



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 326 174**

51 Int. Cl.:

C12N 15/30 (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)

C07K 14/44 (2006.01)

C07K 16/20 (2006.01)

A61K 31/70 (2006.01)

A61K 38/16 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 33/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05109393 .8**

96 Fecha de presentación : **23.12.1999**

97 Número de publicación de la solicitud: **1624063**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **08.02.2006**

54 Título: **Gen quimérico que codifica los determinantes antigénicos de cuatro proteínas de *L. Infantum*.**

30 Prioridad: **23.12.1998 US 113825 P**
23.12.1998 CA 2256124

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
02.10.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
02.10.2009

73 Titular/es: **Laboratorios LETI, S.L.**
c/ del Sol, 5 - Polígono Industrial Norte
28760 Tres Cantos, Madrid, ES

72 Inventor/es: **Bedate Alonso, Carlos**

74 Agente: **Tomás Gil, Tesifonte Enrique**

ES 2 326 174 T3

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

DESCRIPCIÓN

Gen quimérico que codifica los determinantes antigénicos de cuatro proteínas del *L. Infantum*.

5 **Objetivo de la invención**

La presente descripción se refiere a una solicitud de Patente de Invención, que se refiere a un gen quimérico formado por las secuencias de ADN que codifican los determinantes antigénicos de cuatro proteínas de *L. infantum*, y a proteínas codificadas por dicho gen quimérico, útiles para la prevención o el tratamiento de la leishmaniasis, en particular la leishmaniasis canina. El objetivo obvio de esta invención se basa en usar la secuencia de genes o la proteína obtenida del gen quimérico para suministrar composiciones farmacéuticas para prevenir o tratar la leishmaniasis, en particular la Leishmaniasis canina, que puede estar presente en el cuerpo de un paciente, por ejemplo como una vacuna o una preparación del anticuerpo monoclonal. Este paciente no tiene que ser un perro sino que puede también ser un ser humano que padezca enfermedades que implican la inmunodepresión. Para conseguir este objetivo, se producirá un gen quimérico el cual codifica una proteína llamada PQ que consiste en un producto quimérico que se origina a partir de una síntesis “*in vitro*” de un gen quimérico construido “*ad hoc*”, que contiene cinco de los determinantes antigénicos de cuatro proteínas diferentes. El producto está configurado como altamente sensible y es específico para, por ejemplo, generar una respuesta inmunológica protectora contra la Leishmaniasis canina, o para preparar anticuerpos contra la Leishmaniasis canina.

20 **Campo de la invención**

Esta invención es de utilidad dentro de la industria dedicada a la producción de productos farmacéuticos en general.

25 **Antecedentes de la invención**

Los protozoos parasitarios del género de la Leishmania son los agentes etiológicos que causan la Leishmaniasis, una gama de enfermedades que tienen una distribución mundial y que están caracterizadas porque dan lugar a una amplia variedad de síntomas clínicos.

Las formas principales de Leishmaniasis son zoonóticas en la naturaleza y los seres humanos están considerados como huéspedes secundarios.

Las especies denominadas *L. Infantum*, ampliamente distribuidas por muchas áreas mediterráneas es la causa de la Leishmaniasis visceral (LV) en los seres humanos y perros.

De hecho, los perros infectados con *L. Infantum* son la principal reserva animal de este parásito, particularmente durante el periodo de una larga incubación antes de que los síntomas clínicos puedan ser observados.

Los datos epidemiológicos indican que hay una correlación directa entre la prevalencia de la Leishmaniasis canina y la transmisión del parásito a los seres humanos. Por esta razón, es crucial detectar la enfermedad o infección pronto en campañas emprendidas para controlar la extensión de la enfermedad.

El parásito es transmitido al huésped vertebrado como un promastigoto flagelado, mediante la picadura de una mosca de la familia “*Phlebotominae*”, y el parásito introduce las células de los fagos mononucleares en las cuales se diferencian y se reproducen como amastigotos, dentro de la estructura fagolisosómica.

Las células infectadas se acumulan en ciertos tejidos, principalmente bazo, hígado y ganglios linfáticos. Se estima que alrededor de 15 millones de personas están infectadas por Leishmaniasis, y cada año en el mundo aparecen 500.000 casos clínicos nuevos, principalmente en el mundo subdesarrollado y en vías de desarrollo.

En los países sudoccidentales de Europa, la Leishmaniasis visceral (VL), es una enfermedad zoonótica provocada por las especies de *L. Infantum*, como se ha mencionado antes. Los datos recientes derivados de estudios epidemiológicos indican que hay una incidencia inquietante de esta infección.

En Italia los datos proporcionados sobre la incidencia de LV varía entre el 14,4% y el 37% según la región.

En Portugal, más particularmente en la región alrededor de Lisboa, se han encontrado índices seropositivos del 8,4% y en la región de los Alpes marítimos franceses se han encontrado centros diferentes de prevalencia que varían entre el 3,2% y el 17,1%.

En España, la prevalencia de Leishmaniasis depende de la zona en estudio. En Cataluña un índice de promedio de incidencia del 9,3% ha sido observado aunque en algunos focos se ha encontrado una prevalencia de perros infectados de hasta un 18%.

En la Isla de Mallorca, el índice de incidencia es del 14%, y otros índices que han sido encontrados son: el 2,4% en Murcia, el 8,8% en Granada, el 10 al 15% en Salamanca, el 5,25% en la provincia de Madrid, y el 14% en Cáceres.

ES 2 326 174 T3

Aunque el número de casos de LV en seres humanos provocado por *L. Infantum* puede ser considerado relativamente bajo, el alto porcentaje de pacientes con inmunodepresión que han sido infectados por Leishmania podría estar relacionado con el nivel elevado de esta enfermedad en los perros.

5 De hecho, en el sur de Europa, el 50% de los adultos que son infectados por Leishmaniasis son también pacientes infectados por el virus del VIH. En cambio, según estos datos de coinfección de Leishmania y VIH, se ha estimado que el nivel de infección (por parásitos) puede ser una o dos veces mayor que esta figura debido a la existencia de un gran número de infecciones no detectadas.

10 Una característica común de los diferentes tipos de infección por Leishmania es que ésta induce una respuesta humoral fuerte en el huésped. En consecuencia, se utilizan habitualmente de forma más amplia los métodos diagnósticos basados en técnicas serológicas.

15 Se ha descrito que estos anticuerpos son detectados incluso durante la fase asintomática de la enfermedad en infecciones naturales y experimentales.

20 La sensibilidad y especificidad de estos métodos dependen del tipo, fuente y pureza del antígeno empleado en los procesos inmunológicos que son comercializados habitualmente, los promastigotos completos y las preparaciones más o menos preparadas a partir de estos son usadas como una fuente de antígeno. Este método normalmente conduce a reacciones cruzadas con suero de pacientes que padecen lepra, tuberculosis, tripanosomiasis africana, enfermedad de Chagas, malaria y otras parasitosis.

25 La sensibilidad y especificidad de los métodos serológicos dependen del tipo, fuente y pureza del antígeno empleado. Durante los últimos años un gran número de antígenos de Leishmania han sido caracterizados, algunos de éstos pueden ser considerados como proteínas específicas del parásito.

Entre estas proteínas específicas del parásito, la proteasa de superficie GP63, la glicoproteína de superficie gp46 y la proteína KMP-11 asociada al lipofosfoglicano merecen ser nombradas.

30 Un grupo adicional de antígenos de Leishmania se forma a partir de proteínas conservadas evolutivamente, tales como la quinesina, proteínas inducidas térmicamente, actina y tubulina.

35 Como parte de una estrategia para desarrollar un sistema diagnóstico serológico específico para la Leishmaniasis canina, se ha emprendido un proyecto de laboratorio para identificar los antígenos de *L. Infantum*, mediante una búsqueda por inmunodetección de una genoteca de expresión para genes de *L. Infantum* que usan suero de perro con Leishmaniasis visceral activa.

40 Se ha observado que la mayor parte de los antígenos aislados por este método pertenecen a la familia de proteínas conservada durante el transcurso de la evolución. La identificación de epítomos B de estos antígenos indican, no obstante, que todos los casos los determinantes antigénicos estaban localizados en regiones que no estaban bien conservadas.

45 En particular, las proteínas ribosómicas ácidas LiP2a y LiP2b son reconocidas por más del 80% de los sueros de VL.

Se ha confirmado que estas proteínas contienen determinantes antigénicos específicos de enfermedades, y que las proteínas recombinantes LiP2a y LiP2b, en las que se ha eliminado un fragmento, podrían ser usadas como instrumento específico capaz de distinguir entre LV y la enfermedad de Chagas.

50 También se ha mostrado que la proteína ribosómica PO de *L. Infantum*, muy conservada en la escala evolutiva, está reconocida por un alto porcentaje de sueros de LV de perro.

55 Además, los determinantes antigénicos son encontrados exclusivamente en el C-término de la proteína, es decir, en la región que ha sido mal conservada durante el transcurso de la evolución.

60 Se ha observado que el 78% de los sueros de LV de perro, anticuerpos contra la proteína H2A están también presentes, y ha sido confirmado que a pesar de la identidad de las secuencias en todas las proteínas H2A entre organismos eucarióticos, la respuesta humoral para esta proteína en sueros de LV está particularmente provocada por determinantes específicos para la proteína H2A de Leishmania.

Los determinantes antigénicos reconocidos por los sueros de LV de perro se encuentran en ambos terminales de la proteína H2A.

65 La solución obvia para el problema encontrado de forma habitual en esta técnica sería tener una invención que permita el ensamblaje de un gen quimérico sintético que contenga las regiones del ADN que codifican los determinantes antigénicos específicos para las proteínas LiP2a, LiP2b, LiPO, y H2A, con el propósito de construir una proteína rica en determinantes antigénicos.

No obstante, por lo que el solicitante sabe, no hay hasta ahora ninguna invención que contenga las características descritas como ideales, con el propósito de alcanzar el objetivo deseado. Este objetivo es la construcción de una proteína rica en determinantes antigénicos, procedente del ensamblaje de un gen sintético quimérico, que contiene las regiones del ADN que codifican los determinantes antigénicos específicos para las proteínas mencionadas.

5

Descripción de la invención

En un primer aspecto, la invención se refiere a un gen quimérico formado por las secuencias de ADN que codifica los determinantes antigénicos de cuatro proteínas de *L. infantum*, útiles para prevenir o tratar la Leishmaniasis canina.

10

En otro aspecto, la invención se refiere a una proteína codificada por el gen quimérico, que contiene uno o más de los determinantes antigénicos de cuatro proteínas de *L. infantum* codificadas por el gen quimérico.

15

La invención también se refiere a un método para prevenir y/o tratar la Leishmaniasis canina en un ser humano o en un animal. En este método terapéutico, el gen quimérico de la invención o la proteína codificada por éste pueden ser usados. También, los anticuerpos contra la proteína codificada por el gen quimérico de la invención, o una parte antigénica de la misma tal como un epítipo, pueden ser usados.

20

En otros aspectos, la invención se refiere a composiciones farmacéuticas para la prevención y el tratamiento, en seres humanos o animales, de la Leishmaniasis, que comprende una sustancia activa derivada de o dirigida contra el gen quimérico de la invención y/o la proteína codificada por éste, o partes de la misma. La sustancia activa es preferiblemente tal que puede ser usada en una composición farmacéutica para el tratamiento y/o la prevención de la Leishmaniasis.

25

En particular, la composición farmacéutica estará en forma de una vacuna, conteniendo la proteína codificada por el gen quimérico de la invención, o una o varias partes de la misma, conteniendo uno o varios determinantes antigénicos de la proteína codificada por el gen quimérico de la invención.

30

Así, en un aspecto adicional, la invención se refiere a una composición farmacéutica para la prevención y el tratamiento, en un ser humano o animal, de la leishmaniasis formada:

a) por la proteína Quimera Q, o una variante de esta proteína conteniendo modificaciones o sustituciones de aminoácidos conservados administrados a un sujeto (humano o animal), o

35

b) por la proteína Q en una forma aislada o combinada con un adyuvante fisiológico por la vía intraperitoneal, subcutánea o intramuscular.

40

La invención se refiere también a una vacuna que es capaz de estimular la producción de anticuerpos que reconocen el parásito de la Leishmania, formado

a) por la proteína Quimera Q o una variante de esta proteína que difiere de la proteína Q en los aminoácidos conservados, administrada a un sujeto (humano o animal), o

45

b) por la proteína Q en una forma aislada o combinada con un adyuvante fisiológico por la vía intraperitoneal, subcutánea o intramuscular.

50

Además, la invención se refiere a una composición farmacéutica para la prevención y tratamiento, humano o animal, de la leishmaniasis formada

a) por la proteína Q, o una variante de esta proteína conteniendo modificaciones o sustituciones de los aminoácidos conservados, combinada con la proteína LiHsp70, completa o fragmentada, administrada a un sujeto (humano o animal), o

55

b) por la proteína Q en forma aislada o combinada con un adyuvante fisiológico por la vía intraperitoneal, subcutánea o intramuscular.

60

En otro aspecto, la invención se refiere a una composición farmacéutica para la prevención y el tratamiento, en un ser humano o animal, de la leishmaniasis, formada

a) por un vector de ADN que contiene la secuencia que codifica para la proteína Quimera Q, o una variante de esta secuencia que contiene modificaciones o sustituciones de nucleótidos que codifican para los aminoácidos conservados,, administrados a un sujeto (humano o animal), o

65

b) por un vector de ADN que contiene la proteína Q combinada con un adyuvante fisiológico, administrado por la vía intraperitoneal, subcutánea o intramuscular.

ES 2 326 174 T3

Otro aspecto de la invención se refiere a una composición farmacéutica para la prevención y tratamiento, humano o animal, de la leishmaniasis, formada

a) por cualquier vector de ADN que contiene:

- 1) la secuencia que codifica para la proteína Quimera Q, o una variante de esta secuencia que contiene modificaciones o sustituciones de nucleótidos que codifican para los aminoácidos conservados, y
- 2) la secuencia de nucleótidos que codifica para la proteína LiHsp70 o variantes de la misma que difiere con respecto de los aminoácidos conservados, administrados a un sujeto (humano o animal), o

b) por cualquier vector que contiene la secuencia de ADN que codifica para la proteína Q como se define bajo a) administrado con un adyuvante fisiológico, por la vía intraperitoneal, subcutánea o intramuscular.

En otra forma de realización, la composición farmacéutica de la invención comprende anticuerpos dirigidos a la proteína codificada por el gen quimérico de la invención, o partes de la misma.

Las preparaciones farmacéuticas de la invención pueden además contener todos los adyuvantes conocidos, solventes, tampones, etc. conocidos *per se* para composiciones farmacéuticas y/o vacunas.

En otro aspecto adicional, la invención se refiere a un método para el tratamiento o la prevención de la Leishmaniasis, usando una composición farmacéutica o una vacuna según la invención, o una preparación comprendiendo anticuerpos dirigidos contra la proteína codificada por el gen quimérico de la invención.

Este método generalmente comprenderá la administración de una sustancia activa dirigida contra el gen quimérico o la proteína a un ser humano o animal, tal como un perro, en una cantidad farmacéuticamente activa.

Para la prevención de la Leishmaniasis, una vacuna que comprende la proteína codificada por el gen quimérico, o que codifica una o varias partes de dicha proteína comprendiendo uno o varios de los determinantes antigénicos, será administrada a un ser humano para obtener una respuesta inmunitaria protectora.

La administración de las preparaciones, anticuerpos y/o vacunas de la invención pueden ser realizadas en cierto modo conocido *per se*, tal como por vía oral, intramuscular, intravenosa, subcutánea, por infusión (goteo) etc..

Preferiblemente, la preparación o una vacuna es inyectada, mientras que con una preparación de anticuerpos, se puede usar una infusión.

Debe ser notado que cuando se hace referencia en la presente al gen quimérico de la invención, este término también incluye las secuencias de ácidos nucleicos que pueden hibridarse con la secuencia mencionada más abajo bajo condiciones de hibridación moderadas o severas.

En este contexto, las condiciones de hibridación heterólogas pueden ser las siguientes: hibridación en 6 x SSC (20xSSC por 1000 ml: 175,3 g NaCl, D 107,1 g de citrato sódico. 5H₂O, pH 7.0), 0,1% SDS, 0,05% pirofosfato sódico, 5* solución de Denhart (100 x solución de Denhart por 500 ml: 10 g Ficoll-400, 10 g de polivinilpirrolidona, 10 g de Albúmina de Suero Bovino (Fracción V de Pentax) y 20 µg/ml de ADN esperma de arenque desnaturalizado a 56°C durante 18-24 hrs seguido de dos lavados de 30 min. en 5 x SSC, 0,1% SDS a 56°C y dos lavados de 30 min. en 2 x SSC, 0,1% SDS a 56°C.

Por ejemplo, las secuencias que pueden hibridarse con la secuencia mencionada más abajo incluyen las secuencias mutantes de ADN que codifican las proteínas con la misma función biológica que la proteína codificada por la secuencia mencionada más abajo.

Tales secuencias mutantes pueden comprender una o más delaciones de nucleótidos, sustituciones y/o adiciones a la secuencia mencionada más abajo. Preferiblemente, las secuencias mutantes continúan teniendo al menos el 50%, más preferiblemente al menos el 70%, incluso más preferiblemente más del 90% de homología de nucleótidos con la secuencia dada a continuación.

El término gen quimérico como se utiliza en este caso también incluye secuencias de ácidos nucleicos que comprenden una o más partes de la secuencia mencionada a continuación.

Preferiblemente, tales secuencias comprenden al menos 10%, más preferiblemente al menos 30%, más preferiblemente al menos 50% de la secuencia de nucleótidos dada a continuación. Tales secuencias pueden comprender un fragmento contiguo de la secuencia mencionada a continuación, o dos o más fragmentos de la secuencia dada abajo que ha sido combinada en y/o incorporada en una secuencia de ADN única.

Debe ser notado que cuando aquí, se hace referencia a una proteína codificada por el gen quimérico de la invención, este término también incluye proteínas mutantes que además tienen esencialmente la misma función biológica.

ES 2 326 174 T3

Tales proteínas mutantes pueden comprender una o más deleciones, sustituciones y/o adiciones de aminoácidos en comparación con la proteína codificada por la secuencia mencionada más abajo.

Preferiblemente, las proteínas mutantes continúan teniendo al menos el 50%, más preferiblemente al menos el 70%, incluso más preferiblemente más del 90% homología de aminoácidos con la secuencia dada a continuación.

El término proteína también incluye fragmentos de la proteína codificada por el gen quimérico de la invención.

Tales fragmentos preferiblemente continúan mostrando la actividad biológica de la proteína completa. Preferiblemente, tales proteínas comprenden al menos el 30%, más preferiblemente al menos el 50% de la secuencia de aminoácidos de la proteína completa. También, dos o más fragmentos de la proteína completa codificados por el gen quimérico de la invención pueden ser combinados para formar una proteína única.

Más específicamente, la invención se refiere a un gen quimérico formado por las secuencias de ADN que codifican los determinantes antigénicos de cuatro proteínas de *L. Infantum*, que codifican una proteína útil para fines farmacológicos, en particular para la prevención y/o tratamiento de Leishmaniasis, en particular la Leishmaniasis canina, y obteniendo el producto final o la construcción del gen quimérico que codifica un polipéptido que contiene todos los determinantes antigénicos seleccionados, caracterizado porque éste usa una estrategia de clonación en la que el clon que expresa la proteína rLiPO-Ct-Q se usa como vector inicial, y para este vector, mediante el uso de lugares de restricción adecuados, se añaden de forma secuencial fragmentos de ADN que codifican las proteínas LiP2a-Q, LiP2b-Q, LiH2A-Ct-Q, LiH2A-Nt-Q, y después de cada fase de clonación se deduce la orientación correcta de cada uno de los insertos y el tamaño de los productos de la expresión, la secuencia deducida completa de aminoácidos de la proteína de fusión final, pPQV, expresada en el vector pMal es:

```
MBP  IEGRPLTPRSAKKAVRKSGSKSAKCGLI F PVGRVGGMMRRGYARRIGA  50
SGAPRISEFSVKAAAQSGKKRCRLNPRIVMLAARHDDDIGTLLKNVTL SHSGVV  140
PNISKAMAKKGGKKGKATPSAPEFGDSSRPMSTKYLAAYALASLSKASPSQAD  157
VEAICKAVHIDVDQATLAFVME SVTGRDVATLIAEGAAKMSAMPAASSGAAAGV  211
TASAAGDAAPAAAAAKKDEPEEEADDMGPSVRDPMQYLAAYALVALSGKTPSK  265
STAGAGAGAVAEAKKEEPEEEEADDMGPVDLQAAAAPAAPSAAAKAAPEESD  374
EDDFGMGGLF (SEC ID NO. 3)
```

La invención también se refiere a una composición farmacéutica para la prevención y tratamiento, en seres humanos o animales, de Leishmaniasis formada:

a) por la proteína Quimera Q, o una variante de esta proteína que contiene modificaciones o sustituciones de conservado aminoácidos, administradas a un sujeto (humano o animal), bien

b) en forma aislada o junto con cualquier adyuvante fisiológico por medio de las vías intraperitoneal, subcutánea o intramuscular.

También, la invención se refiere a una vacuna capaz de estimular la producción de anticuerpos que reconocen el parásito de Leishmania, formado

a) por la proteína Quimera Q o una variante de esta proteína que difiere de la proteína Q en aminoácidos conservados administrados a un sujeto (humano o animal), bien

b) en forma aislada o junto con cualquier adyuvante fisiológico por medio de las vías intraperitoneal, subcutánea o intramuscular.

Otro aspecto de la invención comprende una composición farmacéutica para la prevención y tratamiento, en seres humanos o animales, de Leishmaniasis formada:

a) por la proteína Q, o una variante de esta proteína que contiene modificaciones o sustituciones de aminoácidos conservados, vinculadas a la proteína LiHsp70, completa o fragmentada, administrada a un sujeto (humano o animal), bien

b) en forma aislada o junto con cualquier adyuvante fisiológico por medio de las vías intraperitoneal, subcutánea o intramuscular.

ES 2 326 174 T3

Otra composición farmacéutica de la invención para la prevención y tratamiento, en seres humanos o animales, de leishmaniasis puede estar formada:

5 a) por cualquier vector de ADN que lleva la secuencia que codifica la quimera de proteína Q, o una variante de esta secuencia que contiene modificaciones o sustituciones de nucleótidos que codifican para aminoácidos conservados, administrados a un sujeto (humano o animal), bien

b) por las vías intramuscular o subcutánea.

10

En otro aspecto adicional, la invención se refiere a una composición farmacéutica para la prevención y tratamiento, en seres humanos o animales, de Leishmaniasis formada:

15 a) por cualquier vector de ADN que lleva 1-la secuencia que codifica la proteína Quimera Q, o una variante de esta secuencia que contiene modificaciones o sustituciones de nucleótidos que codifican para aminoácidos conservados, y 2- la secuencia que codifica la proteína LiHsp70, o variantes de la misma que difieren en los aminoácidos conservados, que se administra a un sujeto (humano o animal), bien

b) por la vía intramuscular, subcutánea o intramuscular.

20

La invención también se refiere a una secuencia de nucleótidos y a una proteína útil para fines farmacológicos, en particular para la prevención y/o tratamiento de Leishmaniasis, en particular Leishmaniasis canina, que tiene la secuencia de ADN y de aminoácidos como se muestra abajo expresada en el vector PQ31. La secuencia de aminoácidos contiene un fragmento del vector (AA 1-37). El resto de la secuencia de aminoácido es idéntica a aquella de la SEC ID NO 3 excepto en la fracción MBP y los siete primeros aminoácidos (AA 1-7):

30

(Secuencia pasa a página siguiente)

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 326 174 T3

	1														45
	ATG	AGA	GGA	TCT	CAC	CAC	CAC	CAC	CAC	CAC	ACG	GAT	CCG	CAT	GCG
	Met	Arg	Gly	Ser	His	His	His	His	His	His	Thr	Asp	Pro	His	Ala
5					5					10					15
	46														90
	AGC	TCG	AAC	AAC	AAC	AAC	AAT	AAC	AAT	AAC	AAC	AAC	CTC	GGG	ATC
	Ser	Ser	Asn	Leu	Gly	Ile									
10					20					25					30
	91														135
	GAG	GGA	AGG	CCT	TTA	GCT	ACT	CCT	CGC	AGC	GCC	AAG	AAG	GCC	GTC
	Glu	Gly	Arg	Pro	Leu	Ala	Thr	Pro	Arg	Ser	Ala	Lys	Lys	Ala	Val
15					35					40					45
	136														180
	CGC	AAG	AGC	GGC	TCC	AAG	TCC	GCG	AAA	TGT	GGT	CTG	ATC	TTC	CCG
	Arg	Lys	Ser	Gly	Ser	Lys	Ser	Ala	Lys	Cys	Gly	Leu	Ile	Phe	Pro
20					50					55					60
	181														225
	GTG	GGC	CGC	GTC	GGC	GGG	ATG	ATG	CGC	CGC	GGC	CAG	TAC	GCT	CGC
	Val	Gly	Arg	Val	Gly	Gly	Met	Met	Arg	Arg	Gly	Gln	Tyr	Ala	Arg
25					65					70					75
	226														270
	CGC	ATC	GGT	GCC	TCT	GGC	GCC	CCC	AGG	ATT	TCA	GAA	TTC	TCC	GTG
	Arg	Ile	Gly	Ala	Ser	Gly	Ala	Pro	Arg	Ile	Ser	Glu	Phe	Ser	Val
30					80					85					90
	271														315
	AAG	GCG	GCC	GCG	CAG	AGC	GGG	AAG	AAG	CGG	TGC	CGC	CTG	AAC	CCG
	Lys	Ala	Ala	Ala	Gln	Ser	Gly	Lys	Lys	Arg	Cys	Arg	Leu	Asn	Pro
40					95					100					105
	316														360
	CGC	ACC	GTG	ATG	CTG	GCC	GCG	CGC	CAC	GAC	GAC	GAC	ATC	GGC	ACG
	Arg	Thr	Val	Met	Leu	Ala	Ala	Arg	His	Asp	Asp	Asp	Ile	Gly	Thr
45					110					115					120
	496														540
	ACC	AAG	TAC	CTC	GCC	GCG	TAC	GCT	CTG	GCC	TCC	CTG	AGC	AAG	GCG
	Thr	Lys	Tyr	Leu	Ala	Ala	Tyr	Ala	Leu	Ala	Ser	Leu	Ser	Lys	Ala
50					170					175					180
	541														585
	TCC	CCG	TCT	CAG	GCG	GAC	GTG	GAG	GCT	ATC	TGC	AAG	GCC	GTC	CAC
	Ser	Pro	Ser	Gln	Ala	Asp	Val	Glu	Ala	Ile	Cys	Lys	Ala	Val	His
55					185					190					195
	596														630
	ATC	GAC	GTC	GAC	CAG	GCC	ACC	CTC	GCC	TTT	GTG	ATG	GAG	AGC	GTT
	Ile	Asp	Val	Asp	Gln	Ala	Thr	Leu	Ala	Phe	Val	Met	Glu	Ser	Val
60					200					205					210
65															

ES 2 326 174 T3

5 641 675
ACG GGA CGC GAC GTG GCC ACC CTG ATC GCG GAG GGC GCC GCG AAG
Thr Gly Arg Asp Val Ala Thr Leu Ile Ala Glu Gly Ala Ala Lys
215 220 225

10 676 720
ATG AGC GCG ATG CCG GCG GCC AGC TCT GGT GCC GCT GCT GGC GTC
Met Ser Ala Met Pro Ala Ala Ser Ser Gly Ala Ala Ala Gly Val
230 235 240

15 721 765
ACT GCT TCC GCT GCG GGT GAT GCG GCT CCG GCT GCC GCC GCC GCG
Gly Asp Ala Ala Pro Ala Ala Ala Ala Ala Lys Lys Asp Glu Pro
245 250 255

20 766 810
AAG AAG GAC GAG CCC GAG GAG GAG GCC GAC GAC GAC ATG GGC CCC
Thr Ala Ser Ala Ala Glu Glu Glu Ala Asp Asp Asp Met Gly Pro
260 265 270

25 811 855
TCT AGA GTC GAC CCC ATG CAG TAC CTC GCC GCG TAC GCC CTC GTG
Ser Arg Val Asp Pro Met Gln Tyr Leu Ala Ala Tyr Ala Leu Val
275 280 285

30 856 900
GCG CTG TCT GGC AAG ACG CCG TCG AAG GCG GAC GTT CAG GCT GTC
Ala Leu Ser Gly Lys Thr Pro Ser Lys Ala ASP Val Gln Ala Val
290 295 300

35 901 945
CTG AAG GCC GCC GGC GTT GCC GTG GAT GCC TCC CGC GTG GAT GCC
Leu Lys Ala Ala Gly Val Ala Val Asp Ala Ser Arg Val Asp Ala
305 315 315

40 946 990
GTC TTC CAG GAG GTG GAG GGC AAG AGC TTC GAT GCG CTG GTG GCC
Val Phe Gln Glu Val Glu Gly Lys Ser Phe Asp Ala Leu Val Ala
320 325 330

45 991 1035
GAG GGC CGC ACG AAG CTG GTG GGC TCT GGC TCT GCC GCT CCT GCT
Glu Gly Arg Thr Lys Leu Val Gly Ser Gly Ser Ala Ala Pro Ala
335 340 345

50 1036 1080
GGC GCT GTC TCC ACT GCT GGT GCC GGC GCT GGC GCG GTG GCC GAG
Gly Ala Val Ser Thr Ala Gly Ala Gly Ala Gly Ala Val Ala Glu
350 355 360

55 65

ES 2 326 174 T3

1081 1125
 GCG AAG AAG GAG GAG CCC GAG GAG GAG GAG GCC GAT GAT GAC ATG
 Ala Lys Lys Glu Glu Pro Glu Glu Glu Glu Ala Asp Asp Asp Met
 365 375

1136 1170
 GGC CCC GTC GAC CTG CAG CCC GCC GCT GCC GCG CCG GCC GCC CCT
 Gly Pro Val Asp Leu Gln Pro Ala Ala Ala Ala Pro Ala Ala Pro
 380 390

1171 1215
 AGC GCC GCT GCC AAG GAG GAG CCG GAG GAG AGC GAC GAG GAC GAC
 Ser Ala Ala Ala Lys Glu Glu Pro Glu Glu Ser Asp Glu Asp Asp
 395 405

TTC GGC ATG GGC GGT CTC TTC TAAGCGACTC GCCATCTCTT 1256
 Phe Gly Met Gly Gly Leu Phe
 410 412

1257 1306
 AGCCTCCTTG TGGTGCGCTT GAGGTGCTCT CGCTCTGCTT CTCCTTGCAG

1307 1356
 TGTTGGCTGA CTCTGGCGGG TATGTGCCGT CGCATTACAC CCACCTCTCC

1357 1406
 CACCCCTTTG CCCTACGCGC TCGCATGCGC AATCCGTGAA TCATCGAGGG

1407 1436
 AAGTCTCTCT GGGTGGCAGT GGGTAAGCTT

SEC ID N°1 Y SEC ID N° 2

50 o un mutante o fragmento del mismo que puede ser usado para generar una respuesta inmunitaria protectora en un humano o animal contra la Leishmaniasis, y a una composición farmacéutica para la prevención y tratamiento, en seres humanos o animales, de la Leishmaniasis, comprendiendo esta proteína o un mutante o fragmento de la misma que se puede usar para generar una respuesta inmunitaria protectora en un humano o animal contra la Leishmaniasis. Esta proteína es derivada de la inserción del gen PQV en el vector de expresión pQE31. Aquí dicho gen quimérico
 55 preferiblemente codifica un polipéptido generado con un peso molecular de 38 kD y un punto isoeléctrico de 7.37.

60 También, la invención se refiere a una vacuna capaz de estimular la producción de anticuerpos que reconocen el parásito de Leishmania, que comprende la proteína mencionada arriba o un mutante o fragmento de la misma que pueden ser usados para generar una respuesta inmunitaria protectora en un humano o animal contra la Leishmaniasis.

65 Otro aspecto de la invención comprende una composición farmacéutica para la prevención y tratamiento, en seres humanos o animales, de Leishmaniasis, comprendiendo anticuerpos dirigidos contra la proteína mencionada arriba o un mutante o fragmento de la misma, preferiblemente conteniendo uno o varios determinantes antigénicos tal como un epítipo.

ES 2 326 174 T3

La invención también se refiere a un método para la prevención o tratamiento de la Leishmaniasis en un humano o animal, comprendiendo la administración al humano o animal de una composición farmacéutica como se ha descrito anteriormente, o a un método para prevenir la Leishmaniasis en un humano o animal, comprendiendo la administración al humano o animal de una vacuna como se ha descrito anteriormente.

5

El gen quimérico formado de las secuencias de ADN que codifican los determinantes antigénicos de cuatro proteínas de *L. Infantum* y la proteína, obtenida útil para prevenir y/o tratar la Leishmaniasis, que la invención propone, en su propio derecho constituye una evidente novedad dentro de su ámbito de aplicación, ya que, según la invención, un gen sintético quimérico es producido el cual como es obtenido por ensamblaje, conteniendo la región de ADN que codifica los determinantes antigénicos específicos a las proteínas LiP2a, LiP2b, LiPO y H2A, así construyendo una proteína rica en determinantes antigénicos. El gen quimérico obtenido es expresado en *Escherichia coli* y el producto ha sido analizado con respecto a sus propiedades antigénicas. Los resultados confirman que esta proteína quimérica mantiene todos los determinantes antigénicos de las proteínas parentales y que ello constituye un elemento pertinente farmacéuticamente útil para la LV canina, con una sensibilidad que oscila entre el 80% y el 93%, y una especificidad de entre el 96% y el 100%.

15

Más particularmente, el gen quimérico formado por las secuencias de ADN que codifican los determinantes antigénicos de cuatro proteínas de *L. Infantum* y la proteína codificada por él, útil para la prevención y/o el tratamiento de la Leishmaniasis canina y la proteína obtenida objeto de la invención, es producido mediante los estadios siguientes, es decir:

20

- Construcción del gen quimérico. Metodología.

25

Estrategia de clonación.

Clonación de las secuencias de ADN que codifican los determinantes antigénicos de la proteína histona H2A.

30

Clonación de las secuencias que codifican rLiP2a-Q y rLiP2b-Q.

Clonación de la secuencia rLiPO-Q.

Clonación del gen quimérico.

35

- construcción del gen quimérico a partir de la construcción de productos intermedios.

Clonación de epítomos específicos para los antígenos de *L. infantum*.

40

- Construcción del producto final

Construcción del gen quimérico que codifica un polipéptido que contiene todos los determinantes antigénicos seleccionados.

45

- opcionalmente expresión de la secuencia así obtenida.

- Evaluación del producto final.

- Sueros.

50

- Purificación de proteínas

- Electroforesis de proteínas e inmunoanálisis.

- Mediciones por Fast-ELISA

55

- Evaluación del producto final.

- Propiedades antigénicas.

60

La sensibilidad y especificidad de la proteína quimérica CP en la diagnosis del suero de LV canina.

65

La estrategia seguida de la clonación de las secuencias de ADN que codifican cada uno de los determinantes antigénicos seleccionados es la misma en cualquier caso, y en una primera fase, la secuencia de interés es amplificada mediante una PCR y el uso de oligonucleótidos específicos que contienen objetivos para las enzimas de restricción en los extremos.

Para la fase de clonación, el producto amplificado es dirigido mediante la enzima de restricción apropiada y es insertado en el centro de restricción correspondiente del plásmido pUC18.

ES 2 326 174 T3

Después de la secuenciación del ADN, el inserto es recuperado y subclonado para el centro de restricción correspondiente del plásmido modificado denominado pMAL-c2. La modificación se hace por la inserción de un codón de terminación descendente del objetivo HindIII en el poliligador de pMal-c2, denominando al plásmido resultante pMAL-c2*.

Con respecto a la clonación de la secuencia de ADN que codifica los determinantes antigénicos de la proteína histona H2A, debe ser señalado que el ADNc del clon cL71, que codifica la histona H2A de *L. Infantum*, se usa como molde para las reacciones de la PCR, y para la amplificación del ADN, que codifica la región N-terminal de la histona H2A, más exactamente rLiH2A-Nt-Q, los oligonucleótidos siguientes son usados:

Sentido, 5'-CCTTTAGCTACTCCTCGCAGCGCCAAG-3' (posición 84-104 de la secuencia cL71);

Antisentido, 5'CCTGGGGGCGCCAGAGGCACCGATGCG-3' (inverso y complementario a la posición 204-224 de la secuencia cL71).

Las secuencias que están incluidas en los oligonucleótidos para la clonación y que no están presentes en la secuencia madre cL-71 están marcadas con letras en negrita.

El fragmento de ADN amplificado es clonado directamente a partir del centro de restricción XmnI de pMAI-c2*.

El fragmento es ordenado mediante el iniciador #1234 malE y la región C-terminal antigénica de la histona H2A, en particular rLiH2A-Ct-Q, es amplificada con los oligonucleótidos siguientes. Estos son:

Sentido, 5'-GAATTCTCCGTAAGGCGGCCGCGCAG-3' (posición 276-296 de la secuencia cL71).

Antisentido,5'-GAATTCGGGCGCGCTCGGTGTCGCCTTGCC-3'

(inverso y complementario a las posiciones 456- 476 del plásmido cL71).

Un triplete que codifica prolina (indicado como GGG después de las letras subrayadas) está incluido en el oligonucleótido sin sentido, el sitio de restricción EcoRI incluido en ambos oligonucleótidos para la clonación está indicado por subrayado.

Con respecto a la clonación de las secuencias que codifican rLiP2a-Q, debe ser señalado que las regiones de interés son amplificadas por PCR de los ADNcs que codifican LiP2a y LiP2b.

Los oligonucleótidos que son usados para construir el clon de expresión LiP2a-Q, son los siguientes.

Sentido, 5'-GTCGACCCCATGCAGTACCTCGCCGCGTAC-3'.

Antisentido, 5'-GTCGACGGGGCCCATGTCATCATCGGCCTC-3'.

Se debe señalar que los sitios de restricción SalI añadidos a los extremos 5' de los oligonucleótidos han sido subrayados.

Al construir el clon de expresión LiP2b-Q, los oligonucleótidos usados fueron:

Sentido, 5'-TCTAGACCCGCCATGTCGTCGTCTTCCTCGCC-3'.

Antisentido, TCTAGAGGGGCCATGTCGTCGTGGCCTC-3'.

En los extremos 5' de los oligonucleótidos los sitios de restricción son incluidos para la enzima XbaI (subrayada), y debido a la clonación necesita un triplete adicional que codifique un residuo de prolina, incluido hacia abajo del sitio de restricción.

Con respecto a la clonación de la secuencia rLiPO-Q, debe ser señalado que se realiza la clonación de la secuencia de ADN de la región C-terminal de la proteína PO de *L. Infantum* amplificando un clon de ADNc llamado L27 y los oligonucleótidos siguientes:

5 Sentido, 5'-CTGCAGCCCGCCGCTGCCGCGCCGCGCCG-3'

(posiciones 1-24 del L27 ADNc) y el iniciador de la secuencia pUC18

10 (#1211), el ADN amplificado es dirigido por las enzimas PstI+HindIII, con

la inserción posterior en el plásmido pMAL-c2.

15 El clon resultante es denominado pPQI y se debe destacar que el sitio de restricción PstI está incluido en el nucleótido con sentido (secuencia subrayada) y que el objetivo de restricción HindIII está presente en el L27 de ADNc.

20 Con respecto a la clonación del gen quimérico, se debe señalar que las secuencias de ADN que codifican los cinco determinantes antigénicos están ensamblados en un gen quimérico, y este ensamblaje se realiza en el clon pPQI, al cual se añaden las regiones de codificación para las regiones antigénicas LiP2a-Q de forma secuencial en la dirección 3' (llamando a los resultados de la clonación pPQII), LiP2b-Q (clon pPQIII), LiH2a-Ct-Q (clon pPQIV) y LiH2A-Nt-Q (clon pPQV).

25 Finalmente, el inserto obtenido después de la digestión con SacI+HindIII del clon final pPQV es insertado en el plásmido de expresión pQE31, llamando al clon resultante pPQ.

Descripción de los dibujos

30 Para completar la descripción que está siendo realizada y con el fin de ayudar a la comprensión de las características de la invención, la presente descripción está acompañada, como parte íntegra de la misma, por un grupo de planos de naturaleza ilustrativa sin ser limitativos. Lo siguiente está representado:

35 Fig 1. Corresponde a la expresión (A), la purificación en columnas de amilosa (b) y la antigenicidad (C: Western blot; D: ELISA) de cada una de las proteínas recombinantes fusionadas a la proteína de enlace a la maltosa. La figura D también presenta la reactividad en ELISA de cada una de las proteínas recombinantes con respecto a la proteína completa.

40 Fig 2. Representación gráfica de los vectores diferentes considerados para obtener el gen quimérico objeto de la invención, donde la proteína pertinente destinada a llevar a cabo un diagnóstico preciso en animales o seres humanos que muestran síntomas de Leishmaniasis será extraída.

Fig 3. Corresponde a la identificación de la proteína obtenida del gen quimérico fusionado a la proteína MBP, cuya preparación está representada en la figura 2.

45 Fig 4. Corresponde a la expresión (A), la purificación en columnas de amilosa (B) y la antigenicidad (C: Western blot; F: ELISA) de los productos intermedios y de la proteína quimérica final fusionada a proteína de enlace a la maltosa (PQI- PGV). La figura también representa la expresión de la proteína quimérica (D fila 1), purificación en columnas de agarosa Ni-Nt (D fila 2) y la antigenicidad de la proteína purificada contra un suero de LV (E: Western blot) y contra una recogida de sueros (F: PQ en ELISA).

50 Fig 5. Muestra finalmente una representación gráfica sintetizada de la reactividad de una amplia variedad de sueros caninos, divididos en tres grupos. El primer grupo contiene animales con verdadera infección por *L. Infantum*. El segundo grupo incluye suero obtenido de perros con varios síntomas clínicos pero que no están infectados con Leishmania, y un tercer grupo se compone de quince sueros de control de perros saludables. Esta figura demuestra el valor de la invención para llevar a cabo la diagnosis serológica de LV.

Forma de realización preferida de la invención

60 El gen quimérico formado a partir de las secuencias de ADN que codifican los determinantes antigénicos de cuatro proteínas de *L. Infantum*, útiles para la diagnosis serológica de la Leishmaniasis canina y la proteína obtenida propuesta están constituidos por la construcción de productos intermedios. En un primer ejemplo, se realiza la clonación de epítomos específicos para los antígenos de *L. Infantum*, que está configurada en base a estudios anteriores sobre las propiedades antigénicas de cuatro antígenos de proteínas de *L. Infantum* (LiP2a, PiPO, LiP2b, LiH2a), que permiten la existencia de epítomos B para ser definidos para estas proteínas, y que son reconocidos específicamente por los sueros caninos de LV.

ES 2 326 174 T3

Con el propósito de mejorar la especificidad antigénica de estos antígenos con respecto a las proteínas de *L. Infantum*, los determinantes antigénicos específicos son clonados a partir de estas proteínas. Después de eliminar ciertas regiones de estas proteínas, éstas pueden ser reconocidas por sueros de animales que son portadores de LV y otras enfermedades diferentes.

Usando los oligonucleótidos específicos y la amplificación por PCR de regiones específicas para los genes LiP2a, LiP2b, Po y H2A, diferentes clones son construidos los cuales expresan las proteínas recombinantes rLiPO-Ct-Q, rLiP2a-Q, rLiP2b-Q, rLiH2A-Ct-Q y rLiH2A-Nt-Q, recién detalladas en la descripción de la invención con respecto a la metodología, donde se han descrito los detalles de la clonación.

Las proteínas recombinantes usadas son las siguientes rLiPO-Ct-Q, que corresponde a los 30 residuos C-terminales de la proteína ribosómica LiPO.

- rLiP2a-Q y rLiP2b-Q, que son derivados de las proteínas ribosómicas LiP2a y LiP2b respectivamente.
- dos subregiones de la histona H2A, que corresponden a los 46 residuos del N-término (xLiH2A-Nt-Q), y a los 67 residuos del C-término (residuos (xLiH2A-Ct-Q).

Cada una de las proteínas recombinantes fusionadas a la proteína de enlace a la maltosa (MBP) es expresada en *E. coli*, según está representado en la figura número IA, y éstas fueron purificadas por cromatografía de afinidad en una columna de amilosa B. Después del proceso de purificación, se efectuó la electroforesis en las proteínas recombinantes (filas 1 a 5).

Con el objetivo de analizar si las proteínas recombinantes fueron reconocidas por sueros caninos de LV, se incubó un Western blot, que contenía las proteínas recombinantes en una mezcla de tres sueros caninos de LV. Suponiendo que todas estas proteínas son reconocidas por los sueros, se concluye que los determinantes antigénicos presentes en las proteínas madres se mantienen en las proteínas recombinantes (C).

Las propiedades antigénicas de las proteínas recombinantes son comparadas con los determinantes antigénicos de los antígenos parentales mediante un FAST ELISA, realizando la prueba contra una recogida de 26 sueros caninos de LV, justo como está mostrado en la sección de la figura número ID, y el hecho de que los sueros mostrasen un valor de reactividad similar, contra las regiones antigénicas seleccionadas y las proteínas completas correspondientes, demuestra que no ha ocurrido ninguna alteración en el epítipo antigénico durante el procedimiento de clonación.

Con respecto a la construcción del producto final, más exactamente del gen quimérico que codifica un polipéptido que contiene todos los determinantes antigénicos seleccionados, se debe señalar que la estrategia de la clonación está indicada según la figura 2 sección A.

Los productos intermedios generados durante el proceso están mostrados.

Un clon que expresa las proteínas rLiPO-Ct-Q (pPQI) se usa como el vector inicial, y los fragmentos de ADN que codifican las proteínas rLiPO-Ct-Q, rLiP2a-Q, rLiP2b-Q, rLiH2A-Ct-Q y rLiH2A-Nt-Q son añadidos de forma secuencial usando los sitios de restricción apropiados.

Después de cada fase de la clonación, la orientación correcta de cada uno de los insertos es deducida a partir del tamaño de los productos de la expresión, y finalmente la secuencia de nucleótidos completa del clon final pPQV es determinada y la secuencia de aminoácidos es deducida de la secuencia representada en la figura número 3.

El polipéptido generado tiene una masa molecular de 38 kD, con un punto isoeléctrico de 7,37, incluyendo las secuencias separadoras que codifican la prolina, subrayadas en la figura número 3.

El objetivo de hacer esto es separar eficazmente los dominios antigénicos y prevenir conformaciones terciarias posibles que podrían interferir con la estabilidad y la antigenicidad del producto final.

La expresión y recuperación de cada uno de los productos intermedios está mostrada en la figura número 4, cuadros A y B. Según estaba previsto, después de cada adición, el tamaño del producto de la expresión en el vector pMAL aumenta gradualmente hasta alcanzar un peso molecular de 80 kDa, observando un cierto grado de rotura durante la purificación.

El gen quimérico fue también clonado en el plásmido pQE, un vector que permite la expresión de las proteínas con un fragmento de 6 histidinas en el N-término extremo. El clon resultante y las proteínas recombinantes se denominan pPQ y PQ respectivamente.

El nivel de expresión de la proteína en las bacterias transformadas con el plásmido pPQ y las proteínas purificadas está mostrado en la figura número 4, referenciado en particular con una D, con la proteína PQ, purificada por cromatografía de afinidad en condiciones de desnaturalización es más estable que con la proteína recombinante pPQV representada en la figura número 4, en el cuadro D fila 2.

ES 2 326 174 T3

Para evaluar el producto final, se usó una serie de materiales, y obviamente algunas técnicas, según está descrito a continuación.

5 Se usan sueros de LV obtenidos de perros de diferentes orígenes. Los animales son evaluados clínicamente y analíticamente en el laboratorio pertinente, generalmente en un Departamento de Parasitología, y todos los sueros positivos son evaluados para la inmunofluorescencia indirecta (IIF).

10 La presencia de amastigotos de los parásitos de estos animales está confirmada por observación directa de los ganglios linfáticos poplíteos y preescapulares, y a un segundo grupo de 33 sueros de LV originados en otras regiones, se le dio una diagnosis positiva en la ELISA contra los extractos proteínicos del parásito y/o por IIF.

Los sueros de perros afectados por enfermedades diferentes distintas de la LV son obtenidos a partir de distintos orígenes. Dentro de este grupo, se encuentran sueros de las infecciones siguientes:

15 *Mesocostoides* spp.

Dyphylidium caninum

20 *Uncinaria stenocephala*

Toxocara canis

Dipetalonema dranunculoides

25 *Demodex canis*

Babesia canis

30 *Ehrlichia canis*

Rickettsia rickettsiae.

35 El resto de los sueros fueron obtenidos a partir de perros que mostraron varios síntomas clínicos que no estaban relacionados con ningún proceso infeccioso, y los controles del suero fueron obtenidos a partir de quince animales saludables controlados cuidadosamente.

40 La purificación de las proteínas recombinantes expresadas por los clones pMAI-c2 se realiza por cromatografía de afinidad en columnas de amilosa, y la purificación de la proteína recombinante expresada por el clon pPQ fue realizada en columnas de resina Ni-NTA en condiciones de desnaturalización (Qiagen).

45 Para analizar las proteínas, se efectuó una electroforesis en geles de poliacrimida al 10% en presencia de SDS bajo condiciones estándares. El análisis inmunológico de las proteínas separadas por electroforesis se efectuó en las membranas de la nitrocelulosa a las que las proteínas habían sido transferidas. Las proteínas transferidas fueron bloqueadas con el 5% de leche desnatada en polvo en un tampón PBS con el 0,5% de Tween 20.

50 Los filtros fueron consecutivamente puestos en contacto con antisuero primario y secundario en soluciones de bloqueo y uno inmunoconjugado marcado con peroxidasa fue usado como segundo anticuerpo, visualizando el enlace específico mediante un sistema ECL. La Figura 4E muestra un Western blot de la proteína PQ.

55 Se usó una Fast-ELISA en vez de la ELISA clásica, y la activación del antígeno se efectuó durante 12 horas a la temperatura ambiente.

Las placas fueron sensibilizadas con 100 μ l de antígeno cuya concentración en cualquier caso fue de 2 pg/ml.

60 Después de sensibilizar los pocillos las placas fueron incubadas durante 1 hora con la solución de bloqueo (0,5% de leche desnatada en polvo disuelta en PBS - 0,5% de Tween 20 y los sueros fueron diluidos trescientas veces en la solución de bloqueo).

65 Los pocillos fueron incubados con suero durante 2 horas a la temperatura ambiente, y después de la exposición de los anticuerpos los pocillos fueron lavados con PBS-Tween 20.

Los anticuerpos marcados con peroxidasa fueron usados como segundos anticuerpos a una dilución de 1:2000 y el color de la reacción fue desarrollado usando la ortofenilendiamina del sustrato, midiendo la absorción a 450 nm.

65 En cuanto a la evaluación del producto final, debe ser señalado que las propiedades antigénicas fueron determinadas mediante el estudio pertinente de la reactividad de los sueros caninos de LV contra la proteína quimérica y contra cada uno de los productos intermedios en un ensayo "Western blot". Todos los productos intermedios mantuvieron su antigenicidad al igual que lo hizo el producto pPQV final, en todo el proceso de clonación (Fig. 4C).

ES 2 326 174 T3

También debería ser señalado que la proteína recombinante expresada por el plásmido pPQ fue reconocida por los sueros de LV. Con el propósito de analizar con mayor precisión las propiedades antigénicas de la proteína quimérica y los productos intermedios, un análisis de la reactividad de una amplia variedad de sueros caninos de LV fue realizado mediante una fast-ELISA contra las proteínas recombinantes, como se muestra en la sección F de la figura número 4. Se puede subrayar que la sensibilidad de los diferentes productos intermedios de la clonación aumenta después de cada fase de adición. También debería ser señalado que la proteína pQI es reconocida por la mayor parte de los sueros de LV y la proteína PQII igualmente por la mayor parte de los sueros. Esta proporción es superior para la proteína PQIII y las proteínas PQIV, PQV y PQ son reconocidas prácticamente por todos los sueros.

Según lo mencionado anteriormente, el porcentaje de reconocimiento mostrado por los sueros fue similar tanto en el caso de la evaluación de las proteínas quiméricas PQV y PQ, como en el de la evaluación de una mezcla de proteínas recombinantes rLiPO- Ct-Q, rLiP2a, rLiP2b y rLiH2A. Se constató que las propiedades antigénicas de cada una de las 5 regiones antigénicas seleccionadas están presentes en el producto de la expresión PQ, y en consecuencia este producto puede ser usado para el diagnóstico en vez de una mezcla de los antígenos expresados individualmente.

Para determinar si la proteína quimérica puede ser usada para la diagnosis del suero de la LV canina, y según el análisis pertinente de una amplia variedad de sueros caninos contra esta proteína, teniendo en cuenta las características clínicas de los animales, los sueros caninos han sido clasificados en tres grupos. Un primer grupo consistió en sueros de perros con una verdadera infección por *L. infantum*. Un segundo grupo estaba compuesto por sueros de perros que tenían varios síntomas clínicos sin estar infectados con Leishmania, incluyendo perros infectados con parásitos diferentes a la Leishmania, y que podrían mostrar síntomas clínicos que podrían ser confundidos con aquellos observados durante la Leishmaniasis.

El tercer grupo estaba constituido por sueros de control, originados a partir de perros saludables.

En la figura número 5 los valores de reactividad de promedio están mostrados para cada grupo de sueros, la reactividad de los sueros de la LV alcanzando un valor de reactividad de promedio de 0,8 (S.D. = 0,4).

Dentro de este grupo la reactividad de 12 sueros fue positiva pero inferior a 0,35, mientras que la reactividad de 10 sueros alcanza valores de entre 0,35 y 0,5. Se observó que la reactividad de 23 sueros varía entre 0,5 y 1,0, con 14 sueros que muestran una reactividad superior a 1,0.

El valor de absorción de promedio de los sueros del segundo grupo, es decir, el grupo infectado con parásitos diferentes a los parásitos de la Leishmania, es 0,2 (S.D. = 0,05) y la reactividad de los sueros de control, es decir, el tercer grupo, es 0,1 (S.D. = 0,003). Sólo dos sueros del grupo 2 mostraron reactividad entre 0,35 y 0,40.

Los datos presentados arriba indican que la proteína quimérica PQ en la FAST ELISA tiene una sensibilidad del 80% para la diagnosis de la LV, si se define el valor de corte como el valor de la reactividad de promedio de los sueros del grupo 2 más tres S.D.'s (es decir 0,35).

La sensibilidad del grupo evaluado alcanza el 93%, si el valor de corte está definido por los valores de la reactividad del grupo de control. La proteína Q tiene una especificidad del 96% para la diagnosis de la LV, cuando el valor de corte está definido por los sueros mencionados del grupo 2. El 100% de la especificidad en el ensayo fue alcanzado al considerar los valores de la reactividad de perros saludables.

El proceso que se debe usar es el siguiente:

1. Las placas de microtitulación están cubiertas con anticuerpos por 100 μ l incubados de una solución que contiene 1 μ g/ml de antígeno disuelto en un tampón PBS - 0,5% de Tween 20 - 5% de leche desnatada (Tampón A).

La incubación se realiza durante 12 horas a la temperatura ambiente, y luego las placas son lavadas tres veces con el mismo tampón que no contiene ningún antígeno. Las placas antigenadas secas podrían ser mantenidas a la temperatura ambiente.

2. Una primera incubación de los pocillos se efectuó con el suero del animal a una dilución de 1/200 en el Tampón A. La incubación duró 1 hora.

3. Los pocillos son lavados con el tampón A, según se describe en el punto 1, tres veces con un matraz de lavado.

4. Se incuban con un segundo anticuerpo (IgG marcado con peróxido) diluido 1:2000 en el tampón A, llevando a cabo la incubación durante 1 hora.

5. Los pocillos son lavados otra vez con el tampón A tres veces, como se indicó en la tercera sección, es decir con un matraz de lavado.

6. La reactividad es revelada usando la ortofenilendiamina del sustrato y la absorción medida a 450 nm.

ES 2 326 174 T3

La proteína usada para la diagnosis extraída del gen quimérico es identificada, y la secuencia de nucleótidos que codifica dicha proteína, siendo las siguientes:

5	1		45
	ATG AGA GGA TCT CAC CAC CAC CAC CAC CAC ACG GAT CCG CAT GCG		
	Met Arg Gly Ser His His His His His His Thr Asp Pro His Ala		
		5	15
10	46		90
	AGC TCG AAC AAC AAC AAC AAT AAC AAT AAC AAC AAC CTC GGG ATC		
	Ser Ser Asn Leu Gly Ile		
		20	30
15	91		135
	GAG GGA AGG CCT TTA GCT ACT CCT CGC AGC GCC AAG AAG GCC GTC		
	Glu Gly Arg Pro Leu Ala Thr Pro Arg Ser Ala Lys Lys Ala Val		
20		35	45
25	136		180
	CGC AAG AGC GGC TCC AAG TCC GCG AAA TGT GGT CTG ATC TTC CCG		
	Arg Lys Ser Gly Ser Lys Ser Ala Lys Cys Gly Leu Ile Phe Pro		
		50	60
30	181		225
	GTG GGC CGC GTC GGC GGG ATG ATG CGC CGC GGC CAG TAC GCT CGC		
	Val Gly Arg Val Gly Gly Met Met Arg Arg Gly Gln Tyr Ala Arg		
		65	75
35	226		270
	CGC ATC GGT GCC TCT GGC GCC CCC AGG ATT TCA GAA TTC TCC GTG		
	Arg Ile Gly Ala Ser Gly Ala Pro Arg Ile Ser Glu Phe Ser Val		
40		80	90
45			
50			
55			
60			
65			

ES 2 326 174 T3

271 315
 AAG GCG GCC GCG CAG AGC GGG AAG AAG CGG TGC CGC CTG AAC CCG
 Lys Ala Ala Ala Gln Ser Gly Lys Lys Arg Cys Arg Leu Asn Pro
 95 100 105

 316 360
 CGC ACC GTG ATG CTG GCC GCG CGC CAC GAC GAC GAC ATC GGC ACG
 Arg Thr Val Met Leu Ala Ala Arg His Asp Asp Asp Ile Gly Thr
 110 115 120
 361 405
 CTT CTG AAG AAC GTG ACC TTG TCT CAC AGC GGC GTT GTG CCG AAC
 Leu Leu Lys Asn Val Thr Leu Ser His Ser Gly Val Val Pro Asn
 125 130 135
 406 450
 ATC AGC AAG GCG ATG GCA AAG AAG AAG GGC GGC AAG AAG GGC AAG
 Ile Ser Lys Ala Met Ala Lys Lys Lys Gly Gly Lys Lys Gly Lys
 140 145 150

 391 495
 GCG ACA CCG AGC GCG CCC GAA TTC GGA TCC TCT AGA CCC ATG TCC
 Ala Thr Pro Ser Ala Pro Glu Phe Gly Ser Ser Arg Pro Met Ser
 155 160 165

 496 540
 ACC AAG TAC CTC GCC GCG TAC GCT CTG GCC TCC CTG AGC AAG GCG
 Thr Lys Tyr Leu Ala Ala Tyr Ala Leu Ala Ser Leu Ser Lys Ala
 170 175 180

 541 585
 TCC CCG TCT CAG GCG GAC GTG GAG GCT ATC TGC AAG GCC GTC CAC
 Ser Pro Ser Gln Ala Asp Val Glu Ala Ile Cys Lys Ala Val His
 185 190 195

 596 630
 ATC GAC GTC GAC CAG GCC ACC CTC GCC TTT GTG ATG GAG AGC GTT
 Ile Asp Val Asp Gln Ala Thr Leu Ala Phe Val Met Glu Ser Val
 200 205 210

 641 675
 ACG GGA CGC GAC GTG GCC ACC CTG ATC GCG GAG GGC GCC GCG AAG
 Thr Gly Arg Asp Val Ala Thr Leu Ile Ala Glu Gly Ala Ala Lys
 215 220 225

 676 720
 ATG AGC GCG ATG CCG GCG GCC AGC TCT GGT GCC GCT GCT GGC GTC
 Met Ser Ala Met Pro Ala Ala Ser Ser Gly Ala Ala Ala Gly Val
 230 235 240

 721 765
 ACT GCT TCC GCT GCG GGT GAT GCG GCT CCG GCT GCC GCC GCC GCG
 Gly Asp Ala Ala Pro Ala Ala Ala Ala Ala Lys Lys Asp Glu Pro
 245 250 255

ES 2 326 174 T3

766 810
 AAG AAG GAC GAG CCC GAG GAG GAG GCC GAC GAC GAC ATG GGC CCC
 Thr Ala Ser Ala Ala Glu Glu Glu Ala Asp Asp Asp Met Gly Pro
 260 270
 265

811 855
 TCT AGA GTC GAC CCC ATG CAG TAC CTC GCC GCG TAC GCC CTC GTG
 Ser Arg Val Asp Pro Met Gln Tyr Leu Ala Ala Tyr Ala Leu Val
 275 285
 280

856 900
 GCG CTG TCT GGC AAG ACG CCG TCG AAG GCG GAC GTT CAG GCT GTC
 Ala Leu Ser Gly Lys Thr Pro Ser Lys Ala ASP Val Gln Ala Val
 290 300
 295

901 945
 CTG AAG GCC GCC GGC GTT GCC GTG GAT GCC TCC CGC GTG GAT GCC
 Leu Lys Ala Ala Gly Val Ala Val Asp Ala Ser Arg Val Asp Ala
 305 315
 315

946 990
 GTC TTC CAG GAG GTG GAG GGC AAG AGC TTC GAT GCG CTG GTG GCC
 Val Phe Gln Glu Val Glu Gly Lys Ser Phe Asp Ala Leu Val Ala
 320 330
 325

991 1035
 GAG GGC CGC ACG AAG CTG GTG GGC TCT GGC TCT GCC GCT CCT GCT
 Glu Gly Arg Thr Lys Leu Val Gly Ser Gly Ser Ala Ala Pro Ala
 335 345
 340

1036 1080
 GGC GCT GTC TCC ACT GCT GGT GCC GGC GCT GGC GCG GTG GCC GAG
 Gly Ala Val Ser Thr Ala Gly Ala Gly Ala Gly Ala Val Ala Glu
 350 360
 355

1081 1125
 GCG AAG AAG GAG GAG CCC GAG GAG GAG GAG GCC GAT GAT GAC ATG
 Ala Lys Lys Glu Glu Pro Glu Glu Glu Glu Ala Asp Asp Asp Met
 365 375
 370

1136 1170
 GGC CCC GTC GAC CTG CAG CCC GCC GCT GCC GCG CCG GCC GCC CCT
 Gly Pro Val Asp Leu Gln Pro Ala Ala Ala Ala Pro Ala Ala Pro
 380 390
 385

1171 1215
 AGC GCC GCT GCC AAG GAG GAG CCG GAG GAG AGC GAC GAG GAC GAC
 Ser Ala Ala Ala Lys Glu Glu Pro Glu Glu Ser Asp Glu Asp Asp
 395 405
 400

TTC GGC ATG GGC GGT CTC TTC TAAGCGACTC GCCATCTCTT 1256
 Phe Gly Met Gly Gly Leu Phe
 410 412

1258**AGCCTCCTTG TGGTGCGCTT GAGGTGCTCT CGCTCTGCTT CTCCTTGACAG 1306****1307****TGTTGGCTGA CTCTGGCGGG TATGTGCCGT CGCATTACAC CCACCTCTCC 1356****1357****CACCCCTTTG CCCTACGCGC TCGCATGCGC AATCCGTGAA TCATCGAGGG 1406****1407****AAGTCTCTCT GGGTGGCAGT GGGTAAGCTT 1436**

15 (SEC ID N°1 y SEC ID N° 2)

20 No se considera necesario el hecho de extender esta descripción puesto que un experto en la técnica puede entender el objetivo de la invención y las ventajas que ésta confiere.

Los materiales, forma, tamaño y disposición de los elementos son susceptibles al cambio, siempre que ello no suponga un cambio en la esencia de la invención.

25 Los términos en los cuales esta descripción ha sido escrita deberían siempre ser considerados de naturaleza amplia y no limitativos.

Vacuna contra la Leishmania

30 La inmunidad intensa después de la recuperación de Leishmaniasis cutánea ha supuesto un gran impulso para el desarrollo de vacunas profilácticas contra esta enfermedad. Esta inmunidad está derivada de la inducción de una respuesta T a la cual se asocia la producción de citoquinas inflamatorias que activan los macrófagos y destruyen los parásitos. La memoria inmunológica en los casos de infección es probablemente mantenida por la presencia persistente del parásito en el huésped en un proceso conocido como inmunidad concomitante.

35 Los primeros estudios con respecto a la vacunación contra la *Leishmania* en la década de los 40 usaban parásitos vivos como inmunógenos. Estos estudios condujeron a la producción de vacunas que producían una protección significativa contra una posterior reinfección. No obstante, el conocimiento de la posibilidad de que los organismos vivos podrían producir verdaderas infecciones condujo a que tales programas de vacunación no se realizaran durante mucho tiempo y, por el contrario, el interés se centró en vacunas basadas en parásitos muertos. Estos estudios proporcionaron la primera evidencia de la posibilidad de producir vacunas eficaces por inoculación de parásitos.

40 Las vacunas de subunidades se han centrado fuertemente en antígenos proteínicos porque estos son fáciles de identificar, aislar y clonar. No obstante, es preciso tener en cuenta que no todas las moléculas de la vacuna potencial han de ser proteínas. De hecho, el lipofosfoglicano (LPG) juega un papel esencial en el establecimiento de la infección.

45 Un problema más importante en el uso de subunidades puede surgir a partir del hecho de que puede no haya una respuesta a un único antígeno en una población diversa genéticamente.

50 La vacunación con ácidos nucleicos portadores de genes que codifican proteínas de *Leishmania* implica la administración de material genético del parásito al huésped.

55 El primer vector de ADN para ser administrado como vacuna contenía el gen gp63. También, el gen PSA-2 ha sido introducido en un plásmido y se ha observado que genera una respuesta Th-1 y la inducción de protección.

60 Una proteína artificial denominada Q ha sido recientemente descrita por nuestro grupo, la cual está compuesta por diferentes fragmentos antigénicos de 4 proteínas de *Leishmania infantum* (más específicamente, Lip2a, Lip2b, Po y H2A), las cuales, después de ser usadas como antígeno, ha demostrado tener un valor importante para la diagnosis de la Leishmaniasis canina, con un 93% de sensibilidad y un 100% de especificidad en comparación con sueros de animales de control sin infectar. Igualmente, nuestro grupo ha demostrado que la proteína hsp70 de *Leishmania infantum* es un objetivo importante de la respuesta inmunitaria en infecciones provocadas por infección con este parásito.

65 Con el objetivo de explorar la posibilidad de que la proteína Q pueda ser usada para diseñar sistemas de protección contra la infección por *Leishmania infantum*, tanto por sí misma como en combinación con Hsp70, tres series de experimentos fueron diseñadas usando el hámster como modelo. Un experimento fue diseñado para controlar si la inmunización con la proteína Q protegía a los animales contra la infección a corto plazo, otro para comprobar si la inmunización los protegía a largo plazo y el tercero fue realizado para comprobar este efecto protector después de la

ES 2 326 174 T3

inmunización con las dos proteínas juntas. Después se observó tanto a partir del análisis a corto plazo como del análisis a largo plazo, que la proteína Q era capaz de suscitar una respuesta inmunitaria que reduce la carga parasitaria tanto en el hígado como en el bazo tras la infección por *Leishmania Infantum* en la mayor parte de los animales inmunizados, y que la inmunización con las proteínas Q+Hsp70 también inducía una respuesta significativa contra ambas proteínas y conducía a una reducción significativa de la carga parasitaria en la mayoría de los animales inmunizados.

Ejemplo 1

Inmunización con proteína Q

4 animales fueron inmunizados con 5 microgramos de proteína Q disueltos en 40 microlitros de adyuvante de Freund, y otros 4 animales fueron inmunizados con la misma cantidad de adyuvante emulsionada con 40 microlitros de solución salina PBS sin la proteína. En la primera inmunización, el adyuvante de Freund completo fue empleado combinado con la proteína, mientras que en las dos inmunizaciones posteriores, se usó el adyuvante de Freund incompleto mezclado con la proteína en la misma proporción de proteína/adyuvante. Tres inmunizaciones intraperitoneales fueron realizadas en intervalos de 15 días. Empezando desde la semana después de cada inmunización y durante todo el periodo de inmunización, se extrajeron muestras de sangre para medir la respuesta humoral contra la proteína Q en ensayos ELISA. Se observó que ya en la segunda semana después de la inmunización hubo una respuesta IgG positiva contra la proteína Q, y que esta respuesta fue alta después de la segunda semana tras la infección, y aumentaba con el tiempo de inmunización alcanzando títulos de 1/100.000. Igualmente, se observó que la respuesta inmunitaria contra la proteína Q no fue modificada significativamente después de la infección con el parásito Fig. 1.

Quince días después de la inmunización, los animales fueron infectados con una dosis de 105 parásitos promastigotos, diferenciados de amastigotos infecciosos originados a partir de un hámster infectado. Se ha comprobado previamente que el inóculo era capaz de inducir una parasitemia fuerte con la enfermedad cuatro meses después de haberse administrado a los parásitos, en el 100% de los animales infectados. La Tabla 1 indica el nivel de parasitemia por mg de tejido tanto en el hígado como en el bazo del los animales de control y vacunados. Es posible observar que en todos los animales vacunados la carga parasitaria en el hígado decrece con respecto a los controles, y que esto ocurre de forma muy significativa en el 75% de ellos. Cuando la carga parasitaria en el bazo es examinada, es posible observar que también en el 75% de los animales esta carga fue inferior significativamente que la de los animales de control, la RPL alcanzando el 83%-86%. El animal donde la RPL fue del 20% en el hígado, tuvo una del 48% en el bazo.

Tabla 1

Carga parasitaria en el hígado y bazo de hámsters vacunados con proteína Q por vía intraperitoneal. Después de cuatro semanas de infección, la carga parasitaria fue medida por el método de diluciones límites (corto plazo). La carga parasitaria está expresada como parásitos por miligramo de tejido. RPL = reducción en la carga parasitaria en %.

Hámster inmunizado con la proteína Q

Hámster	Hígado	(RPL)	Bazo	(RPL)
1	4 ± 1	(71%)	49 ± 3	(83%)
2	3 ± 2	(78%)	39 ± 2	(86%)
3	5 ± 1	(64%)	50 ± 4	(83%)
4	11 ± 3	(20%)	153±19	(48%)

Los números representan la media de tres determinaciones

Animales de control

4 hámsters 14 ± 5 295 ± 30

El número representa la media de los 4 animales

Ejemplo 2

Para verificar el efecto de la vacunación con la proteína Q en la reducción de la carga parasitaria a largo plazo, usando otra vía de inoculación, 4 animales fueron inyectados subcutáneamente con 5 microgramos de proteína Q disueltos en 40 microlitros de PBS y mezclados con 40 microlitros de adyuvante de Freund. En la primera inmunización, se empleó adyuvante completo de Freund, mientras que en las dos posteriores, se usó adyuvante de Freund incompleto

como se ha indicado anteriormente. La vacunación fue administrada en tres dosis separadas en intervalos de 15 días. Quince días después de la inmunización se les administró un inóculo de 105 parásitos infecciosos. Durante todo el periodo de la inmunización y durante toda la infección (cinco meses) se extrajo sangre para determinar el tipo de respuesta humoral contra la proteína Q y contra las proteínas totales del parásito. La Figura 2 muestra que ya después de la segunda semana de inmunización, la respuesta contra la proteína Q fue positiva, como en el caso anterior, en tres de los ratones, y que la respuesta contra la proteína fue altísima después de dos semanas desde la primera inmunización. La respuesta siguió siendo altísima después de las inmunizaciones restantes, alcanzando una concentración de 1/75.000 en la semana después de la tercera inmunización. En uno de los animales la respuesta contra la proteína Q fue más lenta en el tiempo, aunque la respuesta alcanzó el nivel de los demás animales hacia el final del experimento. Consecuentemente, a partir de los datos derivados ambos del Ejemplo 1 y del Ejemplo 2, es posible concluir que el grado de la respuesta inmunitaria contra la proteína, por ambas vías, intraperitoneal y subcutánea, es muy rápido, aunque la respuesta por vía intraperitoneal lograra títulos más altos en los mismos periodos de tiempo (1/75.000 contra 1/30.000). La Figura 3 indica la respuesta contra la proteína Q en los animales de control. Es posible observar que la reactividad contra esta proteína está detectada en la 12-14ª semana después de la infección, que es cuando los primeros síntomas atribuibles a una leishmaniasis potencial empiezan a ser detectados en los animales infectados. La Tabla 2 muestra los niveles de parasitemia en el hígado y bazo de los animales de control y vacunados. Se puede observar que el 50% de los animales fueron protegidos al nivel del hígado, en cuanto a que la reducción en el nivel de parasitemia fue muy elevada (87-89%). Uno de los animales no fue protegido, mientras que en otro animal la reducción de la carga parasitaria fue del 22%. Por el contrario, la reducción de la carga parasitaria fue del 98-99% en el 100% de los animales a nivel del bazo.

Tabla 2

Carga parasitaria en el hígado y bazo de hámsters vacunados con proteína Q por vía subcutánea. Después de 20 semanas de infección, la carga parasitaria fue medida por el método de diluciones límites (largo plazo). La carga parasitaria está expresada como parásitos por miligramo de tejido. RPL = reducción en carga parasitaria en %.

Hámsters inmunizados con la proteína Q

Hámster	Hígado	(RPL)	Bazo	(RPL)
1	$1,4 \times 10^6$	(22%)	$1,0 \times 10^7$	(98%)
2	$2,0 \times 10^5$	(89%)	$4,9 \times 10^5$	(99.9%)
3	$2,4 \times 10^5$	(87%)	$3,3 \times 10^5$	(99.9%)
4	$2,4 \times 10^6$	(0%)	$6,3 \times 10^5$	(99.9%)

El número representa la media de tres determinaciones

Animales de control

4 hámsters.	$1,8 \times 10^6 \pm 1,2 \times 10^5$	$5,2 \times 10^8 \pm 2,6 \times 10^7$
-------------	---------------------------------------	---------------------------------------

Los números representan la media de la carga parasitaria de los 4 animales

Con el fin de evaluar si la proteína Q podría ser usada para diseñar sistemas de protección en formulaciones que contenían la proteína LiHsp70 de *Leishmania infantum*, se efectuó un experimento en ratones Balb/C. Se observó que después de la inmunización, la carga parasitaria tanto en el hígado como en el bazo fue reducida significativamente, siendo en algunos animales, cuatro órdenes de magnitud inferior.

Ejemplo 3

Inmunizaciones con proteína Q + proteína Hsp70 en adyuvante de Freund

Cada uno de los 4 hámsters fue inyectado intraperitonealmente con 5 microgramos de proteína Q y 5 microgramos de proteína LiHsp70 disueltos en 40 microlitros de PBS y emulsionados en 40 microlitros de adyuvante de Freund. En la primera inmunización, se empleó adyuvante de Freund completo, mientras que en las dos posteriores, se usó adyuvante de Freund incompleto como se ha indicado anteriormente. La vacunación fue administrada en tres dosis separadas en intervalos de 15 días.

Quince días después de la inmunización se les administró un inóculo de 106 parásitos infecciosos por vía intracardíaca y fueron sacrificados en la semana 22. Cada dos semanas, a pesar del periodo de inmunización y durante toda

ES 2 326 174 T3

la infección, se extrajo sangre de ellos para determinar el grado de respuesta humoral contra la proteína Q y contra la proteína LiHsp70.

La carga parasitaria relativa entre los ratones inmunizados con la proteína Q más LiHsp70 está mostrada en la tabla 3. Se observó que todos los animales fueron altamente protegidos y en algunos de ellos, en el bazo, la reducción fue próxima a dos-tres órdenes de magnitud.

Tabla 3

Carga parasitaria relativa de ratones Balb/C inmunizados con la proteína Q más LiHsp70 después de 4 meses de infección.

Ratones inmunizados con la proteína Q y LiHsp70

Ratón	Hígado	(RPL)	Bazo	(RPL)
1	$1,5 \times 10^3$	(97%)	$1,5 \times 10^4$	(99%)
2	$0,9 \times 10^3$	(98%)	$1,4 \times 10^3$	(99%)
3	$2,0 \times 10^4$	(60%)	$5,6 \times 10^4$	(99%)
4	$0,8 \times 10^4$	(84%)	$1,2 \times 10^5$	(96%)

Los números representan la media de tres determinaciones.

Animales de control

4 ratones $5,1 \times 10^4 \pm 2 \times 10^3$ $3,2 \times 10^6 \pm 8 \times 10^4$

Los números representan la media de la carga parasitaria de los 4 animales.

Las Tablas 4 y 5 muestran que todos los animales de los ejemplos 1 y 2 responden inmunológicamente a la proteína Q, y que empezando desde la segunda semana después de la inmunización, la respuesta contra la proteína Q fue alta y esta respuesta aumentó después de la segunda inmunización (semana 4). La Tabla 6 muestra que la respuesta contra la proteína LiHsp70 durante toda la duración del experimento fue también positiva, aunque más baja que la respuesta en el ejemplo 3 contra la proteína Q.

Las Tablas 4 y 5. Muestran la respuesta inmunitaria en 4 hámsters inyectados intraperitonealmente con 5 microgramos de proteína Q (TABLA 4- ejemplo 1, corto plazo) y la respuesta inmunitaria en 4 hámsters inyectados subcutáneamente con 5 microgramos de proteína Q (TABLA 5 - ejemplo 2, largo plazo).

TABLA 4

Ejemplo 1, corto plazo

Ratones inmunizados con la proteína Q (corto plazo)				
Respuesta inmunitaria contra la proteína Q				
Semana	Ratón 1	Ratón 2	Ratón 3	Ratón 4
2	0,8	0,2	0,3	0,6
4	1,9	2,3	1,1	2,1
6 Infectados	3	3	2,4	2,9
8	3	3	2,9	3
10	3	3	3	3

Los sueros (diluidos 1/200) que mostraban una densidad óptica de 3 tenían un título superior a 1/45.000.

ES 2 326 174 T3

Ratones de control

Respuesta inmunitaria contra la proteína Q (corto plazo).

Semana	Ratón 1	Ratón 2	Ratón 3	Ratón 4
2	0	0	0	0
4	0	0	0	0
6	0	0	0	0
8	0	0	0	0
10	0	0	0	0

Los sueros fueron diluidos 1/200

TABLA 5

Ejemplo 2, largo plazo

ratones de inmunizados con la proteína Q (largo plazo). Respuesta inmunitaria contra la proteína Q				
Semana	Ratón 1	Ratón 2	Ratón 3	Ratón 4
2	1,8	1,3	1,9	0,4
4	2,1	1,8	2,2	0,7
6	2,5	2,7	2,5	0,5
8	2,8	2,2	2,2	0,8
10	3	2,9	2,5	0,7
12	3	3	3	0,9
14	3	3	3	1
16	3	3	2,9	1,5
18	3	3	3	1,7
20	3	3	3	2,2
22	3	3	3	2,6
24	3	3	3	3
26	3	3	3	3
Los sueros (diluidos 1/200) que mostraban una densidad óptica de 3 tenían un título superior a 1/45.000.				
Ratones de control				
Respuesta inmunitaria contra la proteína Q (largo plazo)				
Semana	Ratón 1	Ratón 2	Ratón 3	Ratón 4

ES 2 326 174 T3

2	0	0	0	0
4	0	0	0	0
5	6	0	0	0
8	0	0	0	0
10	10	0	0	0
12	0,2	0,1	0,3	0,1
14	0,3	0,5	0,4	0,2
15	16	0,4	0,5	0,7
18	0,9	1,1	1,7	0,6
20	1,1	1,3	1,5	0,8
20	22	2,5	2,3	2,7
24	2,3	2,1	1,8	2,2
25	26	1,9	2,2	2,3
Los sueros fueron diluidos 1/200				

Tabla 6

Muestra la respuesta inmunitaria en 4 hámsters inyectados intraperitonealmente con 5 microgramos de proteína Q más 5 microgramos de proteína LiHSP 70 (ejemplo 3, largo plazo).

Los ratones inmunizados con la proteína Q + Hsp70 respuesta inmunitaria contra la proteína Q				
Semana	Ratón 1	Ratón 2	Ratón 3	Ratón 4
2	0,4	0,6	0,5	0,4
45	4	1,6	1,1	1,6
6	3	2	1,9	1,9
8	3	2,4	2,6	2,5
50	10	3,	2,9	3
12	2,7	2,9	2,9	2,9
14	2,5	2,6	2,9	2,7
55	16	2,6	2,5	2,5
18	2,8	2,7	2,7	2,5
60	20	2,5	2,8	2,4
22	2,5	2,4	2,8	2,9
Los sueros fueron diluidos 1/800				

ES 2 326 174 T3

Ratones de control				
Respuesta inmunitaria contra la proteína Q				
Semana	Ratón 1	Ratón 2	Ratón 3	Ratón 4
2	0	0	0	0
4	0	0	0	0
6	0	0	0	0
8	0	0	0	0
10	0	0	0	0
12	0	0,1	0,2	0,1
14	0,3	0,4	0,2	0,5
16	0,5	0,6	0,7	0,7
18	0,8	1,4	1,1	1,5
20	1,8	1,6	1,8	2,2
Los sueros fueron diluidos 1/200				
Ratones inmunizados con la proteína Q + Hsp70				
Respuesta inmunitaria contra la proteína Hsp70				
Semana	Ratón 1	Ratón 2	Ratón 3	Ratón 4
2	0,1	0,2	0,1	0,4
4	0,4	0,6	0,3	0,5
6	0,8	0,7	0,4	0,3
8	0,7	1,1	1,2	0,5
10	1,2	1,4	1,5	0,8
12	1,9	1,9	2	1,2
14	2	1,8	2,2	1,7
16	1,9	2	2,2	1,9
18	2,	2,1	2	2
20	2	2,1	2,2	1,9
22	2,4	2,3	2,1	1,9
Los sueros fueron diluidos 1/800				
Ratones de control				
Respuesta inmunitaria contra la proteína Hsp70				
Semana	Ratón 1	Ratón 2	Ratón 3	Ratón 4
2	0	0	0	0

ES 2 326 174 T3

4	0	0	0	0
6	0	0	0	0
8	0	0	0	0
10	0	0	0	0
12	0,1	0	0,3	0
14	0,3	0,2	0,5	0,4
16	0,5	0,6	0,6	0,3
18	0,7	0,6	0,7	0,5
20	1	0,8	0,5	1,2
22	1,7	1,4	0,8	1,1

Los sueros fueron diluidos 1/200

25

Ejemplo 4

Inmunización con proteína Q + BCG en ratones Balb/C

30

Cuatro ratones Balb/C fueron inyectados cada uno intraperitonealmente con 5 microgramos de proteína Q y 10^6 Unidades de Formación de Colonias (CFU) de BCG (Bacille Calmette-Gu-rin) disueltas en 40 microlitros de PBS. La inmunización fue efectuada en tres dosis, después de 15 días. 15 días después de la inmunización, se les administró un inóculo de parásitos infecciosos de 10^5 BCN150 de *L. Infantum* por vía intracardíaca. Cada dos semanas, durante toda la duración de la inmunización y durante toda la infección, se tomaron muestras de sangre de ellos para examinar el grado de respuesta humoral a la proteína Q. Los animales fueron sacrificados 8 semanas después de la infección.

35

La Tabla 7 (a y b) muestra que los animales inmunizados responden positivamente a la proteína Q empezando desde la segunda semana y que la respuesta aumenta progresivamente hasta que en muchos casos alcanza valores de 400,000. La Tabla 8 muestra la diferencia de carga parasitaria entre el hígado y bazo de los animales vacunados y de control.

40

45

(Tabla pasa a página siguiente)

50

55

60

65

ES 2 326 174 T3

Tabla 7

Respuesta inmunitaria a la proteína Q en ratones Balb/C inmunizados con 5 microgramos de proteína Q y 106 CFU de BCG Ratones 1, 2, 3, 4 inmunizados Ratones 5, 6, 7, 8 controles no inmunizados.

TABLA 7

Reacción a la proteína Q

semana	Ratón 1	Ratón 2	Ratón 3	Ratón 4
preimmune	0	0	0	0
1ª inmuniz.				
1	0	0,2	0,1	0
2ª inmuniz.				
3	0,5	0,7	0,8	0,9
3ª inmuniz.				
6	1,6	2,1	2,6	2,7
7	1,8	2,3	2,4	2,1
9	2,1	2,6	2,5	1,9
11	2,7	2,9	3	3
13	3	3	3	3
semana	Ratón 5	Ratón 6	Ratón 7	Ratón 8
preimmune	0	0	0	0
1ª inmuniz.				
1	0	0	0	0
2ª inmuniz.				
3	0	0	0	0
3ª inmuniz.				
6	0	0	0	0
7	0	0	0	0
9	0	0	0	0
11	0	0	0	0
13	0	0	0	0

el número 3 es equivalente a un excedente en el sistema de medición

los sueros fueron tomados al principio de cada una de las semanas indicadas

la 1ª inmunización fue efectuada en el día 0, la 2ª en el día 15 y la tercera en el día 30.

ES 2 326 174 T3

Tabla 8

Carga parasitaria en el hígado y bazo de ratones Balb/C vacunados con proteína Q subcutáneamente + 10^6 de BCG. 8 semanas después de la infección, la carga parasitaria fue medida por microscopía óptica de impresiones tisulares mediante la medición de distintos campos que contienen 7000 células nucleadas. La carga parasitaria está representada como la cantidad de parásitos por miligramo de tejido, habiendo calculado previamente que 1 parásito por 1000 células nucleadas es equivalente a una cantidad aproximada de 210 parásitos por miligramo de tejido. RPB = reducción de carga parasitaria, %.

Ratón	Hígado	(RPB)	Bazo	(RPB)
1	72	(82%)	457	(89%)
2	40	(90%)	207	(95%)
3	48	(88%)	n.d.	(100%)
4	n.d.	(100%)	90	(98%)
Animales de control				
	4 animales. Media		400 ± 15	4155 ± 30
n.d. parásitos no pudieron ser detectados en 5000 células nucleadas				

REIVINDICACIONES

- 5 1. Composición farmacéutica para la prevención y tratamiento de la Leishmaniasis en humanos y animales com-
prendiendo:
- 10 a. una proteína Q que tiene la secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEC ID N°. 1 o que tiene al menos el
90% de identidad de los aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°. 1 y que genera una respuesta
inmunitaria contra la Leishmaniasis combinada con
- 10 b. la proteína LiHsp70 completa o fragmentada.
2. Composición farmacéutica según la reivindicación 1, donde la proteína Q está enlazada a la proteína LiHsp70.
- 15 3. Composición farmacéutica para la prevención y tratamiento de la leishmaniasis en seres humanos y animales
comprendiendo:
- a. un vector que lleva la secuencia que codifica para la proteína Q según está definido en la reivindicación 1 y
- 20 b. un vector que lleva la secuencia que codifica para la proteína LiHsp70 según está definido en la reivindicación
1.
4. Composición farmacéutica según la reivindicación 3, donde un mismo vector lleva ambas secuencias según se
ha definido en la reivindicación 3.
- 25 5. Composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, adecuada para la administración
intraperitoneal, subcutánea o intramuscular.
6. Composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que además comprende un adyuvante
30 fisiológico adecuado para la administración intraperitoneal, subcutánea o intramuscular.
7. Composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que es una vacuna.
8. Composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, para el uso para la generación de una
35 respuesta inmunológica.
9. Uso de una composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para la preparación de un
medicamento para la prevención o tratamiento de la leishmaniasis en un ser humano o animal.
- 40 10. Uso según la reivindicación 9, donde el medicamento es una vacuna.

45

50

55

60

65

Fig 1a

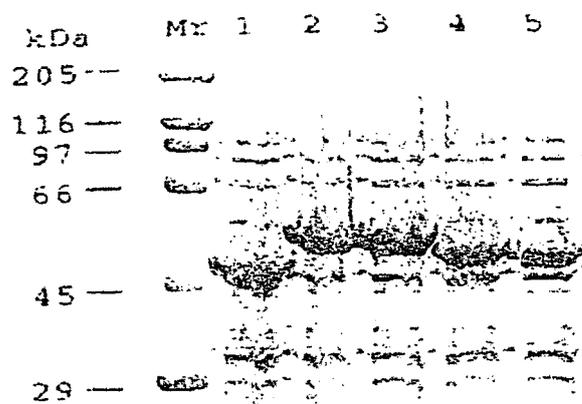


Fig 1b

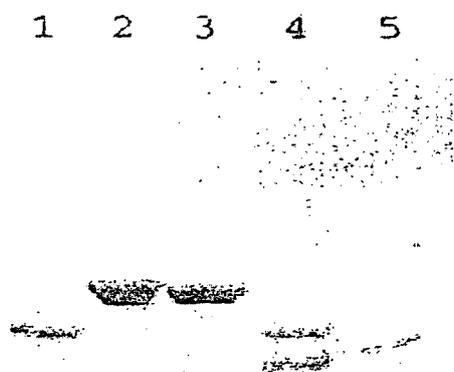


Fig 1c

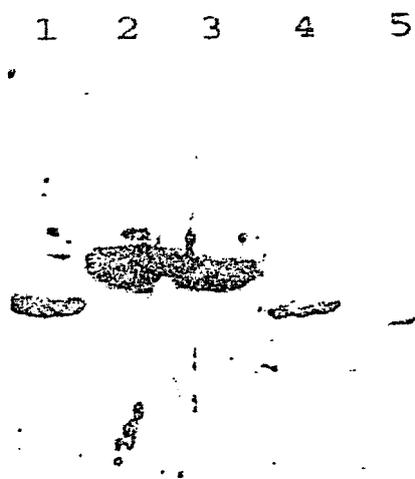


Fig 1d

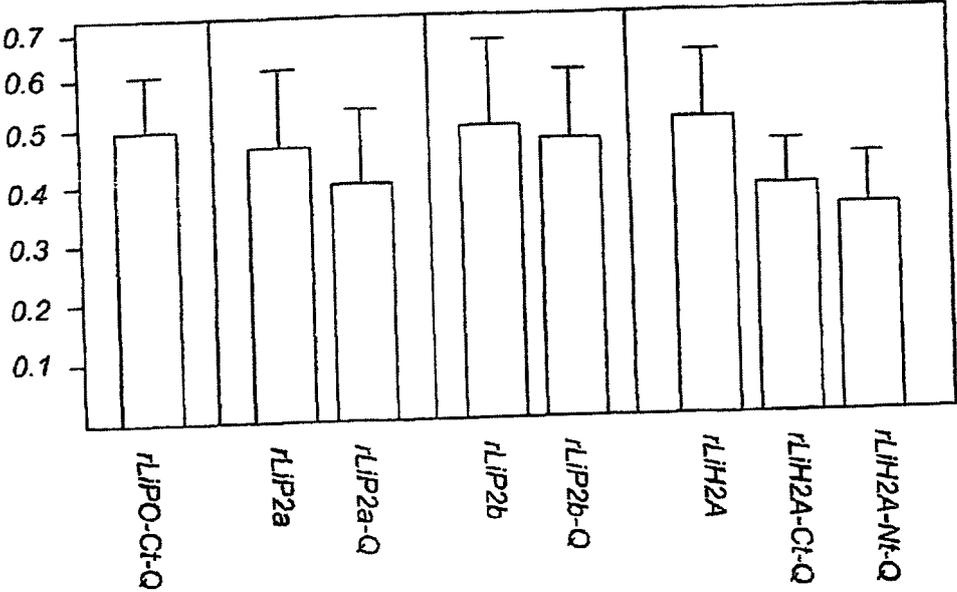


Fig 2

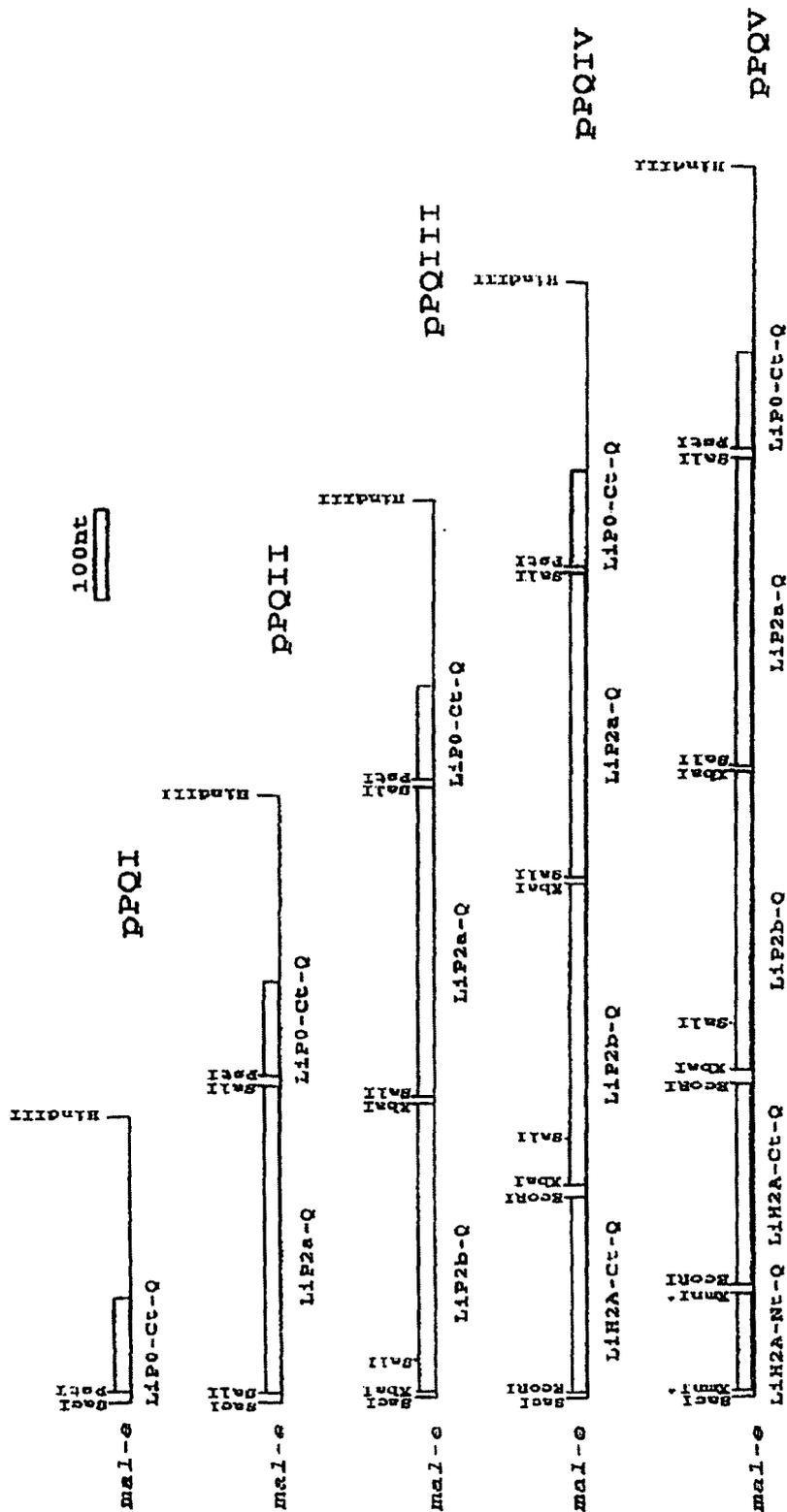


Fig 3

MBP IEGRPLTPRSAKKAVRKSGSKSAKCGLIFFVGRVGGMMRRGQYARRIGA 50
 SGAPRISEFSVKAAAQSGKKRCRLNPRTVMLAARHDDDIGTLLKNVTL^SRS^GVV 104
 PNISKAMAKKKGGKGGKATPSAPEFGDSSRPMSTKYLAAYALASLSKASPSQAD 157
 VEAICKAVHIDVDQATLAFVMESVTGRDVATLIAEGAAKMSAMPAASSGAAAGV 211
 TASAAGDAAAPAAAAAKKDEFEEEEADDDMGPSVRDPMQYLAAYALVALSGKTPSK 265
 ADVQAVLKAAGVAVDASRVDAVFQEVEGQSFDALVAEGRTKLVGSGSAAAPAGAV 319
 STAGAGAGAVAEAKKEEPEEEEEADDDMGPVDLOPAAAAAPAAPSAAAAKAAPEESD 374
 EDDEFGMGGLF

Fig 4a

Fig 4b

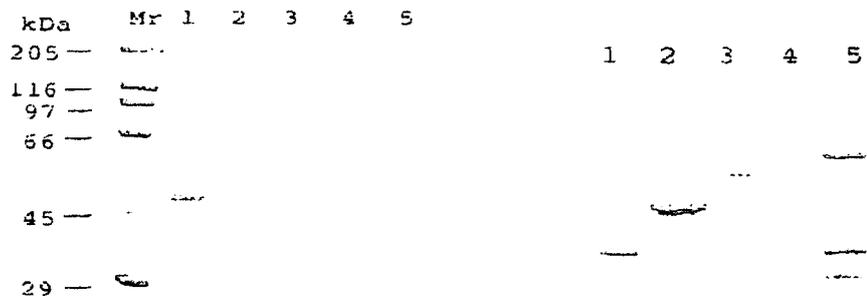


Fig 4c

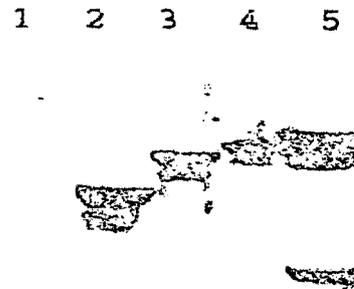


Fig 4d

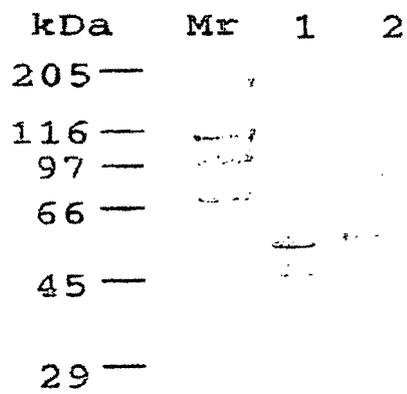


Fig 4e



Fig 4f

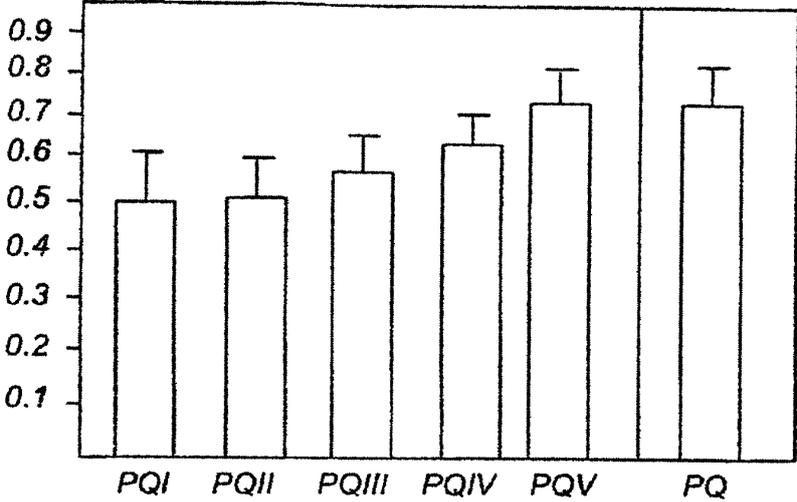
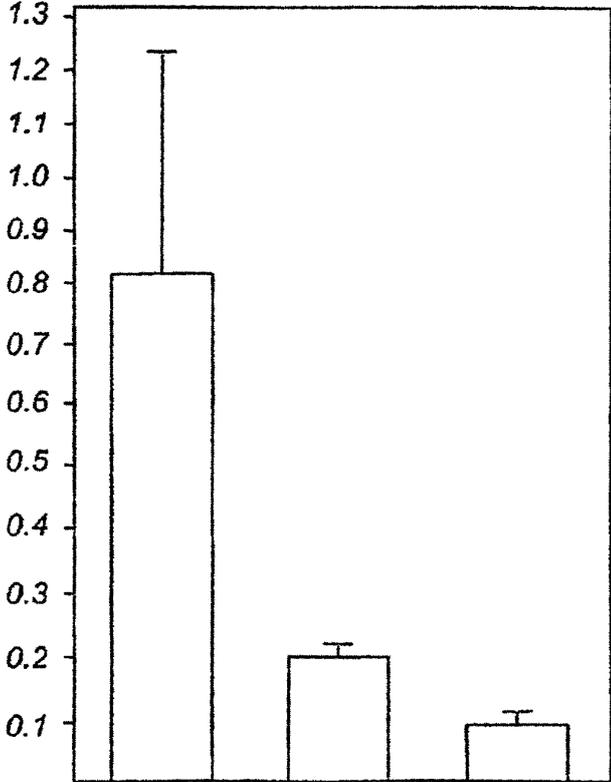


Fig 5



ES 2 326 174 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> CBF-Leti, SA

5 <120> Gen quimérico formado por secuencias de ADN que codifican los determinantes antigénicos de cuatro proteínas de *L. Infantum*

<130> P042418EP1

10

<140> PCT

<141> 1999-12-23

15 <160> 12

<170> PatentIn Ver. 2.1

20 <210> 1

<211> 412

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial:proteína Q expresada en PQ31

30 <400> 1

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

ES 2 326 174 T3

Ser Val Thr Gly Arg Asp Val Ala Thr Leu Ile Ala Glu Gly Ala Ala
 210 215 220
 5 Lys Met Ser Ala Met Pro Ala Ala Ser Ser Gly Ala Ala Ala Gly Val
 225 230 235
 Thr Ala Ser Ala Ala Gly Asp Ala Ala Pro Ala Ala Ala Ala Lys
 245 250 255
 10 Lys Asp Glu Pro Glu Glu Glu Ala Asp Asp Asp Met Gly Pro Ser Arg
 260 265 270
 Val Asp Pro Met Gln Tyr Leu Ala Ala Tyr Ala Leu Val Ala Leu Ser
 275 280 285
 15 Gly Lys Thr Pro Ser Lys Ala Asp Val Gln Ala Val Leu Lys Ala Ala
 290 295 300
 Gly Val Ala Val Asp Ala Ser Arg Val Asp Ala Val Phe Gln Glu Val
 305 310 315 320
 20 Glu Gly Lys Ser Phe Asp Ala Leu Val Ala Glu Gly Arg Thr Lys Leu
 325 330 335
 Val Gly Ser Gly Ser Ala Ala Pro Ala Gly Ala Val Ser Thr Ala Gly
 340 345 350
 25 Ala Gly Ala Gly Ala Val Ala Glu Ala Lys Lys Glu Glu Pro Glu Glu
 355 360 365
 Glu Glu Ala Asp Asp Asp Met Gly Pro Val Asp Leu Gln Pro Ala Ala
 370 375 380
 30 Ala Ala Pro Ala Ala Pro Ser Ala Ala Ala Lys Glu Glu Pro Glu Glu
 385 390 395 400
 Ser Asp Glu Asp Asp Phe Gly Met Gly Gly Leu Phe
 405 410

35 <210> 2

<211> 1436

<212> ADN

40 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: ADN que codifica la proteína Q

45 <400> 2

atgagaggat ctcaccacca ccaccaccac acggatccgc atgcgagctc gaacaacaaac 60
 50 aacaataaca ataacaacaa cctcgggatac gagggagggc ctttagctac tcctgcagc
 120 gccaaagaag ccttcagcaa gagcggctcc aagtccgcga atgtggtct gatcttcccg
 180 gtgggccgcg tcggcgggat gatgcgccgc gcccaqtacg ctcgcgcgat cggtgccctc
 240 ggcccccca ggatttcaga attctccgtg aaggcggccg cgcagagcgg gaagaagcgg
 300 tgccgcctga acccgcgcac cgtgatgctg gccgcgcgcc acgacgacga catcggcacc
 360

60

65

ES 2 326 174 T3

5 cttctgaaga acgtgacott gtotcacage ggcgttgtgc cgaacatcag caaggogatg
 420
 gcaaagaaga agggcgga caagggcaag gcgacaccga gcgcgccga attcggatcc
 480
 tctagaccca tgtccacca gtacctcgc gcgtacgctc tggcctccct gagcaaggcg
 540
 tccccgtctc aggcggacgt ggaggctatc tgcaggccg tccacatcga cgtcagaccg
 600
 10 gccaccctcg cctttgtgat ggagagcgtt acgggaocgc acgtggccac cctgatcgg
 660
 gaggggcccg cgaagatgag cgcgatgccc gcggccagct ctggtgccc tcctggcgtc
 720
 actgcttcg ctgcggtga tgcggctccg gctgccccc ccgcgaaga ggacgagccc
 780
 15 gaggaggagg ccgacgacga catgggccc tctagagtcg accccatgca gtacctcgc
 840
 gcgtacccc tcgtggcgt gtctggcaag acgcccoga agggggacgt tcaggctgtc
 900
 ctgaaggccg ccggcgttgc cgtggatgc tcccgcgtgg atgccgtctt ccaggaggtg
 960
 20 gagggcaaga gcttcgatgc gctggtggc gagggccga cgaagctggt gggctctggc
 1020
 ttgcccctc ctgctggcgc tgtctccact gctggtgccg gcgctggcgc ggtggccgag
 1080
 25 gcaagaagg aggagcccga ggaggaggag gccgatgatg acatgggccc cgtcagacctg
 1140
 cagcccgcg ctgcccgcgc ggcggcccct agcgcgcctg ccaggagga gcggaggag
 1200
 agcagcagag acgacttcgg catgggcggt ctcttctaa cgaactccca tctcttagcc
 1260
 30 tctttgtggt gcgcttgagg tgcctcgcct ctgcttctcc tgcagtggt ggtgactct
 1320
 ggcgggtatg tgcgctcga ttacacccac ctctcccacc cctttgccct acgagctcgc
 1380
 atgcgcaatc cgtgatcat cgaagggaagt ctctctgggt ggcagtggt aagctt
 1436

35 <210> 3

<211> 328

<212> PRT

40 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial:proteína Q expresada en pMAL 1

45

<400> 3

50 Ile Glu Gly Arg Pro₅ Leu Thr Pro Arg Ser₁₀ Ala Lys Lys Ala Val Arg₁₅
 Lys Ser Gly Ser₂₀ Lys Ser Ala Lys Cys₂₅ Gly Leu Ile Phe Pro₃₀ Val Gly
 55 Arg Val Gly₃₅ Gly Met Met Arg Arg₄₀ Gly Tyr Ala Arg₄₅ Arg Ile Gly Ala
 Ser Gly₅₀ Ala Pro Arg Ile Ser₅₅ Glu Phe Ser Val Lys₆₀ Ala Ala Ala Gln
 60 Ser Gly₆₅ Lys Lys Arg Cys₇₀ Arg Leu Asn Pro Arg₇₅ Thr Val Met Leu Ala₈₀
 Ala Arg His Asp₈₅ Asp Ile Gly Thr Leu₉₀ Lys Asn Val Thr₉₅ Leu

65

ES 2 326 174 T3

Ser His Ser Gly Val Val Pro Asn Ile Ser Lys Ala Met Ala Lys Lys
 100 105 110
 Lys Gly Gly Lys Lys Gly Lys Ala Thr Pro Ser Ala Pro Glu Phe Gly
 115 120 125
 Asp Ser Ser Arg Pro Met Ser Thr Lys Tyr Leu Ala Ala Tyr Ala Leu
 130 135 140
 Ala Ser Leu Ser Lys Ala Ser Pro Ser Gln Ala Asp Val Glu Ala Ile
 145 150 155 160
 Cys Lys Ala Val His Ile Asp Val Asp Gln Ala Thr Leu Ala Phe Val
 165 170 175
 Met Glu Ser Val Thr Gly Arg Asp Val Ala Thr Leu Ile Ala Glu Gly
 180 185 190
 Ala Ala Lys Met Ser Ala Met Pro Ala Ala Ser Ser Gly Ala Ala Ala
 195 200 205
 Gly Val Thr Ala Ser Ala Ala Gly Asp Ala Ala Pro Ala Ala Ala Ala
 210 215 220
 Ala Lys Lys Asp Glu Pro Glu Glu Glu Ala Asp Asp Asp Met Gly Pro
 225 230 235 240
 Ser Val Arg Asp Pro Met Gln Tyr Leu Ala Ala Tyr Ala Leu Val Ala
 245 250 255
 Leu Ser Gly Lys Thr Pro Ser Lys Ser Thr Ala Gly Ala Gly Ala Gly
 260 265 270
 Ala Val Ala Glu Ala Lys Lys Glu Glu Pro Glu Glu Glu Glu Ala Asp
 275 280 285
 Asp Asp Met Gly Pro Val Asp Leu Gln Pro Ala Ala Ala Ala Pro Ala
 290 295 300
 Ala Pro Ser Ala Ala Ala Lys Ala Ala Pro Glu Glu Ser Asp Glu Asp
 305 310 315 320
 Asp Phe Gly Met Gly Gly Leu Phe
 325

<210> 4
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial:oligonucleótido

<400> 4

cctttageta ctctctgcag cgccaag

27

<210> 5
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial:oligonucleótido

ES 2 326 174 T3

	<400> 5			
		ectggggggcg ccagaggcac cgatgcg		27
5		<210> 6 <211> 26 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
10		<220> <223> Descripción de la secuencia artificial:oligonucleótido		
15		<400> 6		
		gaattctccg taaggcggcc gcgcag		26
20		<210> 7 <211> 30 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
25		<220> <223> Descripción de la secuencia artificial:oligonucleótido		
30		<400> 7		
		gaattcgggc gcgctcggtg tgcacttgcc		30
35		<210> 8 <211> 30 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
40		<220> <223> Descripción de la secuencia artificial:oligonucleótido		
45		<400> 8		
		gtcgacccca tgcagtacct cgcgcgctac		30
50		<210> 9 <211> 30 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
55		<220> <223> Descripción de la secuencia artificial:oligonucleótido		
60		<400> 9		
		gtcgaogggg cccatgtcat catcggcctc		30
65		<210> 10 <211> 32 <212> ADN <213> Secuencia artificial		

ES 2 326 174 T3

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial:oligonucleótido

5 <400> 10
tctagaccgg ccatgtogtc gtattactcg cc **32**

<210> 11
10 <211> 29
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial:oligonucleótido

20 <400> 11
tctagagggg ccatgtogtc gtcggcctc **29**

<210> 12
25 <211> 30
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial:oligonucleótido

35 <400> 12
ctgcagcccg ccgctgccgc gccggccgcc **30**

40

45

50

55

60

65