



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

(21) PI 0913972-9 A2



* B R P I 0 9 1 3 9 7 2 A 2 *

(22) Data de Depósito: 02/07/2009

(43) Data da Publicação: 30/09/2014
(RPI 2282)

(51) Int.Cl.:

C07K 14/44

C07K 16/20

A61K 39/008

A61P 33/02

G01N 33/68

(54) Título: PROTEÍNAS DE FUSÃO E SEUS USOS
NO DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO DE
LEISHMANIOSE

(57) Resumo:

(30) Prioridade Unionista: 03/07/2008 US 61/078.255

(73) Titular(es): Infectious Disease Research Institute

(72) Inventor(es): Ajay Bhatia, Steven G.Reed

(74) Procurador(es): Ricardo Pinho

(86) Pedido Internacional: PCT US2009049559 de
02/07/2009

(87) Publicação Internacional: WO 2010/003085de
07/01/2010

ESQUEMA DA CONSTRUÇÃO DA FUSÃO DE K28

6X-His	3- K26	2- K39	K9 FL-ORF
--------	--------	--------	-----------

“PROTEÍNAS DE FUSÃO E SEUS USOS NO DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO DE LEISHMANIOSE”

REFERÊNCIA CRUZADA RELACIONADA AO PEDIDO

5 Este pedido reivindica o benefício sobre USC §119(e) do Pedido de Patente Provisório dos EUA No. 61/078.255 depositada em 3 de Julho de 2008, onde este pedido provisório é aqui incorporada por referência em sua totalidade.

DECLARAÇÃO SOBRE LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

10 A Listagem de Sequências associada com este pedido é provida em formato de texto no lugar de uma cópia em papel e é por este meio incorporada por referência dentro da especificação. O nome do arquivo de texto contendo a Listagem de Sequência é 480239_406PC_SEQUENCE_LISTING.txt. O arquivo de texto tem 53KB, foi criado em 2 de Julho de 2009, e está sendo eletronicamente submetido através da EFS-Web, concomitantemente com o preenchimento da especificação.

ANTECEDENTE

15 Campo Técnico

A presente invenção geralmente se relaciona com proteínas de fusão feitas de uma construção de gene quimérico sintético compreendendo sequências de K26, K39 e K9 e seu uso no diagnóstico e tratamento de leishmaniose.

Descrição da Técnica Relacionada

20 Organismos *Leishmania* são parasitas protozoários intracelulares de macrófagos que causam uma ampla variedade de doenças clínicas em humanos e animais domésticos, principalmente cachorros. Em algumas infecções, o parasita pode ficar dormente por vários anos. Em outros casos, o hospedeiro por desenvolver uma de uma variedade de formas de leishmaniose. Por exemplo, a doença pode ser assintomática ou por se manifestar como
25 leishmaniose visceral sub clínica, o que é caracterizada por sintomas leves de mal estar, diarreia e hepatomegalia intermitente. Pacientes com doenças sub clínicas ou assintomáticas geralmente têm baixos títulos de anticorpos, fazendo ser difícil detectar a doença com técnicas padrão. Alternativamente, leishmaniose pode ser manifestada como uma doença cutânea, o que é um problema médico severo, mas é geralmente auto limitada, ou como
30 uma doença mucosa altamente destrutiva, a qual não é auto limitada. Finalmente, e mais seriamente, a doença pode ser manifestada como uma infecção visceral aguda envolvendo o baço, fígado e linfonodos, os quais, se deixados sem tratamento, são geralmente uma doença fatal. Sintomas de leishmaniose visceral aguda incluem hepatoesplenomegalia, febre, leucopenia, anemia e hipergamaglobulinemia.

35 Três principais variantes clínicas desta doença são conhecidas: cutânea, mucocutânea e visceral. Leishmaniose cutânea por manifestar-se como uma única ulceração da pele no local da picada de flebotomíneos aparecendo logo após infecções ou meses mais

tarde como lesões disseminadas. A síndrome mucocutânea se desenvolve como a forma cutânea, mas progride meses ou anos mais tarde para lesões na boca, nariz ou faringe. Os maiores efeitos de longo prazo das doenças cutâneas e mucocutâneas são cicatrizes. Leishmanioses viscerais têm um período de incubação de 3 a 6 meses e envolvem o sistema reticuloendotelial.

Manifestações clínicas da leishmaniose visceral incluem alargamento do fígado e do baço, febre, anemia e perda de peso. Na ausência de tratamento, a doença visceral sintomática muitas vezes termina em morte. Em anos recentes, a coexistência de HIV e espécies de *Leishmania* causando doenças viscerais tem resultado em vários milhares de casos de indivíduos duplamente infectados (Berman, J.D., (1997) Clin. Infect. Dis. 24:684). A Organização Mundial de Saúde recentemente estimou em 2000 que a leishmaniose afeta pessoas em 88 países, com 350 milhões em risco de contrair a doença e cerca de dois milhões de novos casos a cada ano. O impacto devastador desta doença é exemplificado pela recente epidemia de leishmanioses viscerais no Sudão, o que reivindicou um estimado de 100.000 vidas (Seaman, J., et al. (1996) Int. J. Epidemiol 25:862). Essa doença é frequentemente uma ameaça a operações militares, como demonstrado pelo surto de leishmanioses viscerotrópicas durante a Guerra do Golfo (Magill, J., et al. (1993) N Engl J Med 328:1383).

Leishmaniose é um problema sério em grande parte do mundo, incluindo Brasil, China, África Oriental, Índia e áreas do Oriente Médio. A doença é também epidêmica na região Mediterrânea, incluindo o sul da França, Itália, Grécia, Espanha, Portugal e Norte da África. O número de casos de leishmaniose tem crescido dramaticamente nos últimos 20 anos e milhões de casos dessa doença existem hoje ao redor do mundo. Cerca de 2 milhões de novos casos são diagnosticados a cada ano, 25% dos quais são leishmanioses viscerais. No entanto, não há vacinas ou tratamentos efetivos disponíveis atualmente.

Leishmaniose é causada por várias espécies de *Leishmania*. Esses organismos unicelulares da ordem Kinetoplastida estão relacionados a tripanossomos, os organismos causadores da Doença do Sono na África e Doença de Chagas na América do Sul. Parasitas *Leishmania* existem comumente em duas formas distintas, as promastigotas móveis do inseto vetor e as amastigotas sésseis presentes nos hospedeiros mamíferos. Promastigotas são transmitidas aos humanos pelas picadas de insetos Flebotomíneos infectados, os quais são encontrados pelas regiões intertropicais e temperadas do mundo. No momento da distribuição ao hospedeiro mamífero, promastigotas infectam os macrófagos do sistema reticuloendotelial e se transformam em amastigotas.

Diagnósticos precisos de leishmanioses são frequentemente difíceis de se conseguir. Existem 20 espécies de *Leishmania* que infectam humanos, incluindo *L. donovani*, *L. chagasi*, *L. infantum*, *L. major*, *L. amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. panamensis*, *L. mexicana*, *L. trópica* e *L. guyanensis*, e não há sinais distintos ou sintomas que indicam inequivocada-

mente a presença de infecção *Leishmania*. Métodos de detecção parasita têm sido usados, mas tais métodos não são nem sensíveis, nem clinicamente práticos. Atualmente testes de pele tipicamente usam parasitas inteiros ou lisados. Tais testes são geralmente insensíveis, irreprodutíveis e inclinados a reações cruzadas com uma variedade de outras doenças. Além disso, a preparação empregada em tais testes é muitas vezes instáveis.

Assim, existe a necessidade de métodos de detecção da infecção de *Leishmania* melhorados. Por exemplo, existe uma necessidade de métodos de detecção da infecção de *Leishmania* mais sensíveis e específicos na técnica, e para identificar as infecções de *Leishmania* assintomáticas que são parecidas com o progresso de infecções viscerais agudas. A invenção presente cumpre essas necessidades e prevê ainda outras vantagens relacionadas.

BREVE RESUMO

A invenção presente se relaciona em geral a composições compreendendo pelo menos dois antígenos heterólogos de *Leishmania*, polipeptídeos de fusão compreendendo antígenos e polinucleotídeos codificando os antígenos e fusões, em que os antígenos de *Leishmania* são selecionados a partir de K39, K26 e/ou K9. A invenção presente também relata métodos de utilização de polipeptídeos e polinucleotídeos da invenção no diagnóstico, tratamento e prevenção da leishmaniose. Os antígenos da invenção, quando empregados em combinação e/ou como polipeptídeos ou polinucleotídeos de fusão como aqui descrito, oferecem vantagens melhores e inesperadas, e são particularmente úteis no contexto de diagnóstico de leishmaniose e desenvolvimento de vacina.

Além disso, de acordo com uma modalidade, a invenção presente provê um polipeptídeo de fusão isolado compreendendo dois ou mais antígenos de *Leishmania* selecionados de um grupo consistido de K26, K39 e K9, ou porções imunogênicas ou suas variantes. Em modalidades relacionadas, um polipeptídeo de fusão isolado compreende pelo menos três dos antígenos de *Leishmania* acima, em que pelo menos um dos antígenos é isolado de *Leishmania donovani*.

Em modalidades particulares, polipeptídeos de fusão da invenção compreende uma primeira porção imunogênica compreendendo pelo menos resíduos 142-267 de K26 (SEQ ID NO: 5); uma segunda porção imunogênica compreendendo pelo menos resíduos 2110-2343 de K39 (SEQ ID NO: 6); e uma terceira porção imunogênica compreendendo pelo menos resíduos 1-399 de K9 (SEQ ID NO: 7). Em mais modalidades particulares, um polipeptídeo de fusão da presente invenção compreende uma sequência aminoácida como revelado em resíduos aminoácidos 10-262 da SEQ IN NO: 8. Em certas modalidades, o polipeptídeo de fusão compreende uma sequência aminoácida N-terminal de MHHHHHTS (SEQ IN NO: 21). Em certas outras modalidades, o polipeptídeo de fusão compreende uma sequência aminoácida como revelado na SEQ ID NO: 8.

Em várias modalidades, a invenção presente provê polinucleotídeos isolados codificando um polipeptídeo de fusão da presente invenção.

A presente invenção também provê um anticorpo isolado, ou fragmento de ligação do antígeno que liga especificamente o polipeptídeo de fusão como descritos aqui.

5 Em outra modalidade, a invenção contempla a composição farmacêutica compreendendo um polipeptídeo de fusão da presente invenção, ou um anticorpo isolado ou um fragmento de ligação de antígeno reconhecendo um polipeptídeo de fusão da presente invenção, ou um polinucleotídeo codificando um polipeptídeo de fusão da presente invenção, em combinação com um veículo fisiologicamente aceitável.

10 Em modalidade relacionada, a presente invenção contempla composições de vacina compreendendo um polipeptídeo de fusão da presente invenção, ou um anticorpo isolado ou um fragmento de ligação do antígeno reconhecendo um polipeptídeo de fusão da presente invenção, ou um polinucleotídeo codificando um polipeptídeo de fusão da presente invenção, em combinação com um aumentador da resposta imune não específica.

15 Em modalidades particulares, a presente invenção provê métodos para detectar infecções de *Leishmania* assintomáticas ou sub clínicas em uma amostra biológica selecionada a partir um grupo consistindo de soros, sangue e saliva, compreendendo: contatar uma amostra biológica com um polipeptídeo de fusão compreendendo dois ou mais antígenos de *Leishmania* selecionados a partir de um grupo consistindo de K26, K39 e K9, ou suas
20 porções imunogênicas; e detectando na amostra biológica a presença de anticorpos que ligam ao polipeptídeo de fusão, assim detectando infecções de *Leishmania* ativas ou sub clínicas assintomáticas na amostra biológica. Em mais modalidades particulares, um método para detectar infecções de *Leishmania* sub clínicas ou assintomáticas em uma amostra biológica emprega um polipeptídeo de fusão compreendendo: uma primeira porção imunogênica compreendendo pelo menos resíduos 147-267 de K26 (SEQ ID NO: 5); uma segunda
25 porção imunogênica compreendendo pelo menos resíduos 2110-2343 de K39 (SEQ ID NO:6); e uma terceira porção imunogênica compreendendo pelo menos resíduos 1-399 de K9 (SEQ ID NO: 7). Em modalidades ainda mais particulares, o polipeptídeo de fusão compreende uma sequência de aminoácidos como revelado nos resíduos 10-262 de SEQ ID
30 NO: 8. Em modalidades ainda mais particulares relacionadas, o polipeptídeo de fusão compreende ainda uma sequência de aminoácidos N-terminais de MHHHHHHTS (SEQ ID NO: 21).

Em modalidades relacionadas, métodos para detecção de infecções de *Leishmania* sub clínicas ou assintomáticas em uma amostra biológica utiliza um polipeptídeo de fusão
35 ligado a um suporte sólido, em que o suporte sólido com compreender, por exemplo, nitrocelulose, látex ou material plástico. Em certas modalidades, os métodos ainda compreendem i) remoção de amostras não ligadas a partir de um suporte sólido; ii) adição de reagente de

detecção ao suporte sólido; e iii) determinação do nível de detecção do reagente ligado ao suporte sólido, relativo ao valor de corte pré determinado, assim detectando infecções de *Leishmania* sub clínicas ou assintomáticas na amostra biológica.

Em várias modalidades, a invenção presente provê métodos de identificar um paciente afligido com leishmaniose visceral sub clínica ou assintomática que é suscetível a desenvolver leishmaniose visceral aguda, compreendendo: contatar uma amostra biológica obtida de um paciente afligido com leishmaniose visceral sub clínica ou assintomática com um primeiro polipeptídeo que é um polipeptídeo de fusão compreendendo dois ou mais antígenos de *Leishmania* selecionados do grupo consistindo de K26, K39 e K9, ou suas porções imunogênicas, a amostra biológica sendo selecionada a partir do grupo consistindo de soro, sangue e saliva; e independentemente contatar a amostra biológica com um segundo polipeptídeo compreendendo uma sequência de aminoácidos como revelado nas SEQ ID Nos: 6, 10 ou 11; e detectar na amostra a presença de anticorpos que são vinculados a pelo menos um do primeiro e segundo polipeptídeo, assim identificando um paciente afligido com leishmaniose visceral sub clínica ou assintomática que é suscetível a desenvolver leishmaniose visceral aguda.

Em modalidades particulares, os métodos de identificação de pacientes afligidos com leishmaniose visceral sub clínica ou assintomática que são suscetíveis a desenvolver leishmaniose visceral aguda empregam um polipeptídeo compreendendo uma primeira porção imunogênica incluindo pelo menos resíduos 142-267 (SEQ ID NO: 5); uma segunda porção imunogênica compreendendo pelo menos resíduos 2110-2343 de K39 (SEQ ID NO: 6) e uma terceira porção compreendendo pelo menos resíduos de 1-399 de K9 (SEQ ID NO:7). Em modalidades ainda mais particulares, o polipeptídeo de fusão compreende uma sequência de aminoácido como revelado em resíduos aminoácidos 10-262 SEQ ID NO: 8. Em modalidades ainda mais particulares relacionadas, o polipeptídeo de fusão compreende ainda uma sequência de aminoácido N-terminal de MHHHHHHTS (SEQ ID NO: 21).

Em modalidades relacionadas, métodos de identificação de pacientes afligidos com leishmaniose visceral sub clínica ou assintomática que é suscetível a desenvolver leishmaniose visceral aguda empregam um polipeptídeo de fusão ligado a um suporte sólido, em que o suporte sólido pode compreender, por exemplo, nitrocelulose, látex ou material plástico. Em certas modalidades relacionadas, os métodos ainda compreendem i) remoção de amostra não ligada a partir de cada suporte sólido; ii) adição de um reagente de detecção a cada suporte sólido; e iii) comparação do nível de detecção do reagente ligado a cada suporte sólido, relativo ao valor de corte pré determinado, assim identificando um paciente afligido com leishmaniose sub clínica ou assintomática que é suscetível a desenvolver leishmaniose visceral aguda.

Em modalidades particulares, o reagente de detecção compreende um grupo repór-

ter conjugado a um agente ligado. Em modalidades relacionadas o agente de ligação é selecionado a partir do grupo consistindo de antiimunoglobulina, Proteína G, Proteína A e lectinas. Em modalidades mais relacionadas, o grupo repórter é selecionado a partir do grupo consistindo de radioisótopos, grupos fluorescentes, grupos luminescentes, enzimas, ouro coloidal, biotina e partículas de corante.

Em várias outras modalidades, a invenção presente provê kits de diagnóstico para detecção de leishmaniose visceral sub clínica ou assintomática em uma amostra biológica. Em modalidades particulares, kits para detecção de leishmaniose visceral sub clínica ou assintomática em uma amostra biológica, em que a amostra é selecionada a partir de um grupo consistindo de soro, sangue e saliva compreende um polipeptídeo de fusão compreendendo dois ou mais antígenos *Leishmania* selecionados a partir do grupo consistindo de K26, K39 e K9, ou suas porções imunogênicas; e um reagente de detecção.

Em certas modalidades, um kit de diagnóstico para identificação de um paciente afetado com leishmaniose visceral sub clínica ou assintomática que é suscetível a desenvolver leishmaniose visceral aguda, contém um primeiro polipeptídeo que é um polipeptídeo de fusão compreendendo dois ou mais antígenos de *Leishmania* selecionados de um grupo consistindo de K26, K39 e K9, ou suas porções imunogênicas; e um segundo polipeptídeo compreendendo uma sequência de aminoácido como revelado em SEQ ID NOs: 10 ou 11; e um reagente de detecção.

Kits da presente invenção podem ainda compreender, um reagente de detecção compreendendo um grupo repórter conjugado a um agente de ligação e/ou um agente de ligação selecionado a partir de um grupo consistindo de antiimunoglobina, Proteína G, Proteína A e lectinas e/ou um grupo repórter é selecionado a partir de um grupo consistindo de radioisótopos, grupos fluorescentes, grupos luminescentes, enzimas, ouro coloidal, biotina e partículas de corante.

BREVE DESCRIÇÃO DAS VÁRIAS VISÕES DOS DESENHOS

Figura 1 mostra um diagrama esquemático da construção do gene de fusão K28, o qual compreende um motivo de 9 aminoácidos N-terminal incluindo um marcador 6X HIS (isto é, 6 resíduos histidina), polinucleotídeos 142-267 de uma sequência de gene LdK26 (SEQ ID NO: 1), polinucleotídeos 2110-2343 de uma sequência do gene LdK39 (SEQ ID NO: 2), e polinucleotídeos 1-399 de uma sequência do gene LdK9 (SEQ ID NO: 3).

A figura 2 mostra uma comparação da habilidade dos antígenos K28, K39 e K9 em detectar LV no soro de pacientes humanos da Venezuela.

A figura 3 mostra a comparação da habilidade de antígenos K9, K26, K28, e K39 em detectar LV no soro de caninos da Venezuela.

BREVE DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA DE IDENTIFICADORES

SEQ ID NO: 1 representa polinucleotídeos 142-267 de uma *L. donovani* de sequên-

cia do gene K26, a qual codifica uma porção imunogênica de antígeno K26.

SEQ ID NO: 2 representa polinucleotídeos 2110-2343 de uma *L. donovani* de sequência do gene K39, a qual codifica uma porção imunogênica de antígeno K39.

5 SEQ ID NO: 3 representa polinucleotídeos 1-399 de uma *L. donovani* de sequência do gene K9, a a qual codifica uma porção imunogênica e um antígeno KO de comprimento total.

10 SEQ ID NO: 4 representa a sequência polinucleotídica de uma gene sintético, K28, o qual compreende um motivo de 9 aminoácidos N-terminal compreendendo um marcador 6X HIS, a sequência polinucleotídica de SEQ ID NO: 1, fusionada à sequência polinucleotídica de SEQ ID NO: 2, a qual é fusionada a sequência polinucleotídica SEQ ID NO3. O ORF começa no nucleotídeo 4.

SEQ ID NO: 5 representa a sequência de aminoácido de um polipeptídeo imunogênico codificado por polinucleotídeos 142-267 de um antígeno K26 de *L. donovani*.

15 SEQ ID NO: 6 representa uma sequência de aminoácido de um polipeptídeo imunogênico codificado por polinucleotídeos 2110-2343 de um antígeno K39 de *L. donovani*.

SEQ ID NO: 7 representa a sequência de aminoácido do polipeptídeo imunogênico de comprimento total codificado pelos polinucleotídeos 1-399 de um antígeno K9 de *L. donovani*.

20 SEQ ID NO: 8 representa a sequência de aminoácido do polipeptídeo K28 codificada pelo SEQ ID NO: 4.

SEQ ID NO: 9 representa a sequência de aminoácido de uma única unidade de repetição de um antígeno K39 de *L. donovani*.

SEQ ID NO: 10 representa a sequência de aminoácido de uma única unidade de repetição de um antígeno K39 de *L. donovani*.

25 SEQ ID NO: 11 representa a sequência de aminoácido de uma única unidade de repetição de um antígeno K39 de *L. donovani*.

SEQ ID NO: 12 representa uma sequência polinucleotídica codificando uma única unidade de repetição de um antígeno K26 de *L. donovani* de acordo com a SEQ ID NO: 9.

30 SEQ ID NO: 13 representa uma sequência polinucleotídica de uma única unidade de repetição de um antígeno K26 de *L. donovani* de acordo com a SEQ ID NO: 9.

SEQ ID NO: 14 representa uma sequência polinucleotídica codificando a única unidade de repetição de um antígeno K39 de *L. donovani* de acordo com a SEQ ID NO: 10.

SEQ ID NO: 15 representa uma sequência polinucleotídica codificando a única unidade de repetição de um antígeno K39 de *L. donovani* de acordo com a SEQ ID NO: 11.

35 SEQ ID NO: 16 representa a sequência polinucleotídica de comprimento total de um gene K26 de *L. donovani*.

SEQ ID NO: 17 representa a sequência polinucleotídica de comprimento total de um

gene K39 de *L. donovani*.

SEQ ID NO: 18 representa a sequência polinucleotídica de comprimento total de um gene K9 de *L. donovani*.

SEQ ID NO: 19 representa a sequência de aminoácido codificada por SEQ ID NO: 16.

SEQ ID NO: 20 representa a sequência de aminoácido codificada por SEQ ID NO: 17.

SEQ ID NO: 21 representa um marcador histidina N-terminal ilustrativo utilizado na produção recombinante de polipeptídeos na presente invenção.

DESCRIÇÃO DETALHADA

ANTÍGENOS DE LEISHMANIA E SUAS FUSÕES

A presente invenção geralmente se relaciona a composições e métodos de utilização dos antígenos *Leishmania*. As composições da presente invenção geralmente compreendem pelo menos dois antígenos heterólogos ou suas porções imunogênicas de uma espécie de *Leishmania*. Sequência de antígeno de *Leishmania* pode ser obtida, por exemplo, a partir do banco de dados do Centro Nacional de Informação Biotecnológica (NCBI) para uma variedade de espécies de *Leishmania*, incluindo *L. donovani*, *L. chagasi*, *L. infantum*, *L. major*, *L. amazonensis*, *L. venezuelensis*, *L. braziliensis*, *L. panamensis*, *L. mexicana*, *L. tropica* e *L. guianensis*.

Em um aspecto, a presente invenção provê polipeptídeo de *Leishmania* isolado, como aqui descrito, incluindo fusão de polipeptídeos, e composições contendo os mesmos. Geralmente, um polipeptídeo da presente invenção será um polipeptídeo isolado e pode compreender um fragmento de polipeptídeo (por exemplo, uma porção antigênica/imunogênica), múltiplos fragmentos polipeptídeos (por exemplo, polipeptídeo de fusão), ou um polipeptídeo de comprimento total de uma sequência de aminoácido a partir de dois ou mais genes *Leishmania*, incluindo, mas não limitado a K26, K39 e/ou K9. Um dos versados na técnica apreciará que fragmentos de polipeptídeos antigênicos podem também ser obtidos a partir daqueles já disponíveis na técnica. Polipeptídeos da invenção, seus fragmentos antigênicos/imunogênicos, a outras variantes podem ser preparados utilizando técnicas de recombinações e/ou sintéticas convencionais.

Em certas modalidades, os polipeptídeos da presente invenção são polipeptídeos de fusão. Em modalidades particulares, os polipeptídeos de fusão compreendem antígenos K26, K39 e/ou K9 ou suas porções imunogênicas, as quais são antigênicas/imunogênicas, isto é, elas reagem detectavelmente dentro de um imunoensaio (tal como um ELISA ou ensaio de estimulação de células T) com antisoro e/ou células T a partir de um paciente infectado. Triagem para atividade imunogênica pode ser realizada utilizando-se técnicas bem conhecidas pelo versado na técnica. Por exemplo, tais triagens podem ser realizadas utili-

zando-se métodos tais como aqueles descritos em Harlow e Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988. Em um exemplo ilustrativo, um polipeptídeo da presente invenção (por exemplo, um polipeptídeo de fusão) pode ser imobilizado em um suporte sólido e contatado com soro paciente para permitir a ligação dos anticorpos com o soro para o polipeptídeo imobilizado. Soro não ligado pode então ser removido e ligar anticorpos utilizando, por exemplo, Proteína A marcada com¹²⁵I].

Como pode ser reconhecida por um versado na técnica, o polipeptídeo de fusão da presente invenção pode compreender porções ou fragmentos antigênicos ou imunogênicos de polipeptídeos K26, K39 e/ou K9 de *Leishmania* aqui revelados. Uma “porção imunogênica”, como utilizado aqui, é um fragmento de um polipeptídeo imunogênico da invenção que é reativa imunologicamente por si mesmo (isto é, se liga especificamente) com os receptores de antígenos de superfície de células B e/ou células T que reconhecem o polipeptídeo. Porções imunogênicas podem geralmente ser identificadas utilizando-se técnicas bem conhecidas, tais como aquelas resumidas em Paul, *Fundamental Immunology*, 5^a ed., Lippincott Williams e Wilkins, 2003 e referências aqui citadas. Tais técnicas incluem triagem de polipeptídeos para a habilidade de reagir com anticorpos com antígenos específicos, antosoros e/ou linhagens ou clones de células T. como aqui utilizados, antosoros e anticorpos são “antígenos específicos” se eles estão especificamente ligados a um antígeno (isto é, eles reagem com a proteína em imunoenaios, e não reagem diretamente com proteínas não relacionadas). Tais antosoros e anticorpos podem ser preparados como aqui descrito e utilizando-se técnicas bem conhecidas.

Em uma modalidade particular, uma porção imunogênica/antigênica ou fragmento polipeptídeo de um polipeptídeo de fusão da presente invenção é uma porção que reage com antosoros e/ou células T em um nível que não é substancialmente menor que a reatividade do polipeptídeo de fusão de comprimento total (por exemplo, em uma ELISA e/ou ensaio de reatividade na célula T). Preferivelmente, o nível de atividade imunogênica da porção antigênica/imunogênica dentro um polipeptídeo de fusão é pelo menos cerca de 50%, preferivelmente pelo menos cerca de 70% e mais preferivelmente melhor do que cerca de 90% da imunogenicidade para o polipeptídeo de fusão de comprimento total. Em alguns exemplos, porções imunogênicas preferidas serão identificadas as que tem nível de atividade imunogênica maior que o polipeptídeo de fusão de comprimento total correspondente, por exemplo, tendo mais que cerca de 100% ou 150% ou mais atividade imunogênica. Em modalidades particulares, a imunogenicidade do polipeptídeo de fusão de comprimento total terá imunogenicidade aditiva contribuída para cada uma das porções antigênicas/ imunogênicas aqui contidas.

Um polipeptídeo de fusão pode também compreender um ou mais polipeptídeos que são imunologicamente reativos com células T e/ou anticorpos gerados contra um poli-

peptídeo da invenção, particularmente um polipeptídeo tendo uma sequência de aminoácido aqui revelada, ou a um fragmento imunogênico e suas variantes. Em modalidades particulares, o polipeptídeo é um polipeptídeo de fusão com aqui descrito.

Em outra modalidade da invenção, polipeptídeos de fusão são providos e compreendem dois ou mais polipeptídeos que são capazes de elicitar células T e/ou anticorpos que são imunologicamente reativos com dois ou mais polipeptídeos aqui descritos, ou dois ou mais polipeptídeos codificados por sequências polinucleotídias contíguas contidas na sequência polinucleotíδια aqui revelada, ou fragmentos imunogênicos ou suas variantes, ou duas ou mais sequências polinucleotídicas as quais hibridizam para duas ou mais destas sequências sob condições de moderado a alto rigor.

A presente invenção também provê polipeptídeos de fusão compreendendo fragmentos de polipeptídeos K26, K29 e/ou K9, incluindo fragmentos imunogênicos/antigênicos compreendendo pelo menos cerca de 5, 10, 15, 20, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 250, 300 ou 350 aminoácido contíguos, ou mais, incluindo todos os comprimentos intermediários, de um antígeno K26, K39 e ou K9 de *Leishmania*, tais como aqueles aqui revelados, ou aqueles codificados por uma sequência polinucleotíδια aqui revelada.

Em outro aspecto, polipeptídeos de fusão da presente invenção contêm múltiplas cópias de fragmentos de polipeptídeos, repetições de fragmentos de polipeptídeos, ou fragmentos de polipeptídeos multiméricos, incluindo fragmentos antigênicos/imunogênicos tais como polipeptídeos K26, K39, e/ou K9 de *Leishmania*, compreendendo pelo menos cerca de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 ou mais fragmentos contíguos, em qualquer ordem, e incluindo todos os comprimentos de uma composição de polipeptídeos aqui revelados, ou aqueles codificados por uma sequência polinucleotíδια aqui revelada. Em outro aspecto, polipeptídeos de fusão da presente invenção podem compreender dois ou mais fragmentos de antígenos de *Leishmania* como recitado em SEQ ID NO:5-7, e 9-11. Em um aspecto relacionado, o polipeptídeo de fusão compreende a sequência de aminoácido revelada na SEQ ID NO: 8 ou aminoácidos 10-262 da SEQ ID NO: 8.

Em ainda outro aspecto, a presente invenção provê polipeptídeos de fusão compreendendo duas ou mais variantes de polipeptídeos K26, K29 e/ou K9 de *Leishmania* aqui descritos. Variantes de polipeptídeos geralmente compreendidos pela presente invenção exibirão tipicamente cerca de 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% de identidade ou mais (determinado como descrito abaixo), a longo de seu comprimento, para uma sequência de polipeptídeo aqui revelada. Preferivelmente, tais variantes terão a mesmo, ou similar ou melhorada atividade imunológica relativa a uma sequência K26, K29 e/ou K9 nativa.

Um polipeptídeo“variante”, como o termo aqui utilizado, é um polipeptídeo que tipicamente difere de um polipeptídeo especificamente aqui revelado (por exemplo, polipeptí-

deos K26, K29 e/ou K9 de *Leishmania*) em uma ou mais substituições, deleções, adições e/ou inserções. Tais variantes podem estar ocorrendo naturalmente ou podem ser geradas sinteticamente, por exemplo, através da modificação uma ou mais sequências de polipeptídeos da invenção acima e avaliação de suas atividades imunogênicas como aqui descrito

5 utilizando qualquer de um número de técnicas bem conhecidas pela técnica.

Em muitos exemplos, uma variante irá conter substituições conservadas. Uma “substituição conservada” é uma em que um aminoácido é substituído por outro aminoácido que tem propriedades similares, tais que um técnico versado na técnica de química peptídica pode esperar a estrutura secundária e natureza hidropática dos polipeptídeos a serem

10 substancialmente inalterados. Como descrito acima, modificações podem ser feitas na estrutura dos polinucleotídeos e polipeptídeos da presente invenção e ainda obterem uma molécula funcional que codifica um polipeptídeo variante ou derivado com características desejáveis, por exemplo, com características imunogênicas. Quando é desejado alterar a sequência de aminoácido de um polipeptídeo para criar uma equivalente, ou até uma porção ou

15 variante imunogênica melhorada de um polipeptídeo da invenção, um versado na técnica modificará tipicamente um ou mais códons da sequência do DNA codificante de acordo com a Tabela 1.

Por exemplo, certos aminoácidos podem ser substituídos por outros aminoácidos em uma estrutura protéica sem perdas apreciáveis de capacidade de ligação interativa com

20 estruturas tais como, por exemplo, regiões de ligação de antígenos de anticorpos ou sítios de ligação em moléculas substrato. Desde que seja a capacidade interativa e natureza de uma proteína a definir que a atividade funcional biológica da proteína, certas substituições de sequências de aminoácidos podem ser feitas em uma sequência protéica, e, claro, sua sequência de DNA codificante subjacente, e no entanto, obter uma proteína com propriedades parecidas. É assim contemplado que várias mudanças que podem ser feitas em se-

25 quências peptídicas das composições reveladas, ou sequências de DNA correspondentes que codificam os referidos peptídeos sem perdas apreciáveis de suas atividades ou utilidades biológicas.

Tabela 1

Aminoácidos			Códons					
Alanina	Ala	A	GCA	GCC	GCG	GCU		
Cisteína	Cys	C	UGC	UGU				
Ácido Aspártico	Asp	D	GAC	GAU				
Ácido Glutâmico	Glu	E	GAA	GAG				

Fenilalanina	Phe	F	UUC	UUU				
Glicina	Gly	G	GGA	GGC	GGG	GGU		
Histidina	His	H	CAC	CAU				
Isoleucina	Ile	I	AUA	AUC	AUU			
Lisina	Lys	K	AAA	AAG				
Leucina	Leu	L	UUA	UUG	CUA	CUC	CUG	CUU
Metionina	Met	M	AUG					
Asparagina	Asn	N	AAC	AAU				
Prolina	Pro	P	CCA	CCC	CCG	CCU		
Glutamina	Gln	Q	CAA	CAG				
Arginina	Arg	R	AGA	AGG	CGA	CGC	CGG	CGU
Serina	Ser	S	AGC	AGU	UCA	UCC	UCG	UCU
Treonina	Thr	T	ACA	ACC	ACG	ACU		
Valina	Val	V	GUA	GUC	GUG	GUU		
Triptofano	Trp	W	UGG					
Tirosina	Tyr	Y	UAC	UAU				

Fazendo-se tais modificações, o índice hidropático de aminoácidos pode ser considerado. A importância do índice aminoácido hidropático em conferir função biológica interativa em uma proteína é geralmente entendida na técnica (Kyte e Doolittle, 1982, aqui incorporado por referência). É aceitável que o caráter hidropático relativo do aminoácido contribua para a estrutura secundária da proteína resultante, a qual define por sua vez a interação da proteína com as outras moléculas, por exemplo, enzimas, substratos, receptores, DNA, anticorpos, antígenos e semelhantes. Cada aminoácido tem sido atribuído a um índice hidropático baseado em sua hidrofobicidade ou característica de carga (Kyte e Doolittle, 1982). Esses valores são: isoleucina (+4,5); valina (+4,2); leucina (+3,8), fenilalanina (+2,8); cisteína/cistina (+2,5); metionina (+1,9); alanina (+1,8); glicina (-0,4); treonina (-0,7); serina (-0,8); triptofano (-0,9); tirosina (-1,3); prolina (-1,6); histidina (-3,2); glutamato (-3,5); glutamina (-3,5); aspartato (-3,5); asparagina (-3,5); lisina (-3,9); e arginina (-4,5).

É conhecido na técnica que certos aminoácidos podem ser substituídos por outros aminoácidos tendo o mesmo índice ou pontuação hidropático e ainda resultar em uma proteína de atividade biológica similar, isto é, ainda obter uma proteína de funcionalidade biológica equivalente. Fazendo-se tais mudanças, a substituição de aminoácidos, dos quais os índices hidropáticos estão entre ± 2 é preferido, aqueles entre ± 1 são particularmente preferidos, e aquele que estão entre ± 0.5 são ainda mais particularmente preferidos. É também entendido na técnica que a substituição de um aminoácido parecido pode ser feita efetiva-

mente na base de hidrofiliçidade.

Como detalhado na Patente dos EUA 4.554.101 os valores de hidrofiliçidade a seguir têm sido atribuídos a resíduos aminoácidos: arginina (+3,0); lisina (+3,0); aspartato (+3,0 $\pm$ 1); glutamato (+3,0 $\pm$ 1); serina (+3,0); asparagina (+0,2); glutamina (+0,2); glicina (0);
 5 treonina (-0,4); prolina (-0,5 $\pm$ 1); alanina (-0,5); histidina (-0,5); cisteína (-1,0); metionina (-1,3); valina (-1,5); leucina (-1,8); isoleucina (-1,8); tirosina (-2,3); fenilalanina (-2,5); triptofano (-3,4). É entendido que um aminoácido pode ser substituído por outro tendo hidrofiliçidade de valor semelhante a ainda obter-se um equivalente biológico, e em particular, uma proteína imunologicamente equivalente. Em tais mudanças, a substituição de um aminoácido cujos
 10 valores de hidrofiliçidade estão dentro de ± 2 é preferido, aqueles dentro de ± 1 são particularmente preferidos e aqueles dentro de ± 0.5 são ainda mais particularmente preferidos.

Como delineado acima, substituições de aminoácidos são geralmente baseadas na similaridade relativa dos substituintes de aminoácidos de cadeia lateral, por exemplo, sua hidrofobicidade, hidrofiliçidade, carga, tamanho e semelhança. Substituições exemplares que
 15 levam várias das características precedentes em consideração são bem conhecidas por aqueles versados na técnica e incluem: argina e lisina; glutamato e aspartato; serina e treonina; glutamina e asparagina; e valina, leucina e isoleucina.

Em adição, qualquer polinucleotídeo pode ser ainda modificado para aumentar a estabilidade *in vivo*. Possíveis modificações incluem, mas não estão limitadas a, adição de
 20 sequências flanqueadoras na terminação 5' e/ou 3'; o uso de fosforotioato ou 2' O-metil ao invés de ligações fosfodiesterase na estrutura; e/ou a inclusão de bases não tradicionais tais como inosina, queosina e wybotusine, bem como acetil-metil, tio e outras forma modificadas de adenina, citidina, guanina, timina e uridina.

Substituições de aminoácidos podem ainda ser feitas nas bases de similaridade de
 25 polaridades, carga, solubilidade, hidrofobicidade, hidrofiliçidade e/ou natureza anfipática dos resíduos. Por exemplo, aminoácidos negativamente carregados incluem ácido aspártico e ácido glutâmico; aminoácidos positivamente carregados incluem lisina e arginina; e grupos de aminoácidos com cabeças polares não carregadas tendo valores de hidrofiliçidade similares incluem leucina, isoleucina e valina; glicina e alanina; asparagina e glutamina; e serina,
 30 treonina, fenilalanina e tirosina. Outro grupos de aminoácidos que podem representar mudanças conservadoras incluem: (1) ala, pro, gly, glu, asp, gln, ser, thr; (2) cys, ser, tyr, thr; (3) val, ile, leu, met, ala, phe; (4) lys, arg, his, e (5) phe, tyr, trp, his. Uma variante pode também, ou alternativamente, conter mudanças não conservativas. Em uma modalidade preferida, polipeptídeos variantes diferem de uma sequência nativa por substituição, deleção, ou
 35 adição de cinco aminoácidos ou menos. Variantes podem também (ou alternativamente) serem modificadas por, por exemplo, a deleção ou adição de aminoácidos que têm mínima influencia na imunogenicidade, estrutura secundária e natureza hidropática do polipeptídeo.

Como anotado acima, polipeptídeos podem compreender uma sequência sinal (ou líder) no terminação N-terminal da proteína, a qual co-traducionalmente ou pós traducionalmente direciona a transferência da proteína. O polipeptídeo pode também estar conjugado a um ligador ou outra sequência para facilitar a síntese, purificação ou identificação do polipeptídeo (por exemplo, marcador de poli-histidina (6XHis), GST, MBP, TAP/TAG, epítipo FLAG, epítipo MYC, epítipo V5, epítipo VSV-G etc.), ou para aumentar a ligação do polipeptídeo a um suporte sólido. Por exemplo, um polipeptídeo pode estar conjugado a uma região Fc de imunoglobulina.

Quando comparando sequências de polipeptídeos, duas sequências são ditas serem “idênticas” se a sequência de aminoácidos nas duas sequências forem a mesma quando alinhadas pelo máximo de correspondência, como descrito abaixo.

Comparações entre duas sequências são tipicamente realizadas pela comparação de sequências sobre uma janela de comparação para indentificar e comparar regiões locais de uma sequência de similaridade. Uma “janela de comparação” como aqui utilizado, refere-se ao segmento de pelo menos 20 posições contíguas, usualmente 30 a cerca de 75, 40 a cerca de 50, nas quais a sequência pode ser comparada a uma sequência de referência do mesmo número de posições contíguas depois que as duas sequências são idealmente alinhadas.

O alinhamento ótimo de sequências para comparação pode ser conduzido utilizando-se do programa Megalign no programa adequado Lasergene de bioinformáticos (DNASTAR, Inc., Madison, WI) utilizando-se parâmetros padrões. Este programa incorpora vários esquemas de alinhamento descritos nas referências a seguir: Dayhoff, M.O (1978) A model of evolutionary change in proteins – Matrices for detecting distant relationships. In Dayhoff, M.O. (ed.) Protein Sequence and Structure, National Biomedical Research Foundation, Washington DC ol. 5, Supl. 3, PP. 345-358; Hein J. (1990) Unified Approach to Alignment and Phylogenesis PP. 626-645 *Methods in Enzymology* vol. 183, Academic Press, Inc. San Diego, CA, Higgins, D. G. e Sharp, P.M (1989) *CABIOS* 5: 151-153; Myers, E.W. e Muller W. (1988) *CABIOS* 4:11-17; Robinson, E.D., (1971) *Comb. Theor* 11:105; Santou, N. Nes, M. (1987) *Mol. Biol. Evol.* 4:406-425; Sneath, P.H.A e Sokal, R.R (1973) *Numerical Taxonomy – The Principles and Practice of Numerical Taxonomy*, Impressão Freeman, San Francisco, CA; Wilbur, W. J. e Lipman, D. J. (1983) *Proc. Nat'l Acad., Sci. USA* 80:726-730.

Alternativamente, o alinhamento ótimo de sequências para comparação pode ser conduzido pelo algoritmo de identidade local de Smith e Waterman (1981) *Add. APL. Math* 2:482, pelo algoritmo de alinhamento de identidade de Needleman e Wunsch (1970) *J. Mol. Biol.* 48:443, pela procura de métodos similares de Pearson e Lipman (1988) *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 85: 2444, por implementação computadorizada destes algoritmos (GAP, BESTFIT, BLAST, FASTA e TFASTA no Pacote de Programa de Genética Wisconsin, Gru-

po Computadores Genéticos (GCG), 575 Science, Dr., Madison, WI), ou por inspeção.

Um exemplo preferido de algoritmos que são adequados para determinar o percentual de identidade de sequência e similaridade de sequência são os algoritmos BLAST e o BLAST 2.0, os quais são descritos em Altschul *et al* (1977) *Nucl. Acids Res.* 25:3389-3402 e Altschul *et al* (1990) *J. Mol. Biol.* 215: 403-410, respectivamente. BLAST e BLAST 2.0 podem ser utilizados, por exemplo, com os parâmetros aqui descritos, para determinar percentual de identidade de sequência para os polinucleotídeos e polipeptídeos da invenção. Programa BLAST para realizar análises é publicamente disponível pelo Centro Nacional de Informação Biotecnológica. Para sequências aminoácidas, uma matriz de pontos pode ser utilizada para calcular os pontos cumulativos. Extensão da palavra atinge em cada direção são interrompidas quando: o alinhamento dos pontos cumulativos cai pela quantidade de X do seu valor máximo atingido; os pontos cumulativos vão a zero ou abaixo, devido ao acúmulo de um ou mais alinhamentos de resíduos de pontos negativos; ou o final de qualquer sequência é alcançado. Os parâmetros W, T e X do algoritmo BLAST determinam a sensibilidade e velocidade do alinhamento.

Em um alinhamento preferencial, a “porcentagem de identidade de sequência” é determinada pela comparação de duas sequências alinhadas idealmente sobre uma janela de comparação de pelo menos 20 posições, em que a porção de sequência polipeptídeo na janela de comparação pode compreender adições ou deleções (isto é, gaps) de 20 por cento ou menos, usualmente de 5 a 15 por cento, ou de 10 a 12 por cento, como comparado com as sequências de referência (a qual não compreende adições ou deleções) para alinhamento ideal de duas sequências. A porcentagem é calculada pela determinação do número de posições nas quais o resíduo aminoácido idêntico ocorre em ambas as sequências para produzir o número de posições correspondentes, dividindo o número de posições correspondentes pelo total do número de posições nas sequências de referência (isto é, o tamanho da janela) e multiplicando os resultados por 100 para produzir a porcentagem de identidade de sequência.

Em certas modalidade preferidas da invenção, existem polipeptídeos de fusão de *Leishmania* fornecidos, e polinucleotídeos codificando fusões polipeptídicas, onde a polipeptídeo de fusão compreende duas ou mais sequências de polipeptídeos K26, K39 e/ou K9, ou suas porções imunogênicas. Fusão polipeptídica e proteína de fusão referem-se a um polipeptídeo tendo pelo menos dois polipeptídeos heterólogos de *Leishmania sp.*, tais como polipeptídeos de *Leishmania donovani* ligados covalentemente, ou diretamente ou via um ligador aminoácido. As sequências antigênicas K26, K39 e/ou K9 podem, mas não precisam ser derivadas da mesma espécie de *Leishmania*. Os polipeptídeos formando a proteína de fusão são tipicamente ligados a C-terminal a N-terminal, embora eles também possam ser ligados C-terminal a C-terminal, N-terminal a N-terminal ou N-terminal a C-terminal. Os

polipeptídeos da proteína de fusão podem estar em qualquer ordem e podem conter múltiplas cópias, repetições de, ou multímeros de cada um ou qualquer um dos polipeptídeos compreendendo a proteína de fusão. Polipeptídeos de fusão ou proteínas de fusão podem também incluir variantes conservadoramente modificadas, variantes polimórficas, alelos, mutantes, subsequências, interespécies homólogas, e fragmentos imunogênicos dos antígenos que compõem a proteína de fusão. Em modalidades particulares, polipeptídeos de fusão da presente invenção podem compreender um ou mais fragmentos de antígenos de *Leishmania* como recitado nas SEQ ID NOs: 5-7 e 9-11. Em modalidades relacionadas, o polipeptídeo de fusão inclui a sequência de aminoácido revelada em SEQ ID NO: 8 ou aminoácidos 10-262 da SEQ ID NO: 8.

Antígenos de outra espécie de *Leishmania* que correspondem a antígenos de *Leishmania donovani* podem também ser utilizados e podem ser identificados, *por exemplo*, utilizando-se a sequência de comparação de algoritmos, como aqui descrito, ou outros métodos conhecidos pelos versados na técnica, *por exemplo*, ensaios de hibridização e ensaios de ligação de anticorpos.

Os polipeptídeos de fusão da invenção geralmente compreendem pelo menos duas porções ou fragmentos antigênicos/imunogênicos de polipeptídeos K26, K39, e/ ou K9 como aqui descrito, e podem ainda compreender outras sequências não relacionadas, tais como a sequência que auxilia o fornecimento de epítomos auxiliares T (um parceiro de fusão imunológica), preferivelmente epítomos auxiliares T reconhecidos por humanos, ou que auxiliam em proteínas inexpressivas (um aumentador de expressões) em rendimentos maiores do que proteínas recombinantes nativas. Certos parceiros de fusão preferidas são ambos parceiros de fusão imunológica e aumentadores de expressão. Outros parceiros de fusão podem ser selecionados assim como para aumentar a solubilidade da proteína ou para permitir a proteína ser alvo para compartimentos intracelulares desejados. Ainda parceiros de fusão adicionais podem incluir marcadores de afinidade tais como V5, 6XHIS, MYC, FLAG e GST, os quais facilitam a purificação da proteína. Isso poderia ser entendido por um versado na técnica que aquelas sequências não relacionadas podem, mas não precisam estar presentes em um polipeptídeo de fusão utilizado em acordo com a presente invenção.

Proteínas de fusão podem geralmente ser preparadas usando técnicas padrão. Preferivelmente, uma proteína de fusão é expressa como uma proteína recombinante. Por exemplo, sequências de DNA codificando os componentes do polipeptídeo de uma fusão desejada podem ser unidos separadamente, e ligados a um vetor de expressão apropriado. A terminação 3' da sequência de DNA codificando um componente de polipeptídeo é ligada, com ou sem um peptídeo de ligação, à terminação 5' de sequência de DNA codificando o segundo componente de polipeptídeo para que a os quadros de leitura da sequência estejam em fase. Isso permite a tradução em uma única proteína de fusão que retém a atividade

biológica de ambos os polipeptídeos componentes.

Uma sequência ligadora de polipeptídeos pode ser empregada para separar o primeiro e o segundo componente de peptídio por uma distância suficiente para assegurar que cada polipeptídeo dobre-se em sua estrutura secundária e terciária, se desejado. Tal sequência ligadora peptídica é incorporada na proteína de fusão utilizando-se técnicas padrões bem conhecidas na técnica. Certas sequências ligadoras de peptídeos podem ser escolhidas baseadas nos seguintes fatores: (1) sua habilidade de adotar uma conformação estendida flexível; (2) sua inabilidade em adotar uma segunda estrutura que pode interagir com epítomos funcionais no primeiro e no segundo polipeptídeo; e (3) a falta de resíduos carregados ou hidrofóbicos que podem reagir com os epítomos funcionais polipeptídeos. Sequências ligadoras de peptídeos preferidas contêm resíduos Gly, Asn e Ser. Outros aminoácidos neutros próximos, tais como Thr e Ala podem também ser utilizados na sequência ligadora. Sequências de aminoácidos as quais podem ser empregadas utilmente como ligadores incluem aquelas reveladas em Maratea *et al*, *Gene* 40:39 46 (1985); Murphy *et al*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:8258 8262 (1986); Pat.dos EUA No. 4,935,233 e Pat. Dos EUA No. 4,751,180. A sequência ligadora pode geralmente ser de 1 a cerca de 50 aminoácidos em comprimento. Sequências ligadoras não são requisitadas quando o primeiro e o segundo polipeptídeo têm regiões aminoácidas N-terminal não essenciais que podem ser utilizadas para separar os domínios funcionais e prevenir interferências estéricas.

As sequências de DNA ligadas são operacionalmente ligadas a elementos regulatório traducional ou transcricional adequado. Os elementos regulatórios responsáveis pela expressão do DNA são localizados em apenas 5' para a sequência do DNA codificando o primeiro peptídio. Similarmente, códon de parada necessários para terminar a tradução e os sinais de terminação da transcrição estão presentes apenas em 3' para a sequência de DNA codificando o segundo polipeptídeo.

Dentro de modalidades preferidas, um parceiro imunológico de fusão para uso num polipeptídeo de fusão da invenção é derivado de uma proteína D, uma proteína de superfície da bactéria gram negativa *Haemophilus influenza B* (WO 91/18926). Preferivelmente, a proteína D derivada compreende aproximadamente o primeiro terço da proteína (*por exemplo*, o primeiro aminoácido N-terminal 100 110), e uma proteína D derivada pode ser lipídica. Dentro de certas modalidades preferidas, os primeiros 109 resíduos de um parceiro de fusão lipoproteína D no N-terminal para prover o polipeptídeo de fusão com epítomos de células T exógenos adicionais e para aumentar o nível de expressão em *E. coli* (assim funcionando como um potencializador de expressão). A cauda lipídica garante a ótima apresentação do antígeno para células apresentadoras de antígeno. Outros parceiros de fusão incluem a proteína não estrutural do vírus influenza, NS1 (Hemaglutinin). Tipicamente os aminoácidos 81 N-terminal são utilizados, embora diferentes fragmentos que incluem epítomos de T auxiliar

possam ser utilizados. Em outra modalidade, um parceiro de fusão imunológico compreende uma sequência de aminoácido derivada da proteína conhecida como LYTA, ou sua porção (preferivelmente uma porção C-terminal). LYTA é derivada do *Streptococcus pneumoniae*, a qual sintetiza uma amidase N-acetil-L-alanina conhecida como amidase LYTA (codificada pelo gene *LytA*; Gene 43:265-292 (1986)). LYTA é uma autolisina que especificamente degrada certas ligações na estrutura peptidoglicana. O domínio C-terminal da proteína LYTA é responsável pela afinidade com a colina ou a algum análogo de colina tal como DEAE. Essa propriedade tem sido explorada para o desenvolvimento de *E. coli* C-LYTA expressando plasmídeos úteis para expressão de proteínas de fusão. Purificação de proteínas híbridas contendo o fragmento C-LYTA no terminal amino tem sido descrita (ver *Biotechnology* 10:795-798 (1992)). Dentro de uma modalidade preferida, uma porção repetida de LYTA pode ser incorporada ao polipeptídeo de fusão da presente invenção, como aqui descrito. Uma porção repetida é encontrada em região C-terminal começando no resíduo 178. Uma particularmente preferida repetida incorpora resíduos 188-305.

Em geral polipeptídeos e polipeptídeos de fusão (assim como seus polinucleotídeos codificantes) são isolados. Um polipeptídeo "isolado" ou polinucleotídeos é um que é removido do seu ambiente original. Por exemplo uma proteína que ocorre naturalmente é isolada se for separada de alguns ou todos os materiais coexistentes no sistema natural. Preferivelmente, tais polipeptídeos são pelo menos 90% puros, mais preferivelmente pelo menos cerca de 95% puro e o mais preferivelmente pelo menos cerca de 99% puro. Um polinucleotídeo é considerado ser isolado se, por exemplo, é clonado em um vetor que não é parte do ambiente natural.

Em certas modalidades, o polipeptídeo de fusão da invenção incluirá pelo menos um epítopo de cada K26, K39 e K9. Epítopos podem geralmente ser determinados pela geração de polipeptídeos contendo porções ou fragmentos de sequências e avaliando a reatividade dos polipeptídeos com soro de indivíduos infectados com *Leishmania* utilizando-se, por exemplo, um ensaio imunoabsorvente ligado à enzima (ELISA). Ensaio adequados para avaliação de reatividade de um polipeptídeo com soro infectado de *Leishmania* são descritos em mais detalhes abaixo. Dentro de tais ensaios representativos, porções de sequências que geram um sinal que diferencia entre soros negativos e positivos em maneira substancialmente similar ao comprimento total são considerados conter um epítopo. Em outras palavras, uma porção de antígeno que contém um epítopo gerará um sinal indicando infecção de *Leishmania* em substancialmente todas as amostras (*isto é*, pelo menos cerca de 80%, e preferivelmente pelo menos cerca de 90%) das amostras biológicas para as quais tal infecção seria indicado utilizando-se antígeno de comprimento total e será gerado um sinal indicando a ausência de infecção de *Leishmania* em todas aquelas amostras que podem negativas com polipeptídeo de comprimento total.

Em um aspecto relacionado, polipeptídeo de fusão compreendendo epítomos de múltiplos polipeptídeos de *Leishmania* são revelados. Em certas modalidades particulares, epítomos de diferentes polipeptídeos de *Leishmania*, repetidos, ou suas variantes, são unidos através de uma ligação peptídica em uma única cadeia de aminoácido. Os epítomos podem ser unidos diretamente (*por exemplo*, sem intervenção de aminoácidos) ou podem ser unidos por meio de sequência ligadora (*por exemplo*, Gly-Cys-Gly) o que não significa alterar as propriedades antigênicas do epítomo. Em modalidades particulares o polipeptídeo de fusão é derivado de duas ou mais porções ou fragmentos antígenos/imunogênicos. Em outro aspecto, polipeptídeos de fusão da presente invenção podem conter dois ou mais fragmentos de antígenos de *Leishmania* como recitado em SEQ ID Nos: 5-7 e 9-11. Em um aspecto relacionado, o polipeptídeo de fusão inclui a sequência de aminoácido revelada em SEQ ID NO: 8 ou resíduos de aminoácidos 10-262 SEQ ID NO: 8.

Os polipeptídeos de fusão desta invenção podem ser gerados utilizando-se técnicas bem conhecidas por um versado na técnica. Polipeptídeos da presente invenção tendo menos de cerca de 100 aminoácidos e geralmente menos de cerca de 50 aminoácidos, podem ser sintetizados utilizando-se, por exemplo, o método sintético de fase sólida Merrifield, onde aminoácidos são sequencialmente adicionados a uma cadeia crescente de aminoácidos (Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* 85:2149-2146, 1963). Equipamento para sínteses automáticas dos polipeptídeos são comercialmente disponíveis de provedores tais como Applied Biosystems, Inc. Foster City, Calif. Assim, por exemplo, antígenos de *Leishmania* K26, K39 e/ou K9 ou suas porções, podem ser sintetizadas por este método.

Alternativamente, os polipeptídeos desta invenção podem ser preparados pela expressão de DNA recombinante codificando o polipeptídeo em células hospedeiras em cultura. Preferivelmente, as células hospedeiras são *E. coli*, levedura, uma linhagem celular de inseto (tais como *Spodoptera* ou *Trichoplusia*) ou uma linhagem celular de mamífero, incluindo (mas não limitado a) CHO, COS, HEK-293T e NS-1. A sequência de DNA expressa desta maneira pode codificar proteínas ocorrendo naturalmente, e proteínas de fusão compreendendo antígenos de *Leishmania* como K26, K9 e/ou K39, suas porções e repetições ou variantes de tais proteínas. Polipeptídeos de fusão expressos desta invenção são geralmente isolados substancialmente em forma pura. Preferivelmente, os polipeptídeos de fusão são isolados a uma pureza de pelo menos 80% por peso, mais preferivelmente, a uma pureza de pelo menos 95% por peso, e mais preferivelmente a uma pureza de pelo menos 99% por peso. Em geral, tais purificações podem ser conseguidas utilizando-se, por exemplo, o técnicas padrão de fracionamento de sulfato de amônio, electroforese em SDS-PAGE, e cromatografia de afinidade.

COMPOSIÇÃO DE POLINUCLEOTÍDEOS

A presente invenção também provê polinucleotídeos isolados, particularmente a-

queles codificando os polipeptídeos de fusão da invenção, bem como composições contendo tais polinucleotídeos. Como aqui utilizado, os termos “DNA” e “polinucleotídeos” e “ácido nucléico” referem-se a uma molécula de DNA que tenha sido isolada livre do DNA genômico total de espécies particulares. Portanto, um segmento de DNA codificando um polipeptídeo

5 refere-se a um segmento de DNA que contém uma ou mais sequências codificadoras ainda é substancialmente isolada de, ou purificada de, DNA genômico total de espécies das quais o segmento de DNA é obtido. Incluído dentro do termo “segmento de DNA” e “polinucleotídeo” estão segmentos de DNA e fragmentos menores de tais segmentos, e também, vetores recombinantes, incluindo, por exemplo, plasmídeos, cosmídeos, fagemídeos, fago, vírus e

10 semelhantes.

Como será entendido pelos versados na técnica, as sequências de polinucleotídeos desta invenção podem incluir sequências genômicas, extra genômicas, sequências codificadas por plasmídeos e segmentos de engenharia genética que expressam, ou podem ser adaptados para expressar, proteínas, polipeptídeos de fusão, peptídeos e semelhantes.

15 Tais segmentos podem ser naturalmente isolados, recombinados, ou modificados sinteticamente pelas mãos do homem.

Como será reconhecido pelo versado na técnica, polinucleotídeos podem ser de fita simples (codificante ou anti-senso) ou de fita dupla, e podem ser moléculas de DNA (genômica, cDNA ou sintética) ou moléculas de RNA. Codificação adicional ou sequências não

20 codificantes podem, mas não precisam, estar presentes dentro de um polinucleotídeo da presente invenção, e um polinucleotídeo pode, mas não precisa, ser vinculado a outra molécula e/ou material de suporte.

Polinucleotídeos podem compreender uma sequência nativa (*isto é*, uma sequência endógena que codifica o antígeno de *Leishmania* ou sua porção) ou pode incluir uma variante, ou um biológico ou antígeno funcional equivalente de tais sequências. Em modalidades

25 particulares, polinucleotídeos podem ser codificados por duas ou mais porções antigénicas/imunogénicas, fragmentos ou variantes derivadas dos antígenos de *Leishmania* K26, K39 e/ou K9. Em certas modalidades polinucleotídeos codificando polinucleotídeos de fusão da presente invenção podem codificar dois ou mais fragmentos de antígenos de *Leishmania*

30 como recitado em SEQ ID Nos: 5-7 e 9-11. Em aspecto relacionado, o polipeptídeo de fusão é codificado pelos polipeptídeos codificando a sequência de aminoácidos revelada em SEQ ID NO: 8 ou aminoácidos 1-262 da SEQ ID NO: 8.

Polinucleotídeos variantes podem conter uma ou mais substituições, adições, supressões e/ou inserções, como ainda descrito abaixo, preferivelmente tais que a imunogenicidade do polipeptídeo codificado não é diminuída, relativa a proteína nativa. O efeito na

35 imunogenicidade do polipeptídeo codificado pode geralmente ser acessado como descrito aqui. O termo “variantes” também compreende genes homólogos de origem xenogênica.

Em modalidades adicionais, polinucleotídeos de fusão isolados irão incluir vários comprimentos de trechos contíguos de sequências idênticas as, ou complementares a dois ou mais K26, K39 e/ou K9, tais como aquelas sequências reveladas aqui, suas variantes e porções. Por exemplo, polinucleotídeo são providos por essa invenção que compreende pelo menos 15, 20, 30, 40, 50, 75, 100, 150, 200, 300, 400, 500 ou 1000 ou mais nucleotídeos contíguos de duas ou mais sequências aqui reveladas bem como todos os comprimentos entre eles. Será prontamente entendido que “comprimento intermediário”, neste contexto, significa qualquer comprimento entre os valores entre aspas, tais como 16, 17, 18, 19 etc.; 21, 22, 23 etc.; 30, 31, 32 etc.; 50, 51, 52, 53 etc.; 100, 101, 102, 103 etc.; 150, 151, 152, 153, etc.; incluindo todos inteiros por meio de 200-500; 500-1.000, e semelhantes.

Os polinucleotídeos de fusão da presente invenção, ou seus fragmentos, independentemente do comprimento da própria sequência codificada, podem ser combinados com outras sequências de DNA, tais como promotores, sinais de poliadenilação, enzimas locais de restrição adicional, sítios de clonagem múltipla, outros segmentos codificados e semelhantes, tais que seus comprimentos globais podem variar consideravelmente. É portanto contemplado que o fragmento de polinucleotídeo de quase qualquer comprimento pode ser empregado; com o comprimento total preferivelmente sendo limitado pela facilidade de preparação e uso na recombinação do protocolo de DNA tencionado.

Além disso, será apreciado por aqueles versados na técnica que, como resultado da degeneração do código genético, existem tantas sequências de nucleotídeos que codificam um polipeptídeo como aqui descrito. Alguns destes polinucleotídeos tem homologia mínima à sequência de nucleotídeos de qualquer gene nativo. Não obstante, polinucleotídeos que variam devido a diferenças na utilização de códons são especificamente contemplados pela presente invenção, por exemplo, polinucleotídeos que são idealizados para seleção de códon humanos e/ou primatas. Ainda, alelos dos genes compreendendo sequências de polinucleotídeos providos aqui estão dentro do objetivo da presente invenção. Alelos são genes endógenos que são alterados como um resultado de uma ou mais mutações, tais como deleções, adições e/ou substituições de nucleotídeos. O mRNA resultante e a proteína podem, mas não precisam, ter uma estrutura ou função alterada. Alelos podem ser identificados utilizando-se técnicas padrões (tais como hibridização, amplificação e ou banco de dados de comparações de sequências).

Polinucleotídeos de *Leishmania* e suas fusões podem ser preparados, manipulados e/ou expressos utilizando-se qualquer uma das variadas técnicas bem estabelecidas conhecidas e disponíveis na técnica. Por exemplo, sequências de polinucleotídeos ou seus fragmentos os quais podem codificar polipeptídeos da invenção, ou proteínas de fusão ou seus equivalentes funcionais, podem ser utilizados em molécula de DNA recombinante para direcionar expressões de um polipeptídeo em células hospedeiras apropriadas. Devido a dege-

neração inerente do código genético, outra sequência de DNA que substancialmente codifica o mesmo ou equivalente funcional da sequência de aminoácido pode ser produzido e estas sequências podem ser utilizadas para clonar e expressar um dado polinucleotídeo da presente invenção.

5 Como será entendido pelos versados na técnica, pode ser vantajoso em alguns exemplos produzir sequências de nucleotídeos codificando polipeptídeo de fusão possuindo códons não ocorrentes naturalmente. Por exemplo, códons preferidos por um hospedeiro procariótico ou eucariótico podem ser selecionados para aumentar a taxa de expressão de proteína ou para produzir um RNA recombinante transcrito tendo propriedades desejáveis, tais como uma meia vida que é mais longa do que um transcrito gerado da sequência de ocorrência natural.

10 Além disso, as sequências de polinucleotídeos da presente invenção podem ser construídas utilizando-se métodos geralmente conhecidos na técnica de modo a alterar o polipeptídeo de fusão codificando sequências por uma variedade de razões, incluindo mas não se limitando a, alterações as quais modificam a clonagem, processamento, expressão e/ou a imunogenicidade do gene produto.

15 De modo a expressar o polipeptídeo de fusão desejado incluindo dois ou mais fragmentos antigênicos/imunogênicos ou porções de polipeptídeos K26, K39 e/ou K9, uma sequência de nucleotídeo codificando o polipeptídeo de fusão, ou um equivalente funcional, pode ser inserido em um vetor de expressão apropriado, isto é, um vetor que contenha os elementos necessários para a transcrição e a tradução da sequência codificada inserida. Métodos que são bem conhecidos pelos versados na técnica podem ser utilizados para construir vetores de expressão contendo sequências codificadoras de polipeptídeos de interesse e elementos de controle transcricional e traducional apropriados. Estes métodos incluem técnicas *in vitro* de DNA recombinantes, técnicas sintéticas e recombinação genética *in vivo*. Tais técnicas são descritas em Smabrook et al, Molecular Cloning, A Laboratory Manual (2001), e Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology (Janeiro de 2008, edição atualizada).

25 Uma variedade de sistemas de vetor de expressão/hospedeiros são conhecidos e podem ser utilizados para conter e expressar sequências de polinucleotídeos. Estas incluem, mas não estão limitadas a microorganismos tais como bactérias transformadas com bacteriófago recombinante, plasmídeo, ou de vetor de expressão de DNA cosmídios; levedura transformada com vetores de expressão de levedura; sistemas de células de insetos infectadas com vetores de expressão de vírus (*por exemplo*, baculovírus); sistemas de células de plantas transformadas com vetores de expressão de vírus (*por exemplo*, vírus mosaico de couve flor, CaMV; vírus mosaico tabaco, TMV) ou com vetores de expressão bacteriano (*por exemplo*, plasmídeos Ti ou pBR322); ou sistemas de células animais.

O “controle de elementos” ou “sequências regulatórias” presentes em um vetor de expressão são aquelas regiões não traduzidas do vetor – aumentadores, promotores, regiões não traduzidas 5’ e 3’ – as quais interagem com proteínas celulares hospedeiras para realizar a transcrição ou tradução. Tais elementos podem variar em sua força e especificidade. Dependendo do sistema do vetor e hospedeiro utilizado, qualquer número de elementos de transcrições e traduções adequados, incluindo promotores constitutivos e induzíveis, podem ser utilizados. Por exemplo, quando clonando sistemas bacterianos, promotores induzíveis tais como promotor lacZ híbrido do fagomídeo PBLUESCRIPT (Stratagene, La Jolla, Calif.) ou plasmídeo PSORT1 (Gibco BRL, Gaithersburg, Md) e semelhantes podem ser utilizados. Em sistemas celulares de mamíferos, promotores de genes mamíferos ou de vírus mamíferos são geralmente preferidos. Se for necessário gerar uma linhagem celular que contenha múltiplas cópias da sequência codificando um polipeptídeo, vetores baseados em SV40 ou EBV podem ser vatajosamente utilizados com um marcador selecionável apropriado.

Em sistemas bacterianos, um número de vetores de expressão pode ser selecionado dependendo do uso tencionado para o polipeptídeo expresso. Por exemplo, quando grandes quantidades são necessárias, vetores o quais direcionam altos níveis de expressões de proteínas de fusão que são facilmente purificados podem ser utilizados. Tais vetores incluem, mas não estão limitados a, clonagem multifuncional de *E. coli* e vetores de expressão tais como PBLUESCRIPT (Stratagene), no qual a sequência codificando o polipeptídeo de interesse pode ser ligada ao vetor no quadro com sequências para o Met amino terminal e o resíduo 7 subsequente de β -galactosidase para que uma proteína híbrida seja produzida; vetores pIN (Van Heeke & Schuster, *J. Biol. Chem.* 264:5503-5509 (1989)); e semelhantes. Vetores pGEX (Promega, Madison, Wis.) podem também ser utilizados para expressar polipeptídeos externos como proteínas de fusão com glutathione S-transferase (GST). Em geral, tais proteínas de fusão são solúveis e podem facilmente ser purificadas de células lisadas por adsorção para esferas glutathione-agarose seguidos por aluição na presença de glutathione livre. Proteínas feitas em tais sistemas podem ser desenhadas para incluir heparina, trombina ou sítios de clivagem da protease fator XA para que o polipeptídeo clonado de interesse possa ser liberado a partir a fração GST quando queira.

Na levedura, *Saccharomyces cerevisiae*, um número de vetores contendo promotores constitutivos ou induzíveis tais como fator alfa, álcool oxidase, e PGH podem ser utilizados. Para revisões, veja Ausubel et al, (acima) e Grant et al, *Methods Enzymol.* 153:526-544 (1987).

Em casos em que vetores de expressão de plantas são utilizados, a expressão de sequências codificando polipeptídeos pode ser direcionada por qualquer um do número de promotores. Por exemplo, promotores virais tais como os promotores 35S e 19S do CaMV

podem ser utilizados sozinhos ou em combinação com a sequência ômega líder de TMV (Takamatsu, *EMBO J.* 6:307-311 (1987)). Alternativamente, promotores de plantas tais como pequenas subunidades de RUBISCO ou promotores de choque térmico podem ser utilizados (Coruzzi et al, *EMBO J.* 3: 1671-1680 (1984); Broglie et al, *Science* 224: 834-843 (1984); e Winter et al, *Results. Prob. Cell Differ* 17:85-105 (1991)). Estas construções podem ser introduzidas em células de plantas por transformação direta de DNA ou transfecção mediada por patógeno. Tais técnicas são descritas em um número de revisões geralmente disponíveis (veja, *por exemplo*, Hobbs in McGraw Hill, *Yearbook of Science and Technology*, pp. 191-196 (1992)).

Um sistema de inseto pode também ser usado para expressar um polipeptídeo de interesse. Por exemplo, em um sistema, *Autographa californica* vírus poliedrose nuclear (AcNPV) é utilizado como vetor para expressar genes externos em células *Spodoptera frugiperda* ou em larvas *Trichoplusia*. As sequências codificando os polipeptídeos podem ser clonadas em regiões não essenciais dos vírus, tais como o gene poliedrino, e colocadas sob controle do promotor poliedrino. Inserções bem sucedidas da sequência de codificando polipeptídeos dará o gene poliedrino inativo e produzirá vírus recombinantes com falta de capa protéica. Os vírus recombinantes podem então ser utilizados para infectar, por exemplo, células *S. frugiperda* ou larva *Trichoplusia* na qual o polipeptídeo de interesse pode ser expresso (Engelhard et al, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91:3224-3227 (1994)).

Em células hospedeiras de mamíferos, um número de sistemas de expressão baseados em vírus estão geralmente disponíveis. Por exemplo, em casos onde um adenovírus é usado como um vetor de expressão, sequências codificando um polipeptídeo da presente invenção podem ser ligadas em um complexo transcrição/tradução de adenovírus consistindo no último promotor e sequência líder tripartida.

Inserção em uma região não essencial E1 ou E3 do genoma viral pode ser utilizada para obter vírus viáveis que são capazes de expressar o polipeptídeo em células hospedeiras infectadas (Logan 7 Shenk, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 81: 3655-3659 (1984)). Em adição, aumentadores de transcrição, tais como o aumentador vírus sarcoma Rous (RSV), pode ser utilizado para melhorar a expressão em células hospedeiras de mamíferos.

Sinais de iniciação específicos podem também ser utilizados para conseguir traduções mais eficientes das sequências codificando um polipeptídeo de fusão de interesse. Tais sinais incluem o códon de iniciação ATG e sequências adjacentes. Em casos onde sequências codificando o polipeptídeo, seus códons de iniciação e sequências montantes são inseridas dentro do vetor de expressão apropriado, nenhum outro sinal adicional de controle de transcrição ou de tradução pode ser necessário. Entretanto, em casos onde apenas a sequência codificadora, ou sua porção, é inserida, sinais de controle de tradução exógenos incluindo o códon de iniciação ATG deverá ser fornecido. Além disso, o códon de iniciação

deverá estar no quadro de leitura correto para assegurar a translação da inserção inteira. Elementos traducionais exógenos e códonos de iniciação podem ser de várias origens, tanto naturais quanto sintéticas. A eficiência da expressão pode ser aumentada pela inclusão de aumentadores que são apropriados para sistemas celulares particulares, os quais são utilizados, tais como aqueles descritos na literatura (Scharf. et al, *Results Probl. Cell Differ.* 20:125-162 (1994)).

Em adição, uma cepa da célula hospedeira pode ser escolhida por sua habilidade de modular a expressão das sequências inseridas ou para processar a proteína de fusão expressa de forma desejada. Tais modificações do polipeptídeo incluem, mas não estão limitadas a acetilação, carboxilação, glicosilação, fosforilação, lipidação e acilação. Processamento pós traducional o qual cliva uma forma "pre-pro" da proteína pode também ser utilizada para facilitar inserções corretas, dobraduras e/ou funções. Diferentes células hospedeiras tais como CHO, HeLA, MDCK, HEK23 e W138 as quais possuem máquinas celulares específicas e mecanismos característicos para tais atividades pós traducionais, podem ser escolhidas para assegurar a modificação correta e o processamento da proteína externa.

Para produção de longo prazo, e alto rendimento de proteínas recombinantes, expressões estáveis são geralmente preferidas. Por exemplo, linhagens celulares, que de forma estável expressam um polinucleotídeo de fusão da presente invenção podem ser transformadas utilizando-se vetores de expressão os quais podem conter origens virais de replicação e/ou elementos de expressão endógena e um gene marcador selecionável no mesmo ou em vetor separado. Seguindo a introdução do vetor, células podem ser permitidas crescer por 1-2 dias em um meio enriquecido antes de eles serem trocadas para um meio seletivo. O propósito do marcador selecionável é conferir a resistência para seleção, e sua presença permite o crescimento e a recuperação de células que expressam com sucesso as sequências introduzidas. Clones resistentes de células estavelmente transformadas podem ser proliferados utilizando-se a técnica de cultura de tecidos apropriada para o tipo de célula.

Qualquer número de sistemas selecionados pode ser utilizado para recuperar linhagens celulares transformadas. Estes incluem, mas não estão limitados a, genes do vírus herpes simples *timidina quinase* (Wigler et al, *Cell* 11:223-232 (1977)) e *adenina fosforibosil-transferase* (Lowe et al, *Cell* 22:817-823 (1990)) que podem ser empregados em células *tk-* ou *aprt-*, respectivamente. Também, resistência antimetabólica, a antibiótico e herbicida pode ser utilizada como a base para seleção; por exemplo, *dhfr* que confere resistência a metotrexato (Wigler et al, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 77:3567-70 (1980)); *npt*, que confere resistência aos aminoglicosídeos, neomycin e G-418 (Colbere-Garapin et al, *J. Mol. Biol.* 150: 1-14 (1981)); e *als* ou *Pat*, que confere resistência ao clorosulfurona e fosfinotricina acetil-transferase, respectivamente (Murry, acima). Genes selecionáveis adicionais têm sido descritos, por exemplo, *trpB*, o qual permite que células utilize indol no lugar de triptofano, ou

hisD, o qual permite as células utilizarem histinol no lugar de histidina (Hartman & Mulligan, *Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A* 85:8047-51 (1988)). A utilização de marcadores visíveis tem ganhado popularidade com tais marcadores como antocianinas, β -glucuronidase e seu substrato GUS e luciferase e seu substrato luciferina, sendo amplamente utilizados não apenas para identificar transformantes, mas também para quantificar a quantidade de proteínas de expressão transitórias ou estáveis atribuíveis a um sistema vetor específico (Rhodes et al, *Methods Mol. Biol.* 55:121-131 (1995)).

Uma variedade de protocolos para detecção e mensuração de expressão de produtos codificados por polinucleotídeos, utilizando anticorpos policlonais e monoclonais específicos para o produto são conhecidos na técnica. Exemplos incluem ensaio imunoadsorvente ligado à enzima (ELISA), radioimunoensaio (RIA) e seleção de célula ativada por fluorescência (FACS). Estes e outros ensaios são descritos, entre outros lugares, em Hampton et al, *Serological Methods, a Laboratory Manual* (1990) e Maddox et al, *J. Exp. Med.* 158: 1211-1216 (1983).

Uma ampla variedade de marcadores e técnicas de conjugação são conhecidas por versados na técnica e devem ser utilizados em vários ensaios de ácidos nucleicos e amino-ácidos. Meios que para produção de hibridização marcada ou sondas PCR para detecção de sequências relacionadas a polinucleotídeos incluem oligomarkação, tradução Nick, marcação terminal ou amplificação de PCR utilizando-se nucleotídeos marcados. Alternativamente, as sequências, ou qualquer uma de suas porções podem ser clonadas em um vetor para a produção de uma sonda de mRNA. Tais vetores são conhecidos na técnica, são comercialmente disponíveis e podem ser utilizados para sintetizar sondas mRNA *in vitro* por adição de uma RNA polimerase apropriada, tal como T7, T3 ou SP6 e nucleotídeos rotulados. Estes procedimentos podem ser conduzidos utilizando uma variedade de kits comercialmente disponíveis. Moléculas repórteres adequadas ou marcadores, os quais podem ser utilizados, incluem radionuclídeos, enzimas, fluorescentes, quimioluminescente, ou agentes cromogênicos, bem como substratos, cofatores, inibidores, partículas magnéticas e semelhantes.

Células hospedeiras transformadas com sequência de polinucleotídeos de interesse podem ser cultivadas sob condições adequadas para a expressão e recuperação da proteína a partir da cultura de célula. A proteína produzida por uma célula recombinante pode ser secretada ou contida intracelularmente dependendo da sequência e/ou do vetor utilizado. Como será entendido pelos versados na técnica, vetores de expressão contendo polinucleotídeos da invenção podem ser desenhados para conter sequências de sinais que direcionam secreção do polipeptídeo codificado através da membrana celular procariótica e eucariótica. Outras construções recombinantes podem ser utilizadas para unir sequências codificando um polipeptídeo de interesse para sequência de nucleotídeo codificando um domínio poli-

peptídeo que facilitará a purificação de proteínas solúveis.

Em adição a métodos recombinantes de produção, polipeptídeos de fusão da invenção, e seus fragmentos, podem ser produzidos por síntese direta de peptídeos utilizando-se técnicas de fase sólida (Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* 85:2149-2154 (1963)). Síntese de proteínas podem ser realizadas utilizando-se técnicas manuais ou por automação. Sínteses automatizadas podem ser alcançadas, por exemplo, utilizando-se Applied Biosystems 431A Sintetizador de Peptídeos (Perkin Elmer). Alternativamente, vários fragmentos, por exemplo, dois ou mais fragmentos antigênicos/imunogênicos dos antígenos de *Leishmania* K26, K39 e/ou K9, podem ser sintetizados quimicamente separadamente e combinados utilizando-se métodos químicos para produzir a molécula de comprimento total.

MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO E KITS

Em outro aspecto, esta invenção provê compostos e métodos para detecção de leishmaniose em indivíduos e em fornecimento de sangue. Em uma modalidade particular, o indivíduo é um mamífero. Em uma modalidade mais particular o mamífero é humano ou canino.

Em um aspecto, são providos métodos para detecção de leishmaniose visceral assintomática ou sub clínica em uma amostra biológica, compreendendo: (a) contatando uma amostra biológica com um polipeptídeo de fusão como aqui descrito, por exemplo, compreendendo pelo menos dois antígenos heterólogos de *Leishmania*, onde os antígenos de *Leishmania* são selecionados de K39, K26, e/ou K9 ou sua variante que difere apenas em substituições e/ou modificações conservadoras; e (b) detecção na amostra biológica da presença de anticorpos que ligam ao polipeptídeo de fusão, assim detectando infecções de *Leishmania* viscerais assintomáticas ou sub clínicas na amostra biológica.

Em um aspecto particular, a presente invenção provê métodos para detecção de leishmaniose visceral assintomática ou sub clínica em uma amostra biológica, compreendendo: (a) contatando uma amostra biológica com um polipeptídeo de fusão como aqui descrito, por exemplo, compreendendo pelo menos dois antígenos heterólogos de *Leishmania*, onde o antígeno de *Leishmania* é selecionado a partir de sequências polipeptídicas K39, K26 e/ou K9 de acordo com qualquer uma da SEQ ID Nos: 5-7, e 9-11, em qualquer combinação, ou uma variante que difere apenas em substituições e/ou modificações conservadoras; e (b) detectar na amostra biológica a presença de anticorpos que ligam ao polipeptídeo, assim detectando infecção visceral por *Leishmania* assintomáticas ou sub clínicas na amostra biológica. Em modalidades relacionadas, pelo menos um dos antígenos de *Leishmania* K26, K39 e k9 é da espécie *Leishmania donovani*.

Em certos aspectos, a presente invenção provê métodos para detecção de infecção visceral de *Leishmania* em amostras biológicas, compreendendo: (a) contatar uma amostra biológica com um polipeptídeo de fusão como aqui descrito, por exemplo, incluindo pelo me-

nos dois antígenos heterólogos de *Leishmania*, onde a proteína de fusão compreende a sequência de aminoácido revelada em SEQ ID NO: 8 ou aminoácidos 10-262 da SEQ IN NO: 8 ou suas variantes que diferem apenas em substituições e/ou modificações conservadas; e (b) detectar na amostra biológica a presença de anticorpos que ligam ao polipeptídeo, assim detectando infecção visceral por *Leishmania* na amostra biológica.

Em ainda outro aspecto relacionado, métodos são providos para identificar um paciente afligido com leishmaniose visceral assintomática ou sub clínica suscetível a desenvolver leishmaniose visceral aguda. Em uma modalidade, o método compreende: (a) contatar uma amostra biológica obtida de um paciente afligido com leishmaniose visceral assintomática ou sub clínica com um polipeptídeo de fusão como aqui descrito, por exemplo, compreendendo pelo menos dois antígenos heterólogos de *Leishmania*, onde os antígenos de *Leishmania* são selecionados de K39, K26 e/ou K9, ou suas variantes que diferem apenas em substituições e/ou modificação conservadoras; (b) detectar na amostra biológica obtida do paciente a presença de anticorpos que ligam ao polipeptídeo de fusão na etapa (a), assim identificando um paciente afligido com leishmaniose visceral assintomática ou sub clínica suscetível a desenvolver leishmaniose visceral aguda (LV).

Dentro de aspectos relacionados, kits de diagnóstico para diagnóstico de leishmaniose são providos. Em uma modalidade, por exemplo, existem kits providos para detecção de leishmaniose visceral em amostras biológicas, compreendendo: (a) um polipeptídeo de fusão como aqui descrito, por exemplo, compreendendo pelo menos dois antígenos heterólogos de *Leishmania*, onde antígenos *Leishmania* são selecionados de K39, K26 e/ou K9 ou suas variantes que diferem apenas em substituições e/ou modificações conservadoras; e (b) detectando na amostra biológica a presença de anticorpos que ligam ao polipeptídeo, assim detectando leishmaniose visceral na amostra biológica.

Em ainda outro aspecto relacionado, métodos são providos para identificar um paciente afligido com leishmaniose visceral assintomática ou sub clínica suscetível a desenvolver leishmaniose visceral aguda. Em outra modalidade, o método compreende: (a) contatar amostra biológica obtida de paciente afligido com leishmaniose visceral assintomática ou sub clínica com um polipeptídeo de fusão como aqui descrito, por exemplo, compreendendo pelo menos dois antígenos heterólogos de *Leishmania*, onde os antígenos de *Leishmania* são selecionados de sequências de polipeptídeo K39, K26 e/ou K9 de acordo com qualquer das SEQ ID NOs: 5-7 E 9-11, em qualquer combinação, ou suas variantes que diferem apenas em substituições e/ou modificações conservadoras; e (b) detectar na amostra biológica obtida de um paciente a presença de anticorpos que ligam ao polipeptídeo de fusão na etapa (a), assim identificando um paciente afligido com leishmaniose visceral assintomática ou sub clínica suscetível a desenvolver leishmaniose visceral aguda (LV).

Dentro de aspectos relacionados, kits de diagnóstico para diagnóstico de leishma-

niose são fornecidos. Em uma modalidade, existem kits providos para detecção de leishmaniose visceral em amostras biológicas, compreendendo: (a) um polipeptídeo de fusão como aqui descrito, por exemplo, compreendendo pelo menos dois antígenos heterólogos de *Leishmania*, onde os anígenos de *Leishmania* são selecionados de sequências de polipeptídeos K39, K26 e/ou K9 de acordo com qualquer uma das SEQ ID NOs: 5-7 e 9-11, em qualquer combinação, ou sua variante que difere apenas em substituições e/ou modificações conservadoras; ou uma variante que difere apenas em substituições e/ou modificações conservadoras; e (b) detectando na amostra biológica a presença de anticorpos que ligam ao polipeptídeo detectando assim a leishmaniose visceral na amostra biológica.

Em ainda outro aspecto relacionado, métodos são providos para identificar um paciente afligido com leishmaniose visceral assintomática ou sub clínica suscetível a desenvolver leishmaniose visceral aguda. Em uma modalidade, o método compreende: (a) contatar uma amostra biológica obtida de um paciente afligido com leishmaniose assintomática ou sub clínica com um polipeptídeo de fusão como aqui descrito, por exemplo, compreendendo pelo menos dois antígenos heterólogos de *Leishmania*, onde a proteína de fusão compreende a sequência de aminoácido revelada em SEQ ID NO: 8 ou aminoácidos 10-262 da SEQ ID NO: 8, ou suas variantes que diferem apenas em substituições e/ou modificações conservadas; e (b) detectando na amostra biológica a presença de anticorpos que ligam ao polipeptídeo, assim detectando leishmaniose visceral na amostra biológica.

Dentro de aspectos relacionados, kits de diagnóstico para diagnóstico de leishmaniose são providos. Em uma modalidade, são providos kits para detecção de leishmaniose visceral em uma amostra biológica, compreendendo: (a) um polipeptídeo de fusão como aqui descrito, por exemplo, compreendendo pelo menos dois antígenos heterólogos de *Leishmania*, onde a proteína de fusão inclui a sequência de aminoácido revelada em SEQ ID NO: 8 ou aminoácido 10-262 da SEQ ID NO: 8, ou suas variantes que diferem apenas em substituições e/ou modificações conservadoras; e (b) detectando na amostra biológica a presença de anticorpos que ligam ao polipeptídeo, detectando assim leishmaniose visceral na amostra biológica.

Em outro aspecto desta invenção, métodos são revelados para detecção e monitoramento de infecção *Leishmania*, bem como para se distinguir entre tipos de infecções de *Leishmania*, em indivíduos e fornecimento de sangue. Em geral, a infecção de *Leishmania* pode ser detectada em qualquer amostra biológica que contenha anticorpos. Preferivelmente, a amostra é sangue, soro, plasma, saliva, fluido cefalorraquidiano, fezes e urina. Mais preferivelmente, a amostra é sangue ou amostra de soro obtida de um paciente ou de fornecimento de sangue.

Em outro aspecto, a infecção de *Leishmania* pode ser detectada utilizando-se um polipeptídeo de fusão compreendendo dois ou mais polipeptídeos contendo um ou mais dos

epítomos discutidos acima, repetições, ou suas variantes. Se múltiplos epítomos são empregados, estes epítomos podem estar presentes em um ou mais antígenos de *Leishmania*. Por exemplo, em um aspecto, o polipeptídeo de fusão da presente invenção compreende dois ou mais polipeptídeos antigênicos K26, K39 e/ou K9. O polipeptídeo de fusão é então utilizado para determinar a presença ou ausência de anticorpos para o mesmo polipeptídeo antigênico na amostra, relativo ao valor de corte pré-determinado.

Existem uma variedade de formatos de ensaios conhecidos pelos versados na técnica utilizando um polipeptídeo de fusão para detectar anticorpos na amostra. *Veja, por exemplo*, Harlow e Lane, *Antibodies. A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988, o qual é incorporado aqui por referência. Em uma modalidade preferida, o ensaio envolve o uso de polipeptídeo de fusão imobilizado num suporte sólido para ligar e remover o anticorpo da amostra. A ligação do anticorpo pode ser detectada utilizando-se um reagente de detecção que se liga ao complexo do anticorpo/peptídeo e contém grupos repórter detectável. Reagentes de detecção adequados incluem anticorpos que se ligam ao complexo do anticorpo/peptídeo e polipeptídeos livres marcados com um grupo repórter. *(por exemplo*, em um ensaio semi competitivo). Grupos repórteres adequados incluem marcadores fluorescentes, marcadores enzimáticos, radioisótopos, marcadores quimioluminescentes, marcadores eletroquimioluminescentes, marcadores bioluminescentes, polímeros, partículas poliméricas, partículas de metal, haptenos e corantes. Alternativamente, um ensaio competitivo pode ser utilizado, no qual um anticorpo que liga a um polipeptídeo de fusão da presente invenção marcada com um grupo repórter e permitido a ligar-se ao polipeptídeo de fusão imobilizado depois da incubação do polipeptídeo de fusão com a amostra. A extensão a qual os componentes da amostra inibem a ligação do anticorpo marcado ao polipeptídeo de fusão é indicativa da reatividade da amostra com o polipeptídeo de fusão imobilizado.

O suporte sólido pode ser de qualquer material conhecido pelos versados na técnica ao qual o polipeptídeo de fusão deve ser anexado. Por exemplo, o suporte pode ser um poço teste em uma placa de microtitulação, ou uma membrana de nitrocelulose, ou outra membrana adequada. Alternativamente, o suporte pode ser uma esfera ou um disco, tal como vidro, fibra de vidro, látex, ou material plástico tal como poliestireno ou polivinilcloreto. O suporte pode também ser uma partícula magnética ou sensor de fibra óptica, tais como aqueles revelados, por exemplo, na Pat. Dos EUA No. 5.359.681.

O polipeptídeo de fusão pode estar ligado ao suporte sólido utilizando uma variedade de técnicas bem conhecidas na técnica, as quais são amplamente descritas na patente e na literatura científica. No contexto da presente invenção, o termo "ligado" se refere a ambas associações não covalentes, tais como adsorção e ligações covalente (as quais podem estar ligadas direto entre o antígeno e os grupos funcionais no suporte, ou podem estar ligadas

por meio de um agente de ligação cruzada). Ligação por adsorção a um poço em uma placa de microtitulação ou a uma membrana é preferido. Em tais casos, adsorção pode ser conseguida por em contato o polipeptídeo, em um tampão adequado, com o suporte sólido por uma quantidade adequada de tempo. O tempo de contato varia com a temperatura, mas
 5 está tipicamente entre 1 hora e 1 dia. Em geral, contatar um poço de placa de microtitulação de plástico (tal como poliestireno ou polivinilcloreto) com uma quantidade de polipeptídeo de fusão variando de cerca de 10 ng a cerca de 1 µg, e preferivelmente cerca de 100 ng, é suficiente para ligar uma quantidade adequada de antígeno. Nitrocelulose ligará aproximadamente 100 µg de proteína por cm³.

10 Ligação covalente do polipeptídeo de fusão a um suporte sólido pode geralmente ser alcançado por primeiro reagir o suporte com um reagente bifuncional que irá reagir a ambos, suporte e grupo funcional, tais como hidroxila ou grupo amina, no polipeptídeo de fusão. Por exemplo, o polipeptídeo de fusão pode ser ligado a um suporte tendo um revestimento de polímero apropriado utilizando benzoquinona ou por condensação de um grupo
 15 aldeído no suporte com uma amina e um hidrogênio ativo no polipeptídeo (*veja, por exemplo*, Pierce Immunotechnology Catalog and Handbook (1991) em A12-A13).

Em certas modalidades, o ensaio é uma enzima ligada a um ensaio imunoenzimático (ELISA). Este ensaio pode ser realizado por primeiro contatar o polipeptídeo de fusão da presente invenção que tenha sido imobilizado em um suporte sólido, comumente o poço de
 20 placa de microtitulação, com a amostra, tais que os anticorpos aos antígenos de *Leishmania* do polipeptídeo de fusão dentro da amostra são permitidos a ligar-se ao polipeptídeo de fusão imobilizado. A amostra não ligada é então removida do polipeptídeo de fusão imobilizado e um reagente de detecção capaz de ligar aos complexo polipeptídeo-anticorpo imobilizado é adicionado. A quantidade de reagentes de detecção que permanecem ligados ao
 25 suporte sólido é então determinada utilizando-se um método apropriado para a detecção específica do reagente.

Uma vez que o polipeptídeo de fusão é imobilizado no suporte, os sítios de ligação da proteína remanescentes no suporte são tipicamente bloqueados. Qualquer agente bloqueador adequado conhecido pelos versados na técnica, tais como albumina bovina sérica
 30 (BSA) ou Tween 20® (Sigma Chemical Co. St. Louis, Mo.) podem ser empregados. O polipeptídeo imobilizado é então incubado com a amostra, e o anticorpo (se presente na amostra) é permitido ligar-se ao antígeno. A amostra deve ser diluída com diluente adequado, tal como solução salina tamponada com fosfato (PBS) antes da incubação. Em geral, o tempo de contato apropriado (*por exemplo*, tempo de incubação) é aquele período de tempo que é
 35 suficiente para permitir a detecção da presença de anticorpo dentro da amostra infectada por *Leishmania*. Preferivelmente, o tempo de contato é suficiente para se atingir um nível de ligação que é pelo menos 95% do atingido no equilíbrio entre anticorpo ligado e não ligado.

Aqueles versados na técnica reconhecerão que o tempo necessário para se atingir o equilíbrio pode ser facilmente determinado por ensaio de nível de ligação que ocorre após um período de tempo. Na temperatura ambiente, um tempo de incubação de cerca de 30 minutos é geralmente suficiente.

5 Amostra não vinculada pode então ser removida através da lavagem do suporte sólido com um tampão apropriado, tal como PBS contendo 0.1% Tween 20®. O reagente de detecção pode então ser adicionado ao suporte sólido. Um reagente de detecção apropriado é qualquer composto que se liga ao complexo de polipeptídeo-anticorpo imobilizado e que
10 na técnica. Preferivelmente, o reagente de detecção contém um agente de ligação (tais como, por exemplo, Proteína A, Proteína G, imunoglobulina, lectina, ou antígeno livre) conjugado ao um grupo repórter. Grupos repórteres preferidos incluem enzimas (tais como peroxidase de rábado silvestre), substratos, cofatores, inibidores, corantes, radionuclídeos, grupos luminescentes, grupos fluorescentes e biotina. A conjugação de um agente de ligação a
15 um grupo repórter pode ser alcançada utilizando-se métodos padrões conhecidos por aqueles versados na técnica. Agentes de ligação comuns podem também ser comprados conjugados a um a variedade de grupos repórteres de várias fontes (*por exemplo*, Zymed Laboratories, San Francisco, Calif. e Pierce, Rockford, Ill.).

O reagente de detecção é então incubado com o complexo polipeptídeo-anticorpo
20 imobilizado por uma quantidade de tempo suficiente para detectar a ligação do anticorpo. Uma quantidade de tempo apropriada pode geralmente ser determinada pelas instruções do fabricante, ou por ensaios do nível de ligação que ocorre acima de um período de tempo. Reagente de detecção não ligado é então removido e o reagente de detecção ligado é detectado utilizando-se o grupo repórter. O método empregado para detecção do grupo repórter
25 depende da natureza do grupo repórter. Para grupos radioativos, métodos de contagem de cintilação ou auto radiográficos são geralmente apropriados. Métodos pectroscópicos podem ser utilizados detectar corantes, grupos luminescentes e grupos fluorescentes. Biotina pode ser detectada utilizando-se avidina acoplada a um grupo repórter diferente (comumente um grupo radioativo ou fluorescente ou uma enzima). Grupos repórteres de enzima
30 podem ser geralmente detectados pela adição de substrato (em geral para um período de tempo específico), seguido por análise espectral ou outras análises de produtos de reação.

Para determinar a presença ou ausência de anticorpos anti-*Leishmania* na amostra, o sinal detectado pelo grupo repórter que permanece ligado ao suporte sólido é geralmente
35 comparado a um sinal que corresponde a um valor de corte pré determinado. Em uma modalidade preferencial, o valor de corte é preferivelmente a média do sinal médio obtido quando o polipeptídeo imobilizado é incubado com amostras de pacientes não infectados.

Em geral, a amostra gerando um sinal que tem três desvios-padrão acima do valor de corte pré determinado é considerado positivo (*por exemplo*, reativo com o polipeptídeo). Em uma modalidade preferida alternada, o valor de corte é determinado utilizando uma Curva Operadora Receptora, de acordo com o método de Sackett et al, Clinical Epidemiology: A Basic Science for Clinical Medicine, p. 106-7 (Little Brown e Co., 1985). Brevemente, nesta modalidade, o valor de corte pode ser determinado de um gráfico de pares de taxas positivas verdadeiras (*isto é*, sensibilidade) e taxas falso positivas (100% especificamente) que correspondem a cada valor de corte possível para o resultado do teste de diagnóstico. O valor de corte nos gráficos é o mais próximo ao canto esquerdo superior (*isto é*, o valor que anexa a maior área), é o valor de corte mais preciso, e uma amostra gerando sinal maior que o valor de corte determinado por esse método pode ser considerado positivo. Alternativamente, o valor de corte pode ser deslocado para a esquerda ao longo do gráfico, para minimizar as taxas falsas positivas, ou para a direita para minimizar as taxas de falsos negativos.

Em uma modalidade relacionada, o ensaio é realizado em um formato de escoamento ou teste de tira, onde o antígeno é imobilizado em uma membrana tal como nitrocelulose. No teste de escoamento, anticorpos dentro da ligação da amostra se ligam ao polipeptídeo imobilizado a medida que a amostra passa pela membrana. Um reagente de detecção (*por exemplo*, Proteína A - ouro coloidal) então liga-se ao complexo polipeptídeo-anticorpo a medida que a solução contendo reagentes de detecção escoa pela membrana. A detecção do reagente de detecção vinculado pode então ser realizado como descrito acima. No teste em formato de tira, uma terminação da membrana ao qual o polipeptídeo é ligado é imersa em uma solução contendo a amostra. A amostra migra ao longo da membrana através da região contendo o reagente de detecção e à área do polipeptídeo de fusão imobilizado. A concentração de reagente de detecção no polipeptídeo de fusão indica a presença de anticorpos contra *Leishmania* na amostra. Tipicamente, a concentração de reagente de detecção naquele local gera um padrão, como uma linha, que pode ser lida visualmente. A ausência de tal padrão indica resultado negativo. No geral a quantidade de polipeptídeos de fusão imobilizados na membrana é selecionada para gerar padrões de discernimento visuais quando a amostra biológica contém um nível de anticorpos que seriam suficientes para gerar um sinal positivo em um ELISA, como discutido acima. Preferivelmente, uma quantidade de polipeptídeo de fusão imobilizado na membrana varia de cerca de 25 ng a cerca de 1µg, e mais preferivelmente de cerca de 50 ng a cerca de 500 ng. Tais testes podem tipicamente ser realizados com uma quantidade muito pequena (*por exemplo*, uma gota) de soro ou sangue de paciente.

Claro que numerosos outros protocolos de ensaios são adequados para uso com o polipeptídeo de fusão da presente invenção existem. As descrições acima têm intenção apenas de exemplificar.

Em um aspecto da invenção, o ensaio discutido acima pode ser utilizado para especificamente detectar leishmaniose visceral. Neste aspecto, anticorpos na amostra podem ser detectados utilizando-se polipeptídeos de fusão compreendendo a sequência de aminoácido de dois ou mais fragmentos antígenos/imunogênicos ou epítomos de um antígeno de *Leishmania* K26, K39 e/ou K9. Em outro aspecto, anticorpos na amostra podem ser detectados utilizando-se um polipeptídeo de fusão compreendendo a sequência de aminoácido de dois ou mais fragmentos imunogênicos ou epítomos como revelado em qualquer uma das SEQ ID NOs: 5-7 e 9-11. Em outro aspecto, anticorpos na amostra podem ser detectados utilizando-se polipeptídeos de fusão compreendendo a sequência de aminoácido revelada na SEQ ID NO: 8 ou aminoácidos 10-262 da SEQ ID NO: 8. Preferivelmente, os antígenos de *Leishmania* são imobilizados por adsorção a um suporte sólido tal como um poço de placas de microtítulos ou uma membrana, como descrito acima, em quantidades aproximadamente similares tais que a quantidade total de polipeptídeo de fusão em contato com o suporte varia de certa de 10 ng a cerca de 100 µg. O restante das etapas no ensaio pode geralmente ser realizada como descrito acima. Será facilmente aparente para aqueles versados na técnica que, combinando polipeptídeos aqui descritos com outros polipeptídeos que podem detectar leishmanioses cutâneas e de mucosa, os polipeptídeos revelados aqui podem ser utilizados em métodos que detectam todos os tipos de leishmaniose.

Em outro aspecto na invenção, pacientes com LV assintomática ou sub clínica de quem a doença é suscetível a progredir para leishmaniose visceral aguda pode ser distinguido de pacientes infectados de quem a doença não é suscetível a essa progressão. Tal progressão pode ocorrer dentro de um ano (e tipicamente de 5 a 12 meses) para doenças sub clínicas, ou dentro de muitos anos nos casos de pacientes assintomáticos. Essa determinação pode ser feita utilizando-se várias abordagens. Em uma modalidade, o ensaio é realizado utilizando-se um polipeptídeo aqui descrito, por exemplo, que compreende pelo menos uma unidade repetida do antígeno K39, como revelado em SEQ ID NOs: 6, 10, ou 11, por exemplo. Em uma modalidade relacionada, o polipeptídeo compreende uma unidade de antígeno repetida K39 codificada pela sequência de polinucleotídeo recitada em SEQ ID NOs: 2, 14 ou 15. Enquanto uma unidade de antígeno repetido K39 gera um resultado positivo (relativo ao valor de corte pré determinado) quando reagido com soro de mais de 97% dos pacientes com leishmaniose visceral aguda, pacientes com leishmaniose assintomática reagem muito fracamente, se reagem, com esse antígeno. Aqueles soros que reagem fracamente são suscetíveis a indicar infecções que estão nos processos de progressão, ou estão suscetíveis a progredir, a leishmaniose visceral aguda (ou infecções que estão em remissão ou respondendo a tratamento, o que pode ser distinguido baseando-se na história do paciente).

Em outra modalidade, o ensaio é separadamente realizado com um polipeptídeo de

fusão da invenção, por exemplo, compreendendo a sequência de aminoácido de dois ou mais fragmentos antigênicos/imunogênicos ou epítomos de um antígeno de *Leishmania* K26, K39 e/ou K9, tal como K28 por exemplo, e com um polipeptídeo que compreende pelo menos uma unidade repetida de antígeno K39. Nesta modalidade, a densidade óptica (DO) obtida no ensaio utilizando-se o polipeptídeo de fusão K28 é comparada ao valor obtido utilizando-se o polipeptídeo K39. Uma DO significativamente maior no ensaio utilizando-se o polipeptídeo de fusão K28, quando comparado com a DO no ensaio utilizando o polipeptídeo K39 indica uma detecção mais robusta e confiável de uma infecção LV assintomática ou sub clínica. Aqueles pacientes assintomáticos ou sub clínicos para quem ambos os valores são relativamente altos são suscetíveis ao processo de desenvolvimento de leishmaniose visceral aguda (ou no processo de recuperação da infecção). Em outro aspecto, o ensaio é separadamente realizado com um polipeptídeo de fusão compreendendo a sequência de aminoácido de dois ou mais fragmentos imunogênicos ou epítomos como revelado em qualquer das SEQ ID NOs: 5-7 e 9-11 e com um polipeptídeo que compreende pelo menos uma unidade de repetição de um antígeno K39. Em outro aspecto, o ensaio é separadamente realizado com um polipeptídeo de fusão compreendendo a sequência de aminoácido revelada em SEQ ID NO: 8 ou aminoácido 10-262 da SEQ ID NO: 8 e com um polipeptídeo que compreende pelo menos uma unidade de repetição antígeno K39.

Em outra modalidade, pacientes assintomáticos ou sub clínicos que são suscetíveis a desenvolver leishmaniose visceral aguda podem ser identificados utilizando-se polipeptídeos de fusão separados (*por exemplo*, K28) e ensaios de polipeptídeos K39 (como descrito acima) que são realizados por um período de tempo. Por exemplo, os ensaios podem ser realizados a cada 1, 2, 3, 4, 5 ou 6 meses por um período de meses ou anos. Pacientes assintomáticos ou sub clínicos que são suscetíveis a permanecerem assintomáticos ou subclínicos irão geralmente ter soro que mostra uma reatividade alta com K28 e baixa reatividade com o polipeptídeo K39, como discutido acima, a cada ponto de tempo. Entretanto, pacientes que estão progredindo em direção a leishmaniose visceral aguda mostrarão um aumento na reatividade de ambos os peptídeos K28 e K39 durante o período de tempo dos ensaios. Monitorando um paciente individual desta maneira, o desenvolvimento de leishmaniose visceral aguda pode ser identificado antes que outros sintomas se tornem aparentes. Essa identificação precoce permite tratamento seletivo apenas daqueles pacientes assintomáticos pré dispostos a desenvolver formas mais sérias de doença.

Em outro aspecto desta invenção, polipeptídeos de fusão imobilizados podem ser utilizados para purificar anticorpos que se ligam respectivamente. Tais anticorpos podem ser preparados por qualquer uma das variedades de técnicas conhecidas pelos versados na técnica. *Veja, por exemplo*, Harlow e Land, *Antibodies. A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988. Em uma destas técnicas, um imunógeno compreendendo

um polipeptídeo de fusão da presente invenção é inicialmente injetado em qualquer um de uma ampla variedade de mamíferos (*por exemplo*, camundongos, ratos, coelhos, ovelhas e caprinos). Nesta etapa, o polipeptídeo pode servir de imunógeno sem modificação. Alternativamente, particularmente para polipeptídeos relativamente pequenos, uma resposta imune superior pode ser eliciada se o polipeptídeo estiver ligado em uma proteína transportadora, tais como albumina de soro bovino ou “*keyhole limpet*” hemocianina. O imunógeno é injetado no animal hospedeiro, preferivelmente de acordo com um cronograma pré-determinado incorporando um ou mais reforços de imunizações, e os animais são sangrados periodicamente. Anticorpos policlonais específicos para os polipeptídeos podem então ser purificados a partir de tais soros por, por exemplo, afinidade cromatográfica utilizando o polipeptídeo acoplado a um suporte sólido adequado.

Anticorpos monoclonais específicos para os polipeptídeos de fusão antigênicos de interesse podem ser preparados, por exemplo, utilizando-se a técnica de Kohler e Milstein, *Eur. J. Immunol.* 6:511-519, 1976, e melhoramentos da mesma. Brevemente, estes métodos envolvem a preparação de linhagens celulares imortais capazes de produzir anticorpos tendo especificidade desejada (*isto é*, reatividade com o polipeptídeo de interesse). Tais células podem ser produzidas, por exemplo, a partir de células do baço obtidas de um animal imunizado, como descrito acima. As células do baço são imortalizadas por, por exemplo, fusão com uma célula mieloma de fusão parceira, preferivelmente uma que seja singênea com o animal imunizado. Uma variedade de técnicas de fusão podem ser empregadas. Por exemplo, as células do baço e as células mielomas podem ser combinadas com um detergente não iônico por alguns minutos e depois plaqueadas em baixa densidade em um meio seletivo que suporta o crescimento de células híbridas, mas não células de mielomas. Uma técnica de seleção preferida utiliza seleção HAT (hipoxantina, aminopterina, timidina). Depois de um tempo suficiente, geralmente cerca de 1 a 2 semanas, colônias de híbridos são observadas. Colônias únicas são selecionadas e testadas para atividades de ligação de polipeptídeos. Hibridomas tendo alta reatividade e especificidade são preferidos.

Anticorpos monoclonais podem ser isolados a partir de sobrenadantes do crescimento de colônias hibridomas. Neste processo, várias técnicas podem ser empregadas para potencializar a produção, tais como injeção da linhagem celular hibridomas na cavidade peritoneal de um hospedeiro vertebrado adequado, tal como um camundongo. Anticorpos monoclonais podem então ser coletados dos fluidos ascite ou do sangue. Contaminantes podem ser removidos dos anticorpos por técnicas convencionais, como cromatografia, filtração em gel, precipitação e extração. Um ou mais polipeptídeos podem ser utilizados nos processos de purificação em, por exemplo, uma etapa de cromatográfica afinidade.

Anticorpos mono-específicos que ligam-se a um polipeptídeo de fusão compreendendo duas ou mais porções imunogênicas de antígenos de *Leishmania* K26, K39 e/ou K9

podem ser usados, por exemplo, para detectar infecções de *Leishmania* em uma amostra biológica usando uma de uma variedade de imunoensaios, os quais podem ser diretos ou competitivos. Brevemente, em um ensaio de formato direto, um anticorpo monoespecífico pode ser imobilizado em um suporte sólido (como descrito acima) e contatado com a amostra a ser testada. Depois da remoção de uma amostra não ligada, um segundo anticorpo monoespecífico, o qual foi marcado com um grupo repórter, pode ser adicionado e usado para detectar a ligação antigênica. Em um ensaio competitivo exemplar, a amostra pode ser combinada com o anticorpo monoclonal ou policlonal, o qual tem sido marcado com um grupo repórter adequado. A mistura de amostras e anticorpos pode então ser combinada com o antígeno polipeptídico imobilizado em um suporte sólido adequado. O anticorpo que não foi ligado a um antígeno na amostra é permitido se ligar ao antígeno imobilizado e o restante da amostra e de anticorpo são removidos. O nível de ligação de anticorpo ao suporte sólido é inversamente relacionado ao nível de antígeno na amostra. Então, um nível mais baixo de ligação ao anticorpo ao suporte sólido indica a presença de *Leishmania* na amostra. Outros formatos para utilização de anticorpos monoespecíficos para detectar *Leishmania* nas amostras serão aparentes àqueles versados na técnica, e os formatos acima são providos apenas para propósito de exemplo.

COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS E VACINA

Em outro aspecto, a presente invenção diz respeito a formulações de um ou mais polinucleotídeos, polipeptídeos de fusão ou outras composições reveladas aqui em soluções farmacêuticamente aceitáveis e fisiologicamente aceitáveis para administração a uma célula ou um animal, tanto sozinho quanto em combinação com uma ou mais modalidades de terapia. Tais composições farmacêuticas são particularmente preferidas para uso como vacinas quando formuladas com sistema imunoestimulante/adjuvante. As composições são também adequadas para uso em contexto de diagnóstico.

Também será entendido que, se desejado, as composições da invenção podem ser administradas em combinação com outros agentes também, tais como, *por exemplo*, outras proteínas ou polipeptídeos ou vários agentes farmacêuticamente ativos. Não há limites virtuais para outros componentes que podem também ser incluídos, provido que os agentes adicionais não causam efeito adverso significativo nos objetivos de acordo com a invenção.

Em certas modalidades, as composições da invenção são usadas como vacinas e são formuladas em combinação com um ou mais imunoestimulantes. Um imunoestimulante pode ser qualquer substância que aumenta ou potencializa uma resposta imune, (anticorpo e/ou mediada por célula) a um antígeno exógeno. Exemplos de imunoestimulantes incluem adjuvantes, microesferas biodegradáveis (*por exemplo*, galactídeo polilático) e lipossomas (dentro dos quais o composto é incorporado; veja, *por exemplo*, Fullerton, Pat. Dos EUA No. 4.235.877). Preparação de vacina é geralmente descrita em, *por exemplo*, Powell &

Newman, Eds. Vaccine Design (the subunit and adjuvant approach) (1995).

Qualquer dos vários imunoestimulantes podem ser empregados nas vacinas desta invenção. Por exemplo, um adjuvante pode ser incluído. Muitos adjuvantes contêm uma substância desenhada para proteger o antígeno do catabolismo rápido, tal como hidróxido de alumínio ou óleo mineral, e um estimulador de respostas imunes, como lipídio A (natural ou sintético), espécies *Bordetella pertussis* ou proteínas derivadas de *Mycobacterium*. Adjuvantes adequados são comercialmente disponíveis como, por exemplo, Adjuvante Completo e Incompleto do Freund (Difco Laboratories, Detroit, Mich.); Adjuvante Merck 65 (Merck and Company, Inc. Rahway, N. J.); AS-2 e seus derivados (SmithKline Beecham, Philadelphia, Pa); CWS, TDM, Leif, sais alumínios tais como gel hidróxido de alumínio (alúmen) ou fosfato de alumínio; sais de cálcio, ferro ou zinco; uma suspensão insolúvel de tirosina acilado; açúcar acilado; polissacarídeos derivados cationicamente ou anionicamente ; polifosfatos; microesferas biodegradáveis; monofosforil lipídio A e quil A. Citocinas, tais como GM-CSF ou interleucina-2, -7, ou -12, podem também ser utilizadas com adjuvantes.

Outros adjuvantes ilustrativos úteis no contexto da invenção incluem agonistas do receptor do tipo Toll, tal como agonistas TLR7, agonistas TLR7/8, e semelhantes. Ainda outros adjuvantes ilustrativos incluem imiquimod, gardiquimod e resiquimod e compostos relacionados.

Certas vacinas empregam sistemas adjuvantes desenhados para induzir uma resposta imune predominantemente do tipo Th1. Altos níveis de citocina tipo Th1 (*por exemplo*, IFN- γ , TNF- α , IL-2 e IL-12) tendem a favorecer a indução da respostas imunes mediada por célula a um antígeno administrado. Em contraste, altos níveis de citocina tipo Th2 (*por exemplo*, IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10) tendem a favorecer a indução de respostas imunes humoral. Seguindo a aplicação de uma vacina como aqui provido, um paciente irá suportar uma resposta imune que inclui respostas tipo Th1 e Th2. Dentro da modalidade, em que a resposta é predominantemente tipo Th1, o nível de citocina tipo Th1 aumentará a uma extensão melhor que o nível de citocina tipo Th2. Os níveis destas citocinas podem ser prontamente acessados usando ensaios padrão. Para uma revisão das famílias de citocinas, veja Mossman & Coffman, *Ann. Rev. Immunol.* 7:145-173 (1989).

Certos adjuvantes para uso em elicitar uma resposta predominantemente do tipo Th1 inclui, por exemplo, uma combinação de monofosforil lipídio A, preferivelmente monofosforil lipídio 3-de-O-acilados A (3D-MPL[®]), juntos com um sal alumínio (Pat. Dos EUA Nos. 4.436.727; 4.877.611; 4.866.034; e 4.912.094). Oligonucleotídeos contendo CpG (nos quais o CpG dinucleotídeo é não metilado) também induz uma resposta predominantemente Th1. Tais oligonucleotídeos são bem conhecidos e são descritos, por exemplo, em WO 96/02555, WO 99/33488 e Pat. dos EUA Nos. 6.008.200 e 5.856.462. Sequências DNA imunoestimulatórias também são descritas, por exemplo, por Sato et al, *Science* 273:352 (1996). Outro

adjuvante ilustrativo inclui uma saponina tal como Quil A, ou seus derivados, incluindo QS21 e QS7, Aquila Biofarmacêutica Inc. Framingham, Mass.); Escina; Digitonina; ou *Gypsophila* ou *Chenopodium quinoa*. Outras formulações ilustrativas incluem mais de uma saponina nas combinações adjuvantes da presente invenção, por exemplo, combinações de pelo menos dois dos seguintes grupos incluindo QS21, QS7, Quil A, escina, ou digitonina.

Em uma modalidade, o sistema adjuvante inclui a combinação de um lipídio A monofosforil e uma saponina derivada, tal como a combinação de QS21 e 3D-MPL[®]. Adjuvante, como descrito em WO 94/00153, ou uma composição menos reatogênica onde o QS21 é extinto com colesterol, como descrito em WO 96/33739. Outras formulações compreendem uma emulsão de óleo em água e tocoferol. Outra formulação adjuvante empregando QS21, 3D-MPL[®] adjuvante e tocoferol em uma emulsão de óleo em água é descrita em WO 95/17210.

Outro sistema adjuvante aumentado envolve a combinação de um oligonucleotídeo contendo CpG e uma saponina derivada como revelado em WO 00/09159.

Outros adjuvantes ilustrativos incluem Montanida ISA 720 (Seppic, França), SAF (Chifron, Calif. Estados Unidos), ISCOMS (CSL), MF-59 (Chiron), as séries adjuvantes SBAS (por exemplo, SBAS-2, AS2', AS2'', SBAS-4, ou SBAS6, disponíveis por SmithKline Beecham, Rixensart, Bélgica), Detox, RC-529 (Corixa, Hamilton, Mont.) e outro aminoalquila glicosaminida 4-fosfato (AGPs), tais como aqueles descritos no pedido de patente pendente Ser. dos EUA Nos. 08/853.826 e 09/074.720 as revelações das quais estão aqui incorporadas por referências em suas totalidades, e adjuvante éter de polioxietileno tais como aqueles descritos em WO 99/52549A1.

Composições da invenção podem também, ou alternativamente, compreender células T específicas para um polipeptídeo de fusão de *Leishmania* como aqui descrito. Tais células podem geralmente ser preparadas *in vivo* ou *ex vivo*, usando-se procedimentos padrões. Por exemplo, células T podem ser isoladas a partir da medula óssea, sangue periférico ou uma fração da medula óssea ou sangue periférico de um paciente. Alternativamente, células T podem derivar de humanos relacionados e não relacionados, mamíferos não humanos, linhagens celulares ou culturas.

Células T podem ser estimuladas com um polipeptídeo de fusão compreendendo, duas ou mais porções imunogênicas de antígenos de *Leishmania* K26, K39 e/ou K9, polinucleotídeos codificando tal polipeptídeo de fusão, e/ou uma célula apresentadora de antígeno (APC) que expressa tal polipeptídeo de fusão. Tal estimulação é realizada sob condições e por um tempo suficiente para permitir a geração de células T que são específicas para o polipeptídeo de fusão. Preferivelmente, o polipeptídeo de fusão ou polinucleotídeo está presente dentro de um veículo de entrega, tal como uma microsfere, para facilitar a geração de células T específicas.

Células T são consideradas ser específicas para um polipeptídeo de fusão da invenção se células T proliferam especificamente, secretam citosina ou matam células alvo revestidas com o polipeptídeo ou expressando um gene codificando o polipeptídeo. As especificidades das células T podem ser avaliadas usando qualquer uma das variedades de técnicas padrão. Por exemplo, dentro de um ensaio de liberação de cromo ou ensaio de proliferação, um índice de estimulação de mais de duas vezes aumenta na lise e/ou proliferação, comparado com controles negativos, indicam especificidades de células T. Tais ensaios podem ser realizados, por exemplo, como descrito em Chen et al, *Cancer Res.* 54:1065-1070 (1994)). Alternativamente, a detecção da proliferação de células T pode ser conseguida por uma variedade de técnicas conhecidas. Por exemplo, proliferação de células T pode ser detectadas medindo-se um aumento na taxa de síntese de DNA (*por exemplo*, culturas de pulso-marcação de células T com timidina tritiada e medindo a quantidade de timidina tritiada incorporada ao DNA). O contato com um polipeptídeo da invenção (100ng/mL-100µg/mL, preferivelmente 200ng/mL-25µg/mL) por 3-7 dias deveria resultar em pelo menos um aumento de duas vezes na proliferação de células T. Contato como é descrito acima por 2-3 horas deve resultar em ativação das células T, como medido usando ensaios de citocina padrão nos quais um aumento de duas vezes no nível de liberação de citocina (*por exemplo*, TNFα ou IFN-γ) é indicativo de ativação de células T (veja Coligan et al, *Current Protocols in Immunology* vol.1 (1988)). Células T têm sido ativadas em resposta a um polipeptídeo de fusão, polinucleotídeo ou APC expressando polipeptídeo de fusão pode ser CD4+ e/ou CD8+. Proteínas específicas de células T podem ser expandidas usando técnicas padrões. Dentro de modalidades preferidas, as células T são derivadas de um paciente, um doador relacionado ou um doador não relacionado, e são administrados para o paciente seguindo simulação e expansão.

Na composição farmacêutica da invenção, formulação de excipientes farmacêuticamente aceitáveis e soluções de veículo são bem conhecidas para os versados na técnica, como é o desenvolvimento de dosagem adequadas e regimes de tratamento para uso de composições particulares aqui descritas em uma variedade de regimes de tratamento, incluindo, *por exemplo*, administração e formulação oral, parenteral, intravenosa, intranasal e intramuscular.

Em certas aplicações, as composições farmacêuticas aqui reveladas podem ser distribuídas via administração oral a um paciente. Como tal, estas composições podem ser formuladas com um diluente inerte ou com um transporte comestível assimilável, ou eles podem ser inclusos em cápsula gelatinosa com revestimento duro ou mole, ou eles podem ser comprimidos em comprimidos, ou eles podem ser incorporados diretamente com a comida da dieta.

Em certas circunstâncias será desejável distribuir as composições farmacêuticas

aqui reveladas parenteralmente, intravenosamente, intramuscularmente, ou até intraperitonealmente como descrito, por exemplo, na Pat. dos EUA No. 5.543.158; Pat. dos EUA No. 5.641.515 e Pat. dos EUA No. 5.399.363 (cada especificamente aqui incorporada por referência em sua totalidade). Soluções de compostos ativos como base livre ou sais farmacologicamente aceitáveis podem ser preparados em água devidamente misturada com um tensoativo, tal como hidroxipropilcelulose. Dispersões podem também ser preparadas em polietilenoglicóis líquidos e suas misturas e em óleos. Sob condições comuns de armazenamento e uso, essas preparações contêm um conservante para prevenir o crescimento de microorganismos.

10 As formas farmacêuticas adequadas por uso injetável incluem soluções aquosas estéreis ou dispersões e pós estéreis para a preparação extemporânea de soluções estéreis injetáveis ou dispersões (Pat. dos EUA No. 5.466.468, especificamente incorporada aqui por referência em sua totalidade). Em todos os casos a forma precisa ser esterilizada e deve ser fluído da medida que fácil seringabilidade existe. Ela deve ser estável sob as condições de

15 fabricação e armazenamento e deve ser conservada contra a ação contaminante de microorganismos tais como bactérias e fungos. O veículo pode ser um solvente ou dispersão média contendo, por exemplo, água, etanol, poliol, (*por exemplo*, glicerol, propileno glicol e polietileno glicol líquido e semelhantes), misturas adequadas dos mesmos e/ou óleos vegetais. Fluidez adequada pode ser mantida, por exemplo, pelo uso de revestimento, tal como lecitina, pela manutenção do tamanho da partícula requerido no caso de dispersão e pelo uso de tensoativos. A prevenção da ação de microorganismos pode ser facilitada por vários agentes antibacterianos e antifúngicos, por exemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal, e semelhantes. Em vários casos, será preferível incluir agentes isotônicos, por exemplo, açúcares ou cloreto de sódio. Absorção prolongada das composições injetáveis

20 podem ser trazida pelo uso na composição de agentes que retardam a absorção, por exemplo, monoestearato de alumínio e gelatina.

Para administração parenteral em uma solução aquosa, por exemplo, a solução deve ser adequadamente tamponada se necessário e o líquido diluente primeiro processado isotônico com solução salina ou glicose. Estas soluções aquosas particulares são especialmente adequadas para administrações intravenosas, intramusculares, subcutâneas, e intraperitoneal. Nesta conexão, um meio aquoso estéril que pode ser empregado será conhecido por versados na técnica à luz da presente revelação. Por exemplo, uma dosagem pode ser dissolvida em 1mL de solução NaCl isotônica e adicionado ou não a 1000 mL de hipodermólise fluída ou injetado no local proposto de infusão (*veja, por exemplo, Remington's*

30 *Pharmaceutical Sciences*, 15ª edição, pp. 1035-1038 e 1570-1580). Algumas variações na dosagem ocorrerão necessariamente dependendo da condição que o paciente for tratado. A pessoa responsável pela administração determinará, em qualquer evento, a dose apropriada

para o paciente individual. Além disso, para administração humana, preparações devem encontrar esterilidade, pirogenicidade e a segurança geral e padrões de pureza como requerida pelos padrões do Escritório de Biológicos do FDA.

Soluções estéreis injetáveis são preparadas pela incorporação dos componentes ativos na quantidade requerida no solvente apropriado com vários outros ingredientes enumerados acima, como requerido, seguido de esterilização por filtração. Geralmente, dispersões são preparadas por incorporação de vários ingredientes ativos esterilizados em um veículo estéril o qual contém o meio de dispersão básico e os outros ingredientes requeridos daqueles enumerados acima. No caso de pós estéreis para a preparação de soluções injetáveis estéreis, os métodos preferidos de preparação são secagem à vácuo e técnicas de liofilização que rendem um pó do ingrediente ativo mais qualquer ingrediente adicional desejado de uma de suas soluções estéreis filtradas previamente.

As composições aqui reveladas podem ser formuladas em forma neutra ou de sal. Sais farmacologicamente aceitáveis incluem a adição ácida de sais (formados com grupos amino livres da proteína) e os quais são formados com ácidos inorgânicos, tais como, por exemplo, ácidos clorídricos ou fosfóricos, ou tal como ácidos orgânicos como acético, oxálico, tartárico, mandélico e semelhantes. Sais formados com grupos carboxilas livres podem também ser derivados de bases inorgânicas tais como, por exemplo, hidróxido de sódio, potássio, amônio, cálcio, férrico e tais bases orgânicas como isopropilamina, timetilamina, histidina, procaína e semelhantes. Sobre formulação, soluções serão administradas de maneira compatível com a formulação da dosagem e em tais quantidades como é terapêuticamente efetivas. As formulações são facilmente administradas em uma variedade de formas de dosagem tais como soluções injetáveis, cápsulas de liberação de drogas e semelhantes.

Como utilizado aqui, "veículo inclui todos e quaisquer solventes, meios de dispersão, , veículos, revestimento, diluentes, agentes antibacterianos e antifúngicos, agentes isotônicos e retardadores de absorção, tampões, veículos de soluções, suspensões, colóides e semelhantes. O uso de tais meios e agentes para substâncias farmacêuticas ativas é bem conhecido na técnica. Exceto na medida em que qualquer meio convencional ou agente é incompatível com o ingrediente ativo, seu uso na composição terapêutica é contemplado. Ingredientes ativos suplementares podem também ser incorporados nas composições.

A frase "farmacologicamente aceitável" se refere as entidades moleculares e composições que não produzem reações alérgicas ou inconvenientes semelhantes quando administrados a um humano. A preparação de uma composição aquosa que contenha uma proteína como um ingrediente ativo é bem entendido na técnica. Tipicamente, tais composições são preparadas como injetáveis, quer como soluções líquidas, quer como suspensões; formas sólidas adequadas a solução em, ou suspensão em, líquido antes da injeção podem também ser preparadas. A preparação também pode ser emulsificada.

Em certas modalidades, as composições farmacêuticas podem ser distribuídas por pulverizadores intranasais, inalação e/ou outro veículo de entrega aerossol. Métodos para entrega de genes, polinucleotídeos e composições de peptídios diretamente aos pulmões via pulverizadores aerossóis nasais têm sido descritos, *por exemplo, na* Pat. dos EUA No. 5.756.353 e Pat. dos EUA No. 5.804.212 (cada uma especificamente aqui incorporada por referência em sua totalidade). Da mesma forma, a distribuição de drogas utilizando resinas micropartículas intranasais (Takenaga et al, 1998) e compostos lisofosfatidil-glicerol (Pat. dos EUA No. 5.725.871, especificamente incorporado aqui por referência em sua totalidade) são também bem conhecidos na técnica farmacêutica. Da mesma forma, distribuição de drogas transmucosas na forma de matriz de apoio politetrafluoretileno é descrita na Pat. dos EUA No. 5.780.045 (especificamente aqui incorporada por referência em sua totalidade).

Em certas modalidades, a distribuição pode ocorrer pelo uso de lipossomas, nano-cápsulas, micropartículas, microesferas, partículas lipídicas, vesículas, e semelhantes, para a introdução das composições da presente invenção em células hospedeiras adequadas. Em particular, as composições da presente invenção podem ser formuladas por distribuição de quer encapsulada em uma partícula de lipídio, um lipossoma, uma vesícula, uma nanosfera, uma nanopartícula ou semelhante. A formulação e uso de tais veículos de distribuição podem ser realizados usando técnicas conhecidas e convencionais.

Em outro aspecto desta invenção, vacinas e composições farmacêuticas são fornecidas pela prevenção de infecção de *Leishmania* e suas complicações, em um mamífero, preferivelmente um humano ou cachorro. Composições farmacêuticas geralmente compreendem um ou mais polipeptídeos de fusão como aqui descrito e um veículo fisiologicamente aceitável. As vacinas compreendem um ou mais dos polipeptídeos de fusão e um adjuvante, para aumento da resposta imune.

Vias e frequência da administração e doses de polipeptídeo de fusão vão variar de indivíduo para indivíduo e podem ser paralelas aos atuais sendo utilizados na imunização contra outras infecções de protozoários. Em geral, as composições farmacêuticas e as vacinas podem ser administradas por injeção (*por exemplo*, intramuscular, intravenosa ou subcutânea), intranasalmente (*por exemplo*, por aspiração) ou oralmente. Entre 1 e 4 doses devem ser administradas por um período de 2-6 semanas. Preferivelmente, duas doses são administradas, com a segunda dose sendo de 2-4 semanas depois da primeira. Uma dose adequada é uma quantidade de polipeptídeos de fusão que é efetiva para aumentar anticorpos em um mamífero tratado que sejam suficientes para proteger o mamífero da infecção de *Leishmania* por um período de tempo. Em geral a quantidade de polipeptídeos de fusão presente na dose varia de cerca de 1 pg para 100 mg por kg do hospedeiro, tipicamente de cerca de 10 pg para cerca de 1 mg, e preferivelmente de cerca de 100 pg a cerca de 1 µg. Tamanhos adequados de doses vão variar com o tamanho do animal, mas tipicamente vari-

am de cerca de 0.01mL a cerca de 5 mL por 10-60 Kg de animal.

Enquanto qualquer veículo adequado conhecido pelos versados na técnica podem ser empregados nas composições farmacêuticas desta invenção, o tipo de veículo vai variar dependendo do modo de administração. Para administração parenteral, tal como injeção subcutânea, o veículo preferivelmente inclui água, solução salina, álcool, uma gordura, uma cera ou um tampão. Para administração oral, qualquer dos veículos acima, ou veículos sólidos, tais como manitol, lactose, amido, estearato, sacarina sódica, talco, celulose, glicose, sacarose e carbonato de magnésio, podem ser empregados. Microesferas biodegradáveis (*por exemplo*, galactídeo polilático) podem também ser empregadas como veículos para as composições farmacêuticas desta invenção.

Qualquer uma da variedade de adjuvantes pode ser empregada nas vacinas desta invenção para aumento não específico da resposta imune. A maioria dos adjuvantes contém uma substância designada para proteger o antígeno de rápido catabolismo, tal como hidróxido de alumínio ou óleo mineral e um estimulador não específico de resposta imune, como lipídio A, *Bordella pertussis* ou *Mycobacterium tuberculosis*. Tais adjuvantes são comercialmente disponíveis como, por exemplo, adjuvantes Completos e Incompletos de Freund (Difco Laboratories Detroit, Mich) e Merck Adjuvante 65 (Merck and Company, Inc., Rahway, N. J.)

As várias modalidades descritas acima podem ser combinadas para prover modalidades adicionais. Todas as patentes dos EUA, publicações de pedidos de patentes dos EUA, pedidos de patentes dos EUA, patentes estrangeiras, pedidos de patentes estrangeiras e publicações não patenteadas referidas nesta especificação e/ou listadas na Ficha de Dados do Pedido, são aqui incorporadas por referência em sua totalidade. Aspectos das modalidades podem ser modificados, se necessário para empregar conceitos de várias patentes, pedidos e publicações para provêr ainda mais modalidades.

EXEMPLOS

EXEMPLO1

CLONANDO E EXPRESSANDO POLIPEPTÍDEO DE FUSÃO DE *LEISHMANIA*

A presente invenção relaciona-se a uma construção de gene sintético, referido como K28, compreendendo sequências derivadas de 3 genes de *Leishmania donovani*. O gene sintético compreende sequências de DNA parciais dos genes K26 e K39 e as sequências de DNA completas do gene K9. Adicionalmente, o gene sintético compreende um motivo N-terminal de nove aminoácidos, que inclui 6 histidinas (*por exemplo*, um epítipo marcador 6X HIS). A construção do DNA sintético foi clonada para dentro do local NdeI / XhoI do plasmídio pCRX2.1 a fim de expressar a proteína de fusão deste gene. O gene sintético contém três repetições de 14 aminoácidos do K26 codificado por SEQ ID NO: 1, duas repetições de 39 aminoácidos de K39 codificado por SEQ ID NO: 2, e um quadro de leitura completa para o

gene K9 codificado por SEQ ID NO: 3. Esta construção de fusão foi desenhada para melhorar o potencial diagnóstico de cada uma destas únicas proteínas em uma molécula e oferecer uma cobertura mais ampla, sensibilidade melhorada e custos reduzidos em termos de fabricação de uma única proteína ao invés de todas as três.

5 EXEMPLO 2

DETECÇÃO DE INFECÇÕES DE *LEISHMANIOSE* VISCERAL ASSINTOMÁTICA OU SUB CLÍNICA EM HUMANOS UTILIZANDO POLIPEPTÍDEO K28

Este exemplo ilustra a aumentada sensibilidade de detecção da infecção de *Leishmania* em humanos usando um polipeptídeo de fusão da invenção, preparado como descrito no Exemplo 1, em um formato ELISA.

Os ensaios ELISA foram realizados como se segue. Três séries de placas de 96 poços Polysorp (Nunc, Rochester, NI) onde cada uma foi revestida com 2 µg/mL de um antígeno recombinante diferente em tampão bicarbonato por uma noite a 4°C e bloqueadas por duas horas em temperatura ambiente com PBST com 1% (p/v) de BSA em um agitador de placas. Soro foi diluído apropriadamente para 1/200 em PBST com 0.1% BSA adicionado a cada poço e placas foram incubadas em temperatura ambiente por duas horas com agitação. Placas foram lavadas com PBST com 0.1% BSA e então imunoglobina IgG conjugada com HRP (Sigma, St. Louis, MO), diluída 1:10000 em PBST e 0.1% BSA, foi adicionada a cada poço e incubado em temperatura ambiente por 60 minutos com agitação. Depois da lavagem, placas foram desenvolvidas com substrato de cor peroxidase (KPL, Baltimore MD) com reação extinta por adição de 1N de H₂SO₄ depois de 10 minutos. A densidade óptica correta de cada poço em 450-570nm foi lida usando um leitor de microplaca VERSAmax® (Molecular Devices, Sunnyvale CA). O valor de corte foi determinado por cada teste calculando a média dos controle negativo Conjugados a Enzima mais três desvios padrões (EC).

Indivíduos venezuelanos com leishmaniose visceral (LV) foram identificados baseados em sorologia (*por exemplo*, FAT ou IHA imunofluorescência ou hemaglutinação), sintomas clínicos (*por exemplo*, mal estar, diarreia, esplenomegalia e hepatomegalia) e todo lido ELISA. De 52 amostras de soro de pacientes com LV, 94% dos testes foram positivos usando o ensaio acima. Entretanto, o teste do antígeno K28 mostrou Dos significativamente maiores em 33% das amostras fracas ou marginalmente detectadas utilizando o antígeno K39 sozinho. Em adição, 3 amostras que foram inicialmente caracterizadas como negativas usando o ensaio K39 foram detectadas com segurança usando o teste antígeno K38.

Esses resultados são revelados na FIG. 2, que mostra a distribuição dos valores de absorbância em 450-570 nm para as 52 amostras de soro LV ensaiadas com K26, K28 e K39. Esses resultados indicam que usando K28 provê-se sensibilidade aumentada do que usando K39 sozinho para detectar leishmaniose visceral assintomática ou sub clínica.

EXEMPLO 3

DETECÇÃO DE INFECÇÃO VISCERAL DE *LEISHMANIA* ASSINTOMÁTICA OU SUB CLÍNICA EM CANINOS USANDO O POLIPEPTÍDEO K28

Este exemplo ilustra o aumento na sensibilidade de detecção de infecção de *Leishmania* em caninos usando o polipeptídeo de fusão da invenção, preparado como descrito no Exemplo 1, em um formato ELISA.

Os ensaios ELISA foram realizados como descrito no Exemplo 2, exceto que 4 antígenos recombinantes foram utilizados. Quatro séries de placas de 96 poços Polysorp foram cada revestidas com 2µg/mL de antígeno recombinante K9, K26, K28, ou K39. Caninos venezuelanos com leishmaniose visceral (LV) foram identificados baseados na sorologia (por exemplo, IFAT ou IHA imunofluorescência ou hemaglutinação), sintomas clínicos (por exemplo, mal estar, diarreia, esplenomegalia e hepatomegalia) e ELISA com lisado total.

Os resultados revelador na FIG 3. mostra que K28 identificou um número de casos significativamente maior do que os outros três antígenos usados sozinhos. Isto indica que usando K28 provê-se um aumento da sensibilidade em caninos em detectar leishmaniose sub clínica ou assintomática, e além disso, o K28 provê sensibilidade aumentada de detecção sobre o uso dos antígenos K9, K26 e K39 sozinhos.

EXEMPLO 4

DETECÇÃO DE INFECÇÕES DE *LEISHMANIA* VISCERAL EM HUMANOS USANDO UM POLIPEPTÍDEO K28 OU UM POLIPEPTÍDEO K39 EM UM FORMATO DE TESTE RÁPIDO DE VIA DUPLA COMPARADO AO ENSAIO DE AGLUTINAÇÃO DIRETA

Este exemplo ilustra o aumento da sensibilidade de detecção da infecção de *Leishmania* em humanos usando o polipeptídeo de fusão da invenção (K28), preparado como descrito no Exemplo 1, versus um único antígeno (K39) em um formato de teste rápido de via dupla, como comparado com um ensaio de aglutinação direta (DAT) usando soro do Sudão.

O teste rápido de via dupla foi realizado essencialmente como descrito na Patente dos EUA No. 7.189.522, a qual é aqui incorporada por referência em sua totalidade. Brevemente, K28 ou K39 foram revestidos em tiras de nitrocelulose. Uma gota de soro humano diluído apropriadamente foi adicionada ao poço da amostra no cartucho teste contendo nitrocelulose impregnado com antígeno. Duas gotas de amostra de tampão foram adicionadas ao poço da amostra e a amostra foi permitida migrar por ação capilar até as linhas na janela de detecção do cartucho de teste desaparecerem. Duas gotas de tampão foram adicionadas ao poço do reagente de detecção no cartucho de teste para reconstruir o reagente de detecção imobilizado (proteína A Estafilocócica conjugada com ouro coloidal).

O reagente de detecção migra por fluxo capilar para a janela de detecção. Se a amostra contiver anticorpos ao teste de antígeno, eles ligam ao antígeno imobilizado na janela de detecção, onde eles serão visualizados como duas linhas rosas por ligação do reagente de detecção. Uma única linha rosa indica que não há nenhum anticorpo na amostra e

que o reagente de detecção é ligado a imunoglobina (LG) controle imobilizada na janela de detecção. A ausência de qualquer linha rosa é um indicativo de um teste defeituoso.

O teste DAT foi realizado essencialmente como descrito por Sundar e Raí em Clin Diag Lab Immunol 9: 951-958, 2002.

- 5 Os resultados desta análise demonstram que K28 identificou um número significan-
temente maior de casos de humanos LV do que fez K39 sozinho. Mais especificamente, K28
proveu aumento da sensibilidade em humano (66/69 amostras, 95.6%) para detectar lei-
shmaniose visceral versus K39 sozinho (61/69 amostras, 88.4%) quando empregado em um
formato de teste rápido de via dupla. Em adição, 4 amostras de pacientes com títulos DAT
10 muito baixos (<3200) foram corretamente identificados pelo teste rápido K28, enquanto ape-
nas 2 de 4 foram corretamente identificados pelo teste rápido K39.

- Estas e outras mudanças podem ser feitas às modalidades à luz da descrição deta-
lhada acima. Em geral, nas reivindicações seguintes, os termos usados não devem ser
construídos para limitar as reivindicações às modalidades específicas reveladas na especifi-
15 cação e as reivindicações, mas deve ser construído para incluir todas as modalidades pos-
síveis ao longo do inteiro objetivo de equivalência para o qual tais reivindicações são intitu-
ladas. Consequentemente, as reivindicações não são limitadas pela revelação.

- As várias modalidades descritas acima podem ser combinadas para prover modali-
dades adicionais. Todas as patentes dos EUA, publicações de pedidos de patentes dos
20 EUA, pedidos de patentes dos EUA, patentes estrangeiras, pedidos de patentes estrangei-
ras e publicações não patentes referidas nesta especificação e/ou listadas na Ficha de Da-
dos do Pedido são aqui incorporadas por referência em sua totalidade. Aspectos das moda-
lidades podem ser modificados, se necessário, para empregar conceitos de várias patentes,
aplicações e publicações para provêr ainda modalidades adicionais.

REIVINDICAÇÕES

1. Polipeptídeo de fusão isolado, **CARACTERIZADO** pelo fato de compreender dois ou mais antígenos de *Leishmania* selecionados a partir do grupo consistindo K26, K39 e K9, ou porções imunogênicas ou variantes dos mesmos, em que pelo menos um dos antígenos é isolado a partir de *Leishmania donovani*.

2. Polipeptídeo de fusão, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o polipeptídeo de fusão compreende uma sequência K26 compreendendo SEQ ID NO:5, uma sequência K39 compreendendo SEQ ID NO:6 e uma sequência K9 compreendendo SEQ ID NO:7.

3. Polipeptídeo de fusão, de acordo com a reivindicação 2, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o polipeptídeo de fusão compreende uma sequência aminoácida conforme revelado em 10-262 da SEQ ID NO:8.

4. Polipeptídeo de fusão, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-3, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o polipeptídeo de fusão ainda compreende uma sequência aminoácida N-terminal de MHHHHHHTS (SEQ ID NO:21).

5. Polinucleotídeo isolado **CARACTERIZADO** pelo fato de codificar um polipeptídeo de fusão conforme descrito em qualquer uma das reivindicações 1-4.

6. Anticorpo isolado, ou fragmento ligador de antígeno **CARACTERIZADO** pelo fato de especificamente se ligar a um polipeptídeo de fusão conforme descrito em qualquer uma das reivindicações 1-4.

7. Composição farmacêutica **CARACTERIZADA** pelo fato de compreender,
(a) um polipeptídeo de fusão conforme descrito na reivindicação 1, ou
(b) um anticorpo isolado ou um fragmento ligador de antígeno conforme descrito na reivindicação 6; ou

(c) um polinucleotídeo conforme descrito na reivindicação 5, e um veículo fisiologicamente aceitável.

8. Vacina **CARACTERIZADA** pelo fato de compreender,
(a) um polipeptídeo de fusão conforme descrito na reivindicação 1, ou
(b) um anticorpo isolado ou fragmento de ligação de antígeno conforme descrito na reivindicação 6; ou

(c) um polinucleotídeo conforme descrito na reivindicação 5; e um aumentador da resposta imune não específica.

9. Método para detecção de infecção por *Leishmania* assintomática ou sub-clínica em uma amostra biológica selecionada a partir do grupo consistindo de soro, sangue, e saliva, **CARACTERIZADO** pelo fato de compreender:

(a) por em contato uma amostra biológica com um polipeptídeo de fusão compreendendo dois ou mais antígenos de *Leishmania* selecionados a partir do grupo consistindo

de K26, K39 e K9, ou porções imunogênicas ou variantes das mesmas; e

(b) detecção na amostra biológica da presença de anticorpos que se ligam ao polipeptídeo de fusão, assim detectando infecção por *Leishmania* assintomática ou sub-clínica na amostra biológica.

5 10. Método, de acordo com a reivindicação 9, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o polipeptídeo de fusão compreende as sequências aminoácidas reveladas na SEQ ID NOs 5-7.

10 11. Método, de acordo com a reivindicação 10, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o polipeptídeo de fusão compreende uma sequência aminoácida conforme revelado em 10-262 da SEQ ID NO:8.

12. Método, de acordo com a reivindicação 11, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o polipeptídeo de fusão compreende uma sequência aminoácida N-terminal de MHHHHHHTS (SEQ ID NO: 21).

15 13. Método, de acordo com a reivindicação 9, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o polipeptídeo de fusão está ligado a um suporte sólido.

14. Método, de acordo com a reivindicação 10, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o suporte sólido compreende nitrocelulose, látex ou um material plástico.

15. Método, de acordo com a reivindicação 9, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o passo de detecção compreende:

20 (a) remoção da amostra não ligada a partir do suporte sólido;
(b) adição de um reagente de detecção ao suporte sólido; e
(c) determinação do nível de detecção reagente ligado ao suporte sólido, relativo a um valor de corte pré-determinado.

25 16. Método de identificar um paciente afligido com leishmaniose visceral assintomática ou sub-clínica que é propenso a desenvolver leishmaniose visceral aguda **CARACTERIZADO** pelo fato de compreender:

30 (a) colocar uma amostra biológica obtida a partir de um paciente afligido com leishmaniose visceral assintomática ou sub-clínica com um primeiro polipeptídeo que é um polipeptídeo de fusão compreendendo dois ou mais antígenos de *Leishmania* selecionados a partir do grupo consistindo de K26, K39 e K9, ou porções imunogênicas ou variantes dos mesmos, a amostra biológica sendo selecionada a partir do grupo consistindo de soro, sangue e saliva; e

35 (b) independentemente colocar em contato a amostra biológica com um segundo polipeptídeo compreendendo uma sequência aminoácida conforme revelado nas SEQ ID NOs: 10 e 11; e

(c) detectar na amostra a presença de anticorpos que se ligam a pelo menos um dos primeiro e segundo polipeptídeos, assim identificando um paciente afligido com leish-

maniose visceral assintomática ou sub-clínica que é propenso ao desenvolvimento da leishmaniose visceral aguda.

17. Método, de acordo com a reivindicação 16, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o polipeptídeo de fusão compreende as sequências aminoácidas reveladas nas SEQ ID NOs: 5-7.

18. Método, de acordo com a reivindicação 17, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o polipeptídeo de fusão compreende uma sequência aminoácida conforme revelado em 10-262 da SEQ ID NO:8.

19. Método, de acordo com a reivindicação 18, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o polipeptídeo de fusão ainda compreende uma sequência aminoácida N-terminal de MHHHHHHTS (SEQ ID NO:21).

20. Método, de acordo com a reivindicação 16, **CARACTERIZADO** pelo fato de que os primeiro e segundo polipeptídeos são cada ligados a um suporte sólido separado.

21. Método, de acordo com a reivindicação 20, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o suporte sólido compreende nitrocelulose, látex ou um material plástico.

22. Método, de acordo com a reivindicação 16, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o passo de detecção compreende:

(a) remoção da amostra não ligada a partir de cada suporte sólido;

(b) adição de um reagente de detecção a cada suporte sólido; e

(c) comparar o nível de detecção do reagente ligado a cada suporte sólido, relativo a um valor de corte pré-determinado.

23. Método, de acordo com quaisquer das reivindicações 15 ou 22, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o reagente de detecção compreende um grupo repórter conjugado a um agente de ligação.

24. Método, de acordo com a reivindicação 23, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o agente de ligação é selecionado a partir do grupo consistindo de anti-imunoglobulina, Proteína G, Proteína A e lectinas.

25. Método, de acordo com a reivindicação 23, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o grupo repórter é selecionado a partir do grupo consistindo de radioisótopos, grupos fluorescentes, grupos luminescentes, enzimas, biotina e partículas corantes.

26. Kit diagnóstico para detecção de leishmaniose visceral assintomática ou sub-clínica em uma amostra biológica selecionada a partir de um grupo consistindo de soro, sangue, e saliva **CARACTERIZADO** pelo fato de compreender:

(a) um polipeptídeo de fusão compreendendo dois ou mais antígenos de *Leishmania* selecionados a partir do grupo consistindo de K26, K39 e K9, ou porções imunogênicas ou variantes dos mesmos; e

(b) um reagente de detecção.

27. Kit diagnóstico para identificar um paciente afligido com leishmaniose visceral assintomática ou sub-clínica que é propenso de desenvolver leishmaniose visceral aguda **CARACTERIZADO** pelo fato de compreender:

(a) um primeiro polipeptídeo que é um polipeptídeo de fusão compreendendo dois ou mais antígenos de *Leishmania* selecionados a partir do grupo consistindo de K26, K39 e K9, ou porções imunogênicas ou variantes dos mesmos;

(b) um segundo polipeptídeo compreendendo uma sequência aminoácida conforme revelado nas SEQ ID NOs: 10 ou 11; e

(c) um reagente de detecção.

28. Kit, de acordo com quaisquer das reivindicações 26 ou 27, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o reagente de detecção compreende um grupo repórter conjugado a um agente de ligação.

29. Kit, de acordo com quaisquer das reivindicações 26 ou 27, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o agente de ligação é selecionado a partir do grupo consistindo de anti-imunoglobulina, Proteína G, Proteína A e lectinas.

30. Kit, de acordo com quaisquer das reivindicações 26 ou 27, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o grupo repórter é selecionado a partir do grupo consistindo de radioisótopos, grupos fluorescentes, grupos luminescentes, enzimas, biotina e partículas corantes.

ESQUEMA DA CONSTRUÇÃO DA FUSÃO DE K28



FIG. 1

AMOSTRA DE SORO DE PACIENTE LV HUMANO VENEZUELANO –
COMPARAÇÃO ELISA DE K28, K39 e K9

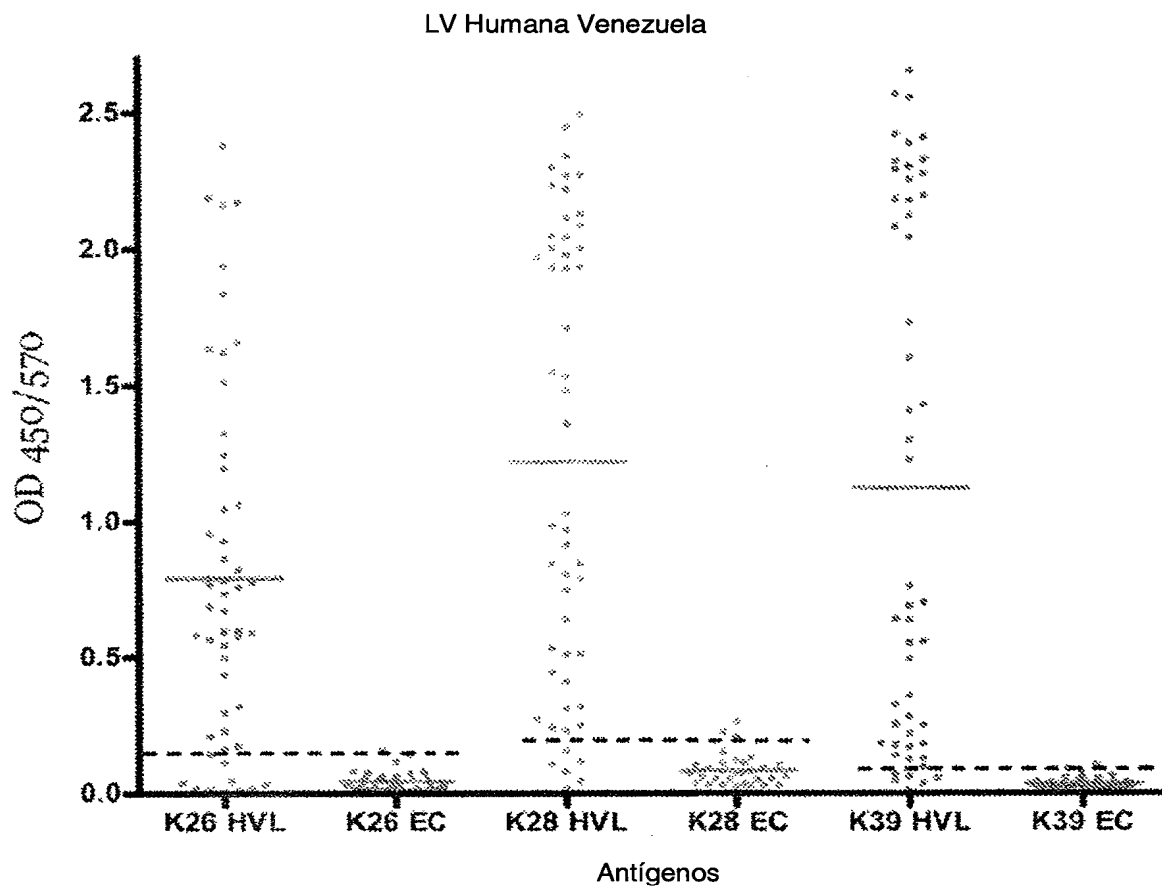


FIG. 2

COMPARAÇÃO ELISA DE K28, K39 e K9 USANDO AMOSTRA DE SORO DE
PACIENTE LV CANINO DA VENEZUELA

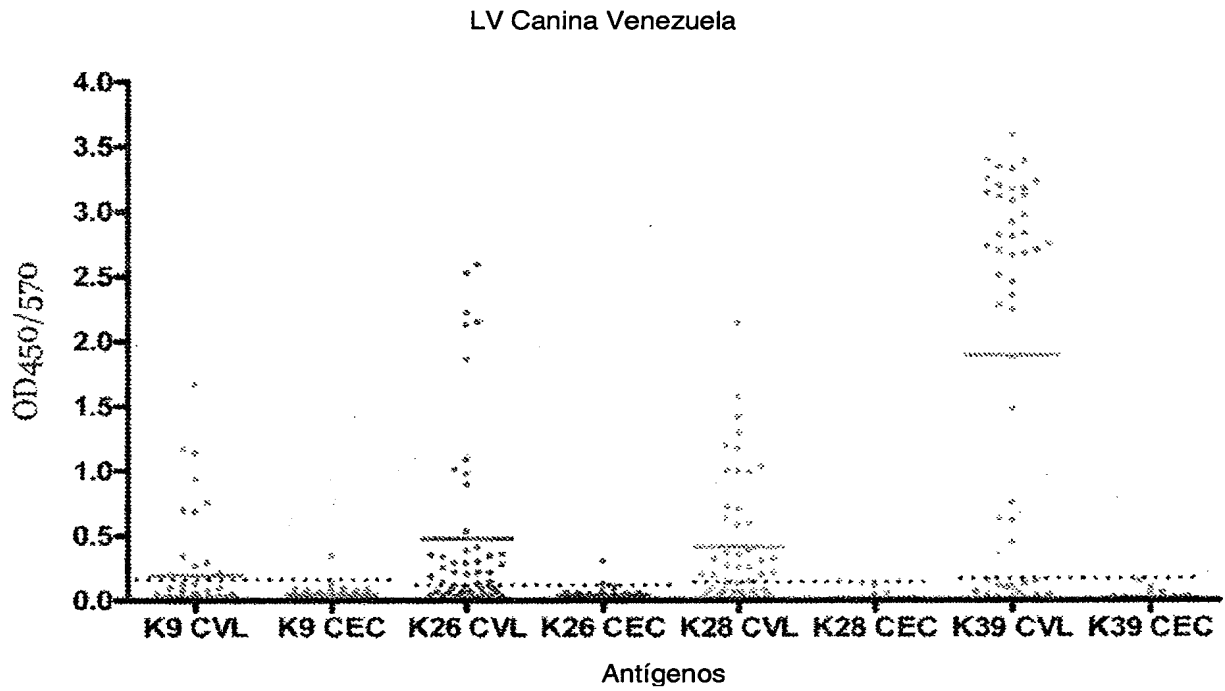


FIG. 3

RESUMO

“PROTEÍNAS DE FUSÃO E SEUS USOS NO DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO DE LEISHMANIOSE”

5 A presente invenção relaciona-se geralmente a uma proteína de fusão feita a partir de construção de gene sintético compreendido de elementos derivados a partir de antígenos de *Leishmania* K26, K39 e K9. A proteína de fusão é particularmente útil no diagnóstico da leishmaniose, particularmente leishmaniose visceral em animais tais como humanos e cachorros.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIA

<110> Instituto de Pesquisa de Doença Infecciosa

Ajay Bhatia

Steven G. Reed

<120> PROTEÍNAS DE FUSÃO E SEUS USOS NO DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO DE LEISHMANIOSE

<130> 480239.406PC

<140> PCT

<141> 2009-07-02

<150> US 61/078,255

<151> 2008-07-03

<160> 21

<170> FastSEQ para Windows Versão 4.0

<210> 1

<211> 126

<212> DNA

<213> L. donovani

<400> 1

ccgaaggagg acggccatac acagaaaaat gacggcgatg gccctaagga ggacggccat 60

acacagaaaa atgacggcga tggcccgaag gaggacggcc atacacagaa aaatgacggc 120

gatggc

126

<210> 2

<211> 234

<212> DNA

<213> L. donovani

<400> 2

cttgagcagc tgcttcgca atccgaggag cgcgctgcgg agctggcgag tcagctggag 60
 tccactactg ctgcgaagat gtcggcggag caggaccgag agaacacgag ggccacgcta 120
 gagcagcagc ttctgactc cgaggagcgc gctgcggagc tggcgagcca gctggaggcc 180
 actgctgctg cgaagtcgtc ggcggagcag gaccgcgaga acacgagggc cgcg 234

<210> 3

<211> 399

<212> DNA

<213> L. donovani

<400> 3

atgggaagtt cttgtacaaa ggactccgca aaggagcccc agaagcgtgc tgataacatc 60
 cataaaacca ctgaggccaa tcacagaggc gccgccgtgc cccgaagca cgccggcggt 120
 gcgatgaacg actctgcccc gaagaaggat ggccatacac agaaaaatga cggcgatggc 180
 cctaaggagg atgaccatac acagaaaaat gacggcgatg gccctaagga ggatgacat 240
 ggcgacaacg acggcggttg ccctaaggag gatgagaatc tgccgcaaaa cgatggggat 300
 ggcgaggaga agaacgaaga tggacacaac gtgggggatg gagctaacga caatgaggat 360
 ggtaacgatg atcagccgaa ggagcacgct gccggcaac 399

<210> 4

<211> 804

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Sequência Polinucleotídica de um gene K28 sintético

<400> 4

```

catatgcatc accatcacca tcacactagt ccgaaggagg acggccatac acagaaaaat 60
gacggcgatg gccctaagga ggacggccat acacagaaaa atgacggcga tggcccgaag 120
gaggacggcc atacacagaa aaatgacggc gatggccttg agcagctgct tcgcaatcc 180
gaggagcgcg ctgcggagct ggcgagtcag ctggagtcca ctactgtgc gaagatgtcg 240
gcgagcagg accgcgagaa cacgagggcc acgctagagc agcagcttcg tgactccgag 300
gagcgcgctg cggagctggc gagccagctg gaggccactg ctgtgcgaa gtcgtcggcg 360
gagcaggacc gcgagaacac gagggccgcg atgggaagtt cttgtacaaa ggactccgca 420
aaggagcccc agaagcgtgc tgataacatc cataaaacca ctgaggccaa tcacagaggc 480
gccgccgtgc ccccgaagca cgccggcggg gcgatgaacg actctgcccc gaagaaggat 540
ggccatacac agaaaaatga cggcgatggc cctaaggagg atgaccatac acagaaaaat 600
gacggcgatg gccctaagga ggatgaccat ggcgacaacg acggcgggtg ccctaaggag 660
gatgagaatc tgccgcaaaa cgatggggat gcgcaggaga agaacgaaga tggacacaac 720
gtgggggatg gagctaacga caatgaggat ggtaacgatg atcagccgaa ggagcacgct 780
gccggcaacg ctagctgact cgag                                     804

```

<210> 5

<211> 42

<212> PRT

<213> L. donovani

<400> 5

Pro Lys Glu Asp Gly His Thr Gln Lys Asn Asp Gly Asp Gly Pro Lys

1

5

10

15

Glu Asp Gly His Thr Gln Lys Asn Asp Gly Asp Gly Pro Lys Glu Asp

20

25

30

Gly His Thr Gln Lys Asn Asp Gly Asp Gly

35

40

<210> 6

<211> 78

<212> PRT

<213> L. donovani

<400> 6

Leu Glu Gln Leu Leu Arg Glu Ser Glu Glu Arg Ala Ala Glu Leu Ala

1

5

10

15

Ser Gln Leu Glu Ser Thr Thr Ala Ala Lys Met Ser Ala Glu Gln Asp

20

25

30

Arg Glu Asn Thr Arg Ala Thr Leu Glu Gln Gln Leu Arg Asp Ser Glu

35

40

45

Glu Arg Ala Ala Glu Leu Ala Ser Gln Leu Glu Ala Thr Ala Ala Ala

50

55

60

Lys Ser Ser Ala Glu Gln Asp Arg Glu Asn Thr Arg Ala Ala

65

70

75

<210> 7

<211> 133

<212> PRT

<213> L. donovani

<400> 7

Met Gly Ser Ser Cys Thr Lys Asp Ser Ala Lys Glu Pro Gln Lys Arg

1 5 10 15

Ala Asp Asn Ile His Lys Thr Thr Glu Ala Asn His Arg Gly Ala Ala

20 25 30

Val Pro Pro Lys His Ala Gly Gly Ala Met Asn Asp Ser Ala Pro Lys

35 40 45

Lys Asp Gly His Thr Gln Lys Asn Asp Gly Asp Gly Pro Lys Glu Asp

50 55 60

Asp His Thr Gln Lys Asn Asp Gly Asp Gly Pro Lys Glu Asp Asp His

65 70 75 80

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

85 90 95

Asn Asp Gly Asp Ala Gln Glu Lys Asn Glu Asp Gly His Asn Val Gly

100 105 110

Asp Gly Ala Asn Asp Asn Glu Asp Gly Asn Asp Asp Gln Pro Lys Glu

115 120 125

His Ala Ala Gly Asn

130

<210> 8

<211> 264

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Sequência aminoácida do gene K28 sintético

<400> 8

Met His His His His His His Thr Ser Pro Lys Glu Asp Gly His Thr

1 5 10 15

Gln Lys Asn Asp Gly Asp Gly Pro Lys Glu Asp Gly His Thr Gln Lys

20 25 30

Asn Asp Gly Asp Gly Pro Lys Glu Asp Gly His Thr Gln Lys Asn Asp

35 40 45

Gly Asp Gly Leu Glu Gln Leu Leu Arg Glu Ser Glu Glu Arg Ala Ala

50 55 60

Glu Leu Ala Ser Gln Leu Glu Ser Thr Thr Ala Ala Lys Met Ser Ala

65 70 75 80

Glu Gln Asp Arg Glu Asn Thr Arg Ala Thr Leu Glu Gln Gln Leu Arg

85 90 95

Asp Ser Glu Glu Arg Ala Ala Glu Leu Ala Ser Gln Leu Glu Ala Thr

100 105 110

Ala Ala Ala Lys Ser Ser Ala Glu Gln Asp Arg Glu Asn Thr Arg Ala

115 120 125

Ala Met Gly Ser Ser Cys Thr Lys Asp Ser Ala Lys Glu Pro Gln Lys

130 135 140

Arg Ala Asp Asn Ile His Lys Thr Thr Glu Ala Asn His Arg Gly Ala

145 150 155 160

Ala Val Pro Pro Lys His Ala Gly Gly Ala Met Asn Asp Ser Ala Pro

165 170 175

Lys Lys Asp Gly His Thr Gln Lys Asn Asp Gly Asp Gly Pro Lys Glu

180 185 190

Asp Asp His Thr Gln Lys Asn Asp Gly Asp Gly Pro Lys Glu Asp Asp

195 200 205

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

210 215 220

Gln Asn Asp Gly Asp Ala Gln Glu Lys Asn Glu Asp Gly His Asn Val

225 230 235 240

Gly Asp Gly Ala Asn Asp Asn Glu Asp Gly Asn Asp Asp Gln Pro Lys

245 250 255

Glu His Ala Ala Gly Asn Ala Ser

260

<210> 9

<211> 14

<212> PRT

<213> L. donovani

<400> 9

Pro Lys Glu Asp Gly His Thr Gln Lys Asn Asp Gly Asp Gly

1 5 10

<210> 10

<211> 39

<212> PRT

<213> L. donovani

<400> 10

Leu Glu Gln Leu Leu Arg Glu Ser Glu Glu Arg Ala Ala Glu Leu Ala

1 5 10 15

Ser Gln Leu Glu Ser Thr Thr Ala Ala Lys Met Ser Ala Glu Gln Asp

20 25 30

Arg Glu Asn Thr Arg Ala Thr

35

<210> 11

<211> 39

<212> PRT

<213> L. donovani

<400> 11

Leu Glu Gln Gln Leu Arg Asp Ser Glu Glu Arg Ala Ala Glu Leu Ala

1 5 10 15

Ser Gln Leu Glu Ala Thr Ala Ala Ala Lys Ser Ser Ala Glu Gln Asp

20 25 30

Arg Glu Asn Thr Arg Ala Ala

35

<210> 12

<211> 42

<212> DNA

<213> L. donovani

<400> 12

ccgaaggagg acggccatac acagaaaaat gacggcgatg gc

42

<210> 13

<211> 42

<212> DNA

<213> L. donovani

<400> 13

cctaaggagg acggccatac acagaaaaat gacggcgatg gc 42

<210> 14

<211> 117

<212> DNA

<213> L. donovani

<400> 14

cttgagcagc tgcttcgca atccgaggag cgcgctgcgg agctggcgag tcagctggag 60
tccactactg ctgcgaagat gtcggcggag caggaccgcg agaacacgag ggccacg 117

<210> 15

<211> 117

<212> DNA

<213> L. donovani

<400> 15

ctagagcagc agcttcgtga ctccgaggag cgcgctgcgg agctggcgag ccagctggag 60
gccactgctg ctgcgaagtc gtcggcggag caggaccgcg agaacacgag ggccgcg 117

<210> 16

<211> 1206

<212> DNA

<213> L. donovani

<400> 16

atgggaactt cttgtacaaa ggactccgca aaggagcccc agaagcgtgc tgataacatc 60

cataaaacca ctgaggccaa tcacggaggc gccactggtg tgccccgaa gcacaccggc 120
 agtgcgatga acgactctgc cccgaaggag gacggccata cacagaaaaa tgacggcgat 180
 ggccctaagg aggacggcca tacacagaaa aatgacggcg atggcccgaa ggaggacggc 240
 catacacaga aaaatgacgg cgatggccct aaggaggacg gccatacaca gaaaaatgac 300
 ggcgatggcc cgaaggagga cggccataca cagaaaaatg acggcgatgg ccctaaggag 360
 gacggccata cacagaaaaa tgacggcgat ggcccgaagg aggacggcca tacacagaaa 420
 aatgacggcg atggccctaa ggaggacggc catacacaga aaaatgacgg cgatggcccg 480
 aaggaggacg gccatacaca gaaaaatgac ggcgatggcc ctaaggagga cggccataca 540
 cagaaaaatg acggcgatgg cccgaaggag gacggccata cacagaaaaa tgacggcgat 600
 ggcccgaagg aggacggcca tacacagaaa aatgacggcg atggccctaa ggaggacggc 660
 catacacaga aaaatgacgg cgatggcccg aaggaggacg gccatacaca gaaaaatgac 720
 ggcgatggcc ctaaggagga cggccataca cagaaaaatg acggcgatgg cccgaaggag 780
 gacggccata cacagaaaaa tgacggcgat ggccctaagg aggacggcca tacacagaaa 840
 aatgacggcg atggcccgaa ggaggacggc catacacaga aaaatgacgg cgatggccct 900
 aaggaggacg gccatacaca gaaaaatgac ggcgatggcc cgaaggagga cggccataca 960
 cagaaaaatg acggcgatgg ccctaaggag gacggccata cacagaaaaa tgacggcgat 1020
 ggcccgaagg aggacggcca tacacagaaa aatgacggcg atggccctaa ggagggtgag 1080
 aatctgcagc aaaacgatgg ggatgcgag gagaagaacg aagatggaca caacgtgggg 1140
 gatggagcta acggcaatga ggatggtaac gatgatcagc cgaaggagca cgctgccggc 1200
 aactag 1206

<210> 17

<211> 9831

<212> DNA

<213> L. donovani

<400> 17

atgcaccctt cactgtgcg gcgtgaggcg gagcgggtga aggtgtcgtg gcgctgctgc 60
 cccctaaacg aacgtgaaaa caatgccccg gaaggagca aagtgaccgt tcgggcgaaa 120

caggcgcccg ccgtggtgac ggtcaaggtc ctgggaggca gcaacaacag cggcgccgcc 180
 gagtcgatgg ggactgcaag gcgggtagcg caggacttgc agttcgacca cgtgttctgg 240
 tctgtggaga cgccggacgc gtgcggcgcg acccccgcga cgcaggcaga cgtgttccgg 300
 acgatcgggt acccgctggt gcagcacgcg ttcgacgggt tcaactcgtg cttgtttgcg 360
 tacgggcaga caggggagcgg gaagacgtac acgatgatgg gcgcggacgt gagcgtgctt 420
 agtggtaggg gcaacggcgt gacgccgcgg atctgcctgg agatctttgc gcggaaggcg 480
 agcgtggagg cgcaggggca ctgcgggtgg atcgtggagc tggggtacgt ggaggtgtac 540
 aacgagcgcg tgcggacct gcttgggaag cggaagaagg gtgtgaaggc cggcgccgag 600
 gaggtgtacg tggacgtgcg cgagcaccgc agccgcggcg tgttcttga ggggcagcgg 660
 ctggtggagg ttgggagcct ggacgatgtt gtgcggctga tcgagatcgg caacggcgtg 720
 cggcacaccg cttcgacgaa gatgaacgac cggagcagcc ggagccacgc gatcatcatg 780
 ctgctgctgc gcgaggagcg gacgatgacg acgaagagcg gggagacgat cctactgcc 840
 ggcaagagca gccgcatgaa cttgtggac cttgcggggt ctgagcgcgt ggcgcagtcg 900
 cagggtggagg ggcagcagtt caaggaggcg acgcacatca acctgtcgtc gacgacgctc 960
 gggcgctga tcgacgtgct cgcggacatg gcgacgaagg gtgcgaaggc gcagtacagc 1020
 gttgcgccgt tccgcgactc gaagctgacg ttcattctga aggactcgtc tggcgggaac 1080
 tcgaagacgt tcatgatcgc gactgtgagc ccgagcgcgc tgaactacga ggagacgctg 1140
 agcacgctgc ggtacgcgtc gcgcgcgcgc gacattgtga atgttgcga ggtgaacgag 1200
 gacccgcgcg cacggcggat ccgcgagctg gaggagcaga tggaggacat gcggcaggcg 1260
 atggctggcg gcgacccgcg gtacgtgtct gagctgaaga agaagctgc gctgctggag 1320
 tcggaggcgc agaagcgtgc ggcgacctg caggcgctgg agagggagcg ggagcacaac 1380
 cagggtcagg agcggctgct gcgcgcgacg gaggcggaga agagcgagct ggagtgcgt 1440
 gcggctgcgc tgcaggagga gatggccgcg actcgacggc aggcggacaa gatgcaggcg 1500
 ctgaacctgc ggctgaagga agagcaggcg cgcaaggagc gcgagctgct gaaagagatg 1560
 gcgaagaagg acgccgcgt ctcgaagggt cggcgacgca aagacgccga gatagcaagc 1620
 gagcgcgaga agctggagtc gaccgtggcg cagctggagc gtgagcagcg cgagcgcgag 1680
 gtggctctgg acgcattgca gacgcaccag agaaagctgc aggaagcgtc cgagagctct 1740
 gagcggacag ccgcggaaag ggaccagctg ctcagcagc taacagagct tcagtctgag 1800
 cgtacgcagc tatcacaggt tgtgaccgac gcgcgagcgc ttacacgca cttgcagcgt 1860

attcagtacg agtacgggga aaccgagctc gcgcgagacg tggcgtgtg cgccgcgcag 1920
 gagatggagg cgcgctacca cgctgtgtg ttccacctgc aaacgtcctt ggagctcgca 1980
 accgagtggg aggacgcact ccgcgagcgt gcgcttgacg agcgtgacga agccgctgca 2040
 gccgaacttg atgccgcagc ctctacttcc caaaacgcac gtgaaagcgc ctccgagcgg 2100
 ctaaccagcc ttgagcagct gcttcgcgaa tccgaggagc gcgctgcgga gctggcgagt 2160
 cagctggagt ccactactgc tgcgaagatg tcggcggagc aggaccgcga gaacacgagg 2220
 gccacgctag agcagcagct tcgtacttcc gaggagcgcg ctgcggagct ggcgagccag 2280
 ctggaggcca ctgtgtgtgc gaagtcgtcg gcggagcagg accgcgagaa cacgagggcc 2340
 gcgttgagc agcagcttcg tgactccgag gagcgcgtg cggagctggc gagtcagctg 2400
 gagtccacta ctgtgcgaa gacgtcggcg gagcaggacc gcgagaacac gagggccacg 2460
 ctagagcagc agcttcgtga ctccgaggag cgcgctgcg agctggcgag tcagctggag 2520
 tccactactg ctgcgaagat gtcagcggag caggaccgcg agaacacgag ggccgcgcta 2580
 gagcagcagc ttctcgaatc cgaggagcgc gctgcggagc tgaaggccga gctagaggcc 2640
 actgtgtgtg cgaagtcgtc ggccgagcag gaccgcgaga acacgagggc cgcgttgag 2700
 cagcagcttc gtgactccga ggagcgcgtc gcggagctgg cgagtcagct ggagtccact 2760
 actgtgcga agacgtcggc ggagcaggac cgcgagaaca cgagggccac gctagagcag 2820
 cagcttcgtg actccgagga gcgcgtgcg gagctggcga gtcagctgga gtccactact 2880
 gctgcgaaga tgtcggcgga gcaggaccgc gagaacacga gggccacgct agagcagcag 2940
 ctctgtgact ccgaggagcg cgctgcggag ctggcgagtc agctggagtc cactactgct 3000
 gcgaagatgt cggcggagca ggaccgcgag aacacgaggg ccacgctaga gcagcagctt 3060
 cgtgactccg aggagcgcgc tcgggagctg gcgagtcagc tggagtccac tactgtgtcg 3120
 aagatgtcag cggagcagga ccgcgagaa acgagggccg cgctagagca gcagcttctc 3180
 gaatccgagg agcgcgtgc ggagctgaag gccgagctag aggccactgc tgctgcgaag 3240
 tcgtcggcgg agcaggaccg cgagaacacg agggccacgc tagagcagca gcttcgtgac 3300
 tccgaggagc gcgctgcgga gctggcgagc cagctggagg ccactgtgc tgcgaagtgc 3360
 tcggcggagc aggaccgcga gaacacgagg gccgcgttg agcagcagct tcgtacttcc 3420
 gaggagcgcg ctggggagct ggcgagccag ctggaggcca ctgtgtgtgc gaagtcgtcg 3480
 gcggagcagg accgcgagaa cacgagggcc gcgttgagc agcagcttct cgaatccgag 3540
 gcgcgcgtg cggagctggc gagccagctg gaggccactg ctgtgcgaa gtcgtcggcg 3600

gagcaggacc gcgagaacac gagggccgcg ttggagcagc agcttcgca atccgaggcg 3660
 cgcgctgggg agctggcgag ccagctggag gccactgctg ctgcaagat gtcagcggag 3720
 caggaccgcg agaacacgag ggccgcttg gagcagcagc ttcgcaatc cgaggagcgc 3780
 gctgcggagc tggcgagcca gctggaggcc actgctgctg cgaagtcgtc ggcgagcag 3840
 gaccgcgaga acacgagggc cgcttggag cagcagctc gcgaatccga ggcgcgct 3900
 gcggagctgg cgagccagct ggaggccact gctgctgca agtcgtcggc ggagcaggac 3960
 cgcgagaaca cgaggccgc gttggagcag cagcttcgca aatccgaggc gcgctgctg 4020
 gagctggcga gccagctgga ggccactgct gctgcaaga cgtcggcgga gcaggaccgc 4080
 gagaacacga gggccgctt ggagcagcag ctgcgcaat ccgaggagcg cgctgcggag 4140
 ctggcgagcc agctggaggc cactgctgct gcgaagatgt cggcgagca ggaccgcgag 4200
 aacacgaggg ccacgctaga gcagcagct ctcgaatccg aggagcgcgc tgcggagctg 4260
 gcgagccagc tggaggccac tgctgctgcg aagatgtcgg cggagcagga ccgagagaac 4320
 acgagggcca cgtagagca gcagcttc gaatccgagg agcgctgc ggagctggcg 4380
 agccagctgg aggccactgc tgctgcaag tcgtcggcg agcaggaccg cgagaacacg 4440
 agggccgctg tggagcagca gcttcggga tccgaggcgc gcgtgcgga gctggcgagc 4500
 cagctggagg cactgctgc tcgaagacg tcggcgagc aggaccgca gaacacgagg 4560
 gccacgctag agcagcagct tcgcaatcc gaggcgcgcg ctggggagct ggcgagccag 4620
 ctggaggcca ctgctgctgc gaagtcgtc gcggagcagg accgcgagaa cacgagggcc 4680
 gcgttggagc agcagcttcg ggaatccgag gagcgcgctg cggagctgat gcggaagtta 4740
 gaggcgactg ctgctcgaa gtcgtcgga gagcaggacc gtgagagcat gaaggtagcg 4800
 ctgaggcgc gcaccgcga gctggcttct cgattgaagg cgacggctgc tcgaagacg 4860
 tcggccgagc aggagcgaga taggacaagg gctaccttg aggagaggct aagagttgct 4920
 gaagtgcgcg ctgtcagct ggcgagtcag ctggaggcca ctgctgctgc gaagtcgtc 4980
 gtggagcagg accgcgaaa gacgaggaca gctctggaag cgcgcttc ggagctggcg 5040
 agcaagctgg aggccactgc tgctcgaa gctttgtag agcaggaccg cgagaacacg 5100
 agggccactt tagaggagcg actccgggtt gctgaggtgc gggctcgga gctggcagcg 5160
 cagctggagg cactgctgc tcgaagtcg tcggtggagc aggaccgca aaagacgagg 5220
 accgctctgg aagcgcgct tgcgagctg gcgagcaagc tggaggccac tgctcgcg 5280
 aagacttcgg cggagcagga ccgagagc acgagggcca cctgaagga gcggcttcgg 5340

attgctggagg tgcgcgctgc ggagctggca acccagttgg aggcgacttc ggctgcgaag 5400
 acgtcgggtgg agcaggaccg cgagagaacg agggcggtctc tggaggcgcg cgttgcggag 5460
 ctggcgagca agctggagtc gacggcggct gcgaaggcct tggttgagca ggaccgag 5520
 agcacgaggg ccaccttga ggagcggctt cggattgcgg aggcgcgcgc tgcggaactt 5580
 gccattgagt tggatgccac tgctgctgcg aaggcttcga tggaacatga ccgcgagagc 5640
 acgagggcca ctttagagga gcggttcgg attgctggagg tgcgcggagc ggaactggca 5700
 agtcagctag aggccactgc tgctgcaaaa gcgttggtgg agcaggaccg ggagagaacg 5760
 agggcggtctc tggaggctcg agctgcggag ctggcgagca agctggaggc cactgctgct 5820
 gcgaagatgt cggcggagca ggaccgagc agaaccaggc cggccataga ggagcagctt 5880
 cggctcgtc aggtgcgcgc tgcggagctg gcgagccagc tggaggccac tgctgctgca 5940
 aaagcgttgt tggagcagga ccgcgagaga acgagggcgg ctctggaagg ccgcgctgcg 6000
 gagctggcgc gaaagctgga ggccactgct attgccaaga cggcgggtgga acaggaccg 6060
 gaaagcacga gggccacctt ggaggagcgc ttgcgcggtg ctgaggtgcg cgttgcggag 6120
 ctggcgagtc agctggaggc cactgctgct gcgaagacgt cggcggagca ggagcgtgcg 6180
 aacactaggg cggcgttga gggccgcgt gcggagctgg cgagcaagct ggaggcgact 6240
 gctgctgcga agttcgcggt ggagcaggac cgtgagagga cgagggccac cttggaggag 6300
 cgcttgcgcg gtgctgaggt gcgcgctgcg gagctggcgc gcaagctgga ggctactgct 6360
 gctgcgaagg cttcgatgga acatgatgc gagagcacga gggcggctt ggaagagcgg 6420
 ttgcgggggg cggaggttcg tgctgcggag ctggcgagca agcttgaggc aactgcggct 6480
 gcgaaggccg cagtggagca ggaccgagc aggactcggg cgaccttga aaagcagctt 6540
 cgtgactccg aggcgcgggt tgcggagctt tcagggcagc tagaggccac tgctgctgcg 6600
 aagacgtcgg cggagcagga ccgcgagaac acgaaggctg ctctgcaggc gcgcgctgcg 6660
 gagctgaagg cccagttgga gtccactgct gctgcgaaga tgcagcggg gcaggaccgc 6720
 gagaacacga gggccgcgtt ggagcagcgg cttcgtgaat ccaggagca cgctgcggag 6780
 ctgaaggccc agctggagtc cactgctgct gcgaagacgt cggcggacca ggaccgag 6840
 aggatgaggg tcgcgctgca ggagcggctg cgcgtcgtg agttgcgcgc tgcggagctg 6900
 gcgagtcagc tggaggccac tgttccgcg aagacgtcgg cggagcagga ccgcgagaac 6960
 acgagggcca cgctagagca gcagcttcgc gaatccgagg cgcgcgctgc ggagctggcg 7020
 agccagctgg aggccactgc tgctgcgaag tcgtcggcgg agcaggaccg cgagaacaca 7080

aaggctgctc tgcaggcgcg cgctgcggag ctggcgagcc agctggagtc cactgctgct 7140
gcgaagatgt cagcggagca ggaccgagc aacacgaggg ccacgctaga gcagcagctt 7200
cgcgaaatccg aggcgcgcgc tgcagagctg gcgagtcagc tggagtccac tgctgctgcg 7260
aagacgtcgg cggagcagga ccgcgagaac acgagggcca cgctagagca gcagcttcgc 7320
gaatccgagg cgcgcgctgc ggagctggcg agccagctgg aggccactgc tgctgcgaag 7380
tcgtcggcgg agcaggaccg cgagaacaca aaggctgctc tgcaggcgcg cgctgcggag 7440
ctggcgagcc agctggagtc cactgctgct gcgaagatgt cagcggagca ggaccgagc 7500
aacacgaggg ctgcgttga gcagcggctt cgcgaaatccg aggagcacgc tcgggagctg 7560
gcgagccagc tggaggccac tgctgctgcg aagtcgtcgg cggagcagga ccgcgagaac 7620
acgagggcca cgctagagca gcagcttcgc gactccgaga cgcgcgctgc ggagctggcg 7680
agtcagctgg agtcactgc tgctgcgaag acgtcggcgg agcaggaccg cgagaacacg 7740
agggccgcgt tggagcagcg gcttcgcgaa tccgaggcgc gcgctgcgga gctgaaggcc 7800
gagctggagg cactgctgc cggaagacg tcggcgagc aggaccgca gaacacgagg 7860
gccgcgttg agcagcggct tcggaatcc gaggcgcgcg ctggggagct gaaggccgag 7920
ctggaggcca ctactgctgc gaagacgtcg gcgagcagg accgcgagaa cacgagggcc 7980
acgctagagc agcagcttcg cgactccgag gagcgcgctg cggagctggc gagccagctg 8040
gaggccactg ctgctgcgaa gtcgtcggcg gagcaggacc gcgagaacac gagggccacg 8100
ctagagcagc agcttcgca atccgaggcg cgcgctgggg agctggcgag ccagctggag 8160
gccactgctg ctgcgaagtc gtcggcgag caggaccgcg agaacacgag ggctgctctg 8220
caggcgcgcg ctgcggagct gaaggccgag ctggaggcca ctgctgctgc gaagacgtcg 8280
gcggagcagg accgcgagag gatgagggc acgttgagg agcggcttcg cgctgctgag 8340
ttgcgcgctg cggagctgac gggagtctg gaggccactg ctgctgcgaa gacgtcggcg 8400
gagcaggatc gtgagaggac gaggaccacg ttgcaggagc agcttcgca atccgaggcg 8460
cgcgctcgg agctgaaggc cgagctggag gccactgctg ctgcgaagtc gtcggcgag 8520
caggaccgcg agaacacgag ggctgctctg gaggagaagc taaggggcac cgaggcgcg 8580
gctcggagc tggaggcccg cctaaaggct atcgctcga caaaggcatc gatcagcag 8640
gagagggaga gctcagggc ttcttgag gaaaggctaa ggggctctga ggcgcgcgt 8700
gcggagctgg ctgctcggct aaaggctgt gctgctcga agacgtcggc ggagcaggag 8760
cgtgagaaca cgagggtgac gttgagcag cagcttcgcg aatccgagaa gcgcgctgcg 8820

gagctggcga gtcagctgga gtccactgct gctgcgaaga cgtcggcgga gcaggaccgc 8880
 gagaacacga ggggtcacgtt ggggcagcag cttcgcaat ccgaggcgcg cgctgcggag 8940
 ctgaaggccg agctggaggc cgctgctgct gcgaagtcgt cggcggagca ggaccgcgag 9000
 aacacgaggg ctgctctgga ggagaagcta aggggcaccg aggcgcgcgc tgcggagctg 9060
 gcggcccccc taaaggctat tgctcgatg aaggcgtaa tggtcagga gcgggaaagc 9120
 gcgagggatg ctctggagga aaagctaagg ggctctgagg cgcgcgctgc ggagctggct 9180
 gctcggctaa aggtgctgc tgctgcgaag acgtcggcgg agcaggagcg tgagaacacg 9240
 aggtgacgt tggagcagca gttcgcgaa tccgaggagc gcgctcgga gctggcgagt 9300
 cagctggagg ccgctgctgc tcgaagtcg tcggcggagc aggaccgcga gaacacgagg 9360
 gctgctctgg aggagaagct aagagactcc gaggagcgcg ctgcggagct gggaaccctg 9420
 gtaaaggcta gttctcggc gaaggcttg gcggagcagg agcgggacag gataagggt 9480
 gccctggagg agaagttcg tgattcgag cgcgcgctg cggagctgac gaccaagctg 9540
 gaggccactg ttgctcgaa gtcgtcggcg gagcaggagc gggaaaatat aaaggtggct 9600
 ttagaggaag aattggtga tgcaagggcg aaattggctg gaatggaggc gtcgttgaag 9660
 gaatcgaagt tggagttga aggtcgtgc ggggagctg aaggagagt cgagaagctg 9720
 aggaatgata aggtcaggta tcgaaaaag gttaatcgc ttgagtatca gatgcgcac 9780
 gatgaggctc gactgaaggc gcgtcgtgat gcggttcac gaaaggagt a 9831

<210> 18

<211> 402

<212> DNA

<213> L. donovani

<400> 18

atgggaagtt cttgtacaaa ggactccga aaggagcccc agaagcgtgc tgataacac 60
 cataaaacca ctgaggccaa tcacagaggc gccgccgtgc cccgaagca cgccggcgg 120
 gcgatgaacg actctgcccc gaagaaggat ggccatacac agaaaaatga cggcgatggc 180
 cctaaggagg atgaccatac acagaaaaat gacggcgatg gccctaagga ggatgacat 240

gcgcacaacg acggcggtag ccctaaggag gatgagaatc tgccgcaaaa cgatggggat 300
 gcgcaggaga agaacgaaga tggacacaac gtgggggatg gagctaacga caatgaggat 360
 ggtaacgatg atcagccgaa ggagcacgct gccggcaact ag 402

<210> 19

<211> 401

<212> PRT

<213> L. donovani

<400> 19

Met Gly Thr Ser Cys Thr Lys Asp Ser Ala Lys Glu Pro Gln Lys Arg

1 5 10 15

Ala Asp Asn Ile His Lys Thr Thr Glu Ala Asn His Gly Gly Ala Thr

20 25 30

Gly Val Pro Pro Lys His Thr Gly Ser Ala Met Asn Asp Ser Ala Pro

35 40 45

Lys Glu Asp Gly His Thr Gln Lys Asn Asp Gly Asp Gly Pro Lys Glu

50 55 60

Asp Gly His Thr Gln Lys Asn Asp Gly Asp Gly Pro Lys Glu Asp Gly

65 70 75 80

His Thr Gln Lys Asn Asp Gly Asp Gly Pro Lys Glu Asp Gly His Thr

85 90 95

Gln Lys Asn Asp Gly Asp Gly Pro Lys Glu Asp Gly His Thr Gln Lys

100 105 110

Asn Asp Gly Asp Gly Pro Lys Glu Asp Gly His Thr Gln Lys Asn Asp

115 120 125

Gly Asp Gly Pro Lys Glu Asp Gly His Thr Gln Lys Asn Asp Gly Asp

130 135 140

Gly Pro Lys Glu Asp Gly His Thr Gln Lys Asn Asp Gly Asp Gly Pro

145 150 155 160
 Lys Glu Asp Gly His Thr Gln Lys Asn Asp Gly Asp Gly Pro Lys Glu
 165 170 175
 Asp Gly His Thr Gln Lys Asn Asp Gly Asp Gly Pro Lys Glu Asp Gly
 180 185 190
 His Thr Gln Lys Asn Asp Gly Asp Gly Pro Lys Glu Asp Gly His Thr
 195 200 205
 Gln Lys Asn Asp Gly Asp Gly Pro Lys Glu Asp Gly His Thr Gln Lys
 210 215 220
 Asn Asp Gly Asp Gly Pro Lys Glu Asp Gly His Thr Gln Lys Asn Asp
 225 230 235 240
 Gly Asp Gly Pro Lys Glu Asp Gly His Thr Gln Lys Asn Asp Gly Asp
 245 250 255
 Gly Pro Lys Glu Asp Gly His Thr Gln Lys Asn Asp Gly Asp Gly Pro
 260 265 270
 Lys Glu Asp Gly His Thr Gln Lys Asn Asp Gly Asp Gly Pro Lys Glu
 275 280 285
 Asp Gly His Thr Gln Lys Asn Asp Gly Asp Gly Pro Lys Glu Asp Gly
 290 295 300
 His Thr Gln Lys Asn Asp Gly Asp Gly Pro Lys Glu Asp Gly His Thr
 305 310 315 320
 Gln Lys Asn Asp Gly Asp Gly Pro Lys Glu Asp Gly His Thr Gln Lys
 325 330 335
 Asn Asp Gly Asp Gly Pro Lys Glu Asp Gly His Thr Gln Lys Asn Asp
 340 345 350
 Gly Asp Gly Pro Lys Glu Gly Glu Asn Leu Gln Gln Asn Asp Gly Asp
 355 360 365
 Ala Gln Glu Lys Asn Glu Asp Gly His Asn Val Gly Asp Gly Ala Asn
 370 375 380

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

385 390 395 400

Asn

<210> 20

<211> 3276

<212> PRT

<213> L. donovani

<400> 20

Met His Pro Ser Thr Val Arg Arg Glu Ala Glu Arg Val Lys Val Ser

1 5 10 15

Val Arg Val Arg Pro Leu Asn Glu Arg Glu Asn Asn Ala Pro Glu Gly

20 25 30

Thr Lys Val Thr Val Ala Ala Lys Gln Ala Ala Ala Val Val Thr Val

35 40 45

Lys Val Leu Gly Gly Ser Asn Asn Ser Gly Ala Ala Glu Ser Met Gly

50 55 60

Thr Ala Arg Arg Val Ala Gln Asp Phe Gln Phe Asp His Val Phe Trp

65 70 75 80

Ser Val Glu Thr Pro Asp Ala Cys Gly Ala Thr Pro Ala Thr Gln Ala

85 90 95

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

100 105 110

Gly Phe Asn Ser Cys Leu Phe Ala Tyr Gly Gln Thr Gly Ser Gly Lys

115 120 125

Thr Tyr Thr Met Met Gly Ala Asp Val Ser Val Leu Ser Gly Glu Gly

130 135 140
 Asn Gly Val Thr Pro Arg Ile Cys Leu Glu Ile Phe Ala Arg Lys Ala
 145 150 155 160
 Ser Val Glu Ala Gln Gly His Ser Arg Trp Ile Val Glu Leu Gly Tyr
 165 170 175
 Val Glu Val Tyr Asn Glu Arg Val Ser Asp Leu Leu Gly Lys Arg Lys
 180 185 190
 Lys Gly Val Lys Gly Gly Gly Glu Glu Val Tyr Val Asp Val Arg Glu
 195 200 205
 His Pro Ser Arg Gly Val Phe Leu Glu Gly Gln Arg Leu Val Glu Val
 210 215 220
 Gly Ser Leu Asp Asp Val Val Arg Leu Ile Glu Ile Gly Asn Gly Val
 225 230 235 240
 Arg His Thr Ala Ser Thr Lys Met Asn Asp Arg Ser Ser Arg Ser His
 245 250 255
 Ala Ile Ile Met Leu Leu Leu Arg Glu Glu Arg Thr Met Thr Thr Lys
 260 265 270
 Ser Gly Glu Thr Ile Arg Thr Ala Gly Lys Ser Ser Arg Met Asn Leu
 275 280 285
 Val Asp Leu Ala Gly Ser Glu Arg Val Ala Gln Ser Gln Val Glu Gly
 290 295 300
 Gln Gln Phe Lys Glu Ala Thr His Ile Asn Leu Ser Leu Thr Thr Leu
 305 310 315 320
 Gly Arg Val Ile Asp Val Leu Ala Asp Met Ala Thr Lys Gly Ala Lys
 325 330 335
 Ala Gln Tyr Ser Val Ala Pro Phe Arg Asp Ser Lys Leu Thr Phe Ile
 340 345 350
 Leu Lys Asp Ser Leu Gly Gly Asn Ser Lys Thr Phe Met Ile Ala Thr
 355 360 365

Val Ser Pro Ser Ala Leu Asn Tyr Glu Glu Thr Leu Ser Thr Leu Arg

370 375 380

Tyr Ala Ser Arg Ala Arg Asp Ile Val Asn Val Ala Gln Val Asn Glu

385 390 395 400

Asp Pro Arg Ala Arg Arg Ile Arg Glu Leu Glu Glu Gln Met Glu Asp

405 410 415

Met Arg Gln Ala Met Ala Gly Gly Asp Pro Ala Tyr Val Ser Glu Leu

420 425 430

Lys Lys Lys Leu Ala Leu Leu Glu Ser Glu Ala Gln Lys Arg Ala Ala

435 440 445

Asp Leu Gln Ala Leu Glu Arg Glu Arg Glu His Asn Gln Val Gln Glu

450 455 460

Arg Leu Leu Arg Ala Thr Glu Ala Glu Lys Ser Glu Leu Glu Ser Arg

465 470 475 480

Ala Ala Ala Leu Gln Glu Glu Met Ala Ala Thr Arg Arg Gln Ala Asp

485 490 495

Lys Met Gln Ala Leu Asn Leu Arg Leu Lys Glu Glu Gln Ala Arg Lys

500 505 510

Glu Arg Glu Leu Leu Lys Glu Met Ala Lys Lys Asp Ala Ala Leu Ser

515 520 525

Lys Val Arg Arg Arg Lys Asp Ala Glu Ile Ala Ser Glu Arg Glu Lys

530 535 540

Leu Glu Ser Thr Val Ala Gln Leu Glu Arg Glu Gln Arg Glu Arg Glu

545 550 555 560

Val Ala Leu Asp Ala Leu Gln Thr His Gln Arg Lys Leu Gln Glu Ala

565 570 575

Leu Glu Ser Ser Glu Arg Thr Ala Ala Glu Arg Asp Gln Leu Leu Gln

580 585 590

Gln Leu Thr Glu Leu Gln Ser Glu Arg Thr Gln Leu Ser Gln Val Val

595 600 605
 Thr Asp Arg Glu Arg Leu Thr Arg Asp Leu Gln Arg Ile Gln Tyr Glu
 610 615 620
 Tyr Gly Glu Thr Glu Leu Ala Arg Asp Val Ala Leu Cys Ala Ala Gln
 625 630 635 640
 Glu Met Glu Ala Arg Tyr His Ala Ala Val Phe His Leu Gln Thr Leu
 645 650 655
 Leu Glu Leu Ala Thr Glu Trp Glu Asp Ala Leu Arg Glu Arg Ala Leu
 660 665 670
 Ala Glu Arg Asp Glu Ala Ala Ala Glu Leu Asp Ala Ala Ala Ser
 675 680 685
 Thr Ser Gln Asn Ala Arg Glu Ser Ala Ser Glu Arg Leu Thr Ser Leu
 690 695 700
 Glu Gln Leu Leu Arg Glu Ser Glu Glu Arg Ala Ala Glu Leu Ala Ser
 705 710 715 720
 Gln Leu Glu Ser Thr Thr Ala Ala Lys Met Ser Ala Glu Gln Asp Arg
 725 730 735
 Glu Asn Thr Arg Ala Thr Leu Glu Gln Gln Leu Arg Asp Ser Glu Glu
 740 745 750
 Arg Ala Ala Glu Leu Ala Ser Gln Leu Glu Ala Thr Ala Ala Ala Lys
 755 760 765
 Ser Ser Ala Glu Gln Asp Arg Glu Asn Thr Arg Ala Ala Leu Glu Gln
 770 775 780
 Gln Leu Arg Asp Ser Glu Glu Arg Ala Ala Glu Leu Ala Ser Gln Leu
 785 790 795 800
 Glu Ser Thr Thr Ala Ala Lys Thr Ser Ala Glu Gln Asp Arg Glu Asn
 805 810 815
 Thr Arg Ala Thr Leu Glu Gln Gln Leu Arg Asp Ser Glu Glu Arg Ala
 820 825 830

Ala Glu Leu Ala Ser Gln Leu Glu Ser Thr Thr Ala Ala Lys Met Ser

835 840 845

Ala Glu Gln Asp Arg Glu Asn Thr Arg Ala Ala Leu Glu Gln Gln Leu

850 855 860

Leu Glu Ser Glu Glu Arg Ala Ala Glu Leu Lys Ala Glu Leu Glu Ala

865 870 875 880

Thr Ala Ala Ala Lys Ser Ser Ala Glu Gln Asp Arg Glu Asn Thr Arg

885 890 895

Ala Ala Leu Glu Gln Gln Leu Arg Asp Ser Glu Glu Arg Ala Ala Glu

900 905 910

Leu Ala Ser Gln Leu Glu Ser Thr Thr Ala Ala Lys Thr Ser Ala Glu

915 920 925

Gln Asp Arg Glu Asn Thr Arg Ala Thr Leu Glu Gln Gln Leu Arg Asp

930 935 940

Ser Glu Glu Arg Ala Ala Glu Leu Ala Ser Gln Leu Glu Ser Thr Thr

945 950 955 960

Ala Ala Lys Met Ser Ala Glu Gln Asp Arg Glu Asn Thr Arg Ala Thr

965 970 975

Leu Glu Gln Gln Leu Arg Asp Ser Glu Glu Arg Ala Ala Glu Leu Ala

980 985 990

Ser Gln Leu Glu Ser Thr Thr Ala Ala Lys Met Ser Ala Glu Gln Asp

995 1000 1005

Arg Glu Asn Thr Arg Ala Thr Leu Glu Gln Gln Leu Arg Asp Ser Glu

1010 1015 1020

Glu Arg Ala Ala Glu Leu Ala Ser Gln Leu Glu Ser Thr Thr Ala Ala

1025 1030 1035 1040

Lys Met Ser Ala Glu Gln Asp Arg Glu Asn Thr Arg Ala Ala Leu Glu

1045 1050 1055

Gln Gln Leu Leu Glu Ser Glu Glu Arg Ala Ala Glu Leu Lys Ala Glu

1060	1065	1070	
Leu Glu Ala Thr Ala Ala Ala Lys Ser Ser Ala Glu Gln Asp Arg Glu			
1075	1080	1085	
Asn Thr Arg Ala Thr Leu Glu Gln Gln Leu Arg Asp Ser Glu Glu Arg			
1090	1095	1100	
Ala Ala Glu Leu Ala Ser Gln Leu Glu Ala Thr Ala Ala Ala Lys Ser			
1105	1110	1115	1120
Ser Ala Glu Gln Asp Arg Glu Asn Thr Arg Ala Ala Leu Glu Gln Gln			
1125	1130	1135	
Leu Arg Asp Ser Glu Glu Arg Ala Gly Glu Leu Ala Ser Gln Leu Glu			
1140	1145	1150	
Ala Thr Ala Ala Ala Lys Ser Ser Ala Glu Gln Asp Arg Glu Asn Thr			
1155	1160	1165	
Arg Ala Ala Leu Glu Gln Gln Leu Leu Glu Ser Glu Ala Arg Ala Ala			
1170	1175	1180	
Glu Leu Ala Ser Gln Leu Glu Ala Thr Ala Ala Ala Lys Ser Ser Ala			
1185	1190	1195	1200
Glu Gln Asp Arg Glu Asn Thr Arg Ala Ala Leu Glu Gln Gln Leu Arg			
1205	1210	1215	
Glu Ser Glu Ala Arg Ala Gly Glu Leu Ala Ser Gln Leu Glu Ala Thr			
1220	1225	1230	
Ala Ala Ala Lys Met Ser Ala Glu Gln Asp Arg Glu Asn Thr Arg Ala			
1235	1240	1245	
Ala Leu Glu Gln Gln Leu Arg Glu Ser Glu Glu Arg Ala Ala Glu Leu			
1250	1255	1260	
Ala Ser Gln Leu Glu Ala Thr Ala Ala Ala Lys Ser Ser Ala Glu Gln			
1265	1270	1275	1280
Asp Arg Glu Asn Thr Arg Ala Ala Leu Glu Gln Gln Leu Arg Glu Ser			
1285	1290	1295	

Glu Ala Arg Ala Ala Glu Leu Ala Ser Gln Leu Glu Ala Thr Ala Ala

1300 1305 1310

Ala Lys Ser Ser Ala Glu Gln Asp Arg Glu Asn Thr Arg Ala Ala Leu

1315 1320 1325

Glu Gln Gln Leu Arg Glu Ser Glu Ala Arg Ala Ala Glu Leu Ala Ser

1330 1335 1340

Gln Leu Glu Ala Thr Ala Ala Ala Lys Thr Ser Ala Glu Gln Asp Arg

1345 1350 1355 1360

Glu Asn Thr Arg Ala Ala Leu Glu Gln Gln Leu Arg Glu Ser Glu Glu

1365 1370 1375

Arg Ala Ala Glu Leu Ala Ser Gln Leu Glu Ala Thr Ala Ala Ala Lys

1380 1385 1390

Met Ser Ala Glu Gln Asp Arg Glu Asn Thr Arg Ala Thr Leu Glu Gln

1395 1400 1405

Gln Leu Leu Glu Ser Glu Glu Arg Ala Ala Glu Leu Ala Ser Gln Leu

1410 1415 1420

Glu Ala Thr Ala Ala Ala Lys Met Ser Ala Glu Gln Asp Arg Glu Asn

1425 1430 1435 1440

Thr Arg Ala Thr Leu Glu Gln Gln Leu Leu Glu Ser Glu Glu Arg Ala

1445 1450 1455

Ala Glu Leu Ala Ser Gln Leu Glu Ala Thr Ala Ala Ala Lys Ser Ser

1460 1465 1470

Ala Glu Gln Asp Arg Glu Asn Thr Arg Ala Ala Leu Glu Gln Gln Leu

1475 1480 1485

Arg Glu Ser Glu Ala Arg Ala Ala Glu Leu Ala Ser Gln Leu Glu Ala

1490 1495 1500

Thr Ala Ala Ala Lys Thr Ser Ala Glu Gln Asp Arg Glu Asn Thr Arg

1505 1510 1515 1520

Ala Thr Leu Glu Gln Gln Leu Arg Glu Ser Glu Ala Arg Ala Gly Glu

1525	1530	1535	
Leu Ala Ser Gln Leu Glu Ala Thr Ala Ala Ala Lys Ser Ser Ala Glu			
1540	1545	1550	
Gln Asp Arg Glu Asn Thr Arg Ala Ala Leu Glu Gln Gln Leu Arg Glu			
1555	1560	1565	
Ser Glu Glu Arg Ala Ala Glu Leu Met Arg Lys Leu Glu Ala Thr Ala			
1570	1575	1580	
Ala Ala Lys Ser Ser Val Glu Gln Asp Arg Glu Ser Met Lys Val Ala			
1585	1590	1595	1600
Leu Glu Ala Arg Thr Ala Glu Leu Ala Ser Arg Leu Lys Ala Thr Ala			
1605	1610	1615	
Ala Ala Lys Thr Ser Ala Glu Gln Glu Arg Asp Arg Thr Arg Ala Thr			
1620	1625	1630	
Phe Glu Glu Arg Leu Arg Val Ala Glu Val Arg Ala Val Gln Leu Ala			
1635	1640	1645	
Ser Gln Leu Glu Ala Thr Ala Ala Ala Lys Ser Ser Val Glu Gln Asp			
1650	1655	1660	
Arg Glu Lys Thr Arg Thr Ala Leu Glu Ala Arg Val Ala Glu Leu Ala			
1665	1670	1675	1680
Ser Lys Leu Glu Ala Thr Ala Ala Ala Lys Ala Leu Val Glu Gln Asp			
1685	1690	1695	
Arg Glu Asn Thr Arg Ala Thr Leu Glu Glu Arg Leu Arg Val Ala Glu			
1700	1705	1710	
Val Arg Ala Ala Glu Leu Ala Ala Gln Leu Glu Ala Thr Ala Ala Ala			
1715	1720	1725	
Lys Ser Ser Val Glu Gln Asp Arg Glu Lys Thr Arg Thr Ala Leu Glu			
1730	1735	1740	
Ala Arg Val Ala Glu Leu Ala Ser Lys Leu Glu Ala Thr Ala Ala Ala			
1745	1750	1755	1760

Lys Thr Ser Ala Glu Gln Asp Arg Glu Ser Thr Arg Ala Thr Leu Lys

1765 1770 1775

Glu Arg Leu Arg Ile Ala Glu Val Arg Ala Ala Glu Leu Ala Thr Gln

1780 1785 1790

Leu Glu Ala Thr Ser Ala Ala Lys Thr Ser Val Glu Gln Asp Arg Glu

1795 1800 1805

Arg Thr Arg Ala Ala Leu Glu Ala Arg Val Ala Glu Leu Ala Ser Lys

1810 1815 1820

Leu Glu Ser Thr Ala Ala Ala Lys Ala Leu Val Glu Gln Asp Arg Glu

1825 1830 1835 1840

Ser Thr Arg Ala Thr Leu Glu Glu Arg Leu Arg Ile Ala Glu Ala Arg

1845 1850 1855

Ala Ala Glu Leu Ala Ile Glu Leu Asp Ala Thr Ala Ala Ala Lys Ala

1860 1865 1870

Ser Met Glu His Asp Arg Glu Ser Thr Arg Ala Thr Leu Glu Glu Arg

1875 1880 1885

Leu Arg Ile Ala Glu Val Arg Gly Ala Glu Leu Ala Ser Gln Leu Glu

1890 1895 1900

Ala Thr Ala Ala Ala Lys Ala Leu Leu Glu Gln Asp Arg Glu Arg Thr

1905 1910 1915 1920

Arg Ala Ala Leu Glu Ala Arg Ala Ala Glu Leu Ala Ser Lys Leu Glu

1925 1930 1935

Ala Thr Ala Ala Ala Lys Met Ser Ala Glu Gln Asp Arg Glu Arg Thr

1940 1945 1950

Arg Ala Ala Ile Glu Glu Gln Leu Arg Leu Ala Glu Val Arg Ala Ala

1955 1960 1965

Glu Leu Ala Ser Gln Leu Glu Ala Thr Ala Ala Ala Lys Ala Leu Leu

1970 1975 1980

Glu Gln Asp Arg Glu Arg Thr Arg Ala Ala Leu Glu Gly Arg Ala Ala

1985	1990	1995	2000
Glu Leu Ala Arg Lys Leu Glu Ala Thr Ala Ile Ala Lys Thr Ala Val			
2005	2010	2015	
Glu Gln Asp Arg Glu Ser Thr Arg Ala Thr Leu Glu Glu Arg Leu Arg			
2020	2025	2030	
Gly Ala Glu Val Arg Val Ala Glu Leu Ala Ser Gln Leu Glu Ala Thr			
2035	2040	2045	
Ala Ala Ala Lys Thr Ser Ala Glu Gln Glu Arg Ala Asn Thr Arg Ala			
2050	2055	2060	
Ala Leu Glu Ala Arg Ala Ala Glu Leu Ala Ser Lys Leu Glu Ala Thr			
2065	2070	2075	2080
Ala Ala Ala Lys Phe Ala Val Glu Gln Asp Arg Glu Arg Thr Arg Ala			
2085	2090	2095	
Thr Leu Glu Glu Arg Leu Arg Gly Ala Glu Val Arg Ala Ala Glu Leu			
2100	2105	2110	
Ala Arg Lys Leu Glu Ala Thr Ala Ala Ala Lys Ala Ser Met Glu His			
2115	2120	2125	
Asp Arg Glu Ser Thr Arg Ala Ala Leu Glu Glu Arg Leu Arg Gly Ala			
2130	2135	2140	
Glu Val Arg Ala Ala Glu Leu Ala Ser Lys Leu Glu Ala Thr Ala Ala			
2145	2150	2155	2160
Ala Lys Ala Ala Val Glu Gln Asp Arg Glu Arg Thr Arg Ala Thr Phe			
2165	2170	2175	
Glu Lys Gln Leu Arg Asp Ser Glu Ala Arg Val Ala Glu Leu Ser Gly			
2180	2185	2190	
Gln Leu Glu Ala Thr Ala Ala Ala Lys Thr Ser Ala Glu Gln Asp Arg			
2195	2200	2205	
Glu Asn Thr Lys Ala Ala Leu Gln Ala Arg Ala Ala Glu Leu Lys Ala			
2210	2215	2220	

Gln Leu Glu Ser Thr Ala Ala Ala Lys Met Ser Ala Glu Gln Asp Arg

2225 2230 2235 2240

Glu Asn Thr Arg Ala Ala Leu Glu Gln Arg Leu Arg Glu Ser Glu Glu

2245 2250 2255

His Ala Ala Glu Leu Lys Ala Gln Leu Glu Ser Thr Ala Ala Ala Lys

2260 2265 2270

Thr Ser Ala Asp Gln Asp Arg Glu Arg Met Arg Val Ala Leu Gln Glu

2275 2280 2285

Arg Leu Arg Val Ala Glu Leu Arg Ala Ala Glu Leu Ala Ser Gln Leu

2290 2295 2300

Glu Ala Thr Val Ala Ala Lys Thr Ser Ala Glu Gln Asp Arg Glu Asn

2305 2310 2315 2320

Thr Arg Ala Thr Leu Glu Gln Gln Leu Arg Glu Ser Glu Ala Arg Ala

2325 2330 2335

Ala Glu Leu Ala Ser Gln Leu Glu Ala Thr Ala Ala Ala Lys Ser Ser

2340 2345 2350

Ala Glu Gln Asp Arg Glu Asn Thr Lys Ala Ala Leu Gln Ala Arg Ala

2355 2360 2365

Ala Glu Leu Ala Ser Gln Leu Glu Ser Thr Ala Ala Ala Lys Met Ser

2370 2375 2380

Ala Glu Gln Asp Arg Glu Asn Thr Arg Ala Thr Leu Glu Gln Gln Leu

2385 2390 2395 2400

Arg Glu Ser Glu Ala Arg Ala Ala Glu Leu Ala Ser Gln Leu Glu Ser

2405 2410 2415

Thr Ala Ala Ala Lys Thr Ser Ala Glu Gln Asp Arg Glu Asn Thr Arg

2420 2425 2430

Ala Thr Leu Glu Gln Gln Leu Arg Glu Ser Glu Ala Arg Ala Ala Glu

2435 2440 2445

Leu Ala Ser Gln Leu Glu Ala Thr Ala Ala Ala Lys Ser Ser Ala Glu

2450 2455 2460
 Gln Asp Arg Glu Asn Thr Lys Ala Ala Leu Gln Ala Arg Ala Ala Glu
 2465 2470 2475 2480
 Leu Ala Ser Gln Leu Glu Ser Thr Ala Ala Ala Lys Met Ser Ala Glu
 2485 2490 2495
 Gln Asp Arg Glu Asn Thr Arg Ala Ala Leu Glu Gln Arg Leu Arg Glu
 2500 2505 2510
 Ser Glu Glu His Ala Ala Glu Leu Ala Ser Gln Leu Glu Ala Thr Ala
 2515 2520 2525
 Ala Ala Lys Ser Ser Ala Glu Gln Asp Arg Glu Asn Thr Arg Ala Thr
 2530 2535 2540
 Leu Glu Gln Gln Leu Arg Asp Ser Glu Thr Arg Ala Ala Glu Leu Ala
 2545 2550 2555 2560
 Ser Gln Leu Glu Ser Thr Ala Ala Ala Lys Thr Ser Ala Glu Gln Asp
 2565 2570 2575
 Arg Glu Asn Thr Arg Ala Ala Leu Glu Gln Arg Leu Arg Glu Ser Glu
 2580 2585 2590
 Ala Arg Ala Ala Glu Leu Lys Ala Glu Leu Glu Ala Thr Ala Ala Ala
 2595 2600 2605
 Lys Thr Ser Ala Glu Gln Asp Arg Glu Asn Thr Arg Ala Ala Leu Glu
 2610 2615 2620
 Gln Arg Leu Arg Glu Ser Glu Ala Arg Ala Gly Glu Leu Lys Ala Glu
 2625 2630 2635 2640
 Leu Glu Ala Thr Thr Ala Ala Lys Thr Ser Ala Glu Gln Asp Arg Glu
 2645 2650 2655
 Asn Thr Arg Ala Thr Leu Glu Gln Gln Leu Arg Asp Ser Glu Glu Arg
 2660 2665 2670
 Ala Ala Glu Leu Ala Ser Gln Leu Glu Ala Thr Ala Ala Ala Lys Ser
 2675 2680 2685

Ser Ala Glu Gln Asp Arg Glu Asn Thr Arg Ala Thr Leu Glu Gln Gln

2690 2695 2700

Leu Arg Glu Ser Glu Ala Arg Ala Gly Glu Leu Ala Ser Gln Leu Glu

2705 2710 2715 2720

Ala Thr Ala Ala Ala Lys Ser Ser Ala Glu Gln Asp Arg Glu Asn Thr

2725 2730 2735

Arg Ala Ala Leu Gln Ala Arg Ala Ala Glu Leu Lys Ala Glu Leu Glu

2740 2745 2750

Ala Thr Ala Ala Ala Lys Thr Ser Ala Glu Gln Asp Arg Glu Arg Met

2755 2760 2765

Arg Val Thr Leu Glu Glu Arg Leu Arg Val Ala Glu Leu Arg Ala Ala

2770 2775 2780

Glu Leu Thr Gly Val Leu Glu Ala Thr Ala Ala Ala Lys Thr Ser Ala

2785 2790 2795 2800

Glu Gln Asp Arg Glu Arg Thr Arg Thr Thr Leu Gln Glu Gln Leu Arg

2805 2810 2815

Glu Ser Glu Ala Arg Ala Ala Glu Leu Lys Ala Glu Leu Glu Ala Thr

2820 2825 2830

Ala Ala Ala Lys Ser Ser Ala Glu Gln Asp Arg Glu Asn Thr Arg Ala

2835 2840 2845

Ala Leu Glu Glu Lys Leu Arg Gly Thr Glu Ala Arg Ala Ala Glu Leu

2850 2855 2860

Glu Ala Arg Leu Lys Ala Ile Ala Ala Thr Lys Ala Ser Ile Glu Gln

2865 2870 2875 2880

Glu Arg Glu Ser Ser Arg Ala Ser Leu Glu Glu Arg Leu Arg Gly Ser

2885 2890 2895

Glu Ala Arg Ala Ala Glu Leu Ala Ala Arg Leu Lys Ala Ala Ala Ala

2900 2905 2910

Ala Lys Thr Ser Ala Glu Gln Glu Arg Glu Asn Thr Arg Val Thr Leu

2915 2920 2925
 Glu Gln Gln Leu Arg Glu Ser Glu Lys Arg Ala Ala Glu Leu Ala Ser
 2930 2935 2940
 Gln Leu Glu Ser Thr Ala Ala Ala Lys Thr Ser Ala Glu Gln Asp Arg
 2945 2950 2955 2960
 Glu Asn Thr Arg Val Thr Leu Gly Gln Gln Leu Arg Glu Ser Glu Ala
 2965 2970 2975
 Arg Ala Ala Glu Leu Lys Ala Glu Leu Glu Ala Ala Ala Ala Lys
 2980 2985 2990
 Ser Ser Ala Glu Gln Asp Arg Glu Asn Thr Arg Ala Ala Leu Glu Glu
 2995 3000 3005
 Lys Leu Arg Gly Thr Glu Ala Arg Ala Ala Glu Leu Ala Ala Arg Leu
 3010 3015 3020
 Lys Ala Ile Ala Ala Met Lys Ala Ser Met Val Gln Glu Arg Glu Ser
 3025 3030 3035 3040
 Ala Arg Asp Ala Leu Glu Glu Lys Leu Arg Gly Ser Glu Ala Arg Ala
 3045 3050 3055
 Ala Glu Leu Ala Ala Arg Leu Lys Ala Ala Ala Ala Lys Thr Ser
 3060 3065 3070
 Ala Glu Gln Glu Arg Glu Asn Thr Arg Val Thr Leu Glu Gln Gln Leu
 3075 3080 3085
 Arg Glu Ser Glu Glu Arg Ala Ala Glu Leu Ala Ser Gln Leu Glu Ala
 3090 3095 3100
 Ala Ala Ala Ala Lys Ser Ser Ala Glu Gln Asp Arg Glu Asn Thr Arg
 3105 3110 3115 3120
 Ala Ala Leu Glu Glu Lys Leu Arg Asp Ser Glu Glu Arg Ala Ala Glu
 3125 3130 3135
 Leu Gly Thr Arg Val Lys Ala Ser Ser Ala Ala Lys Ala Leu Ala Glu
 3140 3145 3150

Gln Glu Arg Asp Arg Ile Arg Ala Ala Leu Glu Glu Lys Leu Arg Asp

3155 3160 3165

Ser Glu Ala Arg Ala Ala Glu Leu Thr Thr Lys Leu Glu Ala Thr Val

3170 3175 3180

Ala Ala Lys Ser Ser Ala Glu Gln Glu Arg Glu Asn Ile Lys Val Ala

3185 3190 3195 3200

Leu Glu Glu Glu Leu Val Asp Ala Arg Ala Lys Leu Ala Gly Met Glu

3205 3210 3215

Ala Ser Leu Lys Glu Ser Lys Leu Glu Phe Glu Gly Arg Val Gly Glu

3220 3225 3230

Leu Glu Gly Glu Cys Glu Lys Leu Arg Asn Asp Lys Val Arg Tyr Ala

3235 3240 3245

Lys Lys Val Gln Ser Leu Glu Tyr Gln Met Arg Ile Asp Glu Ala Arg

3250 3255 3260

Leu Lys Ala Arg Arg Asp Ala Val His Arg Lys Glu

3265 3270 3275

<210> 21

<211> 9

<212> PRT

<213> desconhecido

<220>

<223> Sequência N-terminal do polipeptídeo de fusão

<400> 21

Met His His His His His His Thr Ser

1

5