Os lisados bacterianos foram analisados por SDS-PAGE 10% de acordo com Laemmli, U. K., *Nature*, 227(259): 680-5, 1970. Foi utilizado o sistema de eletroforese vertical Mini-PROTEAN® (BIO-RAD) pequeno (1mm de espessura). As amostras foram aplicadas na DO₆₀₀ 3,0 a 5,0, para um volume total de 20 µl por canaleta, e após a eletroforese o gel foi corado com Comassie blue. O padrão de peso molecular utilizado foi o PageRuler™ Unstained Protein Ladder (Figura 3, na parte A).

Purificação da proteína GDPase recombinante e análise em gel de SDS

Para purificação da proteína recombinante foram empregadas as amostras do sobrenadante (solúvel). Estas amostras foram mantidas sobre agitação na presença de 500 a 700 µL da resina HIS-Select™ Nickel Affinity Gel devidamente preparada segundo o fabricante, em tubos de 15 mL por 1 a 3 horas a 4 °C. Posteriormente o material foi passado em uma coluna, contendo lã de vidro na extremidade abaixo para impedir perda da resina, e as proteínas não ligadas à coluna foram recuperadas no volume separado da resina. O fluxo foi dependente somente da pressão atmosférica não sendo padronizado.

Após a saída de todo material líquido visível da coluna, manualmente preparada pela imobilização da resina de afinidade a uma seringa de 10 mL, a esta foi adicionado um

volume de 2 a 4 mL de tampão de lavagem 1 (50 mM Tris pH 8.0, 300 mM NaCl₂, 5 mM MgCl₂). Esse procedimento se repetiu por 2 a 4 vezes. Em seguida foi adicionado um volume de 2 a 4 mL de tampão de lavagem 2 (50 mM Tris pH 8.0, 300 mM NaCl₂, 5 mM Imidazol, 5 mM MgCl₂). Esse procedimento foi repetido por 2 a 4 vezes. Em seguida foi
 5 adicionado um volume de 2 a 4 mL do tampão de lavagem 3 (50 mM Tris pH 8.0, 300 mM NaCl₂, 10 mM Imidazol, 5 mM MgCl₂). Esse procedimento foi repetido por 2 a 4 vezes. Posteriormente as proteínas mais fortemente ligadas à resina foram eluídas em tampão de eluição. Um volume de 1,5 a 3 mL do tampão de eluição 1 (50 mM Tris pH 8.0, 300 mM NaCl₂, 80 mM Imidazol, 5 mM MgCl₂), foi adicionado. Após término desta
 10 eluição, um volume de 1 a 3 mL do tampão de eluição 2 (50 mM Tris pH 8.0, 300 mM NaCl₂, 160 mM Imidazol, 5 mM MgCl₂) e finalmente um volume de 1 a 3 mL de tampão de eluição 3 (50 mM Tris pH 8.0, 300 mM NaCl₂, 250 mM Imidazol, 5 mM MgCl₂) se procedeu como o primeiro. O processo de eluição 3 se repetiu por mais uma vez. As amostras de todos os passos de purificação foram coletadas em tubos de microcentrifuga e
 15 estocadas a 4°C e analisadas em gel de SDS 10% corado com Comassie blue. As amostras foram aplicadas em um volume total de 20 µl (Figura 4).

Western Blot

Várias amostras do processo de purificação foram submetidas à eletroforese SDS-PAGE 10% e transferidas sob corrente elétrica para membrana de nitrocelulose sob a
 20 condição de transferência de 200-250 mA por 2 a 4 h em sistema de transferência vertical Mini-PROTEAN® 3 Cell Assembly Guide. Após a transferência a membrana foi corada com Ponceau S (Ponceau 0,2% em ácido acético 1,0%) por 10 a 30 min para visualização das bandas protéicas e marcação da região das bandas do padrão de massa molecular. Em seguida a membrana foi descorada com água destilada e colocada em solução de bloqueio
 25 com incubação por 1 a 3 hora em temperatura ambiente utilizando o tampão TBS-T (0,01 M Tris; 0,14 M NaCl; 0,1% Tween 20) contendo 5% de leite desnatado.

Posteriormente a membrana passou por uma rápida lavagem em tampão TBS (0,01 M Tris; 0,14 M NaCl) e em seguida foi feita a incubação com o anticorpo primário anti-rNTPDase de *T. cruzi* 1:1000 diluídos em tampão TBS-T por cerca de 16 a 20 h à 100
 30 rpm. Posteriormente a membrana passou por 3 a 6 lavagens com tampão TBS-T por 5 a 10 min, sob leve agitação constante. Em seguida, a membrana foi incubada com o anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado com peroxidase, na diluição de 1:20.000. A membrana foi deixada sob agitação a 100 a 200 rpm por 1 a 3 horas. Em seguida, a

membrana passou por mais 3 a 6 lavagens com tampão TBS-T por 5 a 10 min, sob as mesmas condições de agitação. A revelação foi realizada com substrato diaminobenzidina (DAB) em solução contendo 50 mM Tris (pH 7,6); 10 mg DAB; 10 μ L H₂O₂ (20%) na ausência de luz por aproximadamente 10 min. Após a revelação a membrana foi tirada com auxílio de uma pinça, parada a reação com água, seca sob papel toalha e a imagem foi digitalizada (Figura 3, parte B).

Ensaio de ELISA indireto usando a GDPase recombinante de *L. major* como antígeno

Nos experimentos de ELISA para análise da reatividade da proteína recombinante purificada foram utilizados 8 soros de cães previamente diagnosticados, sendo 3 soros positivos de cães infectados com *Leishmania* sp., 3 soros de animais negativos e 2 soros positivos de cães infectados com *T. cruzi*.

Para adsorção da rGDPase, placas de micro-diluição foram expostas a uma solução contendo 1,5, 3, 4,5 e 30 μ g da proteína GDPase recombinante purificada em tampão 0,1 M carbonato/bicarbonato pH 9,6 e incubadas *overnight* a 4 °C. Os sítios inespecíficos foram bloqueados incubando-se a placa com solução de bloqueio contendo 5% de soro fetal bovino (SFB) em PBS por uma hora a 37 °C. Posteriormente, a placa foi lavada 3 a 6 vezes com PBS-T (PBS com 0,05% Tween-20) para retirar o excesso de solução de bloqueio. Após as lavagens, o soro foi adicionado na diluição de 1:80. A reação contendo o soro foi incubada por 1 a 3 horas por 37 °C. A lavagem prosseguiu da mesma maneira como descrito anteriormente. A reação com o anticorpo anti-IgG de cão conjugado a peroxidase na diluição 1:5000, foi incubada por 1 a 3 horas por 37 °C. A placa foi novamente lavada conforme descrito acima. A reação da proteína GDPase recombinante com anticorpos foi evidenciada através de revelação com 5 a 10 mg/mL de o-fenilenodiamina (OPD) e 0,01% H₂O₂, em tampão citrato-fosfato (0,1 M ácido cítrico, 0,2 M fosfato de sódio pH 5,0), por 15 a 30 min. A reação foi interrompida pela adição de 32 a 40 μ L de uma solução 2,5 M H₂SO₄. A intensidade da reação, relacionada à intensidade da coloração, foi determinada pela leitura de absorbância a 490nm (Labsystems iEMS). A análise dos dados foi feita no programa Excell (Figura 5) onde se pode ver o reconhecimento positivo com maior leitura de absorbância dos soros sabidamente positivos para leishmaniose em relação aos soros negativos e de cães com doença de Chagas.

A GDPase recombinante foi posteriormente usada em ensaio com maior número de amostras (Figura 6) mostrando um bom reconhecimento específico na maioria dos soros

positivos e negativos utilizados no teste. Análises estatísticas destes dados mostraram Especificidade de 90,3%, Precisão de 72,1% e Sensibilidade de 44,1 %.

Estes resultados em conjunto mostram de forma clara a potencialidade de uso de proteínas da família E-NTPDase de *Leishmania* como antígenos para o diagnóstico da

5 Leishmnaiose.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

<110> UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA

UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO

FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA DO ESTADO DE MINAS GERAIS

<120> “E-NTPDases RECOMBINANTES, USO NA PRODUÇÃO DE KIT DE DIAGNÓSTICO PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS NAS LEISHMANIOSES CAUSADAS POR ESPÉCIES DO GÊNERO *Leishmania*”

<130> 01 - 2010

<160> 12

<210> 1

<211> 2160

<212> DNA

<213> *Leishmania major*

<400> 1

```

atggctagca tgactggtgg acagcaaattg ggtcgcggat ccatgccaat gactgacggc 60
cgcgctccag gcggaagtt acggaggagc atgagtcgcg tcgttcttgc cttcttcgcc 120
gctgtgcttt tcgtcgtctt tctcacggcg tacgaagtcg gcgttggcac tgccaaccgc 180
cttcagtctc ggacatgca gctcacgcag aacgccgtga agaagagtga ggaaaatcta 240
gtgaactgcc gcgaggtcaa cacggattta agaagtgggtg gtgacgtcaa tgtcgcacgg 300
gcgatggcgg agatgaggcg gcagagagag gagctgatga acatcgtcgc gctggagcgt 360
gagcgtgtag tgtcggcgcg tagtctgctg caggtttgcg aggatgagct agcgagcgac 420
ctcagcgtac tcttcggtgt cgctgaccat aacttcactg cgcgcctccg gtcgttggag 480
aaaaagcgga aacacttgga gggtttgcac tcgatgctca acacggaccc gtttgggtgca 540
gtgcagctgc gcagcagcag cgaaatccgc gcgctgcagg cggctctctt tcacgagatg 600
cgcgccagca agaagaaagc agaaaacggg gtggcgagcg gcgcggcggtg cgcggaagtct 660
tcgggtcaagt actccgtcgt gttcgatatt ggcagcactg gaaatcgtgt tcatgtctac 720
aagtacagag tggcacctgc cacgcgtacc gctgccgcgg ccggcagtga gctcagcgac 780
atcgacctcg tcgaggagtt atttgagcta aatcacaaag cccttagcga gctcgagaat 840
tcgggtgcagg atgcgccgga ggctttatgg gagctcttcg tgaaagccaa ggactttgta 900
ccggcgggagc tgcacgcatg cacggcggcc gagttcaagg ctaccgcggg gctgcgcatg 960

```

ctggggatgg agaaggccaa cgaaattctt gccggcattc gcgcgcgcta ccgcaacgag 1020
 acgttctggt tgcgcgccaa cgcatacatt cgcattcttg atgcctgcga ggagggccca 1080
 atggcgtggc tgacagtaaa ctacttactg ggggcattct ccaggggtgc aacggcaacc 1140
 gactcgacgg tggcgcgtcat cgatctcggc ggcggtccca cgcaaatact cttcgaaccc 1200
 ggcgagagca ctttccacgg gatgcgcacc gatttccgct acgcggcaac cttgggcagc 1260
 cggtcagtga gagcctacca gcacagctac gaaggctacg gcctgcacgc ggccaccaag 1320
 aagctgcttt accacataca aggcaagagc caagagaagc cgggcggtgg caccgccacc 1380
 aacacagcaa tgacgaccac cagcagagca ccggcaaacc gcggtgacga ggtcctgcct 1440
 gtttggaagg ctctgagaaa cctgggtgca gacgggagaa gcgagcgagg cgacatcgct 1500
 accaagagag cgccgccgat gccaccgcca gacgcggagg cgatggaggc gttcccgctg 1560
 ttcgctgtcg gctacgaaga cccactaggg gtgaagaacg tcaagagaaa caatgccgag 1620
 gagccggtta tgccccgaa cttccaggct tgcgcgaaacc ttttccgcga tcggttgctg 1680
 aagccagtgg ggctgacatg tgaggcagtc aactgcggca tcgctggtgt catgcagcca 1740
 ccgctgacca acttcaccgg tgaaatctac gcgttttctg tcatctttga tctgctgggt 1800
 ttggcgaaca gctccctggg gccagcgggg gctgctgtgt cgaaggaaaa gtttgagggtg 1860
 aagctgccgg acctagcgaa gatcgcgagg ggtcactgcg ccgccttctc cctcaccctg 1920
 atcgccgagg cgaccgcca ggggggcctc ggtagcctaa agccggagta cgagtgtatg 1980
 tattactcct acgtgtacgc gcttctccgc tacggttacg aggtgccaga ggaccgcgtg 2040
 ctgcacgtgg cgaagaagat ccgcggctac gagaccgcct ggtccctcgg cgcctcactc 2100
 ctctctctta ccgtcgacaa gcttgcgggc gcactcgagc accaccacca ccaccactga 2160

<210> 2

<211> 719

<212> PRT

<213> *Leishmania major*

<400> 2

Met	Ala	Ser	Met	Thr	Gly	Gly	Gln	Gln	Met	Gly	Arg	Gly	Ser	Met	Pro
1				5					10					15	

Met	Thr	Asp	Gly	Arg	Val	Pro	Gly	Gly	Lys	Leu	Arg	Arg	Ser	Met	Ser
			20					25					30		

Arg	Val	Val	Leu	Ala	Phe	Phe	Ala	Ala	Val	Leu	Phe	Val	Val	Phe	Leu
		35					40				45				
Thr	Ala	Tyr	Glu	Val	Gly	Val	Gly	Thr	Ala	Asn	Pro	Leu	Gln	Ser	Arg

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

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

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

<210> 3
 <211> 2166
 <212> DNA
 <213> *Leishmania braziliensis*

<400> 3
 atggctagca tgactggtgg acagcaaattg ggtcgcggat ccatggcagt ggttggcggc 60
 ttcacagctg gcaagccgct gagaggcatg ggccgcacatg tccttggcct cttcgccgtc 120
 atgcttggttg cctttgtcat cactgcgtac caagtcggcg ttagcaccgc caaccacagt 180
 cagtcccgtc acatacagct cgcgcagaac gccgtggcga agagcgaggc aatgctgact 240
 ggctgccgcg aggccaatgc gaatttaaag aacagcggta gtgtcaaggg tgcacaagcg 300
 atcgcggaga tggcacggca gaaagcggag ctgacgagta ctgtcgact ggagcgtgag 360
 cgtgtcgtgt cggcgcgtag tttgttgtag gcgtgcgagg atgggctggc aagcgaacac 420
 cgtacactct tcggcaccgc ccaccgcaac accacggcgc acctcctgtg gttgaaacag 480
 agacgggctc atctgaagtc cgagcacgag aagctcaccg agggccact cgggtgtagtc 540

gagccgcgcc gcagcagcgg catccgcgca ctgcaggcgg ctctccttca agaaatacac 600
 cctagcactg gtttagctgg aaacggtgtg gagaaccgca aggcgtgcgt ggacgctgtg 660
 gccaagtact ccgttgtggt cgatatgtggc agcactggca atcgtgtcca tgtctacaag 720
 tacaggggtga accctctcac gcagatctct gcctcagcgc ctgatgagct cagcaaaatc 780
 gacctcgtcg gggagctggt cgagctgaat tacaaagccc ttagtgagct caacaatccg 840
 gtgcaggatg ccccggaagc cttgtgggag cttttcgcga aggccaagaa cttcgtgccg 900
 gcagagttgc acgcatgcac accaatcgag ttcaaggcta ctgcgggact gcgcatgctg 960
 gggttggaga aagccacaga gattcttgct gagattcgtg ctgcctaccg caaggaaacg 1020
 ttctggctgc gcggcagcgc gccagtccgc atcttggtatt cccacgagga gggcctgatg 1080
 gcgtggctga cgggtgaactt tttactaggg acatttgcca ggaacactga ggcaacagcc 1140
 tcgacggcgg ctatcattga catcgggtggc ggctccacgc agatcgtctt cgagcctggt 1200
 gaagacacgt tctacaaaat gcgcgcagac gtgcgtggct cggcaacggt gggcgggccg 1260
 tcggtgaaag tgtatcagca cagctacgaa ggctacggtc tgcacgcagc caccaaggcg 1320
 ctgctttttc atattcaagg caagcgccaa gagaggccgg gcggcggtc cgctacccgc 1380
 gccacgacga cggcacggac cagcggcgat gacagcacc catccgtcgg gaatggtgtc 1440
 cgcaacgtga gcgccaatga cagcaaagac gaagaagacg aaaacatgat caccgacaca 1500
 gcgccgccga aaactctacc gtggctacag ttggatacgg aggcggtgga cgcattcccc 1560
 tgcttcgctg tcggctacga ggaccagctc ggggtgcgga aactaagag aaacgacgcc 1620
 ggagaacccg ctaggcacc tgacttccag gcttgcgcga accttttccg cgaccggttg 1680
 ctgaaaccgg tggggctgac atgcgaggag gtcaactgcg gcgtcgcggg tgtcttccag 1740
 ccgccgctgg ccaacttcac cggtgacatc tacgcgtttt catttcttt tgatcttctg 1800
 gccatggcga acaactctct agcgccagtg ggggctgcag tatcgaacga taagttcgag 1860
 gtgaagctgc ctgacctggc aaagattggg gagcgtcact gcgcggcctt ctccctcacc 1920
 cggattgccg aggcgaccgc aaagggcggc ctcggtagtc tgaagccaga gtacgagtgc 1980
 atgtattact cctacacgta cgcgtgctc cgatatgggt acgaggtgcc ggagggccgc 2040
 gtgctgcacg tggcaaagaa gatcagcggc tacgagaccg cctggccctt gggtgcttca 2100
 ctcatctctg tcacctaaagt cgacaagctt gcggccgcac tcgagcacca ccaccaccac 2160
 cactga 2166

<210> 4

<211> 720

<212> PRT

<213> *Leishmania braziliensis*

<400> 4

```

Met Ala Ser Met Thr Gly Gly Gln Gln Met Gly Arg Gly Ser Met Ala
 1           5           10           15

Val Val Gly Gly Phe Thr Ala Gly Lys Pro Leu Arg Gly Met Gly Arg
      20           25           30

Ile Val Leu Gly Leu Phe Ala Val Met Leu Val Ala Phe Val Ile Thr
      35           40           45

Ala Tyr Gln Val Gly Val Ser Thr Ala Asn Pro Arg Gln Ser Arg His
      50           55           60

Ile Gln Leu Ala Gln Asn Ala Val Ala Lys Ser Glu Ala Met Leu Thr
      65           70           75           80

Gly Cys Arg Glu Ala Asn Ala Asn Leu Lys Asn Ser Gly Ser Val Lys
      85           90           95

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

Ser Thr Val Ala Leu Glu Arg Glu Arg Val Val Ser Ala Arg Ser Leu
      115          120          125

Leu Gln Ala Cys Glu Asp Gly Leu Ala Ser Glu His Arg Thr Leu Phe
      130          135          140

Gly Thr Ala His Arg Asn Thr Thr Ala His Leu Leu Trp Leu Lys Gln
      145          150          155          160

Arg Arg Ala His Leu Lys Ser Glu His Glu Lys Leu Thr Glu Gly Pro
      165          170          175

Leu Gly Val Val Glu Pro Arg Arg Ser Ser Gly Ile Arg Ala Leu Gln
      180          185          190

Ala Ala Leu Leu Gln Glu Ile His Pro Ser Thr Gly Leu Ala Gly Asn
      195          200          205

Gly Val Glu Asn Arg Lys Ala Cys Val Asp Ala Val Ala Lys Tyr Ser
      210          215          220

Val Val Phe Asp Ile Gly Ser Thr Gly Asn Arg Val His Val Tyr Lys
      225          230          235          240

Tyr Arg Val Asn Pro Leu Thr Gln Ile Ser Ala Ser Ala Pro Asp Glu
      245          250          255

Leu Ser Lys Ile Asp Leu Val Gly Glu Leu Phe Glu Leu Asn Tyr Lys
      260          265          270

Ala Leu Ser Glu Leu Asn Asn Pro Val Gln Asp Ala Pro Glu Ala Leu
      275          280          285

Trp Glu Leu Phe Ala Lys Ala Lys Asn Phe Val Pro Ala Glu Leu His
      290          295          300

```

Ala Cys Thr Pro Ile Glu Phe Lys Ala Thr Ala Gly Leu Arg Met Leu
 305 310 315 320
 Gly Leu Glu Lys Ala Thr Glu Ile Leu Ala Glu Ile Arg Ala Arg Tyr
 325 330 335
 Arg Lys Glu Thr Phe Trp Leu Arg Gly Ser Ala Pro Val Arg Ile Leu
 340 345 350
 Asp Ser His Glu Glu Gly Leu Met Ala Trp Leu Thr Val Asn Phe Leu
 355 360 365
 Leu Gly Thr Phe Ala Arg Asn Thr Glu Ala Thr Ala Ser Thr Ala Ala
 370 375 380
 Ile Ile Asp Ile Gly Gly Gly Ser Thr Gln Ile Val Phe Glu Pro Gly
 385 390 395 400
 Glu Asp Thr Phe Tyr Lys Met Arg Ala Asp Val Arg Gly Ser Ala Thr
 405 410 415
 Leu Gly Gly Arg Ser Val Lys Val Tyr Gln His Ser Tyr Glu Gly Thr
 420 425 430
 Gly Leu His Ala Ala Thr Lys Ala Leu Leu Phe His Ile Gln Gly Lys
 435 440 445
 Arg Gln Glu Arg Pro Gly Gly Gly Ser Ala Thr Arg Ala Thr Thr Thr
 450 455 460
 Ala Arg Thr Ser Gly Asp Asp Ser Thr Pro Ser Val Gly Asn Gly Val
 465 470 475 480
 Arg Asn Val Ser Ala Asn Asp Ser Lys Asp Glu Glu Asp Glu Asn Met
 485 490 495
 Ile Thr Asp Thr Ala Pro Pro Lys Thr Leu Pro Trp Leu Gln Leu Asp
 500 505 510
 Thr Glu Ala Val Asp Ala Phe Pro Cys Phe Ala Val Gly Tyr Glu Asp
 515 520 525
 Gln Leu Gly Val Arg Asn Thr Lys Arg Asn Asp Ala Gly Glu Pro Ala
 530 535 540
 Arg His Pro Asp Phe Gln Ala Cys Ala Asn Leu Phe Arg Asp Arg Leu
 545 550 555 560
 Leu Ile Pro Val Gly Leu Thr Cys Glu Glu Val Asn Cys Gly Val Ala
 565 570 575
 Gly Val Phe Gln Pro Pro Leu Ala Asn Phe Thr Gly Asp Ile Tyr Ala
 580 585 590
 Phe Ser Phe Leu Phe Asp Leu Leu Ala Met Ala Asn Asn Ser Leu Ala
 595 600 605
 Pro Val Gly Ala Ala Val Ser Asn Asp Lys Phe Glu Val Lys Leu Pro
 610 615 620

Asp Leu Ala Lys Ile Gly Glu Arg His Cys Ala Ala Phe Ser Leu Thr
 625 630 635 640
 Arg Ile Ala Glu Ala Thr Ala Lys Gly Gly Leu Gly Ser Leu Lys Pro
 645 650 655
 Glu Tyr Glu Cys Met Tyr Tyr Ser Tyr Thr Tyr Ala Leu Leu Arg Tyr
 660 665 670
 Gly Tyr Glu Val Pro Glu Gly Arg Val Leu His Val Ala Lys Lys Ile
 675 680 685
 Ser Gly Tyr Glu Thr Ala Trp Pro Leu Gly Ala Ser Leu Ile Ser Val
 690 695 700
 Thr Val Asp Lys Leu Ala Ala Ala Leu Glu His His His His His His
 705 710 715 720

<210> 5

<211> 2124

<212> DNA

<213> *Leishmania infantum*

<400> 5

atggctagca tgactggtgg acagcaaattg ggtcgcggtat ccatgagtcg cgtctttggtt 60
 gcctttcttcg ctgctgtgct tttcgtcgtc tttctcaccg cgtacgaagt cggcggttggc 120
 accgccaacc cgcttcagtc gcggcacatg cagctcacgc agaacgcagt gaagaagagt 180
 gaggcaaattc tagtgaactg ccgcgaggtc aacgcggatt taaagagcgg tgggtggcgtc 240
 aatgccgcac aggcgattgc ggagatgagg cggcagagag aggagctgat gaacatcgtc 300
 gcgctggagc gtgagcgtgt agtgtcggcg cgtagtctgc tgcaggtttg cgaggatgag 360
 ctagccagcg acctcagtgt actcttcggt gtgcgcgacc acaacttcac tgcgcgcac 420
 cggtcggttg aggaaaagcg gaaacatttg gagggtttgc actcgatgct caacacgacc 480
 ccgtttggtg cagtggagct gcgccgcagc agcgaaatcc gtgcactgca ggcggctctc 540
 tttcacgaga tgcgcgccag caagaagaaa gcagaaaacg gtgtggcgaa cggcgaagcg 600
 tgcacgaaga cttcggacaa gtactccgtc gtgttcgaca tcggcagcac tggaaatcgt 660
 gtccatgtct acaagtacag agtggcccct gccacgcata ccgctgctgc ggccggcagt 720
 gagctcagcg acatcgacct cgtcgaggag ttgtttgagc taaatcaca agcccttagc 780
 gagctcgata atccggtgca ggatgcgccg gaagccttat gggagctctt catgaaagcc 840
 aagtactttg taccggcgga gctgcacgca tgcacggcag tcgagttcaa ggctaccgcg 900
 ggactgcgca tgctggggat ggagaaggcc accgaaattc ttgacgggat tcgcgcgcgc 960
 taccgcaacg aaacgttctg gttgcgcggc aatgcaccgg ttcgcattct ggatgcctgc 1020

gaggagggcc caatggcgtg gctcacggta aactacttac tgggggtatt ctccaggggt 1080
 acaaaggcaa ccgcctcgac ggtggccgtc atcgacctcg gaggcggctc cacgcagatc 1140
 gtcttcgaac ccggcgagag cgcgttccac gggatgcgca ccgatttgcg ctactcggca 1200
 accttgggca gccggtctgt gagtgcctac caacacagct acgaaggcta cggcctgcac 1260
 gcggccacca aggagctgct ttccacatt caaggcaaga gccaagagaa gccgggagggc 1320
 ggtaccacca ccagcacagc aacgacgacc accacgacaa caccggcaaa cagcggcgac 1380
 aaggctctgt ctgtttggaa cgttctggga aacctgggtg cagacgggag cagcgagcga 1440
 gacgacatcg tcaccaagag agcgccgccg atgccaccac cgccactgcc ggacgcggag 1500
 gcggtggagg cgttcccctg cttcgtctgc ggctacgaag acccgctagg ggtgaagaac 1560
 atcaagaaaa acaataccgg ggagccggct atgccccga acttccaggc ttgcgcgaac 1620
 cttttccgag atcggtctgt aaagccagtg gggctgacat gtgaggcggc caactgcggc 1680
 atcgctggtg tcatgcagcc accgctgacc aacttcaccg gggaaatcta cgtgttttcg 1740
 ttcatctttg atctgctggc cttggcgaac agctccctgg tgccagcggg ggctgccgtg 1800
 tcaagggaaa agtttgaggt gaagctgccg gacctagcga cgattgcgga gggtcactgc 1860
 gccgccttct cctcaccgg tatcgccgag gcgaccgcca aggagggcct cggtagcctg 1920
 aagccggagt acgagtgcac gtattactcc tacgtgtacg cgcttctccg ctacgggtac 1980
 gaggtgccag aggatcgctg gctgcacgtg gtgaagaaga tccgcggcta cgagaccgcc 2040
 tggtcctcg gcgctcact cctctctctt acctaatcg acaagcttgc ggccgcactc 2100
 gagcaccacc accaccacca ctga 2124

<210> 6

<211> 706

<212> PRT

<213> *Leishmania infantum*

<400> 6

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

Asn	Ala	Ala	Gln	Ala	Ile	Ala	Glu	Met	Arg	Arg	Gln	Arg	Glu	Glu	Leu	85	90	95
Met	Asn	Ile	Val	Ala	Leu	Glu	Arg	Glu	Arg	Val	Val	Ser	Ala	Arg	Ser	100	105	110
Leu	Leu	Gln	Val	Cys	Glu	Asp	Glu	Leu	Ala	Ser	Asp	Leu	Ser	Val	Leu	115	120	125
Phe	Gly	Val	Ala	Asp	His	Asp	Phe	Thr	Ala	Arg	Ile	Arg	Ser	Leu	Glu	130	135	140
Glu	Lys	Arg	Lys	His	Leu	Glu	Gly	Leu	His	Ser	Met	Leu	Asn	Thr	Thr	145	150	155
Pro	Phe	Gly	Ala	Val	Glu	Leu	Arg	Arg	Ser	Ser	Glu	Ile	Arg	Ala	Leu	165	170	175
Gln	Ala	Ala	Leu	Phe	His	Glu	Met	Arg	Ala	Ser	Lys	Lys	Lys	Ala	Glu	180	185	190
Asn	Gly	Val	Ala	Asn	Gly	Glu	Ala	Cys	Thr	Lys	Thr	Ser	Asp	Lys	Tyr	195	200	205
Ser	Val	Val	Phe	Asp	Ile	Gly	Ser	Thr	Gly	Asn	Arg	Val	His	Val	Tyr	210	215	220
Lys	Tyr	Arg	Val	Ala	Pro	Ala	Thr	His	Thr	Ala	Ala	Ala	Ala	Gly	Ser	225	230	235
Glu	Leu	Ser	Asp	Ile	Asp	Leu	Val	Glu	Glu	Leu	Phe	Glu	Leu	Asn	His	245	250	255
Lys	Ala	Leu	Ser	Glu	Leu	Asp	Asn	Pro	Val	Gln	Asp	Ala	Pro	Glu	Ala	260	265	270
Leu	Trp	Glu	Leu	Phe	Met	Lys	Ala	Lys	Tyr	Phe	Val	Pro	Ala	Glu	Leu	275	280	285
His	Ala	Cys	Thr	Ala	Val	Glu	Phe	Lys	Ala	Thr	Ala	Gly	Leu	Arg	Met	290	295	300
Leu	Gly	Met	Glu	Lys	Ala	Thr	Glu	Ile	Leu	Asp	Gly	Ile	Arg	Ala	Arg	305	310	315
Tyr	Arg	Asn	Glu	Thr	Phe	Trp	Leu	Arg	Gly	Asn	Ala	Pro	Val	Arg	Ile	325	330	335
Leu	Asp	Ala	Cys	Glu	Glu	Gly	Pro	Met	Ala	Trp	Leu	Thr	Val	Asn	Tyr	340	345	350
Leu	Leu	Gly	Val	Phe	Ser	Arg	Gly	Thr	Lys	Ala	Thr	Ala	Ser	Thr	Val	355	360	365
Ala	Val	Ile	Asp	Leu	Gly	Gly	Gly	Ser	Thr	Gln	Ile	Val	Phe	Glu	Pro	370	375	380
Gly	Glu	Ser	Ala	Phe	His	Gly	Met	Arg	Thr	Asp	Leu	Arg	Tyr	Ser	Ala	385	390	395

Thr Leu Gly Ser Arg Ser Val Ser Ala Tyr Gln His Ser Tyr Glu Gly
 405 410 415
 Tyr Gly Leu His Ala Ala Thr Lys Glu Leu Leu Phe His Ile Gln Gly
 420 425 430
 Lys Ser Gln Glu Lys Pro Gly Gly Gly Thr Thr Thr Ser Thr Ala Thr
 435 440 445
 Thr Thr Thr Thr Thr Thr Pro Ala Asn Ser Gly Asp Lys Ala Leu Ser
 450 455 460
 Val Trp Asn Val Leu Gly Asn Leu Gly Ala Asp Gly Ser Ser Glu Arg
 465 470 475 480
 Asp Asp Ile Val Thr Lys Arg Ala Pro Pro Met Pro Pro Pro Pro Leu
 485 490 495
 Pro Asp Ala Glu Ala Val Glu Ala Phe Pro Cys Phe Ala Val Gly Tyr
 500 505 510
 Glu Asp Pro Leu Gly Val Lys Asn Ile Lys Lys Asn Asn Thr Gly Glu
 515 520 525
 Pro Ala Met Pro Pro Asn Phe Gln Ala Cys Ala Asn Leu Phe Arg Asp
 530 535 540
 Arg Leu Leu Lys Pro Val Gly Leu Thr Cys Glu Ala Ala Asn Cys Gly
 545 550 555 560
 Ile Ala Gly Val Met Gln Pro Pro Leu Thr Asn Phe Thr Gly Glu Ile
 565 570 575
 Tyr Val Phe Ser Phe Ile Phe Asp Leu Leu Ala Leu Ala Asp Ser Ser
 580 585 590
 Leu Val Pro Ala Gly Ala Ala Val Ser Arg Glu Lys Phe Glu Val Lys
 595 600 605
 Leu Pro Asp Leu Ala Thr Ile Ala Glu Gly His Cys Ala Ala Phe Ser
 610 615 620
 Leu Thr Arg Ile Arg Glu Ala Thr Ala Lys Glu Gly Leu Gly Ser Leu
 625 630 635 640
 Lys Pro Glu Tyr Glu Cyr Met Tyr Tyr Ser Tyr Val Tyr Ala Leu Leu
 645 650 655
 Arg Tyr Gly Tyr Glu Val Pro Glu Asp Arg Val Leu His Val Val Lys
 660 665 670
 Lys Ile Arg Gly Tyr Glu Thr Ala Trp Ser Leu Gly Ala Ser Leu Leu
 675 680 685
 Ser Leu Thr Val Asp Lys Leu Ala Ala Ala Leu Glu His His His His
 690 695 700
 His His
 705

<210> 7
 <211> 1362
 <212> DNA
 <213> *Leishmania major*

<400> 7
atggctagca tgactggtgg acagcaaatg ggtcgcggat ccatgcgtcc gtactcctcg 60
 gtgcggcgca tgactcaaca atcgaagcgc ctgcgcgtcg ccagcaccct tgtgcttagc 120
 gcgcttggtta tcttcggttt cctcgtctac catcaaagcc ctttgttctc cccatgtgac 180
 tcggcgtagc cgaatgtata cgacgtcgtc atcgacgtg gcagcactgg ctcacgtgtg 240
 catgtatttc agtacgagcg cggccgcacc ggtttcgtac ttctgagaga gcgcttcaaa 300
 cgagcagagc cggatctgtc ctctttcgcc accgacctgg acggcgccaa ggcgtcgctt 360
 gaggggcttc tgcgctttgc ggatacgggtg gttccgcaga gctaccagaa gtgcacctct 420
 gtcactctca aggccaccgc cggccttagg ctctacctg agtccgccca gcaggcgctg 480
 ctggacgttg cccagcacac actcaacgca tctccatttc agtctcgcgg cgctccatc 540
 atctctggcg ctcaagaggg cgtctacggg tggctgacgg tgaactacct gctggacaga 600
 ctcgacacgg acgttgccac cgtcgcgacc atcgatatgg gaggcgcctc gacacaggtc 660
 gtcttcgaga cgacgccac gtctggagaa tggctgccct tcaactatgc ctaccagctg 720
 cgcacaccaa agcgcacgat cgccatgtat cagcacagct acctcggcct tgggatgaac 780
 gaggcgaaga agaggcttat gacgttggtc gccgaagcga acgggacgtt gtctttcccg 840
 tgcttcccgga gaggggtatac gaagcgcgta aacgggtgtg aacttcgaaa cagtgcgccc 900
 acggacttta acgcgtgtgc aggactatct cgccaacatg tcataacaac gtcgacctgc 960
 aagtttgatg cctgtggcgc ccgcggcgtg ccgcagccgc tgtttcgtc aaggcggcat 1020
 cccatctacg ccttctccta cttttacaac cgctctacg acttcctcaa ggaggggagc 1080
 caggtctacg tctcctcgta caaggaggtc gggcaagagg tgtgccaccg ggaatctgcg 1140
 aggcggacca ccgcccctga ggaaactgcc tgcattggaac tggcgtacat gtacagcttc 1200
 ttgacgtacg ggctagggct tagtgacgcc acggttctca cggtgcccaa ccgcatcgag 1260
 ggtatggcgg tttcctggtc tcttggctcc tctctctcct tcctgctcaa gatggaatga 1320
aagcttgagg ccgcactcga gcaccaccac caccaccact ga 1362

<210> 8
 <211> 452
 <212> PRT
 <213> *Leishmania major*

<400> 8

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

[illegible]

$\langle 210 \rangle$ 9
 $\langle 211 \rangle$ 1368
 $\langle 212 \rangle$ DNA
 $\langle 213 \rangle$ *Leishmania braziliensis*

<400> 9

atggcctagca	tgactggttg	acagcaaattg	ggtcgcggat	ccatgcgcacc	gtactcctca	60
gtgcggcgga	tgactcaaca	gtcgaaccga	ctgcgcgtca	tggcggtact	cgtgcttagc	120
gcattcgttc	tcttcggctt	tgtcatttac	tctgaaagcc	cttggttctc	tccttgcaac	180
tcgccatact	cgaatgtcta	cgacatcgta	atcgacgccg	gcagtaccgg	ctcgcgcgta	240
catgtgtttc	agtacgagcg	cagtagcact	ggtgtcatac	ttctgagaga	gcgcttcaaa	300
cggatagagc	cgggactgtc	ttcatttgcc	accgatcagg	aaggcgctaa	gcagtcgctt	360
gcggggctcc	tgcgcttcgc	tgaaaaggca	gttcacgaa	gctaccagag	gtgcacttcc	420
gtaacctca	agggcacccg	cggcctccgg	cttctccctg	aagccgatca	gcaggtgttg	480
ctggatgctg	cccagcagac	cctcaaggca	tttcggttc	agtctcgtag	cgcctccatc	540
gtctctggtg	ctcaagagg	cgtctatgg	tggctcacgg	tgaactacct	ccttaacagg	600
ctcgacaagg	agggcgccac	cgtcgcgacc	atagacatgg	ggggtgccct	gacgcaggtg	660
gtgttcgaga	cgaagtac	gtctggagag	tggctgcctt	tcaactacgc	ccaccagctg	720
cgcacgcaa	agcgcaccat	cgccatgtat	cagcacagct	acctaggcct	tgggctcaac	780

gagggcaaaga agacactgat gacgttggtc gccaaagtga acgggacatc ccctttttca 840
 tgcttcccga gaaggcatac ggaacacctg aatggtgtgg aacttcgaaa cggcgattcc 900
 acggacttcg acgtttgtgt aaatcttttt cgagagcacg tcataacgaa gccgatctgc 960
 aggtttgatg cctgtggcgc tcgcggcgtg ccgcagccgc cgctgccgtc gaagcagcat 1020
 ccaattttacg cctttttctta cttctacgac cgtctctacc acttcgcgag tgaaggattc 1080
 ccggtatacg tctcgtcgta caaggagctc gggcgggagg tgtgtcagcg agagtctgca 1140
 gaccacacca ccacccccaa ggaaacgacc tgcattggagc tggcatactt gtacagcttc 1200
 ttgacgcacg ggctagggct tagcgacgac agaaccctcg aggttcctaa ccgcatagag 1260
 ggtatcgcgg tctcctggtc tctaggtgc tctctgtcct tcgtgctcaa gatggaatga 1320
 gtcgacaagc ttgcggccgc actcgagcac caccaccacc accactga 1368

<210> 10

<211> 454

<212> PRT

<213> *Leishmania braziliensis*

<400> 10

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

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

<210> 11

<211> 1368

<212> DNA

<213> *Leishmania infantum*

<400> 11

atggctagca tgactggtgg acagcaaagtg ggtcgcgat ccatgcgacc gtactcctcg 60
 gtgcggcgca tgactcaaca gtcgaagcga ctgcgcatcg ccggcaccct tgtgcttagc 120
 gcgcttggtta tcttcggttt cctcgtttac tatcaaagcc ctctgctctc cccatgtgac 180
 tcggcgtagc cgaatgtata cgacgtcgtc atcgacgcg gcagcactgg ctcacgtgtg 240
 catgtgttcc aatacgagcg cggccgcacc ggtctcgtag ttctgagaga gcgcttcaaa 300
 cgagtagagc cgggtctatc ctcttttgcc accgaccag acggcgccaa ggagtcgctt 360
 gcggggctgc tgcgcttcgc ggataagggtg gtcccgcaaa gctaccagaa gtgcaccttc 420
 gtcacctca aggccaccgc cggccttcgg ctctacctg agtccgtcca gcagggtgctg 480
 ctggacgctg cccagcacac actcaacgca tctccatttc agtctcgtag tgctccatc 540
 atctctggcg ctcaagaggg cgtctacggg tggctgacgg tgaactacct gctgaacagg 600
 ctcgacacgg acgttgccac cgtcgcgacc atcgacatgg gaggtgcctc gacacaggtc 660
 gtcttcgaga cgacgccac gtctggagaa tggctgccct tcaactatgc ccaccagctg 720
 cgcacaccaa agcgcacgat caccatgtat cagcacagct atctcgccct tgggatgaac 780
 gaggcgaaga agaagcttat gatgtcattc gccgaagcga acgggacgtc gtctttcccg 840
 tgcttccga gagggtagtc gaagcgctg aacgatgtgg aacttcgaaa cagtgcgccc 900
 acggactttg acgctgtgtg aggactatct cgcgaaatg tcataacaaa gacgacctgc 960
 aagtttgatg cctgtggcgc ccgcgcgctg ccgacgcgc tgtttccgtc aaggcggcat 1020
 ctcatctacg ccttctccta cttttacgac cgactctacc acttcagcaa ggaggggagc 1080
 ccggtctacg tctcgctgta caaggaggtc gggcaagagg tgtgccaccg ggaatctgcg 1140
 aggcggacca ccgcccctga ggaaacggcc tgcattggagc tggcgtagat gtacagcttc 1200
 ttgacatacg gcctagggct tagtgacgcc acggctctca cggtgcccaa ccgcatcgag 1260
 ggtatggcgg tttcctggtc tcttggtccc tctctctcct tctgctcaa gatggaatga 1320
 gtcgacaagc ttgcggccgc actcgagcac caccaccacc accactga 1368

<210> 12

<211> 454

<212> PRT

<213> *Leishmania infantum*

<400> 12

Met Ala Ser Met Thr Gly Gly Gln Gln Met Gly Arg Gly Ser Met Arg
 1 5 10 15

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

340							345					350				
Tyr	His	Phe	Ser	Lys	Glu	Gly	Ser	Pro	Val	Tyr	Val	Ser	Ser	Tyr	Lys	
355							360					365				
Glu	Val	Gly	Gln	Glu	Val	Cys	His	Arg	Glu	Ser	Ala	Arg	Arg	Thr	Thr	
370							375					380				
Ala	Pro	Glu	Glu	Thr	Ala	Cys	Met	Glu	Leu	Arg	Tyr	Met	Tyr	Ser	Phe	
385							390					395				400
Leu	Thr	Tyr	Gly	Leu	Gly	Leu	Ser	Asp	Ala	Thr	Ala	Leu	Thr	Val	Pro	
405							410					415				
Asn	Arg	Ile	Glu	Gly	Met	Ala	Val	Ser	Trp	Ser	Leu	Gly	Ser	Ser	Leu	
420							425					430				
Ser	Phe	Leu	Leu	Lys	Met	Glu	Val	Asp	Lys	Leu	Ala	Ala	Ala	Leu	Glu	
435							440					445				
His	His	His	His	His	His											
450																

REIVINDICAÇÕES

1. **“E-NTPDases RECOMBINANTES DO GÊNERO *Leishmania*”**
caracterizadas por serem homólogas as proteínas naturais, obtidas a partir da sequência nucleotídica dos genes codificantes destas proteínas, incluindo as SEQ. ID. Nº 1, SEQ.
5 ID. Nº 2, SEQ. ID. Nº 3, SEQ. ID. Nº 4, SEQ. ID. Nº 5, SEQ. ID. Nº 6, SEQ. ID. Nº 7, SEQ. ID. Nº 8, SEQ. ID. Nº 9, SEQ. ID. Nº 10, SEQ. ID. Nº 11 e SEQ. ID. Nº 12, e quaisquer variação distinta das referidas sequências, desde que destinadas a conservarem as suas propriedades antigênicas;
2. **“E-NTPDase RECOMBINANTE DA *Leishmania major*”**, de acordo com a
10 reivindicação 1, caracterizada pelas SEQ. ID. Nº 1 e SEQ. ID. Nº 2, derivada do gene codificante da GDPase de *Leishmania major*, apresentando uma identidade de aminoácidos de 93,74% em relação à proteína GDPase natural de *Leishmania major*, sendo que à porção aminoterminal são adicionados 42 pares de bases e à porção carboxiterminal são removidos os três últimos nucleotídeos (códon de parada) e
15 adicionados 45 pares de base, possuindo 719 aminoácidos;
3. **“E-NTPDase RECOMBINANTE DA *Leishmania braziliensis*”**, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelas SEQ. ID. Nº 3 e SEQ. ID. Nº 4, derivada do gene codificante da GDPase de *Leishmania braziliensis*, apresentando uma identidade de aminoácidos de 65,75% em relação à proteína GDPase recombinante da *Leishmania*
20 *major*, sendo que à porção aminoterminal são adicionados 42 pares de bases e à porção carboxiterminal são removidos os três últimos nucleotídeos (códon de parada) e adicionados 45 pares de base, possuindo 720 aminoácidos;
4. **“E-NTPDase RECOMBINANTE DA *Leishmania infantum*”**, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelas SEQ. ID. Nº 5 e SEQ. ID. Nº 6, derivada do
25 gene codificante da GDPase de *Leishmania infantum*, apresentando uma identidade de aminoácidos de 84,49% em relação à proteína GDPase recombinante da *Leishmania major*, sendo que à porção aminoterminal são adicionados 42 pares de bases e à porção carboxiterminal são removidos os três últimos nucleotídeos (códon de parada) e adicionados 45 pares de base, possuindo 706 aminoácidos;
- 30 5. **“NTPDase RECOMBINANTE DA *Leishmania major*”**, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelas SEQ. ID. Nº 7 e SEQ. ID. Nº 8, derivada do gene codificante da NTPDase de *Leishmania major*, apresentando uma identidade de

aminoácidos de 23,09% em relação à proteína GDPase natural de *Leishmania major*, sendo que à porção aminoterminal foram adicionados 42 pares de bases e à porção carboxiterminal são removidos os três últimos nucleotídeos (códon de parada) e adicionados 39 pares de base, possuindo 452 aminoácidos;

5 **6. “NTPDase RECOMBINANTE DA *Leishmania braziliensis*”**, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelas SEQ. ID. N° 9 e SEQ. ID. N° 10, derivada do gene codificante da NTPDase de *Leishmania braziliensis*, apresentando uma identidade de aminoácidos de 23,09% em relação à proteína GDPase natural de *Leishmania major*,
10 carboxiterminal são removidos os três últimos nucleotídeos (códon de parada) e adicionados 45 pares de base, possuindo 454 aminoácidos;

7. “NTPDase RECOMBINANTE DA *Leishmania infantum*”, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelas SEQ. ID. N° 11 e SEQ. ID. N° 12, derivada do gene codificante da NTPDase de *Leishmania infantum*, apresentando uma identidade de
15 aminoácidos de 22,13% em relação à proteína GDPase natural de *Leishmania major*, sendo que à porção aminoterminal foram adicionados 42 pares de bases e à porção carboxiterminal são removidos os três últimos nucleotídeos (códon de parada) e adicionados 45 pares de base, possuindo 454 aminoácidos;

8. “USO DAS E-NTPDases RECOMBINANTES DEFINIDAS NAS
20 **REIVINDICAÇÕES 1 a 7”**, caracterizado por ser utilizado na produção de kit de diagnóstico para detecção de anticorpos nas leishmanioses causadas por espécies do gênero *Leishmania*, em compostos vacinais, em desenvolvimento de anticorpos monoclonais, em marcadores de prognóstico, no desenho racional de drogas inibidoras das E-NTPDases que possam ser usadas na quimioterapia das leishmanioses.

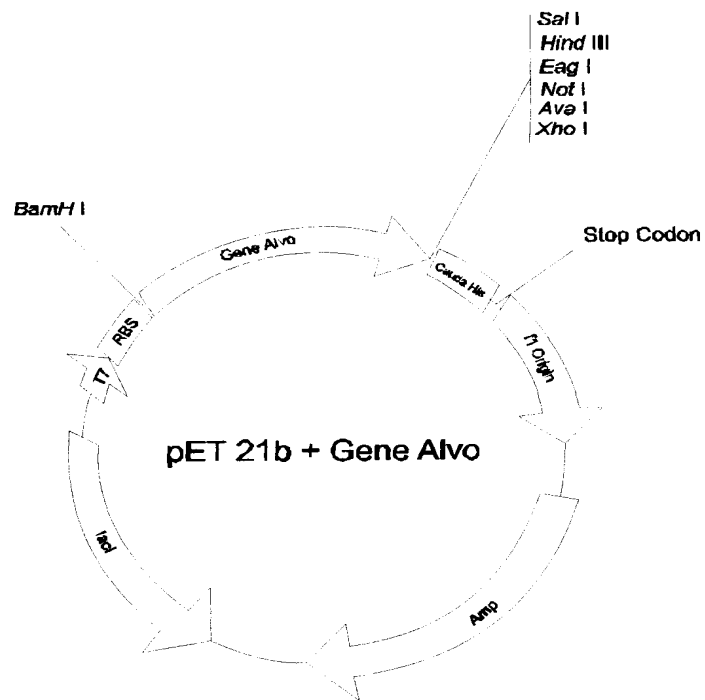


Fig. 1.1

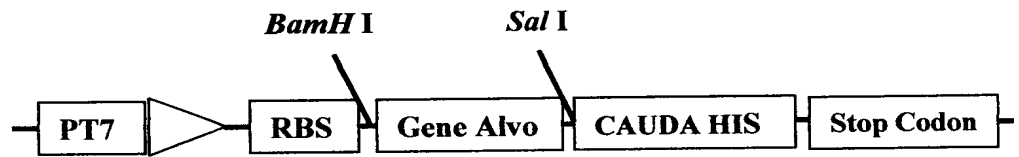


Fig. 1.2

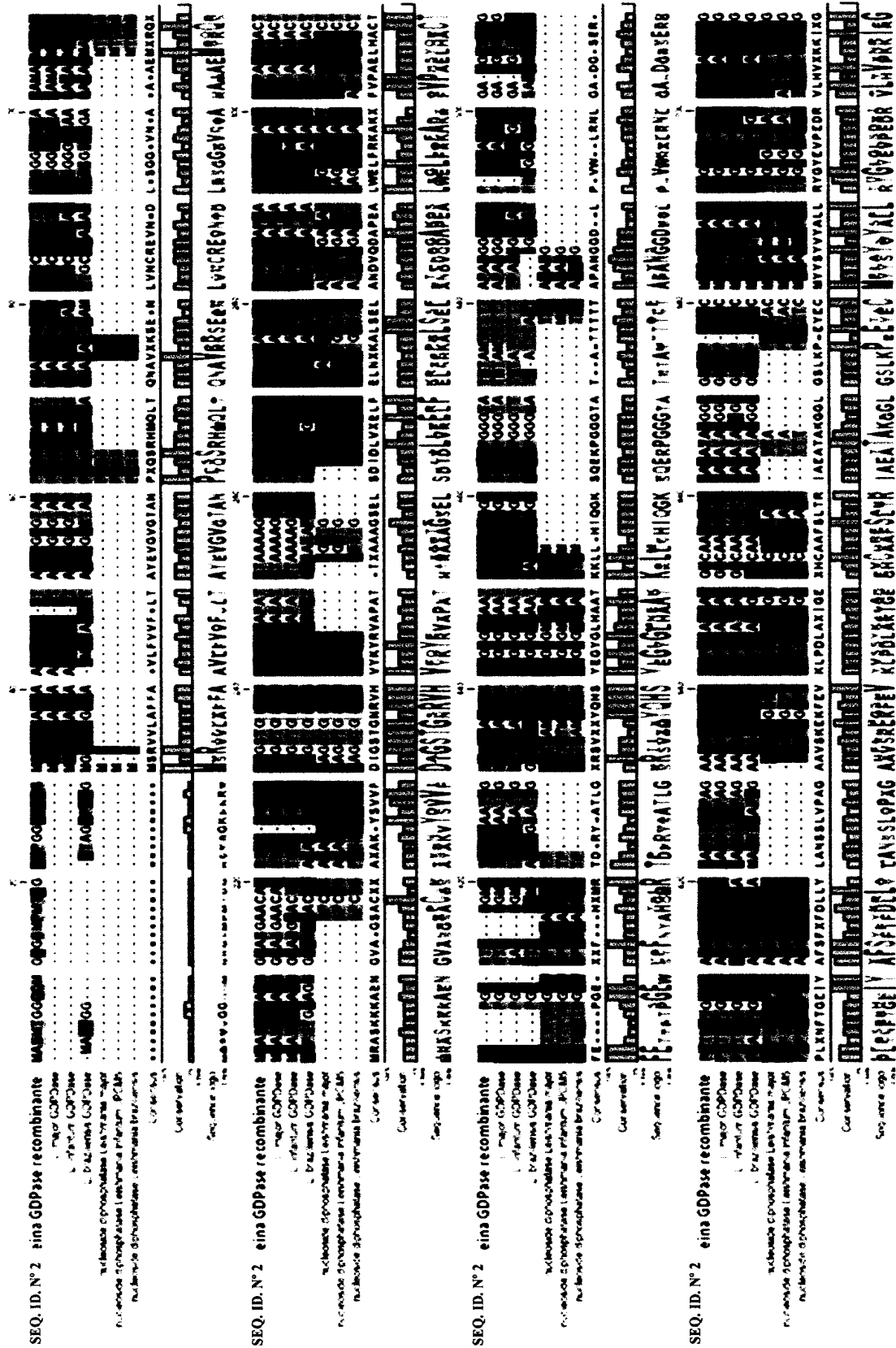


Fig 2.1

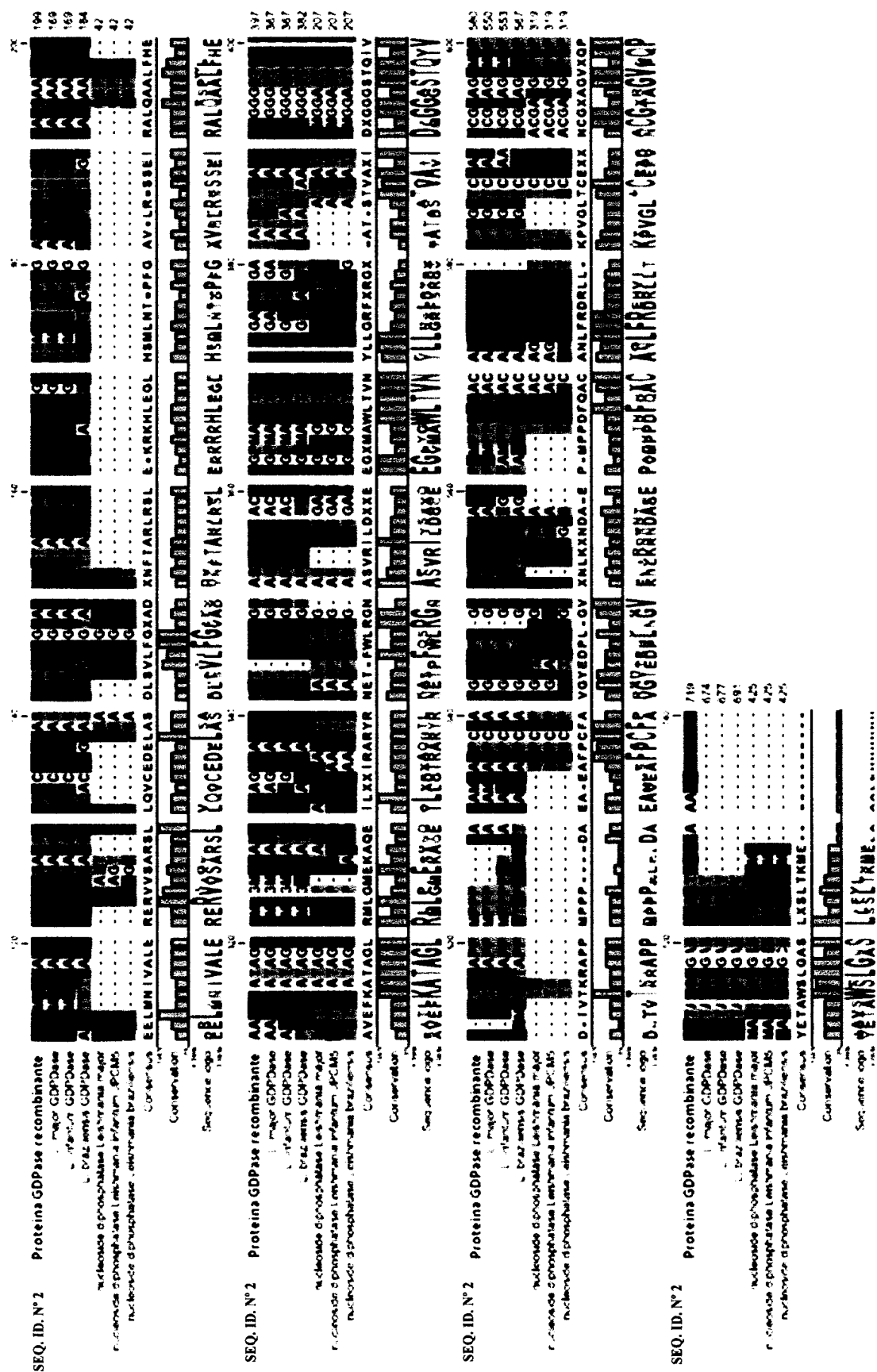


Fig. 2.2

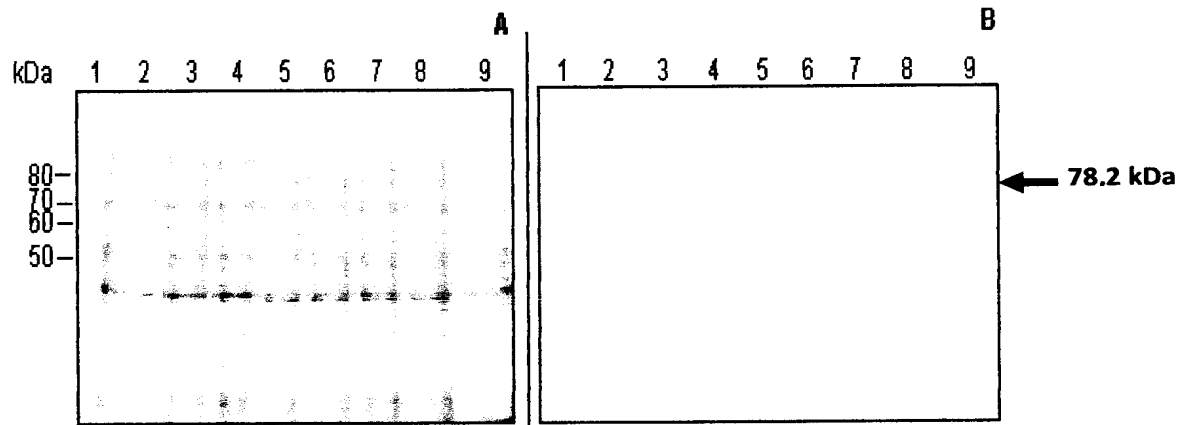


Fig. 3

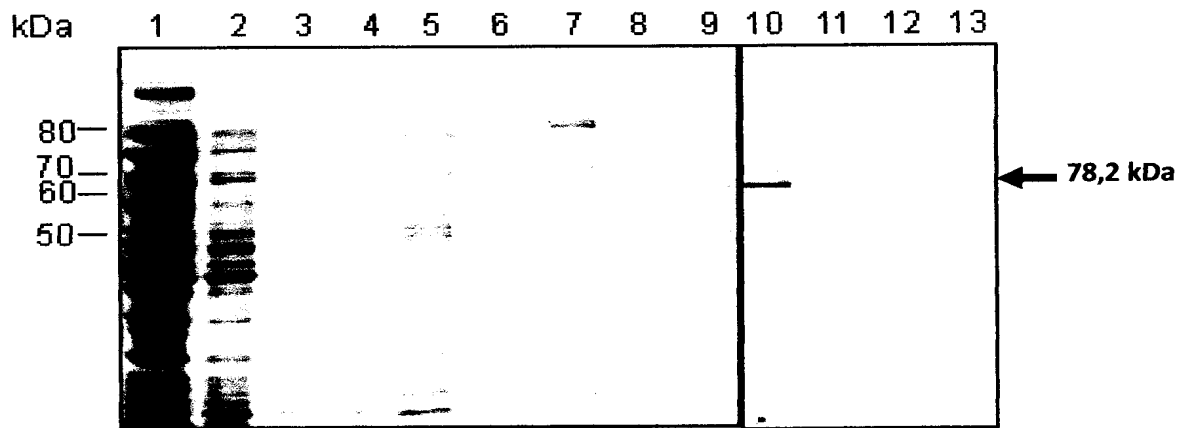


Fig. 4

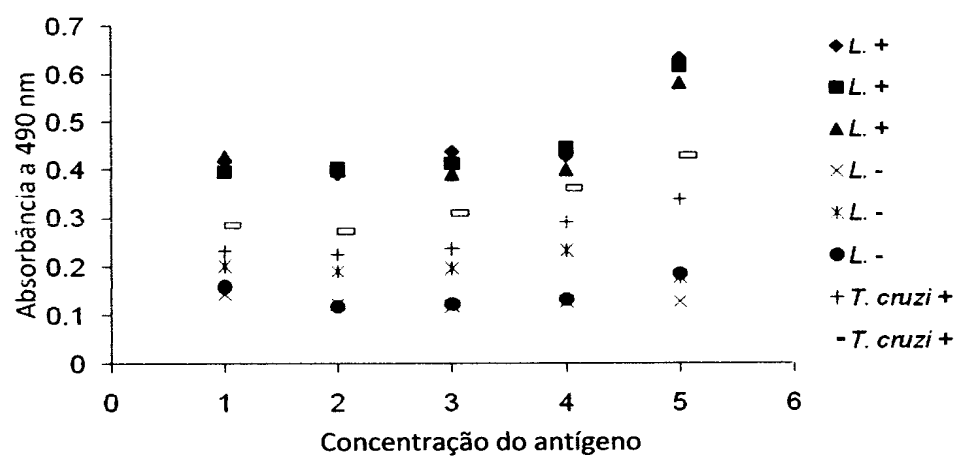


Fig. 5

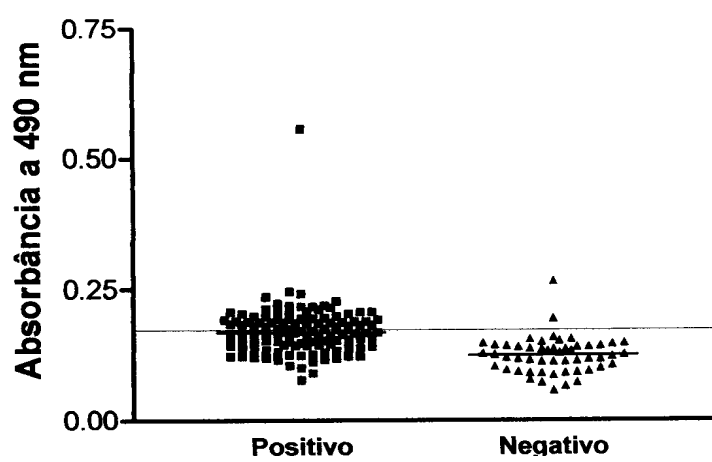


Fig. 6

RESUMO

“E-NTPDases RECOMBINANTES, USO NA PRODUÇÃO DE KIT DE DIAGNÓSTICO PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS NAS LEISHMANIOSES CAUSADAS POR ESPÉCIES DO GÊNERO *Leishmania*”

5 Esta invenção refere-se às proteínas da família E-NTPDases recombinantes que podem ser usadas como antígenos em kits de diagnósticos das leishmanioses animais e humanas. As proteínas da família das E-NTPDases recombinantes obtidas poderão ser empregadas na produção de Kits de diagnósticos para a detecção de anticorpos nas leishmanioses, usando testes do tipo imunológicos. Estes testes podem ser aplicados em
10 detecção de indivíduos soropositivos, em programas de controle de leishmanioses ou no diagnóstico laboratorial das leishmanioses. Estas proteínas também poderão ser usadas em ensaios prognósticos e vacinais, no desenho racional de quimioterápicos para o tratamento das leishmanioses e no desenvolvimento de anticorpos monoclonais a serem usados no diagnóstico, prognóstico ou terapia das leishmanioses.