

REIVINDICACIONES

1.
- 5
- 10
- 15
- 20
- 25
- 30
- 35
1.
2.
3.
4.
5.
6.
7.
8.
9.
- Molécula de ácido nucleico representada por una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en:
- i. secuencias de nucleótidos que codifican para un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 50% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1 a lo largo de toda su longitud,
- ii. secuencias de nucleótidos que comprenden una secuencia de nucleótidos que tiene al menos el 50% de identidad de secuencia con la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO:2 a lo largo de toda su longitud,
- iii. secuencias de nucleótidos cuya hebra complementaria se hibrida con una molécula de ácido nucleico de secuencia de (i) o (ii) y
- iv. secuencias de nucleótidos que difieren de la secuencia de una molécula de ácido nucleico de (iii) debido a la degeneración del código genético,
- para su uso como adyuvante cuando dicha molécula de ácido nucleico está operativamente unida a una secuencia de nucleótidos que codifica para un antígeno.
- Molécula de ácido nucleico según la reivindicación 1, en la que la secuencia de ácido nucleico está operativamente unida a una secuencia de nucleótidos que codifica para el antígeno.
- Molécula de ácido nucleico según la reivindicación 1 y/o 2, estando dicha molécula de ácido nucleico libre de una secuencia que codifica para un polipéptido que es idéntica a SEQ ID NO: 3 a lo largo de toda su longitud.
- Molécula de ácido nucleico según la reivindicación 2 ó 3, codificando la molécula de ácido nucleico identificada en cualquiera de las reivindicaciones 1 para un polipéptido que puede provocar una respuesta inmunitaria específica de antígeno en un sujeto.
- Molécula de ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 2 - 4, en la que dicho antígeno se origina a partir de cualquier organismo conocido que esté asociado con una enfermedad o un estado en un sujeto.
- Molécula de ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 2 - 5, en la que dicho antígeno es un autoantígeno o se origina a partir de virus o un microorganismo tal como una bacteria, una levadura, un hongo o un parásito.
- Polipéptido codificado por una molécula de ácido nucleico según la reivindicación 1.
- Polipéptido codificado por una molécula de ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 6.
- Constructo de ácido nucleico que comprende una molécula de ácido nucleico según la reivindicación 1.

10. Constructo de ácido nucleico que comprende una molécula de ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 6.
- 5 11. Composición que comprende una molécula de ácido nucleico según la reivindicación 1 y/o un polipéptido según la reivindicación 7 y/o un constructo nucleico según la reivindicación 9.
12. Composición que comprende una molécula de ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 6 y/o un polipéptido según la reivindicación 8 y/o un constructo nucleico según la reivindicación 10.
- 10 13. Molécula de ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 6, polipéptido según la reivindicación 8, constructo de ácido nucleico según la reivindicación 10 y/o composición según la reivindicación 12 para su uso como medicamento, siendo preferiblemente el medicamento una vacuna.
- 15 14. Uso de una molécula de ácido nucleico según la reivindicación 1, un polipéptido según la reivindicación 7, un constructo de ácido nucleico según la reivindicación 9 y/o una composición según la reivindicación 11 para la fabricación de un medicamento para tratar una enfermedad o un estado asociado con un antígeno según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 6.
- 20 15. Uso de una molécula de ácido nucleico según las reivindicaciones 2 a 6, un polipéptido según la reivindicación 8, un constructo de ácido nucleico según la reivindicación 10 y/o una composición según la reivindicación 12 para la preparación de un medicamento que es una vacuna para tratar una enfermedad o un estado asociado con el antígeno.
- 25 16. Método de tratamiento de una enfermedad o un estado asociado con un antígeno según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 6, en el que dicho tratamiento comprende una molécula de ácido nucleico según la reivindicación 1, un polipéptido según la reivindicación 7, un constructo de ácido nucleico según la reivindicación 9 y/o una composición según la reivindicación 11.
- 30 17. Método de tratamiento de una enfermedad o un estado asociado con un antígeno según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 6, en el que dicho tratamiento comprende una vacuna que comprende una molécula de ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 2 de 6, un polipéptido según la reivindicación 8, un constructo de ácido nucleico según la reivindicación 10 y/o una composición según la reivindicación 12.

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES

SOLICITUD FASE NACIONAL - PCT

1 Título de la Invención(200 caracteres o espacios máximos)

NUEVO ADYUVANTE

2 Datos del Solicitante / Titular

Nombre:	LABORATORIOS LETI, S.L.	Dirección Electrónica:	notificaciones@clarkemodet.com.co
Dirección:	Calle del Sol, 5 ES-28760,	Nacionalidad/País de constitución:	ESPAÑA - MADRID - TRES CANTOS

Identificación:

☐ CEDULA DE CIUDADANIA ☐ CEDULA DE EXTRANJERIA
☒ EMPRESA EXTRANJERA ☐ NIT
☐ PASAPORTE

Número: 516861779886

3 Solicitantes

Apellidos - Nombres o Razón Social	Identificación	Tipo
1. LABORATORIOS LETI, S.L.	516861779886	NN

4 Datos del Inventor

Nombre:	Carlos ALONSO - BEDATE,	Dirección Electrónica:	notificaciones@clarkemodet.com.co
----------------	-------------------------	-------------------------------	-----------------------------------

Dirección:		Alberto Aguilera 21 ES-28015,	Nacionalidad/País de constitución:	ESPAÑA - MADRID - MADRID
Identificación:				
☐ CEDULA DE CIUDADANIA ☐ EMPRESA EXTRANJERA ☐ PASAPORTE ☐ CEDULA DE EXTRANJERIA ☐ NIT ☒ No Aplica				
Número:				
5	Inventor(es)			
Apellidos - Nombres		Nacionalidad		
1.	ALONSO - BEDATE, Carlos	ESPAÑA		
2.	SOTO - ALVAREZ, Manuel	ESPAÑA		
3.	PARODY - DE LA FUENTE, Nuria	ESPAÑA		
4.	PICO DE COAÑA SUÁREZ, Yago	ESPAÑA		
6	Datos Inventor(es)			
País de Residencia		Departamento/Estado	Ciudad	Dirección
1.	ESPAÑA	MADRID	MADRID	Alberto Aguilera 21 ES-28015,
2.	ESPAÑA	MADRID	MADRID	Av/ Bélgica 85 2Â°-A ES-28916,
3.	ESPAÑA	MADRID	ALCOBENDAS	C/Carlos Muñoz Ruiz 3, portal 5, 3Â°B ES-28100,
4.	ESPAÑA	MADRID	MADRID	c/ Berruguete 19 ES-28049,
7	Datos del Representante Legal / Apoderado			

Nombre:	DILIA MARIA RODRIGUEZ D'ALEMAN		Dirección Electrónica:	notificaciones@clarker
Dirección:	NOTIFICACIONES@CLARKEMODET.COM.CO		Nacionalidad/País de constitución:	COLOMBIA - BOGOTÁ BOGOTÁ D.C.
Identificación: ☒ CEDULA DE CIUDADANIA ☐ CEDULA DE EXTRANJERIA ☐ EMPRESA EXTRANJERA ☐ NIT ☐ PASAPORTE Número: 41654882				
Presentación de Poder				
Año de Radicación				
Número de Radicación				
8	Datos Solicitud: PCT / WO			
Número Solicitud:		PCT/EP2011/069849	Fecha Solicitud:	10/11/2011
Número Publicacion:		WO 2012/062861	Fecha Publicacion:	18/05/2012
9	Declaraciones de prioridad		☒ SI ☐ NO	
	(33) País de origen	Codigo del país	(31) No. Solicitud	(32) Fecha _
1.	ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA	US	61/412,034	2010/11/10
2.	EUROP PATENT ORGANIZATION(EPO)	EP	10190705.3	2010/11/10
10	Reducción de tasas.			
<i>Declaro que carezco de medios económicos para presentar la solicitud de patente.</i> ☐ SI ☒ NO Nota: En caso de ser persona natural y carecer de medios económicos, y por lo tanto, aplique la reducción de tasas a que se refiere la resolución vigente en tarifas, debe firmar la presente solicitud bajo la gravedad de juramento.				
☐ Micro, pequeñas y medianas empresas ☐ Universidades públicas o privadas ☐ Entidades sin ánimo de lucro Debe aportar los documentos que se indican en el numeral 17 de anexos				

11 Documentos Anexos

- ☒ Reivindicaciones
- ☒ Descripción
- ☐ Dibujos y/o Figuras
- ☒ Resumen
- ☐ Certificado Depósito Material Biológico
- ☐ Uso de Conocimiento tradicional
- ☒ Listado de secuencias
- ☐ Artes finales 12 x 12 cm
- ☐ Poderes, si fuere el caso
- ☐ Copia de la primera solicitud si se reivindica prioridad
- ☐ Traducción simple de la primera solicitud, si se reivindica prioridad
- ☒ Otros Anexos

DESCRIPCIÓN

NUEVO ADYUVANTE

Campo de la invención

La invención se refiere a un nuevo adyuvante y a su uso como vacuna en combinación
5 con un antígeno.

Antecedentes de la invención

Los adyuvantes se definen como sustancias cuyo papel es reforzar o dirigir respuestas
inmunitarias específicas de antígeno cuando se usan en combinación con antígenos
específicos (Wack, A., *et al.* (2005) Curr. Opin. Immunol. 17, 411-418.). Habitualmente,
10 los adyuvantes combinados con antígenos, como es el caso con todas las vacunas
comerciales disponibles actualmente, no inducen respuestas inmunitarias contra ellos
mismos. Debido a las malas propiedades inmunogénicas de la mayoría de los
antígenos, se usan adyuvantes para potenciar, activar y dirigir las respuestas
inmunitarias adaptativa e innata frente a esos antígenos. El concepto de adyuvantes se
15 ha extendido a portadores que interaccionan con moléculas de superficie en células
específicas del sistema inmunitario que funcionan en el punto de contacto entre el
sistema inmunitario del huésped y el antígeno administrado (Segal BH, *et al.*, Drug
Discov Today. 2006 Jun; 11(11-12):534-40.). Al hacer esto, los adyuvantes ayudan a
estimular el sistema inmunitario y aumentan la respuesta al antígeno administrado
20 conjuntamente. Por tanto, los adyuvantes se han usado ampliamente para el desarrollo
de vacunas.

Los adyuvantes pueden clasificarse según sus propiedades fisicoquímicas o
mecanismos de acción. Las dos clases principales de adyuvantes incluyen compuestos
que actúan directamente sobre el sistema inmunitario tales como toxinas bacterianas
25 que estimulan respuestas inmunitarias, y moléculas que pueden facilitar la
presentación de antígenos de una manera controlada y que se comportan como un
portador. En la actualidad, se usan un gran número de adyuvantes para aumentar las
características inmunológicas de antígenos incluyendo aceites, sales de aluminio,
proteínas y ácido nucleico (Steven G. Reed, *et al.* (2003) Expert Rev. Vaccines 2, 167-
30 188.).

En principio, debido al hecho que la respuesta contra el antígeno y la calidad de la
respuesta inmunitaria dependerán en gran medida de la pureza y naturaleza del
adyuvante. El adyuvante ideal debe estar química y físicamente bien definido de tal
manera que facilite el control de calidad. Puesto que en la mayoría de casos los
35 antígenos están bien definidos, el control de la especificidad del adyuvante garantizará
un desarrollo reproducible de la respuesta inmunológica específica de antígeno final.
En este contexto, los adyuvantes pueden no sólo provocar una respuesta inmunológica
contra el antígeno sino también dirigir la respuesta inmunitaria que el antígeno provocó
en el huésped. Si la respuesta inmunitaria va en la dirección apropiada, la naturaleza
40 del adyuvante influirá sustancialmente en el valor del antígeno como producto
terapéutico. Además de ayudar a la inducción de una respuesta inmunológica (humoral
o mediada por células) contra antígenos, el objetivo del adyuvante es provocar
efectores inmunitarios que den como resultado la producción de citocinas específicas.
Además, puesto que la especificidad y magnitud de las respuestas inmunitarias
45 inducidas por el constructo de antígeno-adyuvante pueden depender en gran parte de
la naturaleza de las células inmunitarias del huésped, la potencia de los adyuvantes no

puede analizarse sin referencia al huésped. Por tanto, las respuestas inmunitarias inducidas por un antígeno pueden variar dependiendo de la naturaleza del adyuvante y de la naturaleza del sistema inmunitario del huésped.

5 Siempre existe una necesidad de nuevos adyuvantes puesto que están desarrollándose nuevas vacunas y casi siempre se necesitan adyuvantes con el fin de obtener una inducción eficaz de una respuesta inmunitaria. Los nuevos adyuvantes también pueden conferir nuevas propiedades atractivas a las vacunas. Por ejemplo, pueden influir en el tipo y dirección de la respuesta inmunitaria inducida.

Descripción de la invención

10 Se muestra sorprendentemente que la fusión genética de fragmentos de proteína particulares que se originan a partir de una especie de *Leishmania* con un antígeno definido puede aumentar significativamente la potencialidad inmunogénica del antígeno fusionado cuando la proteína quimérica resultante se administra *in vivo* a ratones. También se muestra que la proteína resultante de la expresión *in vivo* del gen
15 quimérico presente en un plásmido de ADN también induce una respuesta humoral alta contra el antígeno fusionado genéticamente mientras que la administración del plásmido que contiene el gen que codifica para el antígeno solo no la induce.

Molécula de ácido nucleico

20 En un primer aspecto se proporciona una molécula de ácido nucleico representada por una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en:

- i. secuencias de nucleótidos que codifican para un polipéptido o un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 50% de identidad o similitud de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1,
- ii. secuencias de nucleótidos que comprenden una secuencia de nucleótidos que tiene
25 al menos el 50% de identidad o similitud de secuencia con la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO:2 ,
- iii. secuencias de nucleótidos cuya hebra complementaria se hibrida con una molécula de ácido nucleico de secuencia de (i) o (ii) y
- iv. secuencias de nucleótidos que difieren de la secuencia de una molécula de ácido
30 nucleico en (iii) debido a la degeneración del código genético.

Dicha molécula de ácido nucleico es preferiblemente para su uso como adyuvante cuando dicha molécula de ácido nucleico está operativamente unida a una secuencia de nucleótidos que codifica para un antígeno tal como se define más adelante en el presente documento.

35 Una molécula de ácido nucleico descrita en esta invención es atractiva puesto que la proteína codificada puede usarse como adyuvante. Un adyuvante se define en el presente documento como una molécula que puede presentar un antígeno al sistema inmunitario de tal manera que se provoque una respuesta inmunitaria, o un aumento de la misma, contra dicho antígeno cuando el antígeno se administra en combinación con
40 el adyuvante. Para analizar la respuesta inmunitaria provocada específica de antígeno, dicha respuesta inmunitaria se compara con la respuesta inmunitaria inducida en presencia del antígeno sin el adyuvante. La inducción se evalúa en un sujeto o en

células de un sujeto.

En este contexto, la respuesta inmunitaria provocada específica de antígeno es sinónimo de la respuesta inmunitaria inducida contra dicho antígeno o el aumento en la inducción de una respuesta inmunitaria contra dicho antígeno o una respuesta
 5 inmunitaria detectable contra dicho antígeno. Provocar una respuesta inmunitaria específica de antígeno puede reemplazarse por inducir, potenciar o aumentar una respuesta inmunitaria contra un antígeno.

Una respuesta inmunitaria puede ser una respuesta de células B y/o T. Una respuesta inmunitaria puede ser una respuesta de células B, es decir producción de un
 10 anticuerpo específicamente dirigido contra dicho antígeno. Un anticuerpo es preferiblemente un anticuerpo de IgG, más preferiblemente un anticuerpo de IgG2a y/o IgG1. Una respuesta inmunitaria puede ser una respuesta de células T, preferiblemente una respuesta Th1, una respuesta Th2 o una respuesta Th1/Th2 equilibrada. El experto sabe que dependiendo de la enfermedad, puede requerirse la
 15 inducción de una respuesta de células B y/o T para controlarla. La producción de dicho anticuerpo podría evaluarse por ELISA, preferiblemente tal como se lleva a cabo en los ejemplos. Alternativamente, dicha respuesta inmunitaria puede detectarse midiendo la producción de citocinas tales como, por ejemplo, IFN gamma, IL-6, TNF alfa o IL-10. La producción de tales citocinas podría evaluarse por ELISA, preferiblemente tal como se
 20 lleva a cabo en los ejemplos.

En una realización preferida, la detección de la respuesta inmunitaria provocada específica de antígeno significa que dicha detección se produce tras al menos una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce horas o más o tras al menos un día de la administración de dicho adyuvante y antígeno, o al menos dos
 25 días, o al menos tres días, o al menos cuatro días o más. La detección se evalúa en un sujeto o en células de un sujeto, preferiblemente tal como se lleva a cabo en los ejemplos.

En el contexto de la invención, la respuesta inmunitaria provocada específica de antígeno preferiblemente significa una respuesta inmunitaria detectable contra dicho
 30 antígeno. Un aumento detectable es preferiblemente un aumento de al menos el 5% de la cantidad de un anticuerpo y/o de una citocina tal como ya se identificó en el presente documento, o el 10%, el 15%, el 20%, el 25%, el 30%, el 35%, el 40%, el 45%, el 50%, el 55%, el 60%, el 65%, el 70%, el 75%, el 80%, el 85%, el 90%, el 95%, el 100%, el 150%, el 200% o más tras al menos una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho,
 35 nueve, diez, once, doce horas o más o tras al menos un día de administración de dicho adyuvante y antígeno, o al menos dos días, o al menos tres días, o al menos cuatro días o más. La detección se evalúa en un sujeto o en células de un sujeto, preferiblemente tal como se lleva a cabo en los ejemplos.

Preferiblemente, se dice que dicha secuencia de aminoácidos y/o secuencia de
 40 nucleótidos que tiene al menos el 50%, el 60%, el 70%, el 80%, el 81%, el 82%, el 83%, el 84%, el 85%, el 86%, el 87%, el 88%, el 89%, el 90%, el 91%, el 92%, el 93%, el 94%, el 95%, el 96%, el 97%, el 98%, el 99% o el 100% de identidad o similitud con una secuencia de nucleótidos y/o aminoácidos identificada específica tal como se definió anteriormente en el presente documento (SEQ ID NO:1 respectivamente SEQ
 45 ID NO:2) son funcionales cuando el polipéptido codificado se califica como adyuvante. Dicho polipéptido, representado por dicha secuencia de aminoácidos, puede provocar, inducir, potenciar o aumentar una respuesta inmunitaria contra un antígeno cuando se

usa con dicho antígeno en al menos cierto grado. En “al menos cierto grado” significa preferiblemente que al menos el 50%, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 80%, al menos el 90% o el 100% de la respuesta inmunitaria específica de antígeno se detecta usando SEQ ID NO:1. Provocar, inducir, potenciar o aumentar una respuesta inmunitaria contra un antígeno se ha definido anteriormente en el presente documento.

Una molécula de ácido nucleico tal como se define en el presente documento es preferiblemente una molécula que comprende al menos 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42 o más nucleótidos contiguos de SEQ ID NO:2, y cuyo polipéptido codificado puede provocar, inducir, potenciar o aumentar una respuesta inmunitaria contra un antígeno cuando se usa con un antígeno tal como se define anteriormente en el presente documento. En una realización preferida, dicha molécula de ácido nucleico tal como se define en el presente documento es preferiblemente una molécula que comprende al menos 762, 765, 770, 780, 790, 800, 810, 820, 830, 840 850, 860, 870, 880, 890, 900, 910, 920, 930, 940, 950, 960, 970, 980, 990, 1000 o 1110 nucleótidos contiguos de SEQ ID NO: 2. En una realización preferida, dicha molécula de ácido nucleico tal como se define en el presente documento es preferiblemente una molécula que comprende como máximo 1110, 1000, 990, 980, 970, 960, 950, 940, 930, 920, 910, 900, 890, 880, 870, 860, 850, 840, 830, 820, 810, 800, 790, 780, 770 o 765 nucleótidos contiguos de SEQ ID NO: 2.

Un polipéptido tal como se define en el presente documento es preferiblemente un polipéptido que comprende al menos 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42 o más aminoácidos contiguos de SEQ ID NO:1 y que puede provocar, inducir, potenciar o aumentar una respuesta inmunitaria contra un antígeno cuando se usa con un antígeno tal como se define anteriormente en el presente documento. En una realización preferida, dicha molécula de ácido nucleico tal como se define en el presente documento es preferiblemente una molécula que comprende al menos 254, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360 ó 370 aminoácidos contiguos de SEQ ID NO: 1. En una realización preferida, dicha molécula de ácido nucleico tal como se define en el presente documento es preferiblemente una molécula que comprende como máximo 370, 360, 350, 340, 330, 320, 310, 300, 290, 280, 270, 260 ó 254 aminoácidos contiguos de SEQ ID NO: 1. El polipéptido que consiste en SEQ ID NO:1 también se denomina AAP (proteína aumentadora y activadora).

Una secuencia de nucleótidos o aminoácidos, abarcada por la presente invención, puede derivarse de una de las secuencias identificadas en el presente documento sustituyendo, insertando, delecionando o añadiendo uno, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más nucleótidos o aminoácidos, respectivamente. Una secuencia de aminoácidos, abarcada por la presente invención, puede derivarse de una de las secuencias identificadas en el presente documento añadiendo restos químicos o aminoácidos N- o C-terminales adicionales para aumentar la estabilidad, solubilidad e inmunogenicidad. En una realización, una secuencia de aminoácidos abarcada por la presente invención se deriva de SEQ ID NO:1 mediante sustitución conservativa de al menos un aminoácido presente en SEQ ID NO:1. Dicho aminoácido que puede reemplazarse puede ser una histidina. El experto sabe que la histidina puede sustituirse por asparagina o glutamina (es decir sustitución conservativa tal como se define más adelante en el presente documento). Por tanto en una realización, una secuencia de aminoácidos abarcada por la invención se deriva de SEQ ID NO:1 y comprende 1, 2, 3, 4, 5 ó 6 histidinas como máximo. Por consiguiente, en una realización, una secuencia de ácido nucleico

abarcada por la invención se deriva de SEQ ID NO:2 y codifica para una secuencia de aminoácidos que comprende 1, 2, 3, 4, 5 ó 6 histidinas como máximo. En una realización, dicha secuencia de aminoácidos no comprende ninguna histidina y/o dicha secuencia de ácido nucleico correspondiente codifica para una secuencia de aminoácidos que no comprende una histidina.

Por consiguiente, en una realización, una molécula de ácido nucleico se representa por una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en:

i. secuencias de nucleótidos que codifican para un polipéptido o un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 50% de identidad o similitud de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1,

ii. secuencias de nucleótidos que comprenden una secuencia de nucleótidos que tiene al menos el 50% de identidad o similitud de secuencia con la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO:2 ,

iii. secuencias de nucleótidos cuya hebra complementaria se hibrida con una molécula de ácido nucleico de secuencia de (i) o (ii) y

iv. secuencias de nucleótidos que difieren de la secuencia de una molécula de ácido nucleico en (iii) debido a la degeneración del código genético

y en la que dicha molécula de ácido nucleico codifica para una secuencia de aminoácidos que comprende 1, 2, 3, 4, 5 ó 6 histidinas como máximo. Preferiblemente dicha molécula de ácido nucleico codifica para una secuencia de aminoácidos que no comprende una histidina. Preferiblemente en dicha molécula de ácido nucleico, al menos un codón que codifica para histidina o al menos 2, 3, 4, 5 ó 6 codones que codifican para histidinas se han sustituido por un codón que codifica para asparagina o glutamina.

En una realización preferida, una molécula de ácido nucleico de la invención que está representada por una secuencia de nucleótidos tal como se definió anteriormente en el presente documento comprende además una secuencia de nucleótidos que codifica para un antígeno. Se encontró que la respuesta inmunitaria provocada por un adyuvante de la invención era óptima cuando la secuencia de nucleótidos correspondiente que codifica para un antígeno estaba comprendida dentro de, o fusionada a, o operativamente unida a, una molécula de ácido nucleico que codifica para el adyuvante tal como se definió anteriormente en el presente documento. Por tanto, el adyuvante de la invención se usa preferiblemente de tal manera que su secuencia de nucleótidos codificante está fusionada a u operativamente unida con una secuencia de nucleótidos que codifica para un antígeno.

En una realización preferida, dicha molécula de ácido nucleico de la invención está libre de o no comprende una secuencia que codifica para un polipéptido que es idéntica o es al menos el 99%, el 98%, el 97%, el 96%, el 95%, el 94%, el 93%, el 92%, el 91%, el 90%, el 89%, el 88%, el 87%, el 86%, el 85%, el 84%, el 83%, el 82%, el 81%, el 80%, el 79%, el 78%, el 77%, el 76%, el 75% a SEQ ID NO: 3 a lo largo de toda su longitud.

Un antígeno se define en el presente documento como una molécula que puede reconocerse por un anticuerpo producido contra dicho antígeno cuando dicha molécula está presente en un sujeto. Un antígeno que puede inducir una respuesta inmunitaria

específica de un sujeto cuando dicho antígeno está presente en dicho sujeto se dice que es inmunogénico o que es un inmunógeno. Una respuesta inmunitaria es preferiblemente tal como se definió anteriormente en el presente documento. Un antígeno es preferiblemente un polipéptido o un péptido. Un péptido puede comprender
 5 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 aminoácidos o más. Un antígeno puede ser un fragmento de proteína o una proteína de longitud completa que se origina a partir de un organismo tal como se identifica más adelante en el presente documento. También es posible usar varios antígenos del mismo organismo con el fin de ser más eficaz al combatir al organismo.
 10 Un antígeno también puede definirse mediante la referencia a una molécula de ácido nucleico codificante representada por una secuencia de ácido nucleico.

La fuente de un antígeno puede ser una proteína, un digesto de la proteína y/o un fragmento de la misma, que puede estar en una forma purificada o puede estar comprendida dentro de una composición bruta, preferiblemente de origen biológico, tal
 15 como un lisado bacteriano, lisado parasitario, lisado de levaduras, lisado viral, lisado fúngico, sonificado o fijado. Alternativamente, un antígeno puede sintetizarse químicamente o producirse enzimáticamente *in vitro*. La fuente de una proteína, o fragmento de la misma como antígeno, también puede ser un ácido nucleico que codifica para dicho, o fragmento del mismo, a partir de un molde de ADN o ARN. Las
 20 moléculas de ARN o ADN puede ser ADN 'desnudo', preferiblemente comprendidas en vesículas o liposomas, o pueden estar comprendidas en un constructo o un vector de ácido nucleico. El vector puede ser cualquier vector de ADN o ARN (recombinante) conocido en la técnica, y preferiblemente es un plásmido; en el que los genes que codifican para antígenos de latencia están operativamente unidos a secuencias
 25 reguladoras que confieren expresión y traducción de los mensajeros codificados. El vector también puede ser también cualquier virus de ADN o ARN, tal como, pero sin limitarse a, adenovirus, virus adenoasociado (VAA), un retrovirus, un lentivirus, virus Vaccinia Ankara modificado (MVA) o virus de la viruela aviar, o cualquier otro vector viral que pueda conferir expresión de un polipéptido en un sujeto escogido. Los
 30 vectores de ADN pueden ser de no integración, tales como vectores de replicación episomal, o pueden ser vectores que se integran en el genoma del huésped mediante integración aleatoria o mediante recombinación homóloga.

Las moléculas de ADN que comprenden genes que codifican para una proteína de antígeno, o fragmentos de la misma según la presente invención, opcionalmente
 35 incrustadas en un vector tal como un virus o plásmido, pueden integrarse en un genoma de un sujeto. En una realización preferida de la invención, un huésped de este tipo puede ser un microorganismo. Preferiblemente un microorganismo recombinante de este tipo es un *Mycobacterium*, por ejemplo de las especies *M. tuberculosis*, *M. smegmatis* o *M. bovis* y lo más preferiblemente *M. bovis* bacilo Calmette Guérin (BCG)
 40 o *M. smegmatis*, que pueden suministrar a un huésped los polipéptidos o fragmentos de los mismos según la invención (tal como se describe en Yue. Y. *et al.*, (2007), J. Virol. Meth., 141: 41-48, Cayabiyab Y. *et al.*, (2006), J. Virol., 80: 1645-1652). Se conocen en la técnica BCG recombinante y métodos para la recombinación; por ejemplo, en el documento WO2004094469. Un microorganismo recombinante de este
 45 tipo puede formularse como una vacuna atenuada viva y/o recombinante viva, tal como se muestra en Jacobs *et al.* 1987, Nature, 327(6122):532-5. El vector también puede estar comprendido en un huésped de origen bacteriano, tal como, pero sin limitarse a, bacterias *Salmonella* o *Shigella* recombinantes y/o vivas-atenuadas.

En el contexto de la invención, un sujeto significa un ser humano o un animal. Un

animal que se abarca dentro del alcance de la invención incluye un mamífero, preferiblemente un perro.

- Un antígeno puede originarse a partir de cualquier organismo conocido que esté asociado con una enfermedad o un estado en un sujeto. Un antígeno puede originarse a partir de un microorganismo tal como una bacteria, una levadura, un hongo, un parásito. Alternativamente, un antígeno puede originarse a partir de un virus. Un antígeno también puede ser un autoantígeno tal como, por ejemplo, los asociados o vinculados con cáncer o un antígeno tumoral. Los antígenos también pueden estar asociados con o vinculados a enfermedades alérgicas.
- Una enfermedad puede ser una enfermedad parasitaria. En este caso, un antígeno puede originarse a partir de un protozoo que pertenece al phylum kinetoplastidae y/o apicomplexa (tal como *Plasmodium*), y en particular miembros de la familia tripanosomatidae, más en particular diferentes especies del protozoo tripanosomático *Leishmania*. Existen más de 20 especies conocidas de *Leishmania*, que incluyen especies del subgénero *Leishmania*, que comprende el complejo *L. major*, que incluye *L. major*, el complejo *L. Donovan*, que incluye *L. chagasi*, *L. donovani* y *L. infantum*, el complejo *L. Mexicana*, que incluye *L. amazonensis* y *L. mexicana*, así como la subespecie *Viannia*, que comprende el complejo *L. braziliensis*, que incluye *L. braziliensis* y *L. peruviana* y el complejo *L. guyanensis*, que incluye *L. guyanensis* y *L. panamensis*. En una realización preferida, un antígeno se origina a partir de una especie de *Leishmania*, preferiblemente *Leishmania major* y/o *Leishmania infantum*. En otra realización preferida, un antígeno se origina a partir de una especie de *Plasmodium*. Las especies de *Plasmodium* de particular interés son *Plasmodium falciparum* y *Plasmodium vivax*.
- Por ejemplo, si un antígeno se origina a partir de un parásito, preferiblemente a partir de una especie de *Leishmania* que provoca leishmaniasis, dicho compuesto podría seleccionarse de un grupo que consiste en una fuente de otras proteínas de un parásito que provocan una enfermedad parasitaria tal como se describe en la publicación de Iborra, S. et al. (Iborra, S., et al., 2004. Vaccine 22:3865-76). Una fuente de proteína preferida de antígenos es en este contexto una histona tal como una H2A, H2B, H3, H4 o una proteína ribosómica tal como LiP0, L2, L7, L8, L16, S6, L3, L5 y S4. Una proteína H2A preferida se representa por SEQ ID NO:3. Un ácido nucleico preferido que codifica para una H2A se representa por SEQ ID NO:4. Una proteína H2B preferida se representa por SEQ ID NO:5. Un ácido nucleico preferido que codifica para una H2B se representa por SEQ ID NO:6. Una proteína H3 preferida se representa por SEQ ID NO:7. Un ácido nucleico preferido que codifica para una H3 se representa por SEQ ID NO:8. Una proteína H4 se representa por SEQ ID NO:9. Un ácido nucleico preferido que codifica para una H4 se representa por SEQ ID NO:10. Una proteína LiP0 preferida se representa por SEQ ID NO:11. Un ácido nucleico preferido que codifica para una LiP0 se representa por SEQ ID NO:12. Una proteína L2 preferida se representa por SEQ ID NO:13. Un ácido nucleico preferido que codifica para L2 se representa por SEQ ID NO:14. Una proteína L7 preferida se representa por SEQ ID NO:15. Un ácido nucleico preferido que codifica para una L7 se representa por SEQ ID NO:16. Una proteína L8 preferida se representa por SEQ ID NO:17. Un ácido nucleico preferido que codifica para una L8 se representa por SEQ ID NO:18. Una proteína L16 preferida se representa por SEQ ID NO:19. Un ácido nucleico preferido que codifica para una L16 se representa por SEQ ID NO:20. Una proteína S4 preferida se representa por SEQ ID NO:21. Un ácido nucleico preferido que codifica para una S4 se representa por SEQ ID NO:22. Una proteína S6 se representa por SEQ ID NO:23 .

Un ácido nucleico preferido que codifica para una S6 se representa por SEQ ID NO:24. Una proteína L3 preferida se representa por SEQ ID NO:25. Un ácido nucleico preferido que codifica para una L3 se representa por SEQ ID NO:26. Una proteína L5 preferida se representa por SEQ ID NO:27. Un ácido nucleico preferido que codifica para una L5 se representa por SEQ ID NO:28.

Otro ejemplo es el uso de poli-proteínas que contienen varios antígenos de parásitos como se observó en Stober *et al.* y Aebischer, *et al.* y Poot *et al.* (Stober C.B.U.G., *et al.* (2006), Vaccine., 24: 2602-2616; Aebischer T., *et al.*, (2000) Infection and Immunity., 68: 1328-1336; y Poot J *et al.*, (2009), Vaccine, 27: 4439-4446).

En párrafos próximos, una proteína histona también puede usarse como fuente de proteína de antígenos. Los compuestos preferidos incluyen una proteína histona o fragmento de la misma, o una molécula de ácido nucleico que codifica para dicha histona o dicho fragmento de histona. Más preferiblemente, una proteína histona es H2A, H2B, H3 y/o H4 tal como se identifica en el documento EP 1 687 023. Las histonas H2A, H2B, H3 y H4 son proteínas nucleares bien conservadas y sus secuencias se conocen bien en la técnica (Requena, J. M., *et al.* 2000; Parasitol Today 16:246-50). Preferiblemente, las histonas se obtienen a partir de un organismo que está próximo al organismo que causa la enfermedad en el árbol evolutivo. Por tanto, de particular interés como fuente de histonas que van a usarse en el tratamiento de enfermedades parasitarias tales como Leishmaniasis son los protozoos, como por ejemplo *Plasmodium*. Adicionalmente, de interés son los miembros de la familia tripanosomatidae, más en particular diferentes especies del protozoo tripanosomático *Leishmania*.

Otros compuestos preferidos incluyen otra proteína ribosómica o fragmento de la misma o una molécula de ácido nucleico que codifica para dicha proteína o fragmento de la misma. Ejemplos de otras proteínas ribosómicas incluyen L19 y S4.

Otros compuestos preferidos incluyen un extracto de proteínas ribosómicas tal como se identifica en el documento WO 2009/090175.

Una enfermedad puede incluir, pero sin limitarse a, alergia o un cáncer. Cualquier tipo de antígeno que se sabe que está asociado o es específico con un cáncer puede usarse en el contexto de la invención. Tal tipo de antígeno también puede denominarse antígeno tumoral. Un antígeno tumoral puede ser un producto de proteína de un oncogén mutado o un gen supresor de tumores mutado, o un producto de proteína de cualquier gen o gen mutado que se sabe que se expresa en un tumor o en un cáncer. Un antígeno tumoral puede ser un producto de proteína de un gen sobreexpresado o expresado de manera aberrante. Un antígeno tumoral puede ser un producto de proteína de un virus oncogénico. Un antígeno tumoral puede ser un producto de proteína de un gen oncofetal. Los ejemplos de antígeno tumoral incluyen producto de proteína de los siguientes genes: alfafetoproteína (AFP), antígeno carcinoembrionario (CEA), antígeno tumoral epitelial (ETA), antígeno asociado a melanoma (MAGE), p53 o CD20. Un antígeno tumoral tal como se define en el presente documento también puede ser parte de un producto de proteína, es decir un polipéptido, un péptido derivado de un producto de proteína de un gen tal como se identifica en el presente documento.

Un antígeno de cáncer preferido incluye CD20 o un fragmento del mismo. CD20 se expresa en algunos tumores malignos de células B. Una secuencia de aminoácidos

preferida que representa CD20 se identifica como SEQ ID NO:37. Un antígeno preferido en este contexto comprende 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 aminoácidos contiguos o más de SEQ ID NO:37 y/o tiene al menos el 50, el 55, el 60, el 65, el 70, el 75, el 80, el 85, el 90, el 95 ó el 99% de identidad o similitud con SEQ ID NO:37.

Un cáncer puede ser un adenocarcinoma gástrico y/o tumor de mama. Un antígeno de cáncer preferido incluye una proteína S100A2 o un fragmento de la misma. La proteína S100A2 es una proteína de unión a calcio que se regula por incremento en asociación con la evolución del adenocarcinoma gástrico humano (1) y del tumor de mama (2).
 Una secuencia de aminoácidos preferida que representa S100A2 se identifica como SEQ ID NO: 42. Una secuencia de ácido nucleico preferida que codifica para una S100A2 preferida se identifica como SEQ ID NO: 43. Un antígeno preferido en este contexto comprende 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 aminoácidos contiguos o más de SEQ ID NO:42 y/o tiene al menos el 50, el 55, el 60, el 65, el 70, el 75, el 80, el 85, el 90, el 95 o el 99% de identidad o similitud con SEQ ID NO:42.

Una enfermedad puede ser una alergia. Un antígeno también puede estar asociado con o vinculado a una enfermedad alérgica. Los ejemplos de antígenos alérgicos preferidos incluyen un alérgeno de una especie de *Cupressus*, preferiblemente *Cupressus arizonica* (Cupa4 o Cupa1). Una secuencia de ácido nucleico preferida que representa la codificación para un Cupa4 preferido se identifica como SEQ ID NO:38. Una secuencia de ácido nucleico preferida que representa la codificación para un Cupa1 preferido se identifica como SEQ ID NO:39. Una secuencia de aminoácidos preferida que representa un Cupa4 preferido se identifica como SEQ ID NO:40. Una secuencia de aminoácidos preferida que representa un Cupa1 preferido se identifica como SEQ ID NO:41. Un antígeno preferido en este contexto comprende 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 aminoácidos contiguos o más de una secuencia de aminoácidos codificada por SEQ ID NO:38 ó 39 y/o tiene al menos el 50, el 55, el 60, el 65, el 70, el 75, el 80, el 85, el 90, el 95 o el 99% de identidad o similitud con una secuencia de aminoácidos codificada por SEQ ID NO:38 ó 39.

Otro antígeno preferido en este contexto comprende 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 aminoácidos contiguos o más de una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO:40 ó 41 y/o tiene al menos el 50, el 55, el 60, el 65, el 70, el 75, el 80, el 85, el 90, el 95 o el 99% de identidad o similitud con una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO:40 ó 41.

Sin embargo, el experto entenderá que la invención no se limita a este antígeno específico.

Cada uno de los antígenos identificados en el presente documento (es decir proteínas, partes de las mismas, polipéptido o péptido) se usa preferiblemente con o fusionado a un polipéptido que es un adyuvante tal como se definió anteriormente en el presente documento. Significa que en una realización preferida, una molécula de ácido nucleico que codifica para un antígeno está operativamente unida con una molécula de ácido nucleico de la invención tal como se definió anteriormente en el presente documento cuyo polipéptido codificado funciona como adyuvante. En una realización más preferida, dicha molécula de ácido nucleico que codifica para un antígeno que está

operativamente unida con una molécula de ácido nucleico de la invención tal como se definió anteriormente en el presente documento que codifica para un polipéptido que funciona como adyuvante es una molécula de ácido nucleico individual, que codifica para un polipéptido individual. Dicho polipéptido puede denominarse polipéptido quimérico. Este polipéptido quimérico comprende o consiste en un antígeno fusionado a un adyuvante de la invención. Este polipéptido quimérico puede comprender uno o más aminoácidos adicionales en el extremo 5' y/o en el extremo 3' y/o entre el antígeno y el adyuvante.

La invención proporciona por tanto una molécula de ácido nucleico tal como se definió anteriormente en el presente documento que codifica para un polipéptido que puede comportarse como un adyuvante para un antígeno dado, cuando esta secuencia de ácido nucleico está operativamente unida a una secuencia de nucleótidos que codifica para dicho antígeno. En una realización preferida, esta molécula de ácido nucleico codifica para un polipéptido que puede inducir una respuesta inmunitaria específica de antígeno en un sujeto. Por tanto, la invención abarca dos tipos de moléculas de ácido nucleico:

- uno que comprende o que consiste en una molécula de ácido nucleico que codifica para un adyuvante,
- uno que comprende o que consiste en una molécula de ácido nucleico que codifica para un adyuvante fusionado a una molécula de ácido nucleico que codifica para un antígeno.

Dependiendo del tipo de fuente usada (a base de proteína o a base de ácido nucleico), el experto sabrá que tipo de formulación es adecuada. Un antígeno puede administrarse como tal (ácido nucleico o proteína desnuda). Alternativamente, una fuente a base de ácido nucleico puede administrarse usando un constructo de ácido nucleico tal como se define en el presente documento. Preferiblemente, se escoge una formulación a base de proteína. Más preferiblemente, se usa un polipéptido quimérico tal como se identificó anteriormente en el presente documento.

En otra realización, un antígeno puede originarse a partir de un virus. Cualquier virus que provoque una enfermedad en seres humanos de la que se conozcan antígenos está abarcada dentro del alcance de la presente invención.

En otra realización, un antígeno puede originarse a partir de una levadura, un hongo, un alérgeno o una célula cancerosa o cualquier otra célula patológica. Cualquier levadura u hongo que provoque una enfermedad en seres humanos de la que se conozcan antígenos está abarcada dentro del alcance de la presente invención.

Por consiguiente, una molécula de ácido nucleico de la invención codifica para un polipéptido, preferiblemente un polipéptido quimérico tal como se identifica en el presente documento que puede inducir una respuesta inmunitaria específica de antígeno cuando dicha molécula de ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos que codifica para un antígeno.

Polipéptido

En un aspecto adicional, se proporciona un polipéptido codificado por una molécula de ácido nucleico tal como se identificó anteriormente en el presente documento. Este polipéptido comprende un adyuvante y preferiblemente un antígeno tal como se define

en la sección previa.

“Polipéptido” tal como se usa en el presente documento se refiere a cualquier péptido, oligopéptido, polipéptido, producto génico, producto de expresión o proteína. Un polipéptido está compuesto por aminoácidos consecutivos. El término “polipéptido”
5 abarca moléculas sintéticas o que se producen de manera natural.

Construido de ácido nucleico

En un aspecto adicional, se proporciona un constructo de ácido nucleico que comprende una molécula de ácido nucleico tal como se identifica la sección previa. Este constructo de ácido nucleico puede comprender una molécula de ácido nucleico
10 que codifica para un polipéptido definido como adyuvante en la sección previa. Este constructo de ácido nucleico puede comprender una molécula de ácido nucleico que codifica para un polipéptido definido como adyuvante y una molécula de ácido nucleico que codifica para un antígeno tal como se define en la sección previa.

La invención también se refiere a un vector de expresión que comprende un constructo de ácido nucleico de la invención. Preferiblemente, un vector de expresión comprende una secuencia de nucleótidos de la invención, que está operativamente unida a una o más secuencias control, que dirigen la producción o expresión del polipéptido
15 codificado en una célula, un sujeto o un sistema de expresión sin células. Un vector de expresión puede observarse como un vector de expresión recombinante.

Por consiguiente, una molécula de ácido nucleico tal como se define en el presente documento que codifica para un polipéptido que comprende o que consiste en o está compuesta por un adyuvante, es preferiblemente para su uso como medicamento, más preferiblemente como adyuvante. Por consiguiente, dicho polipéptido es preferiblemente para su uso como un medicamento, más preferiblemente como
20 adyuvante.
25

Por consiguiente, una molécula de ácido nucleico tal como se define en el presente documento que codifica para un polipéptido que comprende o que consiste en o está compuesta por un adyuvante y un antígeno es preferiblemente para su uso como medicamento, más preferiblemente como vacuna contra dicho antígeno. Por consiguiente, dicho polipéptido es preferiblemente para su uso como medicamento, más preferiblemente como vacuna contra dicho antígeno.
30

Una vacuna de la invención puede funcionar como vacuna terapéutica. Normalmente, existe un periodo de tiempo entre el contacto con un antígeno, es decir, la infección y la aparición del primer síntoma de una enfermedad asociada con dicho antígeno. En este caso, una vacuna actuaría como producto inmunitario farmacológico que prevendría y/o trataría la enfermedad y/o retrasaría su evolución provocando en el huésped una respuesta inmunitaria que contrarresta el efecto patológico de la enfermedad. Una vacuna terapéutica difiere de una vacuna profiláctica en que una vacuna terapéutica inducirá protección en un sujeto que ya tiene la infección o la enfermedad. En otra
35 realización, una vacuna es una vacuna profiláctica. Una vacuna profiláctica puede administrarse a un sujeto antes de que dicho sujeto se haya puesto en contacto con dicho antígeno.
40

Un medicamento tal como se define en el presente documento se administra preferiblemente por vía parenteral, por ejemplo mediante inyección o infusión por vía
45 intravenosa, subcutánea, intraperitoneal, intramuscular, intraarterial o intralesional. Un

modo de administración preferido es subcutáneo. Un medicamento puede combinarse con un medio o vehículo de administración farmacéuticamente aceptable mediante técnicas convencionales conocidas en la técnica. Por ejemplo, un medicamento puede disolverse en solución salina tamponada con fosfato (PBS). Se conocen bien en la técnica métodos para preparar composiciones administrables por vía parenteral y se describen en más detalle en diversas fuentes, incluyendo, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, Ed. AR Gennaro, 20ª edición, 2000, Williams & Wilkins, PA, EE. UU. Un medicamento se administra preferiblemente en una dosis terapéuticamente eficaz, es decir, una que aumentará la capacidad del sistema inmunitario animal o humano para combatir una enfermedad o estado tal como se define en el presente documento. Preferiblemente, una dosis terapéuticamente eficaz de un medicamento de la invención prevendrá y/o retrasará el desarrollo de dicha enfermedad o estado. Dependiendo de la enfermedad o el estado, el experto sabrá qué parámetro o síntoma asociado con el desarrollo de dicha enfermedad escoger con el fin de seguir el desarrollo de la enfermedad o estado.

La invención abarca adicionalmente el uso de otro adyuvante conocido distinto además de una molécula de ácido nucleico o un polipéptido de la invención. Cualquier adyuvante conocido puede usarse en la presente invención. El experto conoce varios adyuvantes adecuados. Los adyuvantes se seleccionan lo más preferiblemente de la siguiente lista de adyuvantes: péptidos catiónicos (antimicrobianos), saponina y ligandos del receptor de tipo Toll (TLR) tales como, pero sin limitarse a, poli(I:C), motivos CpG, LPS, lípido A, lipopéptido Pam3Cys y flagelinas bacterianas o partes de las mismas, y sus derivados que tienen modificaciones químicas. Otros adyuvantes preferidos para su uso en el método y en las composiciones según la invención son: mezclas con BCG muerto o vivo, complejos de inmunoglobulina con dichos antígenos de latencia o partes de los mismos, IC31 (de www.intercell.com; en el documento WO03047602), QS21/MPL (documento US2003095974), DDA/MPL (documento WO2005004911), DA/TDB (documento WO2005004911; Holten-Andersen *et al.*, 2004 Infect Immun. 2004 Mar;72(3):1608-17.) y LAG3 soluble (CD223) (de www.immunotep.com; documento US2002192195). Además, otro adyuvante preferido incluye el uso de *Corynebacterium parvum* o *Propionobacterium acnes* (Aebischer T., *et al.*, (2000) Infección and Immunity., 68: 1328-1336, Poot J *et al.*, (2009), Vaccine, 27: 4439-4446 y Ferreira J.H. *et al.*, (2008), Vaccine, 26: 67-685) .

Adyuvantes particularmente preferidos son los que se sabe que actúan mediante los receptores de tipo Toll. Los adyuvantes que pueden activar el sistema inmunitario innato, pueden activarse particularmente bien mediante los receptores de tipo Toll (TLR), que incluye los TLR 1 - 10 y/o mediante una proteína RIG-1 (gen-1 inducible por ácido retinoico) y/o mediante un receptor de endotelina. Los compuestos que pueden activar receptores TLR, y modificaciones y derivados de los mismos, están bien documentados en la técnica. TLR1 puede activarse mediante lipoproteínas bacterianas y formas acetiladas de las mismas; TLR2 puede, además, activarse mediante glicolípidos de bacterias Gram positivas, LPS, LPA, LTA, fimbrias, proteínas de la membrana externa, proteínas de choque térmico de bacterias o del huésped y *Mycobacterial lipoarabinomannans*. TLR3 puede activarse mediante ARNbc, en particular de origen viral, o mediante el compuesto químico poli(I:C). TLR4 puede activarse mediante LPS Gram negativo, LTA, proteínas de choque térmico del huésped o de origen bacteriano, proteínas de la envuelta o cubierta viral, taxol o derivados del mismo, oligosacáridos que contiene hialuronano y fibronectinas. TLR5 puede activarse con flagelina o flagelos bacterianos. TLR6 puede activarse mediante lipoproteínas micobacterianas y factor soluble termolábil de *Streptococcus* grupo B (GBS-F) o

Staphylococcus modulins. TLR7 puede activarse mediante imidazoquinolinas y derivados. TLR9 puede activarse mediante ADN CpG no metilado o complejos de cromatina - IgG. En particular TLR3, TLR4, TLR7 y TLR9 desempeñan un papel importante en la mediación de una respuesta inmunitaria innata contra infecciones virales, y compuestos que pueden activar estos receptores se prefieren particularmente para su uso en la invención. Adyuvantes particularmente preferidos comprenden, pero no se limitan a, compuestos producidos de manera sintética que comprenden ARNbc, poli(I:C), ADN CpG no metilado que activan receptores TLR3 y TLR9, IC31, un agonista de TLR9, IMSAVAC, un agonista de TLR4. En otra realización preferida, un adyuvante se une físicamente a una molécula de ácido nucleico tal como se definió anteriormente en el presente documento. La unión física de adyuvantes y compuestos coestimuladores o grupos funcionales a péptidos que comprenden epítipo HLA clase I y HLA clase II, proporciona una respuesta inmunitaria potenciada mediante estimulación simultánea de células presentadoras de antígenos, en particular células dendríticas, cuyo papel es internalizar, metabolizar y presentar antígenos. Otro compuesto de modificación inmunitaria preferido es un inhibidor de la adhesión de células T, más preferiblemente un inhibidor de un receptor de endotelina tal como BQ-788 (Buckanovich R.J., *et al.*, (1994), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91:4892.). BQ-788 es N-cis-2,6-dimetilpiperidinocarbonil-L-gamma-metilleucil-D-1-metoxycarboniltryptofanil-D-norleucina. Sin embargo, cualquier derivado de BQ-788 o compuesto BQ-788 modificado también se abarca dentro del alcance de esta invención.

Otros adyuvantes incluyen MPL-SE (Glaxo Smithkline Biologicals, Bélgica) o EM005 (IDRI, EE. UU.).

En una realización preferida, un adyuvante es un adyuvante que promueve Th₁ (como un adyuvante que comprende un motivo de ODN CpG). Un adyuvante que promueve Th1 se ha definido en la bibliografía (Liu N., *et al.* (2003), Nature Immunology, 687-693) como un adyuvante que puede promover, o desencadenar, o inducir, o inducir un aumento de, una respuesta inmunitaria Th₁ contra un antígeno dado cuando se usa junto con este antígeno tal como se detecta en sobrenadantes de esplenocitos de un sujeto tratado cuando se cultiva con el antígeno. Como control, la promoción, o desencadenamiento, de una respuesta inmunitaria Th1 se evalúa en una población de esplenocitos del mismo sujeto que no se ha tratado con el antígeno y el adyuvante, o con la misma población sólo tratada con el antígeno. Desencadenamiento o promoción de una respuesta inmunitaria Th₁ se define preferiblemente por la inducción de IFN γ tal como se detecta mediante el cultivo de esplenocitos de un sujeto tratado con el antígeno y/o induciendo la producción de inmunoglobulinas IgG2a específicas de antígeno. La evaluación de la inducción de esta citocina y de IgG2a ya se ha definido en el presente documento. En una realización preferida, un adyuvante que promueve Th-1 es, o comprende, o consiste en, un oligodesoxinucleótido. Más preferiblemente, un oligodeoxinucleótido (ODN) comprende, o consiste en, CpG en el que la C no está metilada (ODN de CpG): 3'purina-CpG-5'pirimidina. Un oligodeoxinucleótido preferido es, o comprende, o consiste en, una secuencia de ODN modificada con fosforotioato. El uso de oligodeoxinucleótidos que tienen tal modificación es ventajoso puesto que los oligodeoxinucleótidos así usados son más estables que los oligonucleótidos no modificados y por tanto no se degradarán fácilmente una vez que estén en el torrente sanguíneo. Un adyuvante que promueve Th-1 preferido consiste en, o comprende, al menos un motivo CpG, al menos dos, o al menos tres. Secuencias preferidas del ODN inmunoestimulador (5' a 3') eran TCAACGTTGA (SEQ ID NO:29) y GCTAGCGTTAGCGT (SEQ ID NO:30). El experto no se limita a las secuencias descritas explícitamente en el presente documento. Puede diseñar otras secuencias

que porten la propiedad de promoción de Th-1 tal como se definió anteriormente en el presente documento.

En una realización preferida, una medicina (o preparación médica o composición farmacéutica o medicamento) tal como se define en el presente documento se usa para aumentar la capacidad del sistema inmunitario de un sujeto para combatir una infección y/o una enfermedad, más preferiblemente una infección parasitaria y/o una enfermedad parasitaria. En particular, puede usarse para su administración a un sujeto humano o animal. Una medicina tal como se define en el presente documento se administra preferiblemente por vía parenteral, por ejemplo mediante inyección o infusión por vía intravenosa, subcutánea, intraperitoneal, intramuscular, intraarterial, intranasal o intralesional. Un modo de administración preferido es subcutáneo. La invención no se limita a un modo específico de administración de un medicamento o una molécula de ácido nucleico o un constructo de ácido nucleico o un péptido o un polipéptido tal como se define en el presente documento. Un modo de administración preferido es administración oral usando una cápsula o un comprimido. Alternativamente, un medicamento o una molécula de ácido nucleico o un constructo de ácido nucleico o un péptido o un polipéptido tal como se define en el presente documento puede administrarse localmente mediante un catéter o una bomba, o un supositorio. Alternativamente, un medicamento o una molécula de ácido nucleico o un constructo de ácido nucleico o un péptido o un polipéptido tal como se define en el presente documento puede administrarse por vía tópica. La formulación de un medicamento o una molécula de ácido nucleico o un constructo de ácido nucleico o un péptido o un polipéptido tal como se define en el presente documento o de una composición que comprende dichos compuestos depende del modo de administración y aplicación (terapéutica) pretendido. Un portador farmacéutico puede ser cualquier sustancia compatible, no tóxica adecuada para suministrar dicho compuesto a un sujeto. Por ejemplo agua estéril, o sólidos o excipientes inertes pueden usarse como portador, habitualmente complementado con adyuvantes farmacéuticamente aceptables, agentes de tamponamiento, agentes de dispersión y similares. Las composiciones o bien estarán en forma líquida, por ejemplo una suspensión estabilizada de dicho compuesto, o una composición que comprende dicho compuesto, o en formas secas y/o sólidas: por ejemplo polvo. Para administración oral y rectal, dicho compuesto puede administrarse en formas farmacéuticas sólidas, tales como cápsulas, comprimidos, supositorios y polvos, o en formas farmacéuticas líquidas, tales como elixires, jarabes, cremas, pomadas, enemas y suspensiones. Otras forma puede ser una forma semi-líquida o semi-sólida en la que dicho compuesto está presente como una forma líquida en, o sobre, un soporte sólido tal como un parche.

Una medicina puede combinarse con un medio o vehículo de administración farmacéuticamente aceptable mediante técnicas convencionales conocidas en la técnica. Por ejemplo, un medicamento o una molécula de ácido nucleico o un constructo de ácido nucleico o un péptido o un polipéptido tal como se define en el presente documento, y opcionalmente un segundo adyuvante, pueden disolverse en solución salina tamponada con fosfato (PBS). Los métodos para preparar composiciones administrables por vía parenteral se conocen bien en la técnica y se describen en más detalle en diversas fuentes, incluyendo, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, Ed. AR Gennaro, 20ª edición, 2000, Williams & Wilkins, PA, EE. UU. Una medicina se administra preferiblemente en una dosis terapéuticamente eficaz, es decir, una que aumentará la capacidad del sistema inmunitario animal o humano para combatir una infección y/o una enfermedad tal como se define en el presente documento. Preferiblemente, una dosis terapéuticamente eficaz de una

preparación médica de la invención puede provocar una respuesta inmunitaria tal como se define en el presente documento: una dosis es terapéuticamente eficaz cuando puede provocar o inducir la respuesta inmunitaria apropiada, o inducir un aumento de la respuesta inmunitaria apropiada contra un antígeno específico en un sujeto tratado

5 tal como se define en el presente documento. Incluso más preferiblemente, la respuesta inmunitaria provocada o inducida es una respuesta inmunitaria protectora. En una realización preferida, una medicina tal como se define en el presente documento es una vacuna. En una realización más preferida, al menos 5, 10, 15 ó 20 microgramos de una molécula de ácido nucleico o un constructo de ácido nucleico o un

10 péptido o un polipéptido tal como se define en el presente documento está usándose en una vacuna. Dicha vacuna puede administrarse al menos una vez, dos veces, tres veces, cuatro veces o más. Una vacuna, tal como se define en el presente documento, puede ser una vacuna terapéutica o profiláctica. El volumen en el que una molécula de ácido nucleico o un constructo de ácido nucleico o un péptido o un polipéptido tal como

15 se define en el presente documento puede disolverse puede oscilar entre 100-500 microlitros.

Composición

Adicionalmente, se proporciona una composición que comprende una molécula de ácido nucleico o un constructo de ácido nucleico o un péptido o un polipéptido y

20 opcionalmente un segundo adyuvante, preferiblemente un adyuvante que promueve Th₁. Cada característica de dicha composición ya se ha definido en el presente documento. En una realización preferida, esta composición consiste en una molécula de ácido nucleico o un constructo de ácido nucleico o un péptido o un polipéptido tal como se identifica en el presente documento, un adyuvante que promueve Th₁

25 preferido es un ODN CpG. Una composición preferida comprende o consiste en una molécula de ácido nucleico o un constructo de ácido nucleico o un péptido o un polipéptido y opcionalmente un segundo adyuvante, preferiblemente un adyuvante que promueve Th₁ disuelto en PBS o un tampón adecuado. Tal como ya se definió en el presente documento, un antígeno puede estar ya presente estando comprendido

30 dentro de dicho péptido o polipéptido o estando codificado por parte de dicha molécula de ácido nucleico o estando codificado por parte de la molécula de ácido nucleico presente en dicho constructo de ácido nucleico. En una realización preferida adicional, también se abarca por la presente invención que una molécula de ácido nucleico o un constructo de ácido nucleico o un péptido o un polipéptido y opcionalmente un segundo

35 adyuvante, preferiblemente un adyuvante que promueve Th₁ se administren secuencialmente. Por tanto, cada componente no necesita estar físicamente presente en una única composición siempre que ambas se administren a un sujeto.

Tal composición puede comprender además un adyuvante y/o portador farmacéuticamente aceptable.

40 Tal composición es preferiblemente para su uso como medicina o como medicamento. La medicina es preferiblemente una vacuna. Medicina, adyuvante y vacuna ya se han definido extensamente en el presente documento.

Una composición puede estar en la forma líquida, sólida o semi-líquida o semi-sólida tal como ya se definió en el presente documento.

45 En una realización preferida, se usan otros compuestos secuencial o simultáneamente con una molécula de ácido nucleico o un constructo de ácido nucleico o un péptido o

un polipéptido con el fin de mejorar la especificidad del tratamiento profiláctico o terapéutico. Es ventajoso por ejemplo usar otros compuestos que potenciarán adicionalmente la respuesta inmunitaria del sujeto tratado. Más preferiblemente, tales compuestos no están presentes en una única composición junto con una molécula de ácido nucleico o un constructo de ácido nucleico o un péptido o un polipéptido.

Uso

Por consiguiente, se proporciona adicionalmente el uso de una molécula de ácido nucleico tal como se identifica en el presente documento que codifica para un adyuvante y una molécula de ácido nucleico que codifica para un antígeno, un péptido correspondiente, un polipéptido correspondiente, un constructo de ácido nucleico correspondiente y/o una composición correspondiente para la fabricación de un medicamento para tratar una enfermedad o un estado asociado con un antígeno tal como se identificó anteriormente en el presente documento.

Por consiguiente, se proporciona adicionalmente el uso de una molécula de ácido nucleico tal como se identifica en el presente documento que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica para un adyuvante operativamente unido a una molécula de ácido nucleico que codifica para un antígeno, un péptido correspondiente, un polipéptido correspondiente, un constructo de ácido nucleico correspondiente y/o una composición correspondiente para la fabricación de un medicamento que es una vacuna para tratar una enfermedad o un estado asociado con el antígeno.

Cada característica de este uso ya se ha definido en el presente documento.

Método de tratamiento

En un aspecto adicional, se proporciona un método de tratamiento de una enfermedad o un estado asociado con un antígeno, en el que dicho tratamiento comprende una molécula de ácido nucleico que codifica para un adyuvante y una molécula de ácido nucleico que codifica para un antígeno, un péptido correspondiente, un polipéptido correspondiente, un constructo de ácido nucleico correspondiente y/o una composición correspondiente.

Por consiguiente, se proporciona adicionalmente un método de tratamiento de una enfermedad o un estado asociado con un antígeno tal como se identifica en el presente documento, en el que dicho tratamiento comprende una vacuna, comprendiendo dicha vacuna una molécula de ácido nucleico tal como se identifica en el presente documento que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica para un adyuvante operativamente unido a una molécula de ácido nucleico que codifica para un antígeno, un péptido correspondiente, un polipéptido correspondiente, un constructo de ácido nucleico correspondiente y/o una composición correspondiente.

Cada característica de este método ya se ha definido en el presente documento.

Definiciones

Identidad de secuencia

“Identidad de secuencia” se define en el presente documento como una relación entre dos o más secuencias de aminoácidos (péptido, polipéptido o proteína) o dos o más secuencias de ácido nucleico (nucleótido, polinucleótido), tal como se determina

comparando las secuencias. En la técnica, "identidad" también significa el grado de relación de secuencia entre secuencias de ácido nucleico o aminoácidos, como puede ser el caso, tal como se determina por el apareamiento entre hebras de tales secuencias. La "similitud" entre dos secuencias de aminoácidos se determina comparando la secuencia de aminoácidos y sus sustitutos de aminoácidos conservados de un péptido o polipéptido con la secuencia de un segundo péptido o polipéptido. En una realización preferida, la identidad o similitud se calcula con respecto a la SEQ ID NO completa tal como se identifica en el presente documento. La "identidad" y "similitud" pueden calcularse fácilmente mediante métodos conocidos, que incluyen pero no se limitan a los descritos en Computational Molecular Biology, Lesk, A. M., ed., Oxford University Press, Nueva York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D. W., ed., Academic Press, Nueva York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Part I, Griffin, A. M., y Griffin, H. G., eds., Humana Press, Nueva Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heine, G., Academic Press, 1987; y Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. y Devereux, J., eds., M Stockton Press, Nueva York, 1991; y Carillo, H., y Lipman, D., SIAM J. Applied Math., 48:1073 (1988).

Se diseñan métodos preferidos para determinar la identidad para proporcionar el apareamiento más largo entre las secuencias sometidas a prueba. Los métodos para determinar la identidad y similitud están codificados en programas informáticos disponibles públicamente. Los métodos de programas informáticos preferidos para determinar la identidad y similitud entre dos secuencias incluyen por ejemplo el paquete de programas GCG (Devereux, J., *et al.*, Nucleic Acid Research 12 (1): 387 (1984)), BestFit, BLASTP, BLASTN y FASTA (Altschul, S. F. *et al.*, J. Mol. Biol. 215:403-410 (1990)). El programa BLAST X está públicamente disponible del NCBI y otras fuentes (BLAST Manual, Altschul, S., *et al.*, NCBI NLM NIH Bethesda, MD 20894; Altschul, S., *et al.*, J. Mol. Biol. 215:403-410 (1990)). También puede usarse el algoritmo de Smith Waterman bien conocido para determinar la identidad.

Los parámetros preferidos para la comparación de secuencias de polipéptidos incluyen los siguientes: Algoritmo: Needleman y Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443-453 (1970); matriz de comparación: BLOSSUM62 de Hentikoff y Hentikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915-10919 (1992); penalización por hueco: 12; y penalización por longitud de hueco: 4. Un programa útil con estos parámetros está disponible públicamente como el programa "Ogap" de Genetics Computer Group, ubicado en Madison, WI. Los parámetros mencionados anteriormente son los parámetros por defecto para comparaciones de aminoácidos (sin penalización para huecos finales).

Los parámetros preferidos para la comparación de ácido nucleico incluyen los siguientes: Algoritmo: Needleman y Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443-453 (1970); matriz de comparación: apareamientos=+10, apareamientos erróneos=0; penalización por hueco: 50; penalización por longitud de hueco: 3. Disponible como el programa Gap de Genetics Computer Group, ubicado en Madison, Wis. Se facilitan anteriormente los parámetros por defecto para comparaciones de ácido nucleico.

Opcionalmente, al determinar el grado de similitud de aminoácidos, el experto también puede tener en cuenta las denominadas sustituciones de aminoácidos "conservativas", como estará claro para el experto. Las sustituciones de aminoácidos conservativas se refieren a la capacidad de intercambio de residuos que tienen cadenas laterales similares. Por ejemplo, un grupo de aminoácidos que tiene cadenas laterales alifáticas es glicina, alanina, valina, leucina e isoleucina; un grupo de aminoácidos que tiene

5 cadenas laterales alifáticas-con hidroxilo es serina y treonina; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales que contienen amida es asparagina y glutamina; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales aromáticas es fenilalanina, tirosina y triptófano; un grupo de aminoácidos que tiene cadenas laterales básicas es lisina, arginina e histidina; y un grupo de aminoácidos que tiene cadenas laterales que contienen azufre es cisteína y metionina. Grupos de sustitución de aminoácidos conservativa preferidos son: valina-leucina-isoleucina, fenilalanina-tirosina, lisina-arginina, alanina-valina y asparagina-glutamina. Variantes de sustitución de la
 10 secuencia de aminoácidos dada a conocer en el presente documento son aquellas en las que al menos un residuo en las secuencias dadas a conocer se ha eliminado y un residuo diferente se ha insertado en su lugar. Preferiblemente, el cambio de aminoácidos es conservativo. Sustituciones conservativas preferidas para cada uno de los aminoácidos que se producen de manera natural son las siguientes: Ala a ser; Arg a lys; Asn a gln o his; Asp a glu; Cys a ser o ala; Gln a asn; Glu a asp; Gly a pro; His a
 15 asn o gln; Ile a leu o val; Leu a ile o val; Lys a arg; gln o glu; Met a leu o ile; Phe a met, leu o tyr; Ser a thr; Thr a ser; Trp a tyr; Tyr a trp o phe; y Val a ile o leu.

Condiciones de hibridación

Las condiciones de hibridación para una molécula de ácido nucleico pueden tener rigurosidad baja o media o alta (procedimientos de transferencia de tipo Southern).
 20 Condiciones de rigurosidad baja o media o alta significa prehibridación e hibridación a 42°C en 5X SSPE, SDS al 0,3%, ADN de esperma de salmón fragmentado y desnaturalizado 200 pg/ml, y formamida o bien al 25%, al 35% o bien el 50% para rigurosidades baja o media o alta respectivamente. Posteriormente, la reacción de hibridación se lava tres veces durante 30 minutos cada una usando 2XSSC, SDS al
 25 0,2% y o bien 55°C, 65°C o bien 75°C para rigurosidades baja o medio o alta respectivamente.

Constructo de ácido nucleico, vector de expresión, operativamente unido, expresión, secuencias control

30 Un constructo de ácido nucleico se define como una molécula de ácido nucleico que está aislada de un gen que se produce de manera natural o que se ha modificado para que contenga segmentos de ácidos nucleicos que se combinan o yuxtaponen de una manera que de otra forma no existiría en la naturaleza. Una molécula de ácido nucleico está representa por una secuencia de nucleótidos. Opcionalmente, una secuencia de nucleótidos presente en un constructo de ácido nucleico está operativamente unida a
 35 una o más secuencias control, que dirigen la producción o expresión de dicho péptido o polipéptido en una célula o en un sujeto.

“Operativamente unida” se define en el presente documento como una configuración en la que una secuencia control se coloca apropiadamente en una posición en relación con la secuencia de nucleótidos que codifica para el polipéptido de la invención de
 40 manera que la secuencia control dirige la producción/expresión del péptido o polipéptido de la invención en una célula y/o en un sujeto.

“Operativamente unida” también puede usarse para definir una configuración en la que una secuencia (es decir, definida como un adyuvante) se coloca apropiadamente en una posición en relación con otra secuencia que codifica para un antígeno de manera
 45 que se forma un polipéptido quimérico (es decir, que comprende un adyuvante fusionado a un antígeno) en una célula y/o en un sujeto.

“Operativamente unido” se refiere a la fusión genética de una secuencia que codifica para una proteína que puede comportarse como un adyuvante tal como se define en el presente documento con una secuencia que codifica para un antígeno tal como se define en el presente documento dando como resultado una secuencia quimérica de ácido nucleico que codifica para una proteína quimérica.

Expresión se entenderá que incluye cualquier etapa implicada en la producción del péptido o polipéptido incluyendo, pero sin limitarse a, transcripción, modificación postranscripcional, traducción, modificación postraduccional y secreción.

Secuencia control se define en el presente documento que incluye todos los componentes que son necesarios o ventajosos para la expresión de un polipéptido. Como mínimo, las secuencias control incluyen un promotor y señales de terminación de la transcripción y la traducción. Opcionalmente, un promotor representado por una secuencia de nucleótidos presente en un constructo de ácido nucleico está operativamente unido a otra secuencia de nucleótidos que codifica para un péptido o polipéptido tal como se identifica en el presente documento

Un vector de expresión puede ser cualquier vector que puede someterse convenientemente a procedimientos de ADN recombinante y puede propiciar la expresión de una secuencia de nucleótidos que codifica para un polipéptido de la invención en una célula y/o en un sujeto. Tal como se usa en el presente documento, el término “promotor” se refiere a un fragmento de ácido nucleico que funciona controlando la transcripción de uno o más genes o ácidos nucleicos, ubicados en el sentido de 5' con respecto a la dirección de transcripción del sitio de iniciación de la transcripción del gen. Está relacionado con el sitio de unión identificado por la presencia de un sitio de unión para ARN polimerasa dependiente de ADN, sitios de iniciación de la transcripción y cualquier otra secuencia de ADN, incluyendo, pero sin limitarse a, sitios de unión de factores de transcripción, sitios de unión de proteínas activadoras y represoras, y cualquiera otra secuencia de nucleótidos conocida por el experto en la técnica que actúa directa o indirectamente regulando la cantidad de transcripción del promotor. Dentro del contexto de la invención, un promotor preferiblemente termina en el nucleótido -1 del sitio de inicio de la transcripción (TSS).

En este documento y en sus reivindicaciones, el verbo “comprender” y sus conjugaciones se usan en su sentido no limitativo significando que los objetos que siguen a la palabra se incluyen, pero los objetos no mencionados específicamente no se excluyen. Además el verbo “consistir” puede reemplazarse por “consistir esencialmente en” significando que un producto o una composición o una molécula de ácido nucleico o un péptido o polipéptido de un constructo de ácido nucleico tal como se define en el presente documento puede comprender componente(s) adicional(es) que los específicamente identificados; no alterando dicho(s) componente(s) adicionales la característica única de la invención. Además, la referencia a un elemento mediante el artículo indefinido “un” o “una” no excluye la posibilidad de que más de uno de los elementos esté presente, a menos que el contexto claramente requiera que haya uno y sólo uno de los elementos. El artículo indefinido “un” o “una” por tanto significa habitualmente “al menos uno”.

Todas las referencias de bibliografía y de patentes citadas en la presente memoria descriptiva se incorporan por el presente documento como referencia en su totalidad.

Los siguientes ejemplos se ofrecen para fines ilustrativos sólo, y no pretenden limitar el

alcance de la presente invención de ninguna manera.

Descripción de las figuras

Figura 1. Kmp11 en fase sólida. Respuesta humoral contra Kmp11 y contra Q. A: Respuesta de IgG contra Kmp11 tras la administración i.p. y s.c. de Kmp11 (20 µg). B: Respuesta de IgG contra Kmp11 tras la administración i.p. y s.c. de KAAP (5 µg) y Kmp11 (1 µg). C: Respuesta de IgG contra Q tras la administración i.p. y s.c. de KAAP (5 µg). D: Respuesta de IgG contra Kmp11 tras la administración i.p. y s.c. de Q (5 µg) + Kmp11 (20 µg). E: Respuesta de IgG contra Q tras la administración i.p. y s.c. de Q (5 µg) + Kmp11 (20 µg). Las barras indican la variabilidad de la respuesta entre los animales dentro de un grupo.

Figura 2. Kmp11 en fase sólida. Respuesta humoral contra Kmp11 y contra Q. A: Respuesta de IgG humoral contra Kmp11 tras la administración de KAAP(1 µg) y Kmp11 (0,25 µg) i.p. y s.c.. B: Respuesta humoral contra Q tras la administración de KAAP (1 µg) i.p. y s.c.. C: Respuesta de IgG1 e IgG2a contra Kmp11 tras la administración i.p. y s.c. de KAAP (1 µg). D: Respuesta de IgG1 e IgG2a contra Q tras la administración i.p. y s.c. de KAAP (1 µg). Las barras indican la variabilidad de la respuesta entre los animales dentro de un grupo.

Figura 3. Kmp11 en fase sólida. Respuesta humoral contra Kmp11 y contra Q. A: Respuesta de IgG contra Kmp11 tras la administración s.c. de pRcKmp11 (20 µg), KAAP (3 µg) y pRcKAAP 20 µg). B: Respuesta de IgG contra Q tras la administración s.c. de KAAP (3 µg) y pRcKAAP (20 µg). C: Respuesta de IgG1 e IgG2a contra Kmp11 tras la administración s.c. de pRcKmp11 (20 µg), KAAP (3 µg) y pRcKAAP (20 µg). D: Respuesta de IgG1 e IgG2a contra Q tras la administración s.c. de KAAP (3 µg) y pRcKAAP (20 µg). Las barras indican la variabilidad de la respuesta entre los animales dentro de un grupo.

Figura 4. Kmp11 en fase sólida. Producción de citocinas en células de bazo estimuladas con KAAP y en no estimuladas de ratones a los que se les inyectó PBS, KAAP y pRcKAAP. Las barras indican la variación entre determinaciones por triplicado. Las unidades indicadas en el eje Y se facilitan en pg/ml. En el eje X se indican los grupos vacunados.

Figura 5. Kmp11 en fase sólida. Producción de citocinas en células de bazo estimuladas con Kmp11 y en no estimuladas de ratones a los que se les inyectó PBS, KAAP y pRcKAAP. Las barras indican la variación entre determinaciones por triplicado. Las unidades indicadas en el eje Y se facilitan en pg/ml. En el eje X se indican los grupos vacunados.

Figura 6. Cup a 4 en fase sólida. Se inmunizaron los animales con tres dosis de PBS, 5 µg de CAAP; 2 µg de Cup a 4 y 2 µg de Cup a 4 + 3 µg de AAP. Una semana tras la administración de la tercera dosis, se recogieron los sueros y se analizaron para detectar reactividad contra Cup a 4. 1A-: Reactividad de IgG. 1B-: Reactividad de IgG1. 1C-: Reactividad de IgG2a. Los sueros se sometieron a prueba a una dilución de 1/2000 para IgG y 1/1000 para IgG1 e IgG2a. Las estrellas indican diferencias estadísticas.

Figura 7. Cup a 4 en fase sólida. Se inmunizaron los animales con dos dosis de PBS, 5 µg de CAAP; 2 µg de Cup a 4 y 2 µg de Cup a 4+3 µg de AAP. Una semana tras la

administración de la segunda dosis se recogieron los sueros y se analizaron para detectar reactividad contra Cup a 4. 2A-: Reactividad de IgG; 2B-: Reactividad de IgG1; 1C-: Reactividad de IgG2a. Los sueros se sometieron a prueba a una dilución de 1/1600 para IgG y 1/400 para IgG1 e IgG2a. Las estrellas indican diferencias estadísticas.

Figura 8. Cup a 4 en fase sólida. Reactividad de IgG de los sueros de animales inmunizados con una única dosis de PBS, 1,25 μ g de CAAP; 0,5 μ g de Cup a 4 y 0,5 μ g de Cup a 4 + 0,75 μ g de AAP. Una semana tras la administración de la dosis se recogieron los sueros y se analizaron para detectar reactividad contra Cup a 4. Los sueros se sometieron a prueba a una dilución de 1/100. Las estrellas indican diferencias estadísticas.

Figura 9. Cup a 4 en fase sólida. Animales inmunizados con dos dosis de PBS, 1,25 μ g de CAAP; 0,5 μ g de Cup a 4 y 0,5 μ g de Cup a 4 + 0,75 μ g de AAP. Una semana tras la administración de la segunda dosis se recogieron los sueros y se analizaron para detectar reactividad contra Cup a 4. 4A-: IgG; 4B-, IgG1; 4C-, IgG2a. Los sueros se sometieron a prueba a una dilución de 1/4000 para IgG y 1/100 para IgG1 e IgG2a. Las estrellas indican diferencias estadísticas.

Figura 10. S100A2 en fase sólida. Reactividad contra S100A2 (en unidades de D.O.). Se inmunizaron cuatro grupos de animales (N=5) con una única dosis de S100AAP (1,05 μ g), S100A2 (0,3 μ g), AAP (0,75 μ g de AAP) y S100A2 + AAP (0,3 μ g + 0,75 μ g). Se administró tampón PBS a otro grupo de animales usados como controles. Los sueros se obtuvieron 15 días tras la administración de las proteínas. Los sueros se analizaron a una dilución de 1/100.

Figura 11. S100A2 en fase sólida. Reactividad contra S100A2 (en unidades de D.O.). El mismo grupo de animales indicado en la figura 1 se inmunizó con S100AAP (1,05 μ g), S100A2 (0,3 μ g), AAP (0,75 μ g de AAP) y S100A2 + AAP (0,3 μ g + 0,75 μ g) 15 días tras la administración de la primera dosis. Los sueros se obtuvieron una semana después. (A) Reactividad de IgG. (B) Reactividad de IgG1. (C) Reactividad de IgG2. Los sueros se analizaron a una dilución de 1/200. Las estrellas indican diferencias estadísticas altas.

Figura 12. Vector de expresión Cup a 4 AAP

Figura 13. Vector de expresión S100A2 AAP

Figura 14. Reactividad contra S100A2 (en unidades de D.O.) tras una tercera inmunización. El mismo grupo de animales indicado en la figura 1 se inmunizó con S100AAP (1,05 μ g), S100A2 (0,3 μ g), AAP (0,75 μ g de AAP) y S100A2 + AAP (0,3 μ g + 0,75 μ g) 15 días tras la administración de la segunda dosis. Los sueros se obtuvieron una semana después. (A) Reactividad de IgG. (B) Reactividad de IgG1. (C) Reactividad de IgG2a. Los sueros se analizaron a una dilución de 1/6400. Las estrellas indican diferencias estadísticas ($p < 0,05$).

Ejemplos

Sección I

Materiales y métodos

Animales e inmunización. Se adquirieron ratones BALB/c de 6-8 semanas de edad hembras de Harlan Interfauna Ibérica S.A. (Barcelona, España). Se realizó la inmunización de los animales mediante una vía intraperitoneal (i.p.) o subcutánea (s.c.) tal como se indica en las leyendas de las figuras incluidas en la sección de resultados.

5 Se extrajo sangre de los ratones mediante punción del plexo orbital.

Construcción del plásmido de ADN que expresa el gen quimérico Kmp11AAP.

Se eliminaron las secuencias de ADN que codifican para los extremos amino y carboxilo terminales de los determinantes antigenicos de H2A del clon quimérico pPQ (Soto M, *et al.* J Clin Microbiol. Enero de 1998;36(1):58-63.) mediante digestión con Bam HI. La secuencia de ácido nucleico de PQ o Q se representa por SEQ ID NO: 46.

10 La secuencia de aminoácidos de PQ o Q se representa por SEQ ID NO: 47. El clon resultante sin las secuencias que codifican para determinantes de H2A se denominó pAAP (SEQ ID NO:2). Se obtuvo la secuencia de ADN que codifica para la proteína Kmp11 mediante amplificación por PCR de la secuencia de ADN que codifica para esa

15 proteína presente en el plásmido pBLs-KMP-11 (Fuertes M.A., *et al.*, J Biol Inorg Chem 6 (2001) 107-117.) usando como cebadores los oligonucleótidos directo 5'CGGGATCCTTTAATGGCCACCGTACGAGGAG3' (SEQ ID NO: 31) e inverso 5'CGGGATCCCCCCTTGATGGGTACTGCGCAGC3' (SEQ ID NO: 32). Entonces, se digirió el producto de PCR que codifica para la proteína Kmp11 con Bam HI y se

20 insertó en pAAP (el clon de pPQ digerido con Bam HI que carece de los determinantes de H2A) (SEQ ID NO:33). El clon resultante, denominado pKmp11AAP, se transformó en *E. coli* (cepa M15). La proteína purificada quimérica expresada por el clon pKmp11AAP se denominó KAAP (SEQ ID NO:34). En la posición 10^a-12^a, se incluyó un triplete TTA para evitar la selección de clones que tienen una inserción de la

25 secuencia que codifica para Kmp11 en la orientación inversa. En la posición 9^a-11^a, se introdujo un triplete que codifica para glicina para proporcionar flexibilidad a la intersección entre la proteína Kmp11 y el fragmento de proteína codificado por pAAP.

Construcción del plásmido pRcKAAP.

Para construir el plásmido de ADN que contiene la secuencia de ADN que codifica para la proteína KAAP, se amplificó por PCR el plásmido pKmp11AAP indicado

30 anteriormente usando como cebadores el directo 5'-CCCAAGCTTATGGCCACCGTACGAGGAG-3' (SEQ ID NO:35) y el inverso 5'-CATTACTGGATCTATCAACAGG-3' (SEQ ID NO:36). Se insertó la secuencia de ADN en un plásmido pRc/CMV digerido con Hind III. El plásmido pRC está disponible

35 comercialmente de Invitrogen. Se purificaron los plásmidos de ADN mediante un kit de preparación Giga libre de endotoxinas (Qiagen, Hilden, Alemania).

Purificación de proteínas.

Se realizó la purificación de la proteína KAAP recombinante, expresada por el clon pKmp11AAP, así como las proteínas Kmp11 y Q recombinantes (Soto M, *et al.* J Clin Microbiol. (1998) enero;36(1):58-63, y Planelles L, *et al.*, Immunol Cell Biol. (2002);80(3):241-7.), en columnas de resina de ácido nitrilotriacético en condiciones de desnaturalización, según el método proporcionado por el proveedor (Qiagen).

40

Expresión de las proteínas Kmp11 y KAAP mediante pRcKAAP.

Se transfectaron células COS7 con 20 µg de los plásmidos pRcKmp11AAP o pRcKmp11 usando el reactivo Lipofectin® (Gibco, BRL) según el protocolo del

45

fabricante. En resumen, se sembraron 3×10^6 células competentes sobre placas de 100 mm en medio de Eagle modificado por Dulbecco más FCS al 5% y se transfectaron cuando alcanzaron un 50-75% de confluencia. Setenta y dos horas tras la transfección, se recogieron las células, se lavaron dos veces con PBS helado y se lisaron inmediatamente añadiendo tampón de Laemmli. Se resolvieron las proteínas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida-dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Amersham, Aylesbury, RU). Se estudiaron con sonda las transferencias con un suero de ratones inmunizados con la proteína KAAP. Se observó que una banda de proteína del tamaño esperado reaccionaba con anti-KAAP en las transferencias.

Análisis de la respuesta humoral.

Se analizaron muestras de suero para detectar anticuerpos específicos contra Q o Kmp11. En resumen, se recubrieron los pocillos de las placas de ELISA convencional durante la noche a temperatura ambiente con 100 μ l de PBS que contenía Q o Kmp11 2 μ g/ml. Se realizó el análisis específico de isotipo e IgG usando anticuerpo anti-inmunoglobulinas de ratón conjugado con peroxidasa del rábano (Nordic Immunological Laboratories, Tilburg, Países Bajos): dilución de anti-IgG y anti-IgG1 (1:1000) y anti-IgG2a (1:500). Se usó diclorhidrato de ortofenilendiamina -OPD- (Dako, A/S, Glostrup, Dinamarca) como sustrato. Tras 15 min., se detuvo la reacción añadiendo 100 μ l de H_2SO_4 1 M. Se leyó la absorbancia a 450 nm.

Análisis de citocinas.

Se extirparon los bazo de los ratones una semana tras la última inmunización en condiciones asépticas en una placa estéril que contenía medio DMEM. Se prepararon suspensiones de células individuales triturando el bazo usando una malla esterilizada en autoclave. Se añadieron 5-10 ml de medio DMEM a esto y se mezcló el contenido hasta la homogeneidad. Se extrajo lentamente mediante pipeteo el sobrenadante transparente. Se sedimentaron las células mediante centrifugación a 4°C a 250 g (centrífuga Sorvall RC-5, rotor HB-4) durante 10 min. Se recogió el sedimento que contiene eritrocitos y esplenocitos. Se lavó el sedimento una vez con cloruro de amonio al 0,9% para lisar los eritrocitos. Se reunieron los esplenocitos de cada ratón en un grupo y se resuspendieron a una densidad de 10^7 células/ml en RPMI que contenía FCS al 10% y 2-mercaptoetanol 0,05 mM, entonces se dividió en alícuotas de 200 μ l (5×10^5 células) en tubos eppendorf de 1,5 ml. Se reestimularon los esplenocitos con KAAP o Kmp11 12 μ g/ml. Se incubaron las células durante 48 h a 37°C en una atmósfera que contenía un 5% de CO_2 y un 95% de humedad. Se reunieron los sobrenadantes de los ratones de cada grupo (N=4). Se realizaron todas las determinaciones por triplicado. Para controlar la proliferación celular se midió la cantidad de IFN- γ e IL-2 en los sobrenadantes de células tratadas con ConA (3 μ g/ml). Se detectaron altas cantidades de IFN- γ (1000 veces) e IL-2 (200 veces) en células tratadas con ConA en relación con células sin tratar.

Determinación de citocinas. Se determinaron las concentraciones de IL-4, IL-6, IFN- γ , TNF- α , IL-17 e IL-10 en sobrenadantes de cultivo celular usando un kit CBA (BD Biosciences, Singapur) según las instrucciones del fabricante. Se adquirieron los resultados usando FACS CALIBUR (BD Biosciences, Singapur) y se analizaron usando el software FCAP.

Resultados

Con el fin de conocer si la proteína codificada por la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:1 (AAP) puede aumentar o modificar la respuesta humoral frente a un antígeno covalentemente unido tal como Kmp11, se administró una proteína KAAP expresada por un gen quimérico formado por la fusión genética de los ADN de Kmp11 y APP a ratones. La secuencia de AAP se deriva de la secuencia Q descrita anteriormente con la excepción del ADN que codifica para los fragmentos de aminoácidos amino y carboxilo terminales correspondiente a los antígenos de H2A que tienen un 75% de identidad. En la proteína KAAP quimérica, la proteína Kmp11 representa 1/4 de la proteína completa. Se diseñó un ensayo en el que se inyectaron a dos grupos de 5 ratones cada uno tres dosis de 20 µg de Kmp11, 5 µg de KAAP y 20 µg de Kmp11 - 5 µg de Q en el día 0, 15º y 30º. Se administraron las proteínas a los ratones mediante una vía subcutánea (s.c.) o intraperitoneal (i.p.). Una semana tras la administración de la tercera dosis se determinó la reactividad de IgG contra Q y Kmp11 mediante una prueba de ELISA. La figura 1A muestra que la proteína Kmp11 provocaba alta reactividad contra Kmp11 cuando se administraba mediante una vía i.p. pero que no podía desencadenar una respuesta inmunitaria cuando se administraba mediante una vía s.c.. Se observó que tras la administración i.p. de 5 µg de KAAP la respuesta contra Kmp11 también era alta y similar a la observada cuando se administraban 20 µg de proteína Kmp11 sola y que, además, se desencadenó una respuesta alta tras la administración s.c. en contraposición a la falta de respuesta cuando se administraron 20 µg de Kmp11 (figura 1B) sola mediante la misma vía. Se observó una respuesta alta contra Q cuando la proteína KAAP se administró o bien i.p. o bien s.c. (figura 1C).

Puesto que se provocó una respuesta alta contra Kmp11 cuando se administraron 5 µg de KAAP y la cantidad de Kmp11 en 5 µg de KAAP es equivalente a aproximadamente 1 µg de Kmp11, se sometió a prueba si 1 µg de Kmp11 también podía inducir una respuesta serológica. La figura 1B muestra que la proteína puede inducir una respuesta humoral ligera contra Kmp11 cuando se administra i.p. (DO media=0,3) pero que la respuesta era significativamente inferior a la provocada tras la administración de 5 µg de KAAP. Puede observarse, además, que, tal como se esperaba, no hubo ninguna reactividad contra Kmp11 tras la administración s.c. de 1 µg de Kmp11 pero que, por el contrario, la respuesta fue alta tras la administración de la misma cantidad de Kmp11 presente en 5 µg de KAAP.

Con el fin de saber si el aumento en reactividad contra Kmp11 era debido a la administración conjunta de Kmp11 con los fragmentos de proteínas presentes en la proteína Q, se administró la proteína Kmp11 mezclada con Q. Se observó que la reactividad contra Kmp11 disminuía cuando la mezcla se administraba i.p. y que no se observaba ninguna respuesta contra Kmp11 cuando la mezcla se administraba s.c. (figura 1D), como indicación de que los fragmentos de proteínas presentes en Q no provocan ningún efecto adyuvante sobre Kmp11. Se observó reactividad serológica alta contra Q (figura 1E).

Debido a la respuesta serológica alta observada tras la administración de 5 µg de KAAP, se analizó la respuesta contra Q y Kmp11 tras la administración de 1 µg de KAAP. Se inyectaron s.c. cinco ratones en la almohadilla plantar en el día 0 y 15º. Se analizó la respuesta de IgG e IgG1/IgG2a una semana tras la administración de la segunda dosis. Como control, se administraron 0,25 µg de Kmp11, que es la cantidad presente en 1 µg de KAAP, a los ratones. La figura 2A muestra que la respuesta alta contra Kmp11 se obtuvo tras la administración de 1 µg de KAAP mediante administración o bien i.p. o bien s.c. pero que no se obtuvo respuesta tras una

administración o bien s.c. o bien vía i.p. de 0,25 μ g de Kmp11. Se observó respuesta humoral alta contra Q cuando se administró KAAP o bien i.p. o bien s.c. (figura 2B). La respuesta fue similar a la observada tras la administración de 3 μ g y 5 μ g de KAAP (datos no mostrados). El tipo de respuesta fue de manera predominante de un tipo de IgG1 contra o bien Kmp11 o bien Q (figuras 2C y D) siendo la razón de IgG1/IgG2a de aproximadamente 0,5.

Con el fin de conocer si la proteína KAAP puede provocar una respuesta humoral tras la administración a ratones de un ADN de plásmido que contiene el gen que codifica para KAAP, se analizó la respuesta humoral de IgG, IgG1 e IgG2a contra Q y Kmp11. Se inyectaron a grupos de 7 ratones en la almohadilla plantar 20 μ g de pRcKQ1, 20 μ g de pRcKmp11 y 3 μ g de KAAP en el día 0, 15° y 30°. Se administró PBS a los animales control. La figura 3 muestra que se detectó reactividad alta de IgG contra Kmp11 (figura 3A) y Q (figura 3B) tras la administración de pRcKAAP y que era similar a la detectada tras la administración de la proteína KAAP. Sin embargo, no se obtuvo respuesta tras la administración del plásmido de ADN que contiene el gen que codifica para la proteína Kmp11 sola. Se detectó una razón de IgG1/IgG2a equilibrada cuando se analizó la reactividad contra Q (figura 3D) o bien tras la administración de KAAP o bien de pRcKAAP. Se observó una ligera predominancia de la reactividad de IgG1 media cuando se sometió a prueba contra Kmp11 (figura 3C).

Se analizó la producción de citocinas en células de bazo estimuladas con Kmp11 y KAAP y en no estimuladas de ratones a los que se les inyectó KAAP y pRcKAAP. Se observó un aumento de la producción específico de antígeno de IFN- γ , IL-6, TNF- α e IL-10 en células estimuladas con KAAP aisladas de animales inmunizados con pRcKAAP. No se detectaron diferencias en la producción de citocinas mediante células estimuladas con KAAP de ratones inmunizados con PBS y KAAP. Puesto que se detectó un aumento similar en IL-6, TNF- α e IL-10 en células estimuladas con KAAP de ratones inmunizados con PBS y KAAP, lo más probable es que el aumento en la producción de citocinas en relación con células no estimuladas sea debido a una estimulación no específica de las células del bazo en lugar de a una estimulación de células específicas de KAAP. Se observó una producción similar de IL-17 en células de bazo de ratones inmunizados con PBS, KAAP y pRcKAAP estimulados con KAAP (figura 4). Se observó también un aumento de la producción de IFN- γ e IL-17 tras la estimulación con Kmp11 de células de bazo de animales inmunizados con pRcKAAP. Se observó también un aumento en la producción de IL-17 en células de ratones inmunizados con KAAP. Además, se observó una producción no específica de TNF- α , IFN- γ e IL-6 en los cultivos de células estimuladas con Kmp11 en relación con células no estimuladas (figura 5).

Conclusión:

El potencial inmunogénico de Kmp11 es mucho mayor cuando se fusiona genéticamente a una proteína quimérica formada por fragmentos de las proteínas Lip2a, Lip2b y P0 de *Leishmania infantum*. Una proteína quimérica que contiene la mezcla de fragmentos de Lip2a, Lip2b y P0 (pero no fusionados a) con Kmp11 no aumenta el potencial inmunogénico de Kmp11.

La proteína Kmp11, cuando se administra como ADN fusionado a los fragmentos de ADN que codifican para los determinantes antigénicos de las proteínas Lip2a, Lip3b y P0 de *Leishmania infantum*, provocó una respuesta humoral alta. La proteína Kmp11, cuando se administra sola como ADN, no provoca una respuesta humoral detectable.

Se observó un aumento de producción específico de antígeno de IFN- γ , IL-6, TNF- α e IL-10 en células estimuladas con KAAP aisladas de animales inmunizados con pRcKAAP. También se observó un aumento de producción de IFN- γ tras la estimulación con Kmp11. Este tipo de aumento de producción no se detectó en células
5 estimuladas con KAAP aisladas de animales inmunizados con KAAP.

La proteína resultante de la traducción *in vitro* de la secuencia de ADN de AAP puede usarse como herramienta para promover la generación de anticuerpos contra una proteína genéticamente fusionada. La secuencia de ADN de AAP puede usarse como
10 un vector para promover el potencial inmunogénico de un antígeno cuando se administra como ADN.

La proteína AAP puede usarse como portador y como adyuvante para provocar una respuesta inmunitaria contra un antígeno genéticamente fusionado.

Sección II

Materiales y métodos

15 Construcción del vector de expresión de CAAP (Cup a 4-AAP).

Se había clonado previamente Cup a 4 dentro del vector pQE-30 y se expresó y purificó como una proteína recombinante (Molecular cloning and characterization of Cup a 4, a new allergen from *Cupressus arizonica*, Biochem Biophys Res Commun. 22 de octubre de 2010;401(3):451-7. Yago Pico de Coaña, Nuria Parody, Miguel Ángel
20 Fuertes, Jerónimo Carnés, Daniela Roncarolo, Renato Ariano, Joaquín Sastre, Gianni Mistrello, Carlos Alonso). Entonces, se insertó la proteína en el vector de AAP que se había preparado tras la digestión de la proteína quimérica KAAP con Bam HI con el fin de liberar el fragmento K (Kmp11) (esta patente). El vector de expresión resultante contiene la proteína quimérica AAP más el alérgeno de *C. arizonica* Cup a 4 (figura
25 12). La proteína se denomina CAAP.

Expresión y purificación de la proteína CAAP.

Se transformó el vector que codifica para la proteína CAAP (proteína indicadora) en la cepa de expresión de *E. coli* M15 (Qiagen). Se llevó a cabo la expresión en condiciones convencionales tras añadir IPTG 1 mM durante 5 horas al cultivo
30 bacteriano que se había transformado con el vector de CAAP. Se realizó la purificación de la proteína tal como se describió anteriormente para KAAP.

Resultados

En una sección previa se mostró que la respuesta inmunitaria de una proteína escasamente inmunogénica es mucho mayor cuando se fusiona al fragmento de AAP.
35 Con el fin de saber si el fragmento de AAP podría servir también como adyuvante y, por tanto, aumentar el potencial inmunogénico de una proteína que es altamente inmunogénica incluso en ausencia de adyuvante, se construyó el vector de CAAP. La Cup a 4 es una proteína alérgica de *Cupressus arizonica*. Se ha descrito que en el 10% de los pacientes alérgicos a *Cupressus* se desencadena una respuesta de IgGE
40 intensa contra Cup a 4. Para someter a prueba si AAP fusionada a Cup a 4 aumenta la inmunogenicidad de Cup a 4, se inyectaron a un grupo de ratones (N=5), cada uno, 5 μ g de la proteína CAAP recombinante equivalente a 3 y 2 μ g de AAP y Cup a 4, respectivamente. Se inyectó a un segundo grupo de ratones (N=5) cada uno una

mezcla formada por 3 µg de AAP y 2 µ de Cup a 4. Se inyectaron a un tercer grupo de ratones (N=5) cada uno 2 µg de la proteína Cup a 4. A un cuarto grupo se le administraron 3 µg de AAP. Se disolvieron todas las proteínas en PBS y se administraron a los ratones s.c. en ausencia de cualquier adyuvante.

5 Se determinó la reactividad de IgG contra Cup a 4 a una dilución de 1/2000. Tal como se esperaba, una semana tras la administración de una tercera dosis de PBS o AAP no se observó ninguna respuesta contra Cup a 4 (datos no mostrados). Los resultados de la respuesta de IgG una semana tras administrar la tercera dosis de Cup a 4, CAAP, Cup a 4 + AAP y AAP se muestran en la figura 6A. Puede observarse que en los
10 animales inmunizados con Cup a 4 se provocó una respuesta de IgG contra Cup a 4 tal como se esperaba a partir de una proteína altamente inmunogénica. La respuesta era variable oscilando entre 0,9 y 2,3 con un valor medio de 1,4 DO. Se observó una pequeña disminución en la reactividad contra Cup a 4 en los animales inmunizados con Cup a 4 + AAP. Esto indica que la administración de AAP mezclada con Cup a 4 no
15 aumentó la inmunogenicidad de Cup a 4 sino que al contrario AAP compite con Cup a 4. El valor medio fue 0,95 DO. Sin embargo, cuando la proteína Cup a 4 se administró fusionada a AAP (CAAP), se observó un aumento en la respuesta en la mayoría de los animales. La respuesta osciló entre 1,1 y 2,9 DO con un valor medio de 2,2 DO, a diferencia de 1,4 DO detectado en los animales inmunizados con Cup a 4. Se observó
20 un comportamiento similar con respecto a la respuesta de IgG contra Cup a 4 en los sueros de los animales con Cup a 4, Cup a 4 + AAP y CAAP y AAP una semana tras la administración de la segunda dosis (figura 7A) como indicación adicional del carácter inmunogénico intenso de Cup a 4. Con el fin de saber si la AAP tiene alguna influencia en la modulación de la respuesta IgG1 e IgG2a provocada contra Cup a 4, se analizó la
25 respuesta de isotipo de IgG1 e IgG2a en los animales inmunizados con Cup a 4, Cup a 4 + AAP y CAAP (dilución de los sueros 1/400) una semana tras la administración de la segunda y tercera dosis.

La figura 7B muestra que una semana tras la administración de la segunda dosis de Cup a 4 también se detectó una intensidad dispersa en la reactividad de IgG1
30 oscilando entre 0,18 y 2,4 DO (valor medio de 1,1). La reactividad de IgG1 contra Cup a 4 en los animales inmunizados con Cup a 4 + AAP era un tanto inferior y uniforme, alrededor del valor medio de 0,7 DO. En contraposición, el valor medio de la reactividad de IgG1 contra Cup a 4 en los animales inmunizados con CAAP era superior (valor medio de 2 DO) a la observada en los animales con Cup a 4 y Cup a 4 +
35 AAP como indicación adicional de que la AAP se comportaba como un adyuvante cuando se fusionaba al antígeno. También se observaron diferencias similares cuando se analizó la reactividad de IgG1 contra Cup a 4 una semana tras la administración de la tercera dosis (figura 6B), en particular cuando se comparó con la mezcla de Cup a 4 + AAP administrada. Cuando se analizó la intensidad de la reactividad de IgG2a contra
40 Cup a 4 en los sueros de animales inmunizados con Cup a 4, CAAP y Cup a 4 + AAP una semana tras la tercera dosis se observó que en los sueros de los animales inmunizados con Cup a 4 y Cup a 4 + AAP (figura 6C) la reactividad era uniforme alrededor de un valor medio de 0,8 y 0,6 DO, respectivamente. Las respuestas de IgG2a observadas en el grupo de CAAP, con valores que oscilaban entre 1,1 y 2,9 DO
45 y un valor medio de 1,9 DO, eran superiores a las detectadas en los animales con Cup a 4 y con Cup a 4 + AAP. Se detectó una observación similar cuando se analizaron los sueros, obtenidos una semana tras la segunda dosis, de los animales con Cup a 4, Cup a 4 + AAP y CAAP (figura 7C).

Para tener pruebas adicionales de la capacidad adyuvante temprana de AAP, se

inmunizó un grupo de animales con 1/4 de las dosis de proteína de Cup a 4, CAAP y Cup a 4 + AAP usadas en el experimento mostrado anteriormente (equivalente a 0,5 µg de Cup a 4, 1,5 µg de CAAP y 0,5 µg de Cup a 4 + 0,75 µg de AAP, respectivamente). Se recogieron los sueros una semana tras la primera dosis. Se
 5 determinó la reactividad de IgG contra Cup a 4 a una dilución 1/100. Los resultados se muestran en la figura 8. Se observó que mientras que no hubo ninguna respuesta contra Cup a 4 en ninguno de los animales inmunizados con Cup a 4 o Cup a 4 + AAP, se observaron respuestas positivas en todos los animales inmunizados con CAAP. De nuevo, se observó que la respuesta era variable oscilando entre 0,16 y 1,7 DO. Por
 10 tanto, con la excepción de un animal la respuesta era alta en la mayoría de los animales en esa etapa temprana tras la inmunización. Tras la administración de una segunda dosis también se observó un resultado interesante. En el grupo de Cup a 4+ AAP la respuesta desencadenada por AAP compite con la respuesta desencadenada por Cup a 4. De hecho, no se detectó reactividad contra Cup a 4 (figura 9A). De manera interesante, esta competencia no se produjo cuando el antígeno estaba fusionado a AAP. Con el fin de discriminar en detalle la capacidad de adyuvante de AAP se analizaron los sueros a una dilución de 1/4000 (figura 9A). La DO media de los sueros de los animales inmunizados con CAAP era de 0,45 DO mientras que era de 0,15 DO en los sueros de los animales con Cup a 4. En este grupo la reactividad de los sueros contra Cup a 4 de dos animales estaba cerca del nivel de fondo. Todos los sueros del grupo de CAAP de animales eran positivos. La diferencia entre la reactividad contra Cup a 4 en ambos grupos era estadísticamente diferente ($p < 0,05$). Cuando se analizó la respuesta de IgG1 y de IgG2a (dilución 1/100) los datos mostrados anteriormente (figuras 7B y 7C) se confirmaron (figura 9B y 9C). La AAP, cuando se fusiona al antígeno, dirige la respuesta hacia IgG2a. El valor de p de la reactividad de la respuesta contra Cup a 4 debida a la administración de CAAP en relación con Cup a 4 fue de 0,055 y en relación con Cup a 4 + AAP fue de $p < 0,05$.

Por tanto, los datos presentados indican que el fragmento de la proteína APP, cuando se administra fusionado a Cup a 4, puede no sólo aumentar la respuesta inmunitaria
 30 contra una proteína altamente inmunogénica, tal como Cup a 4, sino que también puede modular el tipo de respuesta provocada, en particular hacia una respuesta de IgG2a. Ese tipo de actividad adyuvante no se observa cuando se administró AAP mezclada con proteína Cup a 4. Por el contrario, AAP parece competir con la actividad inmunitaria del antígeno.

35 Sección III

Preparación del vector de expresión S100AAP

Tras la amplificación por PCR del fragmento de ADN de S100A2 en el vector pDEST-17 de Invitrogen (mezcla madre de laboratorio), usando los cebadores 5'-AAGGATCCATGTGCAGTTCTCTGGAG-3' (SEQ ID NO: 44) y 5'-
 40 AACTTAAGCAGGGTCGGTCTGGGCAG-3' (SEQ ID NO: 45), se subclonó en un vector pST Blue-1 (los sitios de restricción Bam HI y Afl II se muestran en *cursiva*). Entonces, se subclonó en un vector de APP modificado (en un vector PQE30) que se había sintetizado incluyendo los sitios de restricción necesarios. El vector de expresión resultante contiene los tres fragmentos de la proteína quimérica AAP más el fragmento de ADN de S100A2 (figura 13). Se transformó este vector en la cepa de expresión de *E. coli* M15 (Qiagen). Se llevó a cabo la expresión en condiciones convencionales: Inducción de un cultivo con D.O._{450nm} de 0,8 con IPTG 1 mM durante 5 horas. El vector final se denominó S100AAP. Se expresó la proteína S100A2 en el vector PQE30.

En secciones previas se mostró que la respuesta inmunitaria contra una proteína escasamente inmunogénica de parásitos (Kmp11) es mucho mayor cuando se fusiona a la secuencia de ADN de AAP y que la respuesta inmunitaria contra una proteína altamente inmunogénica vegetal (Cup a4) también aumenta cuando se fusiona a la secuencia de ADN de AAP. También se mostró que la capacidad de AAP para aumentar la inmunogenicidad de la proteína indicadora era sólo eficaz cuando la proteína indicadora estaba genéticamente fusionada a AAP. Con el fin de saber si el fragmento de AAP también podría servir como un adyuvante y, por tanto, aumentar el potencial inmunogénico de una proteína de mamífero, se construyó el vector S100AAP.

La proteína S100A2 es una proteína de unión a calcio que se regula por incremento en asociación con la evolución del adenocarcinoma gástrico humano (1) y del tumor de mama (2). Para someter a prueba si AAP fusionada a S100 aumenta la inmunogenicidad de la proteína indicadora, se inyectaron a un grupo de ratones (N=5), cada uno, 1,05 µg de la proteína S100AAP recombinante equivalentes a 0,75 µg y 0,3 µg de AAP y S100A2, respectivamente. Se inyectó a un segundo grupo de ratones (N=5) cada uno una mezcla formada por 0,75 µg de AAP y 0,3 µg de S100A2. Se inyectaron a un tercer grupo de ratones (N=5) cada uno 0,3 µg de S100A2. A un cuarto grupo se le administraron 0,75 µg de AAP. Se disolvieron todas las proteínas en PBS y se administraron a los ratones s.c. Como control se inyectó a otro grupo de ratones (N=5) cada uno una disolución de tampón (PBS). La figura 10 muestra la respuesta de IgG total contra S100A2 a una dilución de 1/100 una semana tras la administración de la primera dosis. Tal como se esperaba se observó que ninguno de los sueros de los ratones inmunizados con AAP o con PBS mostraron ninguna reactividad positiva contra S100A2. Con la excepción de un ratón, la reactividad contra S100A2 disminuyó cuando la proteína se administró mezclada a la AAP tal como se notificó previamente para Cup a4 como indicación del efecto competitivo entre dos proteínas inmunogénicas cuando se administran como una mezcla (la reactividad del suero de un animal era negativa). Los datos de los ratones inmunizados con la proteína S100A2 sola indicaban que esa proteína también es inmunogénica en ratones en ausencia de adyuvante puesto que incluso la baja cantidad de proteína administrada pudo inducir una respuesta baja aunque positiva (DO media = 0,41). A pesar de eso se observó que no había ninguna competencia inmunitaria entre AAP y S100A2 en ratones inmunizados con S100AAP pero que, por otro lado, la reactividad contra S100A2 aumentaba (30%) cuando la proteína administrada estaba fusionada a AAP (DO media =0,54).

Tal como se muestra en la figura 11A, la capacidad adyuvante de AAP cuando se fusiona a la proteína indicadora se observó claramente tras la administración de una segunda dosis de S100AAP, S100A2, AAP + S100A2 y AAP (1,05 µg de S100AAP; 0,3 µg de S100A2; 0,75 µg de AAP más 0,3 µg de S100A2 y 0,75 µg de AAP). Se detectó una diferencia estadísticamente significativa en la reactividad contra S100A2 entre los sueros de los animales inmunizados con S100AAP y de los inmunizados con la proteína S100A2 sola. De acuerdo con las observaciones indicadas anteriormente con respecto a la reactividad contra Kmp11 y Cup a4 tras la administración de AAP no fusionada a las proteínas indicadoras, se detectó que la AAP no tenía ninguna capacidad adyuvante cuando no se fusiona a la proteína S100A2 indicadora. Por otro lado, también parece que se produce una competencia inmunitaria entre ambas proteínas. Por tanto, puede deducirse una característica inmunológicamente interesante de los tres diseños experimentales puesto que AAP necesita estar fusionada a la proteína indicadora para ejercer el efecto adyuvante. En otras palabras, esto significa que la capacidad adyuvante incorporada de AAP es relevante cuando está genéticamente fusionada a la proteína indicadora. El efecto adyuvante se observó

adicionalmente cuando se analizó el tipo de respuesta (figura 11B). Se detectó que no sólo la reactividad de IgG contra S100A2 aumentaba tras la administración de la S100AAP en relación con la reactividad contra S100A2 tras la administración de S100A2 o AAP + S100A2 sino que este aumento en reactividad también se observó cuando se analizó el tipo de IgG2a. La razón de reactividad de IgG1/IgG2a observada tras la administración de S100A2 tenía un valor medio de 2,1 mientras que era de 0,95 cuando se inmunizaron los animales con S100AAP como indicación de que la capacidad adyuvante de AAP cuando se fusiona a la proteína indicadora desencadena la respuesta de IgG1-IgG2a hacia IgG2a. De acuerdo con las observaciones indicadas anteriormente con respecto a la respuesta de IgG cuando se inmunizaron los animales con una mezcla de proteínas, se observó que la reactividad de IgG1 de los sueros de los animales inmunizados con S100AAP era significativamente superior a la de los sueros de los animales inmunizados con AAP+S100A2. La media de la respuesta de IgG2a en ambos casos era similar, como indicación adicional de la capacidad de AAP para revertir hacia IgG2a sólo cuando se fusiona a la proteína indicadora.

- 1- Identification of potential biomarkers for early and advanced gastric adenocarcinoma detection. Economescu MC, Necula LG, Dragu D, Badea L, Dima SO, Tudor S, Nastase A, Popescu I, Diaconu CC. Hepatogastroenterology. Noviembre-diciembre de 2010;57(104):1453-64.
- 2- McKiernan E, McDermott EW, Evoy D, Crown J, Duffy MJ. The role of S100 genes in breast cancer progression. Tumour Biol. 2011 Jun;32(3):441-50

La capacidad adyuvante de AAP en relación con S100A2 se observa, incluso más claramente, tras la administración de la tercera dosis tal como se indica:

Como indicación adicional de la capacidad adyuvante de AAP, se analizaron los sueros de los mismos animales obtenidos tras la administración de una tercera dosis de los antígenos. La figura 14 muestra la respuesta contra S100A2. Tras una curva de titulación de la dilución de los sueros usados para el análisis, se escogió una dilución de 1/6400 puesto que es la dilución que mejor discrimina la capacidad adyuvante de AAP. Se detectó claramente que la reactividad contra S100A2 de los sueros de los animales inmunizados con S100AAP es significativamente superior a la observada en los sueros de los animales inmunizados con cualquier mezcla de la proteína S100A2. Con el fin de saber si la AAP modula la respuesta humoral, se analizó la respuesta de IgG1 e IgG2a. Se observó un aumento en ambos tipos de respuestas. Cuando la proteína se administró sola, la razón media entre IgG2a/IgG1 era de 0,45. Sin embargo, la razón media entre IgG2a/IgG1 era de 1,6 cuando AAP se fusionaba a S100A2 como una indicación de que AAP modula la respuesta hacia IgG2a. Debe observarse, además, que AAP también modula la respuesta hacia IgG2a cuando se administra mezclada con S100A2 (razón media entre IgG2a/IgG1 equivalente a 1,1).

SEQ ID NO:2

**GGATCCTCTAGACCCATGTCCACCAAGTACCTCGCCGCGTACGCTCTGGCCTCC
CTGAG**

**CAAGGCGTCCCCGTCTCAGGCGGACGTGGAGGCTATCTGCAAGGCCGTCCACA
TCGACG**

**TCGACCAGGCCACCCTCGCCTTTGTGATGGAGAGCGTTACGGGACGCGACGTG
GCCACC**

CTGATCGCGGAGGGCGCCGCGAAGATGAGCGCGATGCCGGCGGCCAGCTCTGG
TGCCGC

TGCTGGCGTCACTGCTTCCGCTGCGGGTGATGCGGCTCCGGCTGCCGCCGCTGC
TAAGA

5 AGGACGAGCCGGAGGAGGAGGCCGACGACGACATGGGCCCCTCTAGAGTCGA
CCCCATG

CAGTACCTCGCCGCGTACGCCCTCGTGCGGATGTCTGGCAAGACGCCGTCGAA
GGCGGA

10 CGTTCAGGCTGTCCTGAAGGCCGCCGGCGTTGCCGTGGATGCCTCCCGCGTGGA
TGCCG

TCTTCCAGGAGGTGGAGGGCAAGAGCTTCGATGCGCTGGTGGCCGAGGGCCGC
ACGAAG

CTGGTGGGCTCTGGCTCTGCCGCTCCTGCTGGCGCTGTCTCCACTGCTGGTGCC
GGCGC

15 TGGCGCGGTGGCCGAGGCGAAGAAGGAGGAGCCCGAGGAGGAGGAGGCCGAT
GATGACA

TGGGCCCCGTCGACCTGCAGCCCGCCGCTGCCGCGCCGGCCGCCCTAGCGCC
GCTGCC

20 AAGGAGGAGCCGGAGGAGAGCGACGAGGACGACTTCGGCATGGGCGGTCTCTT
CTAA

SEQ ID NO:1

GSSRPMSTKYLAAYALASLSKASPSQADVEAICKAVHIDVDQATLAFVMESVTGRDV
AT

25 LIAEGAAKMSAMPAASSGAAAGVTASAAGDAAPAAAAAKKDEPEEEADDDMGPSR
VDPM

QYLAAYALVAMSGKTPSKADVQAVLKAAGVAVDASRVDAVFQEVEGKSFDALVAE
GRTK

LVGSGSAAPAGAVSTAGAGAGAVAEAKKEEPEEEEEADDDMGPVDLQPAAAPAAP
SAAA KEEPEESDEDDFGMGGLF

30

RESUMEN

La invención se refiere a un nuevo adyuvante y a su uso en combinación con un antígeno.

SEQUENCE LISTING

<110> Laboratorios LETI SL Unipersonal

<120> New adjuvant

<130> P6031289pct

<150> EP10190705.3

<151> 2010-11-10

<150> US61/412,034

<151> 2010-11-10

<160> 47

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 254

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> protein AAP

<400> 1

Gly Ser Ser Arg Pro Met Ser Thr Lys Tyr Leu Ala Ala Tyr Ala Leu
1 5 10 15

Ala Ser Leu Ser Lys Ala Ser Pro Ser Gln Ala Asp Val Glu Ala Ile
20 25 30

Cys Lys Ala Val His Ile Asp Val Asp Gln Ala Thr Leu Ala Phe Val
35 40 45

Met Glu Ser Val Thr Gly Arg Asp Val Ala Thr Leu Ile Ala Glu Gly
50 55 60

Ala Ala Lys Met Ser Ala Met Pro Ala Ala Ser Ser Gly Ala Ala Ala
65 70 75 80

Gly Val Thr Ala Ser Ala Ala Gly Asp Ala Ala Pro Ala Ala Ala Ala
85 90 95

Ala Lys Lys Asp Glu Pro Glu Glu Glu Ala Asp Asp Asp Met Gly Pro
100 105 110

Ser Arg Val Asp Pro Met Gln Tyr Leu Ala Ala Tyr Ala Leu Val Ala
115 120 125

Met Ser Gly Lys Thr Pro Ser Lys Ala Asp Val Gln Ala Val Leu Lys
130 135 140

Ala Ala Gly Val Ala Val Asp Ala Ser Arg Val Asp Ala Val Phe Gln
145 150 155 160

Glu Val Glu Gly Lys Ser Phe Asp Ala Leu Val Ala Glu Gly Arg Thr
165 170 175

Lys Leu Val Gly Ser Gly Ser Ala Ala Pro Ala Gly Ala Val Ser Thr
180 185 190

Ala Gly Ala Gly Ala Gly Ala Val Ala Glu Ala Lys Lys Glu Glu Pro
195 200 205

Glu Glu Glu Glu Ala Asp Asp Asp Met Gly Pro Val Asp Leu Gln Pro
210 215 220

Ala Ala Ala Ala Pro Ala Ala Pro Ser Ala Ala Ala Lys Glu Glu Pro
225 230 235 240

Glu Glu Ser Asp Glu Asp Asp Phe Gly Met Gly Gly Leu Phe
245 250

<210> 2
<211> 765
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> pAAP

<400> 2
ggatcctcta gacccatgtc caccaagtac ctcgccgcgt acgctctggc ctccctgagc 60
aaggcgctccc cgtctcaggc ggacgtggag gctatctgca aggccgtcca catcgacgtc 120
gaccaggcca ccctcgcctt tgtgatggag agcgttacgg gacgcgacgt ggccaccctg 180
atcgcgagg ggcgcgcgaa gatgagcgcg atgccggcgg ccagctctgg tgccgctgct 240

```

ggcgctcactg cttccgctgc ggggtgatgcg gctccggctg ccgccgctgc taagaaggac      300
gagccggagg aggaggccga cgacgacatg ggccccctcta gagtcgaccc catgcagtac      360
ctcgccgcgt acgccctcgt ggcgatgtct ggcaagacgc cgtcgaaggc ggacgttcag      420
gctgtcctga aggccgccgg cgttgccgtg gatgcctccc gcgtggatgc cgtcttccag      480
gaggtggagg gcaagagctt cgatgcgctg gtggccgagg gccgcacgaa gctggtgggc      540
tctggctctg ccgctcctgc tggcgctgtc tccactgctg gtgccggcgc tggcgcggtg      600
gccgaggcga agaaggagga gcccaggag gaggaggccg atgatgacat gggccccgtc      660
gacctgcagc ccgccgctgc cgcgccggcc gcccctagcg ccgctgcaa ggaggagccg      720
gaggagagcg acgaggacga cttcggcatg ggcggtctct tctaa                        765

```

```

<210> 3
<211> 132
<212> PRT
<213> Leishmania infantum

```

```

<400> 3

```

```

Met Ala Thr Pro Arg Ser Ala Lys Lys Ala Val Arg Lys Ser Gly Ser
1          5          10          15

```

```

Lys Ser Ala Lys Cys Gly Leu Ile Phe Pro Val Gly Arg Val Gly Gly
          20          25          30

```

```

Met Met Arg Arg Gly Gln Tyr Ala Arg Arg Ile Gly Ala Ser Gly Ala
          35          40          45

```

```

Val Tyr Leu Ala Ala Val Leu Glu Tyr Leu Thr Ala Glu Leu Leu Glu
          50          55          60

```

```

Leu Ser Val Lys Ala Ala Ala Gln Ser Gly Lys Lys Arg Cys Arg Leu
65          70          75          80

```

```

Asn Pro Arg Thr Val Met Leu Ala Ala Arg His Asp Asp Asp Ile Gly
          85          90          95

```

```

Thr Leu Leu Lys Asn Val Thr Leu Ser His Ser Gly Val Val Pro Asn
          100          105          110

```

Ile Ser Lys Ala Met Ala Lys Lys Lys Gly Gly Lys Lys Gly Lys Ala
 115 120 125

Thr Pro Ser Ala
 130

<210> 4
 <211> 691
 <212> DNA
 <213> Leishmania infantum

<400> 4
 gcctcatccg tcatccgtca tctttgtgct acagctttac tctcactccc ctccaacctta 60
 cccatcgcag ccatggctac tcctcgcagc gccaagaagg ccgtccgcaa gagcgggtcc 120
 aagtccgcga aatgtggtct gatcttcccg gtgggccgcg tcggcgggat gatgcgccgc 180
 ggccagtacg ctgcgccat cgggtgcctct ggcgccgtgt acctggccgc cgtgctggag 240
 tacctgacgg cggagctgct ggagctgtcc gtgaaggcgg ccgcgcagag cgggaagaag 300
 cggtgccgcc tgaacccgcg caccgtgatg ctggccgcgc gccacgacga cgacatcggc 360
 acgcttctga agaacgtgac cttgtctcac agcggcgttg tgccgaacat cagcaaggcg 420
 atggcaaaga agaagggcgg caagaagggc aaggcgacac cgagcgcgta agtcctccgg 480
 cctgacagcg cacacgcgcc gctgtattgt gcgcgtgcgc gcgggtcccg actggggccg 540
 gcgatgaggg gcatcatacc tccatagaga ccctatcttt tgttttatgg cttctcagat 600
 gaccacttgg ttcttcctgc ctttgtttgg tttgtttctc tcctcccctc cgccgaggggt 660
 acgagtcagg gtaggctcgg aaaaaaaaa a 691

<210> 5
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Leishmania infantum

<400> 5

Met Ala Ser Ser Arg Ser Ala Pro Arg Lys Ala Ser His Ala His Lys
 1 5 10 15

Ser His Arg Lys Pro Lys Arg Ser Trp Asn Val Tyr Val Gly Arg Ser
 20 25 30

Leu Lys Ala Ile Asn Ala Gln Met Ser Met Ser His Arg Thr Met Ser
35 40 45

Ile Val Asn Ser Tyr Val Asn Asp Val Met Glu Arg Ile Cys Met Glu
50 55 60

Ala Ala Ser Ile Val Arg Ala Asn Lys Lys Arg Thr Leu Gly Ala Arg
65 70 75 80

Glu Val Gln Thr Ala Val Arg Ile Val Leu Pro Ala Glu Leu Ala Lys
85 90 95

His Ala Met Ala Glu Gly Thr Lys Ala Val Ser Ser Ala Ser Ala
100 105 110

<210> 6
<211> 894
<212> DNA
<213> Leishmania infantum

<400> 6
ccaagccagc caaatccttc gcactttcac gctgtccctc ctttccaacc aaccacatc 60
accatggcct cttctcgctc tgctccccgc aaggcttccc acgcgcacaa gtcgcaccgc 120
aagccgaagc gctcgtggaa cgtgtacgtg ggccgctcgc tgaaggcgat caacgcccag 180
atgtcgatgt cgcaccgcac gatgagcatc gtgaactcgt acgtgaacga cgtgatggag 240
cgcatctgca tggaggccgc gtcgatcggt cgcgcgaaaca agaagcgcac gttgggtgcg 300
cgcgaggtgc agacggcggt gcgcattgtg ctgccggcgg agctcgcgaa gcacgccatg 360
gctgagggca cgaaggccgt gtcgagcgcg tcggcttgag cggctcagtt agagggtttg 420
tccacgcctc ggccgtgtgt ccgggggtgtg gggtagcctc aactcccctc tccccgccta 480
cgccgtgggt tttcatagag atttattgtt tctttttcga ttctctttcc ttgaaggtga 540
tgtctcgtcc tttgctggag tgcgtgccgg gttcgcgggc ggtagaaagc agcggcggag 600
gaggcagcgg cggcgcgaga cgggtgaaggg gaggagaggc gggccgaaag cacagatgcg 660
cttctccgtc tctttctccc ttctctgcat tcgccctcgc tgctcctctc tgatgccctc 720
gtacctcgtg gtgcgcgcgt ctcccgtcgc ccgtccgcgc cacgctgcac agaggcgtgc 780
acggtttgtc ttctatctca gaacgagtga cacacacgtt ttcttggtcc cccctcccc 840

cttcgtcatc gcttcttcgt tttcgttgtc gtctcgacgc ccaaaaaaaaa aaaa

894

<210> 7
<211> 129
<212> PRT
<213> Leishmania infantum

<400> 7

Met Ser Arg Thr Lys Glu Thr Ala Arg Ala Lys Arg Thr Ile Thr Ser
1 5 10 15

Lys Lys Ser Lys Lys Ala Pro Ser Gly Ala Ser Gly Val Lys Arg Ser
20 25 30

His Arg Arg Trp Arg Pro Gly Thr Cys Ala Ile Arg Glu Ile Arg Lys
35 40 45

Phe Gln Lys Ser Thr Ser Leu Leu Ile Gln Cys Ala Pro Phe Gln Arg
50 55 60

Leu Val Arg Gly Val Glu Arg Gln Lys Glu Gly Leu Arg Phe Gln Ser
65 70 75 80

Ser Ala Ile Met Ala Leu Gln Glu Ala Thr Glu Ala Tyr Ile Val Ser
85 90 95

Leu Met Ala Asp Thr Asn Leu Ala Cys Ile His Ala Lys Arg Val Thr
100 105 110

Ile Gln Pro Lys Asp Ile Gln Leu Ala Leu Arg Leu Arg Gly Glu Arg
115 120 125

His

<210> 8
<211> 587
<212> DNA
<213> Leishmania infantum

<400> 8

gtttcactac cgccatccaa cccctgcca ctcccacccc caccgcacca ccatgtcccg

60

```

caccaaggag accgcccgcg cgaagcgcac catcacgtcg aagaagagca agaaggcgcc 120
gagcggggcg tccggcgtga agaggtcgca tcgccgctgg cgcccgggca cctgcgcat 180
ccgcgagatc cgcaagttcc agaagagtac gagcctgctg atccagtgcg cgccgttcca 240
gcgcctggtg cgaggtgtcg agcggcagaa ggagggcctg cgcttccaga gcagcgctat 300
catggcgctg caggaggcga cggaggcgta cattgtgtcg ctgatggcgg acacgaacct 360
cgcctgcatc cacgcgaagc gcgtgacgat ccagccgaag gacatccagc tggcgctgcg 420
cctgcgcggt gagcgccact agggcggggc cgctctcccc cccctcatag ataccatgtt 480
tttgtttcct ttcttttcgc cttccctaag tcgtgcacgc tgccctgccg cggcagccga 540
gagagtgaga gggtcattga acctctagag cccgccaaaa aaaaaaa 587

```

```

<210> 9
<211> 100
<212> PRT
<213> Leishmania infantum

```

```

<400> 9

```

```

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

```

```

Gln Lys Lys Val Leu Arg Asp Asn Ile Arg Gly Ile Thr Arg Gly Cys
20          25          30

```

```

Val Arg Arg Met Ala Arg Arg Gly Gly Val Lys Arg Ile Ser Thr Glu
35          40          45

```

```

Val Tyr Glu Glu Val Arg Arg Val Leu Lys Ala Tyr Val Glu Asp Ile
50          55          60

```

```

Val Arg Cys Ser Thr Ala Tyr Thr Glu Tyr Ala Arg Lys Lys Thr Val
65          70          75          80

```

```

Thr Ala Cys Asp Val Val Thr Ala Leu Arg Lys Gln Gly His Ile Leu
85          90          95

```

```

Tyr Gly Tyr Ala
100

```

<210> 10
 <211> 531
 <212> DNA
 <213> Leishmania infantum

<400> 10
 gctccctttc ttgcctcctc tccccccac gcctcctccc ttcacatata caccatggcc 60
 aagggcaagc gttccactga tgccaagggc agccagaggc gccagaagaa ggtgctgcgc 120
 gacaacatcc gcggcatcac tcgcggtctg gtccgccgca tggcgcgccg cgggtggcgtg 180
 aagcgcatct cgaccgaggt gtacgaagag gtgcgccgtg tgctgaaggc ctacgtggag 240
 gacattgtgc gctgcagcac ggcctacacc gagtacgcgc gcaagaagac cgtgacggcg 300
 tgcgatgttg tgaccgcgct gcgcaagcaa ggccacatcc tgtacggcta cgcgtaaata 360
 ctgcgagagc cgctgcacac tcatagatac accttctttg ttcattgccgt cgtttcgttg 420
 gctttcttgg ttttcgactt cccttcccc cactatggct tttctttcgt ctcgtgctgg 480
 cacccttccc tactcatcgc tgtttgctga aggcagtaca gaacgaagcg g 531

<210> 11
 <211> 323
 <212> PRT
 <213> Leishmania infantum

<400> 11
 Met Pro Ser Ile Thr Thr Ala Lys Arg Glu Tyr Glu Glu Arg Leu Val
 1 5 10 15
 Asp Cys Leu Thr Lys Tyr Ser Cys Val Leu Phe Val Gly Met Asp Asn
 20 25 30
 Val Arg Ser Gln Gln Val His Asp Val Gly Arg Ala Leu Arg Ala Lys
 35 40 45
 Ala Glu Phe Met Met Gly Lys Lys Thr Leu Gln Gly Lys Ile Val Glu
 50 55 60
 Lys Arg Ala Gln Ala Lys Asp Ala Ser Pro Glu Ala Lys His Phe Asn
 65 70 75 80
 Asp Gln Cys Glu Glu Tyr Asn Leu Leu Ser Gly Asn Thr Gly Leu Ile

85										90					95				
Phe	Thr	Asn	Asn	Ala	Val	Gln	Glu	Ile	Thr	Ser	Val	Leu	Asp	Ala	His				
			100					105					110						
Arg	Val	Lys	Arg	Ala	Ala	Arg	Val	Gly	Ala	Ile	Ser	Pro	Cys	Asp	Val				
		115					120					125							
Ile	Val	Ala	Ala	Gly	Ser	Thr	Gly	Met	Glu	Pro	Thr	Gln	Thr	Ser	Phe				
	130					135					140								
Phe	Gln	Ala	Leu	Asn	Ile	Ala	Thr	Lys	Ile	Ala	Lys	Gly	Met	Val	Glu				
145					150					155					160				
Ile	Val	Thr	Glu	Lys	Lys	Val	Leu	Ser	Val	Gly	Asp	Lys	Val	Asp	Asn				
				165					170					175					
Ser	Thr	Ala	Thr	Leu	Leu	Gln	Lys	Leu	Asn	Ile	Ser	Pro	Phe	Tyr	Tyr				
			180					185					190						
Gln	Val	Asn	Val	Leu	Ser	Val	Trp	Asp	Arg	Gly	Val	Leu	Phe	Thr	Arg				
		195					200					205							
Glu	Asp	Leu	Met	Met	Thr	Glu	Asp	Met	Val	Glu	Lys	Met	Leu	Met	Glu				
	210					215					220								
Gly	Leu	Ser	Asn	Val	Ala	Ala	Met	Ala	Leu	Gly	Ala	Gly	Ile	Pro	Thr				
225					230					235					240				
Ser	Ser	Thr	Ile	Gly	Pro	Met	Leu	Val	Asp	Ala	Phe	Lys	Asn	Leu	Leu				
				245					250					255					
Ala	Val	Ser	Val	Ala	Thr	Ser	Tyr	Glu	Phe	Glu	Glu	His	Asn	Gly	Lys				
			260					265					270						
Glu	Leu	Arg	Glu	Ala	Ala	Ile	Asn	Gly	Leu	Leu	Ala	Gly	Ser	Cys	Ser				
		275					280					285							
Ala	Ala	Ala	Glu	Pro	Ala	Ala	Ala	Ala	Pro	Ala	Ala	Pro	Ser	Ala	Ala				
	290					295					300								

Ala	Lys	Glu	Glu	Pro	Glu	Glu	Ser	Asp	Glu	Asp	Asp	Phe	Gly	Met	Gly
305					310					315					320

Gly Leu Phe

<210> 12
 <211> 3790
 <212> DNA
 <213> Leishmania infantum

<400> 12

atgcgcgcgc	gcgcgcgaga	gagcatgtat	ccctgcgtgc	cttcaatgga	gacttgacac	60
ccctcttctc	tgctctctgc	tttctgtctc	gtccccta	taccttgact	gccttttact	120
tgttcccttt	ctatttcctc	gggttttggc	aaccttcctt	atgcgcccaa	caccacaaac	180
ataccacacc	acaaatcggt	gcttcacggc	ctcccctcgt	gctttgcagc	tccctttagc	240
aacgatgccg	tctatcacca	ctgccaagcg	cgagtacgag	gagcgccctg	tcgactgcct	300
gaccaagtac	agctgcgtgc	tgttcgtggg	catggacaac	gtccgctcgc	agcaggtgca	360
cgatgtcggc	cgtgcgctgc	gcgcgaaggc	cgagttcatg	atgggcaaga	agacgctgca	420
gggcaagatc	gtggagaagc	gcgcgcaagc	caaggacgcg	agccccgagg	cgaagcactt	480
caacgatcag	tgtgaggagt	acaacctgct	gagcggcaac	accggcctca	tcttcacgaa	540
caacgctgtc	caggagatca	cgtctgtgct	tgacgcgcac	cgcgtaagc	gcgcggcgcg	600
tgtcggagcg	atttccccgt	gtgacgtgat	tgctcgtgct	ggcagcaccg	gcatggagcc	660
gaccagacg	tccttcttcc	aggcgtgaa	cattgcgacg	aagattgcca	agggtatggt	720
ggagatcgtg	acggagaaga	aggtgctgag	cgtcggcgac	aaggtggaca	actcgacggc	780
gacgctgctg	caaaagctga	acatcagccc	gttctactac	caggtgaatg	tgctgtccgt	840
gtgggaccgc	ggtgtgctgt	tcaccgcga	ggacctgatg	atgacggagg	acatggtgga	900
gaagatgctg	atggaaggcc	tgagcaacgt	tgcggcgatg	gcgctgggtg	ctggcatccc	960
gacgtcttcg	acgattggcc	cgatgctggt	ggacgccttc	aagaacctgc	tggctgtctc	1020
tgtggcgacc	tcgtacgagt	tcgaggagca	caacggcaag	gagctgcgcg	aggccgcgat	1080
caacggcctg	ctggccggct	cttgctcggc	tgctgcggag	cccgccgctg	ccgcgccggc	1140
cgcccctagc	gccgctgcca	aggaggagcc	ggaggagagc	gacgaggacg	acttcggcat	1200

gggcgggtctc	ttctaagcga	ctcgccatct	cttagcctcc	ttgtggtgcg	cttgaggtgc	1260
tctcgctctg	cttctccttg	cagtgttggc	tgactctagc	gggtatgtgt	cgtcgcatta	1320
caccacctc	tcccacccct	ttgctctacg	cgctcgcacg	cgcaatccgt	gaatcatcga	1380
gggaagtctc	tctgggtggc	agtgggtaag	cttgtgagga	aagaggtgtg	tgtgtgagcg	1440
ggcaggtacg	tcggaccact	taaacaaaca	aacacacaca	cacacggaaa	gactcacgta	1500
cagcatccgt	ccggcgcaac	agcaacgtcc	gccgcgcgaa	gcagagcgcg	tgcgctcatt	1560
gtaccgctgt	gaacggagga	gggggggact	cttcgctttt	ttctttttct	tttttttggt	1620
tcggtagttt	attcttcatt	ttccgtctca	actcaaaaaa	cagcacaaaa	acgcggaaac	1680
gcagcatgag	tggcgccgtt	gcaatcgggg	acggtggcgg	cgcaacgcgt	cgtggcaact	1740
gcgcatgggt	tgctatctga	tggatggttg	cactgctgct	cgaacacagg	tggacctccc	1800
cccccccg	aacgacgacg	tccggtcgag	tcgcgggcgt	gtggccgtga	gcacagggta	1860
gcctttcttt	gcgtcgcaca	gcacctatcg	tcgtcgtcgg	cactcctcat	cacatctccc	1920
tcgtgtcgca	cgaaggtgtg	ctgtctgtga	ggacgcttcc	gtgtgagtag	gtgcgtgcaa	1980
acatgcgtgc	atcggcaccg	gatcgcggtc	gggtaggttc	cacgctcctg	gagggtcgca	2040
agtgtcttgc	tgctccaggt	gactgatgac	caaggccata	tcctcacgca	acaccttcac	2100
tgctgccg	ctgctttcct	ccagcacgaa	gcgagcacag	gggcacgggt	gggggcggca	2160
agcgagtagc	ctctgaggtt	gtgcgtaggc	gacacgtcgt	gtgccagtgg	gactgcgca	2220
ccttttcagt	gttgtgtgtg	gaacacaggg	tcggcgcacg	ctgtcttcgg	tgatgctttc	2280
tcattatgag	ccgcttgccg	agcgtgcg	cgacccccgg	cccctcctca	cctcctcg	2340
cggagttaac	gcgtgcacgc	tgtgtcccct	gtgtaaagac	agcttcccc	accccttgt	2400
caactccctc	tcggtccgtc	tttctcgcgt	tcattctctc	ttcttcgtga	acgaaacacg	2460
accactcgcc	tcgcatattc	cgcgtgccca	atatcccact	cactccctta	cacatgcatt	2520
gtccgtgcc	caaccggcg	cacacttcgg	cacacgaaaa	acaccttccc	cgacccacg	2580
acagatagcc	aaggctattg	caagtctcac	aagatgccgt	ctatcaccac	tgccaagcgc	2640
gagtacgagg	agcgccctgt	cgactgcctg	accaagtaca	gctgcgtgct	gttcgtgggc	2700
atggacaacg	tccgctcgca	gcaggtgcac	gatgtcggcc	gtgcgctg	cgcggaaggcc	2760
gagttcatga	tgggcaagaa	gacgctgcag	ggcaagatcg	tggagaagcg	cgcgcaagcc	2820

```

aaggacgcga gccccgaggc gaagcacttc aacgatcagt gtgaggagta caacctgctg 2880
agcggcaaca ccggcctcat cttcacgaac aacgctgtcc aggagatcac gtctgtgctt 2940
gacgcgcacc gcgtgaagcg cgcggcgcgt gtcggagcga tttccccgtg tgacgtgatt 3000
gtcgtgctg gcagcaccgg catggagccg acccagacgt ctttcttcca ggcgctgaac 3060
attgcgacga agattgccaa gggatatgtg gagatcgtga cggagaagaa ggtgctgagc 3120
gtcggcgaca aggtggacaa ctcgacggcg acgctgctgc aaaagctgaa catcagcccc 3180
ttctactacc aggtgaatgt gctgtccgtg tgggaccgcg gtgtgctggt caccgcgag 3240
gacctgatga tgacggagga catggtggag aagatgctga tggaaggcct gagcaacgtt 3300
gcggcgatgg cgctgggtgc tggcatcccg acgtcttcga cgattggccc gatgctggtg 3360
gacgccttca agaacctgct ggctgtctct gtggcgacct cgtacgagtt cgaggagcac 3420
aacggcaagg agctgcgcga ggccgcgata aacggcctgc tggccggctc ttgctcggct 3480
gctgcggagc ccgccgctgc cgcgccggcc gcccctagcg ccgctgcaa ggaggagccg 3540
gaggagagcg acgaggacga cttcggcatg ggcggtctct tctaagcgac tcgccatctc 3600
ccactgagca ccgtcgagtg ttcgtgtggt cgcaggggtg acagcggcga gcgtgtgatg 3660
cccttggate atcaggaagc aactctctcc ctttctctct gtgttcttcg tttcttcttt 3720
cattagtttt ggatcgccgt gcgctgcgca tcgctcagtt ctcatTTata tcaataacaa 3780
caacgaagac 3790

```

```

<210> 13
<211> 260
<212> PRT
<213> Leishmania major

```

```

<400> 13

```

```

Met Gly Lys Thr Val Leu Ser Cys Arg Lys Gly Asn Gly Ser Val Tyr
1           5           10           15

```

```

Gln Val His Gly His Lys Arg Leu Gly Pro Ala Lys Leu Arg Ile Leu
20           25           30

```

```

Asp Tyr Ala Glu Arg His Gly Tyr Met Arg Gly Val Val Lys Ser Ile
35           40           45

```

Glu His Glu Ala Gly Arg Gly Ala Ala Leu Ala Arg Val Glu Phe Arg
50 55 60

His Pro Tyr Lys Phe Arg Arg Val Lys Glu Leu Met Val Ala Pro Glu
65 70 75 80

Gly Met Phe Thr Gly Gln Ser Val Phe Cys Gly Gln Lys Ala Pro Leu
85 90 95

Ala Ile Gly Asn Val Leu Pro Leu Gly Gln Ile Thr Glu Gly Cys Ile
100 105 110

Val Cys Asn Val Glu Ala Lys Pro Gly Asp Arg Gly Thr Leu Ala Arg
115 120 125

Ala Ser Gly Asp Tyr Cys Ile Ile Ile Ser His Asn His Glu Thr Gly
130 135 140

Arg Thr Arg Leu Lys Leu Pro Ser Gly Gln Lys Lys Ser Val Pro Ser
145 150 155 160

Thr Ser Arg Ala Met Ile Gly Ile Ile Ser Gly Gly Gly Arg Ile Glu
165 170 175

Lys Pro Val Leu Lys Ala Gly Asn Ser Phe Tyr Arg Phe Arg Gly Lys
180 185 190

Arg Asn Cys Trp Pro Lys Val Arg Gly Val Ala Arg Asn Pro Val Glu
195 200 205

His Pro His Gly Gly Gly Asn His Gln His Ile Gly His Pro Ser Thr
210 215 220

Val Ser Arg His Ser Pro Pro Gly Gln Lys Val Gly Leu Ile Ala Ala
225 230 235 240

Arg Arg Thr Gly Arg Ile Arg Gly Gly Lys Ala Val Lys Gly Ala Trp
245 250 255

His Pro Glu Glu

<210> 14
 <211> 783
 <212> DNA
 <213> Leishmania major

<400> 14
 atgggtaaga ctgtgctgag ctgccgtaag ggcaacggct ccgtgtacca ggtgcacggc 60
 cacaagcgcc ttggccccgc caagctgcgc attctggact acgccgagcg ccacggctac 120
 atgcgcggtg tggatgaagtc gatcgagcac gaggctggcc gcggtgcggc gctggcgcgc 180
 gtggagttcc gccacccgta caagttccgc cgcgtgaagg agctgatggt ggcgccggag 240
 ggcatgttca ccggccagtc ggtgttctgc ggccagaagg ccccgctcgc gatcggcaac 300
 gtgctgcccc ttggccagat cacggagggc tgcatttgtt gcaacgtgga ggcgaagccc 360
 ggtgaccgcg gcacgctggc gcgcgcgtcc ggcgactact gcatcatcat ctcgcacaac 420
 cacgagacag gccgcacgcg cctgaagctg ccgagcgggc agaagaagtc cgtgccgagc 480
 acgagccgcg cgatgatcgg catcatcagc ggcggtggcc gcatcgagaa gcccgtgctg 540
 aaggccggta actcgttcta ccgcttccgc ggcaagcgca actgctggcc caaggtgcgt 600
 ggtgttgccc gcaaccgggt ggagcaccg cacggtggtg gtaaccatca gcacattggc 660
 caccgctcga cgggtgctcg ccactcgccg ccgggccaga aggtgggtct gatcgctgcc 720
 cgtcgcaccg gccgtattcg cggtggtgaag gctgtcaagg gcgcgtggca cccggaggag 780
 taa 783

<210> 15
 <211> 252
 <212> PRT
 <213> Leishmania major

<400> 15

Met Ala Thr His Ser Val Tyr Gly Asn Ala Ser Asp Met Pro Ala Val
 1 5 10 15

Pro Ala Pro Glu Ser Ala Ile Lys Arg Ala Ala Phe Lys Gln Gln Gln
 20 25 30

Thr Glu Ser Phe Lys Lys Ala Val Val Ala Arg Lys Ala Ala Lys Ala

35	40	45															
Ala	Leu	Lys	Lys	Thr	Ala	Tyr	Leu	Arg	Ala	Arg	Lys	Tyr	Ser	Arg	Glu		
50						55					60						
Tyr	Arg	Gly	Ala	Glu	Lys	Lys	Leu	Val	Thr	Leu	Arg	Arg	Gln	Ala	Ala		
65					70					75					80		
Ser	His	Gly	Asn	Tyr	Tyr	Leu	Glu	Ala	Lys	Pro	Lys	Val	Ala	Val	Val		
				85					90					95			
Thr	Arg	Ile	Arg	Gly	Ile	Ala	Lys	Val	Asn	Pro	Lys	Gln	Arg	Lys	Ile		
			100					105					110				
Leu	Gln	Leu	Leu	Arg	Leu	Arg	Gln	Ile	Phe	Asn	Thr	Val	Phe	Val	Lys		
		115					120					125					
Met	Asn	Lys	Pro	Met	Glu	Asn	Met	Leu	Arg	Ala	Val	Glu	Pro	Tyr	Ile		
	130					135					140						
Ala	Tyr	Gly	Tyr	Pro	Ser	Leu	Ala	Thr	Val	Arg	Ala	Met	Val	Tyr	Lys		
145					150					155					160		
Arg	Gly	Tyr	Leu	Lys	Ile	Asn	Gly	Gln	Arg	Val	Lys	Ile	Thr	Asp	Asn		
				165					170					175			
Gln	Met	Ile	Lys	Asp	Lys	Tyr	Asn	Asn	Val	Asp	Ile	Val	Cys	Ala	Glu		
			180					185					190				
Asp	Met	Val	Asn	Gln	Ile	Tyr	Thr	Cys	Gly	Lys	His	Phe	Arg	Thr	Val		
		195					200					205					
Thr	His	Gly	Met	Trp	Pro	Phe	Lys	Leu	Ala	Pro	Pro	Ala	Gly	Gly	Met		
	210					215					220						
Arg	Gln	Lys	Arg	Arg	His	Phe	Val	Glu	Gly	Gly	Asp	Tyr	Gly	Asn	Arg		
225					230					235					240		
Asp	Thr	Leu	Ile	Asn	Arg	Phe	Leu	Ala	Arg	Met	Ile						
				245					250								

<210> 16
 <211> 759
 <212> DNA
 <213> Leishmania major

<400> 16
 atggccacac actcagttta cggcaacgca tccgacatgc ccgctgtccc tgcccctgag 60
 tccgcgatca agcgtgctgc gttcaagcag cagcagacgg agagcttcaa gaaggccgtg 120
 gtggccagaa aggctgccaa ggctgccctg aagaagaccg cctacctgcg tgcccgcaaa 180
 tactcccgcg agtaccgcgg tgcggagaag aagctggtga cgctgcgccg ccaggccgcc 240
 tctcacggta actactacct ggaggcgaag ccgaaggttg ccgtggtgac tcgcatccgc 300
 ggtatcgcca aggtgaaccc gaagcagcgc aagattcttc agttgctgcg cctgcgccag 360
 atcttcaaca cgggtgtttgt gaagatgaac aagccgatgg agaacatgct gcgtgcggtg 420
 gagccctaca tcgcgtacgg ctaccgcgtc ctggccaccg tccgcgcgat ggtgtacaag 480
 cgcggtacc tgaagatcaa cggccagcgc gtgaagatca ccgacaacca gatgatcaag 540
 gataagtaca acaacgtgga cattgtgtgt gccgaggata tgggtgaacca gatctacacc 600
 tgcggaagc acttccgcac ggtgacgcac ggcatgtggc ctttcaagct ggcccctccg 660
 gccggtggca tgcgccagaa gcgccgtcac ttcgtggagg gtggcgacta tggtaacccg 720
 gacaccttga tcaaccgctt cctcgcccgc atgatctga 759

<210> 17
 <211> 264
 <212> PRT
 <213> Leishmania major

<400> 17

Met Pro Gly Lys Glu Val Lys Lys Val Thr Gln Pro Ala Lys Ala Ala
 1 5 10 15

Ser Pro Tyr Lys Lys Pro Ala Val Ala Ser His Phe Ala Ala Arg Pro
 20 25 30

Lys Asn Phe Gly Ile Gly Gln Asp Val Pro Tyr Ala Arg Asp Leu Ser
 35 40 45

Arg Phe Met Arg Trp Pro Thr Phe Val Thr Met Gln Arg Lys Lys Arg

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

<210> 18
 <211> 795
 <212> DNA
 <213> Leishmania major

<400> 18
 atgcccggca aggaagtgaa gaaggtgacg cagcccgcga aggccgcgtc tccgtacaag 60
 aagcccgccg ttgcgtcgca tttcgcggcc cgcccgaaga acttcggtat tggccaggat 120
 gtgccgtacg cgcgtgacct gtcccgcctt atgcggtggc cgacgttcgt gacgatgcag 180
 cgcaagaagc gcggtgctgca gcgccgcctg aaggtgccgc cggcgctgaa ccagttcacg 240
 aaggtgctgg accgcgcgag ccgaaacgag gcgctgaagc tgattaagaa gtacgcgccg 300
 gagaccgcga aggctcggcg cgagcgcctg cagaaggttg ccgaggagaa gaagaaggac 360
 ccgaagaaga cggatatcgac gaaggctccc ctggctgttg tgaccggtct gcaggagggtg 420
 acgcgcgcga tcgagaagaa gcaggctcgc atggttgtga tcgcaacaa cgtggaccct 480
 gtggagctcg tgctgtggat gccgaacctg tgccgcgcga acaagatccc gtatgccatc 540
 gtgaaggaca tggcgcgcct gggcgatgcg atcgggcgga agacggcgac gtgcgttgcg 600
 ctcaccgacg tgaacgccga ggatgaggcg acgctgaaga acctgatccg ctccgtgaac 660
 gctcgcttct tgtcccgtc ggacgtgatc cgccgccagt ggggtggtct gcagctgtct 720
 ctgcgatccc gcgcgagct gcgcaagaag catgcccgcga acgctggtgt ggacgccgcg 780
 gccatcatcc agtaa 795

<210> 19
 <211> 222
 <212> PRT
 <213> Leishmania major

<400> 19
 Met Ala Phe Pro Ser Arg Lys Asp Ala Phe Arg Ala Gln Arg Lys Gly
 1 5 10 15
 Ala Lys Lys His Arg Pro Glu Ile Ile Val Ile Asp Leu Lys Asp His
 20 25 30
 Val Leu Gly Arg Ala Ala Ala Val Val Ala Lys Gln Leu Leu Leu Gly
 35 40 45

Lys Lys Ile Thr Val Val Arg Cys Glu Gln Leu Asn Ile Ala Gly Thr
50 55 60

Glu Ile Arg Asn Lys Ile Lys Tyr Leu Gln Tyr Leu Arg Lys Arg Lys
65 70 75 80

Leu Thr Asn Pro Thr Lys Gly Pro Phe His His Arg Ala Pro Ser Asp
85 90 95

Val Phe Val Arg Thr Val Arg Ser Met Leu Pro Arg Tyr Thr Lys Arg
100 105 110

Gly Met Lys Ala Leu Asn Ser Leu Val Ala Tyr Glu Gly Ile Pro Pro
115 120 125

Asn Val Val Arg Thr Gly Gly Arg Val Val Ile Pro Arg Ala Gln Arg
130 135 140

His Val Cys Tyr Arg Ser Glu Arg Pro Tyr Thr Val Leu Gly Asn Met
145 150 155 160

Cys Lys His Val Gly Trp Lys Tyr Ser Asp Val Val Ala Asn Leu Glu
165 170 175

Lys Ala Arg Val Glu Lys Ala Ser Arg His His Glu Lys Gln Ala Lys
180 185 190

Leu Arg Asp Ala Trp Lys Ser Ala Arg Lys Glu Ala Leu Ala Lys Met
195 200 205

Pro Lys His Asn Val Glu Val Leu Lys Lys Phe Gly Tyr Ala
210 215 220

<210> 20
<211> 669
<212> DNA
<213> Leishmania major

<400> 20
atggcctttc ctagccgcaa ggatgcgttc cgcgcgcagc gcaagggcgc caagaagcac 60
cgccccgaga tcatcgtgat cgacctgaag gatcacgtgc ttggtcgcgc ggcggctgtg 120

```

gttgccaagc agctgctcct gggtaagaag atcaccgtgg tgcgctgcga gcagctcaac      180
attgccggta cggagatccg caacaagatc aagtacctgc agtacctgcg caagcggaag      240
ctgacgaacc ccacaaaggg tcccttccac caccgtgccc cgtccgacgt gtttgtccgc      300
actgtgcgca gcatgctgcc ccggtacacg aagcgcgcca tgaaggcgct taactcgctg      360
gtggcctacg agggaattcc gcccaacgtg gtgcgcacgg gcgggcgcggt ggtgatcccg      420
cgcgcccagc gccatgtgtg ctaccgctcg gagcgtcctt acacagtgtc cggcaacatg      480
tgcaagcacg tgggctggaa gtacagcgac gtcgtcgcca atctcgagaa ggctcgcgctg      540
gagaaggcgt cccgccacca cgaaaagcag gcgaagcttc gcgacgcgtg gaagtcggcc      600
cgcaaggagg cgctcgccaa gatgcccaag cacaacgtgg aggtgctgaa gaagtttggc      660
tacgcgtag                                     669

```

```

<210> 21
<211> 273
<212> PRT
<213> Leishmania major

```

```

<400> 21

```

```

Met Ala Lys Lys His Leu Lys Arg Leu Tyr Ala Pro Lys Asp Trp Met
1           5           10           15

```

```

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

```

```

His Lys Leu Arg Glu Cys Leu Pro Leu Leu Val Ile Ile Arg Asn Arg
35           40           45

```

```

Leu Lys Tyr Ala Leu Asn Ala Arg Glu Gly Glu Met Ile Leu Arg Gln
50           55           60

```

```

Gly Leu Val His Val Asp Asn His Pro Arg Arg Asp Gly Lys Tyr Pro
65           70           75           80

```

```

Ala Gly Phe Met Asp Val Val Glu Ile Pro Lys Thr Gly Asp Arg Phe
85           90           95

```

```

Arg Leu Met Tyr Asp Val Lys Gly Arg Phe Ala Leu Val Asn Leu Ser

```

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

Lys

<210> 22
 <211> 822
 <212> DNA
 <213> Leishmania major

<400> 22
 atggccaaga agcacctcaa gcgcttgat ggcaccaagg actggatgct gagcaagctg 60

```

accggcgtgt tcgcgccgcg tccgcgtccg ggtccgcaca agctgcgcga gtgcctgccg 120
ctgctggtga tcatccgcaa ccggctgaag tacgcgctga acgcgcgcga gggtagatg 180
atcctgcgcc agggctctggt gcacgtggac aaccacccgc gccgcgacgg caagtatccc 240
gccggtttca tggacgtggt cgagatcccg aagacgggcg accgcttccg cctgatgtac 300
gacgtcaagg gccgcttcgc gttggtgaac ctgtccgagg cggaggcgca gatcaagctg 360
atgaaggttg tgaacctgta cacggccacc ggccgcgtgc cggtcgctgt gacgcacgac 420
ggccaccgca tccgctaccc ggaccgcac acctccattg gtgacaccat cgtgtacaac 480
gtcaaggaga agaagtgcgt ggacctgatc aagaaccgcc agggcaaggc cgtgatcgtg 540
accggtggcg ccaaccgcgg ccgcatcggc gagatcgtga aggtggagtg ccaccccggt 600
gcgttcaaca ttgcgcacct gaaggacgcg tccggcgccg agttcgccac ccgcgccgcg 660
aacatcttcg tgatcggcaa ggacctgaac aacctgcagg taacggtgcc gaagcagcag 720
ggcctgcgca tgaacgtgat ccaggagcgc gaggagcgcc tgatcgcggc ggaggcccg 780
aagaacgcgc cggctcgtgg tgcccgcagg gcccgcgaagt ga 822

```

```

<210> 23
<211> 249
<212> PRT
<213> Leishmania major

```

```

<400> 23

```

```

Met Lys Leu Asn Ile Ala Tyr Pro Arg Asn Gly Thr Val Lys Gln Phe
1           5           10           15

```

```

Glu Ile Ser Asp Glu Val Leu Arg Arg Val Gln Leu Gln Asp Tyr Arg
          20           25           30

```

```

Leu Gly Asn Glu Val Asp Gly Ala Ile Phe Gly Ser Glu Phe Lys Gly
          35           40           45

```

```

Tyr Ile Phe Arg Leu Arg Gly Gly Ser Asp Lys Asp Gly Phe Pro Met
          50           55           60

```

```

Val Pro Gly Val Leu Ala Ser Ser Arg Val Ser Leu Leu Val Lys Arg
65           70           75           80

```

Gly Ala Ile Gly Phe Asn Thr Phe Arg Gly Tyr Gln Gly Glu Arg Arg
85 90 95

Arg Lys Asn Val Arg Gly Cys Val Leu Ala Ser Asp Ile Ala Leu Val
100 105 110

Asn Val Thr Ile Ser Lys Val Gly Asp Gln Pro Ile Glu Gly Val Thr
115 120 125

Asp Thr Thr Ala Pro Arg Arg Leu Gly Pro Lys Arg Ala Ser Lys Ile
130 135 140

Arg Lys Leu Phe Asn Leu Ser Arg Thr Glu Asp Val Arg Lys Tyr Val
145 150 155 160

Val Arg Arg Arg Val Val Lys Ser Gly Lys Lys Asp Arg Leu Lys Ala
165 170 175

Pro Lys Ile Gln Arg Leu Ile Thr Pro Arg Val Lys Ala Arg Arg Ala
180 185 190

Lys Lys Ala Lys Asp Ala Ile Ala Lys Val Arg Ala Ser Ala Ala Glu
195 200 205

Arg Arg Glu Tyr Leu Arg Leu Ile Ala Ser Asn Arg Arg Ala Leu Arg
210 215 220

Gln Arg Asp His Ser Lys Lys His Thr Arg Lys Val His Ala Gln Arg
225 230 235 240

Ala Glu Val Ala Ala Phe Gln Lys Lys
245

<210> 24
<211> 750
<212> DNA
<213> Leishmania major

<400> 24
atgaagctca acatcgcgta cccccgcaac gggacggtga agcagttcga gatctcggac 60
gaggtgctcc gccgcgtgca gctgcaggac taccgcctcg gcaacgaggt ggacggcgcc 120

```

atctttggta gcgagttcaa gggctacatc ttccgcctgc gcggtggctc ggacaaggat 180
ggtttcccgga tgggccctgg cgtgcttgcc tccagccgtg tgctcgctgct ggtgaagcgc 240
ggtgcgatcg gcttcaacac cttccgcggc taccaggggtg agcgccgccg caagaacgtt 300
cgcggtctgcg tgctcgcgag cgacattgcg ctggtgaacg tgaccatctc caaggtcggg 360
gaccagccga tgcaggggtgt gacggacacc acggctcccc gccgtctggg tccgaagcgc 420
gcgagcaaga tccgcaagct cttcaacctg tcccgacccg aagacgtgcg gaagtacgtt 480
gttcgccgcc gcgtcgtgaa gagcggcaag aaggaccggc tgaaggcccc gaagatccag 540
cgtctgatca cgccgagggg caaggcccgc cgtgccaaga aggccaagga cgccatcgcc 600
aaggtgcgcg cgtctgccgc tgagcgccgt gagtacctgc gccttatcgc ctcgaaccgc 660
cgtgcgctgc gccagcgtga ccactccaag aagcacaccc ggaaggtgca cgcccagcgc 720
gctgaggtgg cagcattcca gaagaagtaa 750

```

```

<210> 25
<211> 419
<212> PRT
<213> Leishmania major

```

```

<400> 25

```

```

Met Ser His Cys Lys Phe Glu His Pro Arg His Gly His Leu Gly Phe
1          5          10          15

```

```

Leu Pro Arg Lys Arg Ser Arg Gln Ile Arg Gly Arg Ala Arg Ala Phe
          20          25          30

```

```

Pro Lys Asp Asp Ala Thr Gln Lys Pro His Leu Thr Ser Phe Met Val
          35          40          45

```

```

Phe Lys Ala Gly Met Thr His Ile Val Arg Asp Val Asp Arg Pro Gly
          50          55          60

```

```

Ser Lys Val Asn Lys Lys Glu Val Val Glu Pro Val Thr Ile Leu Glu
65          70          75          80

```

```

Ala Pro Pro Met Val Ile Val Gly Ile Val Gly Tyr Arg Gln Thr Pro
          85          90          95

```

Val Gly Leu Lys Thr Ile Gly Thr Val Trp Ala His His Thr Ser Val
100 105 110

Glu Phe Arg Arg Arg Tyr Tyr Lys Asn Trp Lys Gln Ser Ala Gln Leu
115 120 125

Ala Phe Ser Arg Gln Lys Gln Phe Ala Asn Thr Lys Glu Gly Lys Val
130 135 140

Ala Glu Ala Arg Thr Leu Asn Ala Phe Ala Lys Lys Ala Ser Val Ile
145 150 155 160

Arg Val Ile Ala His Thr Gln Leu Arg Lys Leu Arg Asn His Arg Val
165 170 175

Gly Val Lys Lys Ala His Val Gln Glu Ile Gln Val Asn Gly Gly Ser
180 185 190

Val Ala Ala Lys Ile Ala Leu Ala Lys Ser Leu Leu Glu Lys Glu Val
195 200 205

Arg Val Asp Ser Val Phe Gln Gln Ser Glu Ala Cys Asp Val Cys Ser
210 215 220

Val Thr Lys Gly His Gly Thr Glu Gly Val Val Lys Arg Trp Gly Val
225 230 235 240

Ala Cys Leu Pro Arg Lys Thr His Arg Gly Leu Arg Lys Val Ala Cys
245 250 255

Ile Gly Ala Trp His Pro Ala Arg Val Met Tyr Thr Val Ala Arg Ala
260 265 270

Gly Gln His Gly Tyr His His Arg Thr Gln Leu Asn Lys Lys Ile Tyr
275 280 285

Gln Ile Gly Arg Ser Val Ala Val Glu Pro Asn Gln Ala Thr Thr Thr
290 295 300

Tyr Asp Leu Thr Ala Lys Thr Ile Thr Pro Met Gly Gly Phe Val Gly

305 310 315 320

Tyr Gly Thr Val Arg Asn Asp Tyr Val Met Leu Lys Gly Ser Val Ser
325 330 335

Gly Pro Arg Arg Arg Val Met Thr Leu Arg Arg Pro Met Ala Pro Gln
340 345 350

Thr Ser Arg Gln Leu Lys Glu Lys Ile Val Leu Lys Phe Ile Asp Thr
355 360 365

Ser Ser Lys Ile Gly His Gly Arg Phe Gln Thr Lys Lys Glu Lys Asn
370 375 380

Gln Trp Phe Gly Pro Leu Lys Lys Asp Arg Ile Arg Arg Glu Glu Arg
385 390 395 400

Leu Arg Lys Glu Arg Ala Ala Arg Ala Val Glu Arg Lys Ala Lys Ala
405 410 415

Ala Lys Lys

<210> 26
<211> 1260
<212> DNA
<213> Leishmania major

<400> 26
atgtctcact gcaagttcga gcacccccgc cacggccatc tcggcttcct gccgcgcaag 60
cgctcgcgcc agatccgcgg ccgtgcgcgc gcgttcccca aggacgacgc gacgcagaag 120
ccccacctga cgagcttcat ggtgttcaag gccggtatga cgcacattgt gcgtgatgtc 180
gatcgccctg gatcgaaggt gaacaagaag gaagtgggtg agccggtgac gatcctggag 240
gcgccgccga tgggtgattgt cggcattgtg ggctaccgcc aaacgccggt tggcctgaag 300
acgatcgga cctgtgtggc gcaccacacg agcgtcgagt tccgccgccg ctactacaag 360
aactggaagc agtctgcgca actggccttc tcccgccaga agcagtttgc gaacacgaag 420
gagggcaagg tcgccgaggc gcgcacgctg aacgcgttcg cgaagaaggc gtccgtcatc 480
cgctgatcg cgcacacgca gctgcgcaag cttcgcaacc accgcgtggg cgtgaagaag 540

gcgcacgtgc aggagatcca ggtcaacggc ggcagcggtg cggcgaagat cgcgctggcc 600
 aagtcctgc tggagaagga ggtgcgcgtc gactccgtgt tccagcagtc cgaggcgtgc 660
 gacgtgtgct ccgtcacgaa aggccacggt acggagggcg tggatgaagcg ctggggcggtt 720
 gcctgcctgc cacgcaagac gcaccgcggt ctgcgcaagg ttgcgtgcat cggcgcgtgg 780
 caccctgccc gcgtcatgta cactgtcgcg cgcgccggtc agcacggtta ccaccaccgc 840
 acgcagctga acaagaagat ctaccagatc ggccgctccg ttgctgtgga gccgaaccag 900
 gcgacgacga cctacgatct gacagccaag acgatcacgc ccatgggtgg cttcgtcggc 960
 tacggtacgg tgcgcaacga ctacgtgatg ctgaagggct ccgtgtctgg cccgcgcccgc 1020
 cgtgtgatga cgctgcgccg cccgatggcg ccgcagacgt cgcgccagct gaaggagaag 1080
 atcgtgctga agttcatcga cagagctcg aagatcggcc acggccgctt ccagacgaag 1140
 aaggagaaga accagtgggtt cggcccgcgc aagaaggacc gcatccgccg cgaggagcgc 1200
 ctgcgcaagg agcgcgctgc ccgcgccgtg gagcgcaagg caaaggccgc gaagaagtaa 1260

<210> 27
 <211> 328
 <212> PRT
 <213> Leishmania major

<400> 27

Met Cys Thr Leu Ala Asn Trp Val Arg Ala Ile Ile Lys Lys His Ser
1 5 10 15

Thr Leu Ala His Thr Leu Glu Met Pro Phe Val Lys Val Val Lys Asn
20 25 30

Lys Ala Tyr Phe Lys Arg Phe Gln Val Lys Tyr Arg Arg Arg Arg Glu
35 40 45

Gly Lys Thr Asp Tyr His Ala Arg Arg Gln Met Val Leu Gln Asp Lys
50 55 60

Thr Lys Phe Gly Ser Pro Lys Tyr Arg Leu Val Val Arg Ile Thr Asn
65 70 75 80

Lys Asp Ile Ile Ala Gln Ile Val Gln Ala Lys Ile Val Gly Asp Glu

85

90

95

Val Val Met Ala Ala Tyr Ala His Glu Leu Pro Ala Phe Gly Ile Glu
 100 105 110

His Gly Leu Thr Asn Tyr Ala Ala Ala Tyr Ala Thr Gly Leu Leu Leu
 115 120 125

Ala Arg Arg Thr Leu Ala Lys Leu Gly Ile Ala Asp Lys Phe Gln Gly
 130 135 140

Ala Lys Glu Ala Asp Gly Ser Tyr Ser Ala Val Arg Thr Lys Lys Asp
 145 150 155 160

Asp Glu Gly Asp Asp Glu Glu Arg Phe Pro Phe Lys Ala Ile Leu Asp
 165 170 175

Val Gly Leu Ala Arg Thr Thr Thr Gly Ala Arg Val Phe Gly Val Leu
 180 185 190

Lys Gly Ala Val Asp Gly Gly Met Ala Val Pro His Arg Pro Asn Arg
 195 200 205

Phe Pro Gly Tyr Asn Lys Glu Lys Ser Ser Leu Asp Ala Lys Val His
 210 215 220

Arg Asp Arg Ile Phe Gly Lys His Val Ala Asp Tyr Leu Lys Gln Val
 225 230 235 240

Lys Glu Glu Ala Ser Ser Asn Pro Asp Glu Lys Cys Val Gln Phe Ser
 245 250 255

Lys Tyr Met Ala Ala Lys Val Leu Pro Glu Ser Ile Glu Gly Met Tyr
 260 265 270

Lys Lys Ala His Ala Ala Ile Arg Ala Asp Pro Ser Lys Ser Leu Pro
 275 280 285

Lys Lys Ala Lys Lys Glu Gly Val Ala His Lys Ser Tyr Lys Thr Lys
 290 295 300

Lys Leu Ser Gly Ala Glu Lys Arg Ala Ala Ala Lys Ala Lys Val Ala
 305 310 315 320

Ala Ile Arg Glu Arg Leu Gly Lys
 325

<210> 28
 <211> 987
 <212> DNA
 <213> Leishmania major

<400> 28
 atgtgcacgc tggcaaattg ggtacgcgct atcatcaaga aacactcaac actcgcccac 60
 aactcgaga tgccgttcgt caaggctctg aagaacaagg cgtacttcaa gcgcttccag 120
 gtgaagtacc gccgtcgccg cgagggcaag acggactacc acgcgcgccg gcagatggtg 180
 ctgcaggaca agacgaagtt cggctcgccc aagtaccgcc ttgttgtgcg catcacgaac 240
 aaggacatca ttgcgcagat cgtgcaggcg aagatcgtcg gcgacgaggt ggtgatggcc 300
 gcgtacgcgc acgagctgcc tgcgttcggc attgagcacg gcctgacaaa ctacgtctgt 360
 gcgtacgcga ctggtctgct gctggcgcgc cgcacgttg cgaagctggg catcgcggaac 420
 aagttccagg gcgcgaagga ggcggacggc tcgtactctg ctgtgcgcac gaagaaggac 480
 gacgagggcg acgacgagga gcgctttccg ttcaaggcga tcctggacgt cggccttgcg 540
 cgcacgacga ccggcgcccc cgtgttcggc gtgctgaagg gcgcggtgga cggcggtatg 600
 gctgtgccgc accgccccaa ccgcttcccc ggctacaaca aggagaagag ctcgctggac 660
 gcgaaggtgc accgcgaccg catctttggc aagcacgtgg cggactacct gaagcaggtg 720
 aaggaggagg cgagctcgaa ccctgacgag aagtgcgtgc agttctcgaa gtacatggcc 780
 gcgaaggttt tgccggagag catcgagggc atgtacaaga aggcgcacgc ggcgatccgc 840
 gcggaccctg cgaagtcgct gccgaagaag gcgaagaagg agggcgctcg gcacaagagc 900
 tacaagacga agaagctgag cggcgcgag aagagggccg ccgcgaaggc gaaggtcgcg 960
 gccatccgag agcgccctcg caagtaa 987

<210> 29
 <211> 10
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>		
<223>	adjuvant	
<400>	29	
tcaacgttga		10
<210>	30	
<211>	14	
<212>	DNA	
<213>	Artificial	
<220>		
<223>	adjuvant	
<400>	30	
gctagcgtta gcgt		14
<210>	31	
<211>	33	
<212>	DNA	
<213>	Artificial	
<220>		
<223>	primer	
<400>	31	
cgggatcctt taatggccac cacgtacgag gag		33
<210>	32	
<211>	32	
<212>	DNA	
<213>	Artificial	
<220>		
<223>	primer	
<400>	32	
cgggatcccc ccttgatgg gtactgcgca gc		32
<210>	33	
<211>	1283	
<212>	DNA	
<213>	Artificial	
<220>		
<223>	pKmp11AAP	
<400>	33	
atgagaggat ctcacacca tcaccatcac acggatcctt taatggccac cacgtacgag		60

gagttttcgg cgaagctgga ccgcctgggt gaggagtcca acaggaagat gcaggagcag	120
aacgccaagt tctttgcgga caagccggat gagtcgacgc tgtcgcccga gatgaaggag	180
cactacgaga agttcgagcg catgatcaag gagcacacag agaagttcaa caagaagatg	240
cacgagcact cggagcactt caagcagaag ttcgccgagc tgctggagca gcagaaggct	300
gcgcagtacc catccaaggg gggatcctct agacccatgt ccaccaagta cctcgccgcg	360
tacgctctgg cctccctgag caaggcgtcc ccgtctcagg cggacgtgga ggctatctgc	420
aaggccgtcc acatcgacgt cgaccaggcc accctcgcct ttgtgatgga gagcgttacg	480
ggacgcgacg tggccaccct gatcgcgag ggccgccgca agatgagcgc gatgccggcg	540
gccagctctg gtgccgctgc tggcgctact gcttccgctg cgggtgatgc ggctccggct	600
gccgccgccg cgaagaagga cgagcccgag gaggaggccg acgacgacat gggcccctct	660
agagtcgacc ccatgcagta cctcgccgcg tacgccctcg tggcgctgtc tggcaagacg	720
ccgtcgaagg cggacgttca ggctgtcctg aaggccgccg gcgttgccgt ggatgcctcc	780
cgcgtaggat ccgtcttcca ggaggtaggag ggcaagagct tcgatgcgct ggtggccgag	840
ggccgcacga agctgggtgg ctctggctct gccgctcctg ctggcgctgt ctccactgct	900
ggtgccggcg ctggcgcggt ggccgaggcg aagaaggagg agcccgagga ggaggaggcc	960
gatgatgaca tgggccccgt cgacctgcag cccgccgctg ccgcgccggc cgcccctagc	1020
gccgctgcca aggaggagcc ggaggagagc gacgaggacg acttcggcat gggcggtctc	1080
ttctaagcga ctcgccatct cttagcctcc ttgtggtgcg cttgaggtgc tctcgctctg	1140
cttctccttg cagtgttggc tgactctggc gggatatgtc cgtcgcatta caccacctc	1200
tcccaccctt ttgccctacg cgctcgcgtg cgcaatccgt gaatcatcga ggggaagtctc	1260
tctgggtggc agtgggtaag ctt	1283

<210> 34
 <211> 361
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> KAAP

<400> 34

Met Arg Gly Ser His His His His His His Thr Asp Pro Leu Met Ala
1 5 10 15

Thr Thr Tyr Glu Glu Phe Ser Ala Lys Leu Asp Arg Leu Gly Glu Glu
20 25 30

Phe Asn Arg Lys Met Gln Glu Gln Asn Ala Lys Phe Phe Ala Asp Lys
35 40 45

Pro Asp Glu Ser Thr Leu Ser Pro Glu Met Lys Glu His Tyr Glu Lys
50 55 60

Phe Glu Arg Met Ile Lys Glu His Thr Glu Lys Phe Asn Lys Lys Met
65 70 75 80

His Glu His Ser Glu His Phe Lys Gln Lys Phe Ala Glu Leu Leu Glu
85 90 95

Gln Gln Lys Ala Ala Gln Tyr Pro Ser Lys Gly Gly Ser Ser Arg Pro
100 105 110

Met Ser Thr Lys Tyr Leu Ala Ala Tyr Ala Leu Ala Ser Leu Ser Lys
115 120 125

Ala Ser Pro Ser Gln Ala Asp Val Glu Ala Ile Cys Lys Ala Val His
130 135 140

Ile Asp Val Asp Gln Ala Thr Leu Ala Phe Val Met Glu Ser Val Thr
145 150 155 160

Gly Arg Asp Val Ala Thr Leu Ile Ala Glu Gly Ala Ala Lys Met Ser
165 170 175

Ala Met Pro Ala Ala Ser Ser Gly Ala Ala Ala Gly Val Thr Ala Ser
180 185 190

Ala Ala Gly Asp Ala Ala Pro Ala Ala Ala Ala Lys Lys Asp Glu
195 200 205

Pro Glu Glu Glu Ala Asp Asp Asp Met Gly Pro Ser Arg Val Asp Pro
210 215 220

Met Gln Tyr Leu Ala Ala Tyr Ala Leu Val Ala Leu Ser Gly Lys Thr
 225 230 235 240

Pro Ser Lys Ala Asp Val Gln Ala Val Leu Lys Ala Ala Gly Val Ala
 245 250 255

Val Asp Ala Ser Arg Val Asp Ala Val Phe Gln Glu Val Glu Gly Lys
 260 265 270

Ser Phe Asp Ala Leu Val Ala Glu Gly Arg Thr Lys Leu Val Gly Ser
 275 280 285

Gly Ser Ala Ala Pro Ala Gly Ala Val Ser Thr Ala Gly Ala Gly Ala
 290 295 300

Gly Ala Val Ala Glu Ala Lys Lys Glu Glu Pro Glu Glu Glu Glu Ala
 305 310 315 320

Asp Asp Asp Met Gly Pro Val Asp Leu Gln Pro Ala Ala Ala Ala Pro
 325 330 335

Ala Ala Pro Ser Ala Ala Ala Lys Glu Glu Pro Glu Glu Ser Asp Glu
 340 345 350

Asp Asp Phe Gly Met Gly Gly Leu Phe
 355 360

<210> 35
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> primer

<400> 35
 cccaagctta tggccaccac ctacgaggag

30

<210> 36
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>

<223> primer

<400> 36

cattactgga tctatcaaca gg

22

<210> 37

<211> 297

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 37

Met Thr Thr Pro Arg Asn Ser Val Asn Gly Thr Phe Pro Ala Glu Pro
1 5 10 15

Met Lys Gly Pro Ile Ala Met Gln Ser Gly Pro Lys Pro Leu Phe Arg
20 25 30

Arg Met Ser Ser Leu Val Gly Pro Thr Gln Ser Phe Phe Met Arg Glu
35 40 45

Ser Lys Thr Leu Gly Ala Val Gln Ile Met Asn Gly Leu Phe His Ile
50 55 60

Ala Leu Gly Gly Leu Leu Met Ile Pro Ala Gly Ile Tyr Ala Pro Ile
65 70 75 80

Cys Val Thr Val Trp Tyr Pro Leu Trp Gly Gly Ile Met Tyr Ile Ile
85 90 95

Ser Gly Ser Leu Leu Ala Ala Thr Glu Lys Asn Ser Arg Lys Cys Leu
100 105 110

Val Lys Gly Lys Met Ile Met Asn Ser Leu Ser Leu Phe Ala Ala Ile
115 120 125

Ser Gly Met Ile Leu Ser Ile Met Asp Ile Leu Asn Ile Lys Ile Ser
130 135 140

His Phe Leu Lys Met Glu Ser Leu Asn Phe Ile Arg Ala His Thr Pro
145 150 155 160

Tyr Ile Asn Ile Tyr Asn Cys Glu Pro Ala Asn Pro Ser Glu Lys Asn
165 170 175

Ser Pro Ser Thr Gln Tyr Cys Tyr Ser Ile Gln Ser Leu Phe Leu Gly
180 185 190

Ile Leu Ser Val Met Leu Ile Phe Ala Phe Phe Gln Glu Leu Val Ile
195 200 205

Ala Gly Ile Val Glu Asn Glu Trp Lys Arg Thr Cys Ser Arg Pro Lys
210 215 220

Ser Asn Ile Val Leu Leu Ser Ala Glu Glu Lys Lys Glu Gln Thr Ile
225 230 235 240

Glu Ile Lys Glu Glu Val Val Gly Leu Thr Glu Thr Ser Ser Gln Pro
245 250 255

Lys Asn Glu Glu Asp Ile Glu Ile Ile Pro Ile Gln Glu Glu Glu
260 265 270

Glu Glu Thr Glu Thr Asn Phe Pro Glu Pro Pro Gln Asp Gln Glu Ser
275 280 285

Ser Pro Ile Glu Asn Asp Ser Ser Pro
290 295

<210> 38
<211> 498
<212> DNA
<213> Cupressus arizonica

<400> 38
atggacgaag ttccgtcaag cgacgaatct aagtcggcaa gctctgggaa acggggttttg 60
gaacagagcg ttcacgaatt ggaagaggtt ttcaagaaat ttgatgcgaa cggggatgga 120
aagatctcag gatcagagct tgcagacatc ttgcggtcta tgggaagtga agtagacgag 180
gcagaggtca aggccatgat ggaggaggca gacacggatg gtgacggtta tgtagcctg 240
caagagtttg tggatctgaa tattaaaggc gctactgtga aggatttgaa gaatgctttc 300
aaagtgtttg atcgggactg taatggcacc atttcgcctg ctgagctgtg cgagactctc 360

aaaagcgtgg gcgagccctg caccatcgag gagtctaaga acattattca caacgtcgac	420
aagaatgggg atggacttat taatgttgaa gaatttcaga caatgatgac aagtgaaatg	480
actgataaga gcaaatga	498

<210> 39
 <211> 1044
 <212> DNA
 <213> Cupressus arizonica

<400> 39	
tctgataatc ccatagacag ctgctggaga ggagattcga attgggatca aaacagaatg	60
aagctcgcag actgtgttgt gggatttgga agctcgacca tgggaggcaa aggaggagaa	120
atttacaccg tcacaagctc agaagataat cctgtgaatc ctacaccagg aactttgcgc	180
tatggagcaa caagagaaaa agcacttttg ataattttct ctcagaatat gaatataaag	240
ctccagatgc ctttgtatgt taatggatat aagactattg acggcagggg agcagatgtt	300
catcttggca atggcgggtcc ctgtctgttt atgaggaaaag cgagccatgt tattctccat	360
ggtttgcata tacacggttg taatacgagt gttttggggg atgttttggg aagtgagtcc	420
attggtgtgg agcctgttca tgctcaggat ggggacgcca ttactatgcg gaatgttaca	480
aatgcttgga ttgatcataa ttctctctcc gattgttctg atgggtcttat cgatgttaca	540
cttggttcca ctggaattac tatctccaac aatcacttct tcaaccatca taaagtgatg	600
ttgttaggac atgatgatac atatgatgat gacaaatcta tgaaagtgac agtggcgttc	660
aatcaatttg gacccaatgc tgggcaacga atgccaaggg cacgatatgg acttgtacat	720
gttgcaaaca ataattatga tcaatggaat atatatgcta ttggtgggag ttcaaatacca	780
accattctaa gtgaagggaa tagtttcact gcccctaatg agagctacaa gaaggaagta	840
acaaagcgta taggggtgtga aacaacatca gcttgtgcga actgggtgtg gagatccaca	900
cgagatgctt ttactaatgg agcttatatt gtatcatcgg ggaaagctga agacaccaat	960
atatacaata gtaatgaagc tttcaaagtt gagaatggga atgcagctcc tcaattaaca	1020
caaatgctg gagttgtagc ataa	1044

<210> 40
 <211> 165
 <212> PRT

<213> Cupressus arizonica

<400> 40

Met Asp Glu Val Pro Ser Ser Asp Glu Ser Lys Ser Ala Ser Ser Gly
1 5 10 15

Lys Arg Val Leu Glu Gln Ser Val His Glu Leu Glu Glu Val Phe Lys
20 25 30

Lys Phe Asp Ala Asn Gly Asp Gly Lys Ile Ser Gly Ser Glu Leu Ala
35 40 45

Asp Ile Leu Arg Ser Met Gly Ser Glu Val Asp Glu Ala Glu Val Lys
50 55 60

Ala Met Met Glu Glu Ala Asp Thr Asp Gly Asp Gly Tyr Val Ser Leu
65 70 75 80

Gln Glu Phe Val Asp Leu Asn Ile Lys Gly Ala Thr Val Lys Asp Leu
85 90 95

Lys Asn Ala Phe Lys Val Phe Asp Arg Asp Cys Asn Gly Thr Ile Ser
100 105 110

Pro Ala Glu Leu Cys Glu Thr Leu Lys Ser Val Gly Glu Pro Cys Thr
115 120 125

Ile Glu Glu Ser Lys Asn Ile Ile His Asn Val Asp Lys Asn Gly Asp
130 135 140

Gly Leu Ile Asn Val Glu Glu Phe Gln Thr Met Met Thr Ser Glu Met
145 150 155 160

Thr Asp Lys Ser Lys
165

<210> 41

<211> 347

<212> PRT

<213> Cupressus arizonica

<400> 41

Ser Asp Asn Pro Ile Asp Ser Cys Trp Arg Gly Asp Ser Asn Trp Asp
1 5 10 15

Gln Asn Arg Met Lys Leu Ala Asp Cys Val Val Gly Phe Gly Ser Ser
20 25 30

Thr Met Gly Gly Lys Gly Gly Glu Ile Tyr Thr Val Thr Ser Ser Glu
35 40 45

Asp Asn Pro Val Asn Pro Thr Pro Gly Thr Leu Arg Tyr Gly Ala Thr
50 55 60

Arg Glu Lys Ala Leu Trp Ile Ile Phe Ser Gln Asn Met Asn Ile Lys
65 70 75 80

Leu Gln Met Pro Leu Tyr Val Asn Gly Tyr Lys Thr Ile Asp Gly Arg
85 90 95

Gly Ala Asp Val His Leu Gly Asn Gly Gly Pro Cys Leu Phe Met Arg
100 105 110

Lys Ala Ser His Val Ile Leu His Gly Leu His Ile His Gly Cys Asn
115 120 125

Thr Ser Val Leu Gly Asp Val Leu Val Ser Glu Ser Ile Gly Val Glu
130 135 140

Pro Val His Ala Gln Asp Gly Asp Ala Ile Thr Met Arg Asn Val Thr
145 150 155 160

Asn Ala Trp Ile Asp His Asn Ser Leu Ser Asp Cys Ser Asp Gly Leu
165 170 175

Ile Asp Val Thr Leu Gly Ser Thr Gly Ile Thr Ile Ser Asn Asn His
180 185 190

Phe Phe Asn His His Lys Val Met Leu Leu Gly His Asp Asp Thr Tyr
195 200 205

Asp Asp Asp Lys Ser Met Lys Val Thr Val Ala Phe Asn Gln Phe Gly

210		215		220											
Pro	Asn	Ala	Gly	Gln	Arg	Met	Pro	Arg	Ala	Arg	Tyr	Gly	Leu	Val	His
225				230					235						240
Val	Ala	Asn	Asn	Asn	Tyr	Asp	Gln	Trp	Asn	Ile	Tyr	Ala	Ile	Gly	Gly
			245						250					255	
Ser	Ser	Asn	Pro	Thr	Ile	Leu	Ser	Glu	Gly	Asn	Ser	Phe	Thr	Ala	Pro
			260					265					270		
Asn	Glu	Ser	Tyr	Lys	Lys	Glu	Val	Thr	Lys	Arg	Ile	Gly	Cys	Glu	Thr
		275					280					285			
Thr	Ser	Ala	Cys	Ala	Asn	Trp	Val	Trp	Arg	Ser	Thr	Arg	Asp	Ala	Phe
	290					295					300				
Thr	Asn	Gly	Ala	Tyr	Phe	Val	Ser	Ser	Gly	Lys	Ala	Glu	Asp	Thr	Asn
305					310					315					320
Ile	Tyr	Asn	Ser	Asn	Glu	Ala	Phe	Lys	Val	Glu	Asn	Gly	Asn	Ala	Ala
				325					330					335	
Pro	Gln	Leu	Thr	Gln	Asn	Ala	Gly	Val	Val	Ala					
			340					345							

<210> 42
 <211> 97
 <212> PRT
 <213> human

<400> 42

Met	Cys	Ser	Ser	Leu	Glu	Gln	Ala	Leu	Ala	Val	Leu	Val	Thr	Thr	Phe
1				5					10					15	
His	Lys	Tyr	Ser	Cys	Gln	Glu	Gly	Asp	Lys	Phe	Lys	Leu	Ser	Lys	Gly
			20					25					30		
Glu	Met	Lys	Glu	Leu	Leu	His	Lys	Glu	Leu	Pro	Ser	Phe	Val	Gly	Glu
		35					40					45			

Lys Val Asp Glu Glu Gly Leu Lys Lys Leu Met Gly Ser Leu Asp Glu
50 55 60

Asn Ser Asp Gln Gln Val Asp Phe Gln Glu Tyr Ala Val Phe Leu Ala
65 70 75 80

Leu Ile Thr Val Met Cys Asn Asp Phe Phe Gln Gly Cys Pro Asp Arg
85 90 95

Pro

<210> 43
<211> 291
<212> DNA
<213> human

<400> 43
atgtgcagtt ctctggagca ggcgctggct gtgctgggtca ctaccttcca caagtactcc 60
tgccaagagg gcgacaagtt caagctgagt aagggggaaa tgaaggaact tctgcacaag 120
gagctgcccc gctttgtggg ggagaaagtg gatgaggagg ggctgaagaa gctgatgggc 180
agcctggatg agaacagtga ccagcaggtg gacttccagg agtatgctgt tttcctggca 240
ctcatcactg tcatgtgcaa tgacttcttc caggggctgcc cagaccgacc c 291

<210> 44
<211> 26
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> primer

<400> 44
aaggatccat gtgcagttct ctggag 26

<210> 45
<211> 26
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> primer

<400> 45

aacttaagca gggtcggtct gggcag

26

<210> 46

<211> 1436

<212> DNA

<213> artificial

<220>

<223> Q

<400> 46

atgagaggat ctcaccacca ccaccaccac acggatccgc atgcgagctc gaacaacaac	60
aacaataaca ataacaacaa cctcgggatc gagggaaggc ctttagctac tcctcgcagc	120
gccagaagg ccgtccgcaa gagcggctcc aagtccgcga aatgtggtct gatcttccc	180
gtgggccgcg tcggcgggat gatgcgccgc ggccagtacg ctgccgcat cggcgcctct	240
ggcgccccca ggatttcaga attctccgtg aaggcggccg cgcagagcgg gaagaagcgg	300
tgccgcctga acccgcgcac cgtgatgctg gccgcgcgcc acgacgacga catcggcacg	360
cttctgaaga acgtgacctt gtctcacagc ggcgttgtgc cgaacatcag caaggcgatg	420
gcaaagaaga agggcggaag gaagggaag gcgacaccga gcgcgcccga attcggatcc	480
tctagacca tgtccaccaa gtacctgcc gcgtacgctc tggcctccct gagcaaggcg	540
tcccgtctc aggcggacgt ggaggctatc tgcaaggccg tccacatcga cgtcgaccag	600
gccaccctcg cctttgtgat ggagagcgtt acgggacgcg acgtggccac cctgatcgcg	660
gagggcgccg cgaagatgag cgcgatgccg gcggccagct ctggtgccgc tgctggcgtc	720
actgcttccg ctgcgggtga tgcggctccg gctgccgccg ccgcgaagaa ggacgagccc	780
gaggaggagg ccgacgacga catgggcccc tctagagtcg accccatgca gtacctgcc	840
gcgtacgccc tcgtggcgct gtctggcaag acgccgtcga aggcggacgt tcaggctgtc	900
ctgaaggccg ccggcgttgc cgtggatgcc tcccgcgtgg atgccgtctt ccaggaggtg	960
gagggcaaga gcttcgatgc gctggtggcc gagggccgca cgaagctggg gggctctggc	1020
tctgccgctc ctgctggcgc tgtctccact gctggtgccg gcgctggcgc ggtggccgag	1080
gcgaagaagg aggagcccga ggaggaggag gccgatgatg acatgggccc cgtcgacctg	1140
cagcccgcg ctgccgcgcc ggccgcccct agcgcgctg ccaaggagga gccggaggag	1200
agcgacgagg acgacttcgg catgggcggt ctcttctaag cgactcgcca tctcttagcc	1260

tccttggtggt ggcgttgagg tgctctcgct ctgcttctcc ttgcagtgtt ggctgactct	1320
ggcgggtatg tgccgtcgca ttacaccac ctctcccacc cctttgccct acgcgctcgc	1380
atgcgcaatc cgtgaatcat cgagggaagt ctctctgggt ggcagtgggt aagctt	1436

<210> 47
 <211> 412
 <212> PRT
 <213> artificial

<220>
 <223> Q

<400> 47

Met	Arg	Gly	Ser	His	His	His	His	His	His	Thr	Asp	Pro	His	Ala	Ser
1				5					10					15	

Ser	Asn	Asn	Asn	Asn	Asn	Asn	Asn	Asn	Asn	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			

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

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		

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				

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	
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			
Ser	Val	Thr	Gly	Arg	Asp	Val	Ala	Thr	Leu	Ile	Ala	Glu	Gly	Ala	Ala
	210					215					220				
Lys	Met	Ser	Ala	Met	Pro	Ala	Ala	Ser	Ser	Gly	Ala	Ala	Ala	Gly	Val
225					230					235					240
Thr	Ala	Ser	Ala	Ala	Gly	Asp	Ala	Ala	Pro	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Lys
				245					250						255
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			
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
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		
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

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

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
18 May 2012 (18.05.2012)

(10) International Publication Number
WO 2012/062861 A1

(51) International Patent Classification:

C07K 14/44 (2006.01) *G01N 33/569* (2006.01)
A61K 39/008 (2006.01)

(21) International Application Number:

PCT/EP2011/069849

(22) International Filing Date:

10 November 2011 (10.11.2011)

(25) Filing Language:

English

(26) Publication Language:

English

(30) Priority Data:

61/412,034 10 November 2010 (10.11.2010) US
10190705.3 10 November 2010 (10.11.2010) EP

(71) Applicant (*for all designated States except US*): **LABORATORIOS LETI, S.L.** [ES/ES]; Calle del Sol, 5, ES-28760 Tres Cantos Madrid (ES).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (*for US only*): **ALONSO - BEDATE, Carlos** [ES/ES]; Alberto Aguilera 21, ES-28015 Madrid (ES). **SOTO - ALVAREZ, Manuel** [ES/ES]; Av/ Bélgica 85 2º-A, ES-28916 Madrid (ES). **PARODY"-DE LA FUENTE, Nuria** [ES/ES]; C/Carlos Muñoz Ruiz 3, portal 5, 3ºB, ES-28100 Alcobendas (ES). **PICO DE COAÑA - SUÁREZ, Yago** [ES/ES]; c/ Berruguete 19, ES-28015 Madrid (ES).

(74) Agent: **PALLARD, Caroline**; Nederlandsch Octrooibureau, J.W. Frisolaan 13, NL-2517 JS The Hague (NL).

(81) Designated States (*unless otherwise indicated, for every kind of national protection available*): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (*unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available*): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

- with international search report (Art. 21(3))
- with sequence listing part of description (Rule 5.2(a))



WO 2012/062861 A1

(54) Title: NEW ADJUVANT

(57) Abstract: The invention relates to a new adjuvant and to its use in combination with an antigen.

REIVINDICACIONES

1.
- 5
- 10
- 15
- 20
- 25
- 30
- 35
1.
2.
3.
4.
5.
6.
7.
8.
9.
- Molécula de ácido nucleico representada por una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en:
- i. secuencias de nucleótidos que codifican para un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 50% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1 a lo largo de toda su longitud,
- ii. secuencias de nucleótidos que comprenden una secuencia de nucleótidos que tiene al menos el 50% de identidad de secuencia con la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO:2 a lo largo de toda su longitud,
- iii. secuencias de nucleótidos cuya hebra complementaria se hibrida con una molécula de ácido nucleico de secuencia de (i) o (ii) y
- iv. secuencias de nucleótidos que difieren de la secuencia de una molécula de ácido nucleico de (iii) debido a la degeneración del código genético,
- para su uso como adyuvante cuando dicha molécula de ácido nucleico está operativamente unida a una secuencia de nucleótidos que codifica para un antígeno.
- Molécula de ácido nucleico según la reivindicación 1, en la que la secuencia de ácido nucleico está operativamente unida a una secuencia de nucleótidos que codifica para el antígeno.
- Molécula de ácido nucleico según la reivindicación 1 y/o 2, estando dicha molécula de ácido nucleico libre de una secuencia que codifica para un polipéptido que es idéntica a SEQ ID NO: 3 a lo largo de toda su longitud.
- Molécula de ácido nucleico según la reivindicación 2 ó 3, codificando la molécula de ácido nucleico identificada en cualquiera de las reivindicaciones 1 para un polipéptido que puede provocar una respuesta inmunitaria específica de antígeno en un sujeto.
- Molécula de ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 2 - 4, en la que dicho antígeno se origina a partir de cualquier organismo conocido que esté asociado con una enfermedad o un estado en un sujeto.
- Molécula de ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 2 - 5, en la que dicho antígeno es un autoantígeno o se origina a partir de virus o un microorganismo tal como una bacteria, una levadura, un hongo o un parásito.
- Polipéptido codificado por una molécula de ácido nucleico según la reivindicación 1.
- Polipéptido codificado por una molécula de ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 6.
- Constructo de ácido nucleico que comprende una molécula de ácido nucleico según la reivindicación 1.

10. Constructo de ácido nucleico que comprende una molécula de ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 6.
- 5 11. Composición que comprende una molécula de ácido nucleico según la reivindicación 1 y/o un polipéptido según la reivindicación 7 y/o un constructo nucleico según la reivindicación 9.
12. Composición que comprende una molécula de ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 6 y/o un polipéptido según la reivindicación 8 y/o un constructo nucleico según la reivindicación 10.
- 10 13. Molécula de ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 6, polipéptido según la reivindicación 8, constructo de ácido nucleico según la reivindicación 10 y/o composición según la reivindicación 12 para su uso como medicamento, siendo preferiblemente el medicamento una vacuna.
- 15 14. Uso de una molécula de ácido nucleico según la reivindicación 1, un polipéptido según la reivindicación 7, un constructo de ácido nucleico según la reivindicación 9 y/o una composición según la reivindicación 11 para la fabricación de un medicamento para tratar una enfermedad o un estado asociado con un antígeno según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 6.
- 20 15. Uso de una molécula de ácido nucleico según las reivindicaciones 2 a 6, un polipéptido según la reivindicación 8, un constructo de ácido nucleico según la reivindicación 10 y/o una composición según la reivindicación 12 para la preparación de un medicamento que es una vacuna para tratar una enfermedad o un estado asociado con el antígeno.
- 25 16. Método de tratamiento de una enfermedad o un estado asociado con un antígeno según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 6, en el que dicho tratamiento comprende una molécula de ácido nucleico según la reivindicación 1, un polipéptido según la reivindicación 7, un constructo de ácido nucleico según la reivindicación 9 y/o una composición según la reivindicación 11.
- 30 17. Método de tratamiento de una enfermedad o un estado asociado con un antígeno según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 6, en el que dicho tratamiento comprende una vacuna que comprende una molécula de ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 2 de 6, un polipéptido según la reivindicación 8, un constructo de ácido nucleico según la reivindicación 10 y/o una composición según la reivindicación 12.

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING
OF A CHANGE

(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

To:

PALLARD, Caroline
Nederlandsch Octrooibureau
J.W. Frisolaan 13
NL-2517 JS The Hague
PAYS-BAS

Date of mailing (day/month/year) 22 April 2013 (22.04.2013)
Applicant's or agent's file reference P6031289PCT
International application No. PCT/EP2011/069849

IMPORTANT NOTIFICATION
International filing date (day/month/year) 10 November 2011 (10.11.2011)

1. The following indications appeared on record concerning:		
☒ the applicant	☒ the inventor	☐ the agent
☐ the common representative		
Name and Address PICO DE COAÑA - SUÁREZ, Yago c/ Berruguete 19 ES-28015 Madrid Spain	State of Nationality ES	State of Residence ES
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	E-mail address	
2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:		
☐ the person	☐ the name	☒ the address
☐ the nationality		
☐ the residence		
Name and Address PICO DE COAÑA - SUÁREZ, Yago c/ Berruguete 19 ES-28049 Madrid Spain	State of Nationality ES	State of Residence ES
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	E-mail address ☐ Notifications by e-mail authorized	
3. Further observations, if necessary:		
4. A copy of this notification has been sent to:		
☒ the receiving Office	☐ the International Preliminary Examining Authority	
☐ the International Searching Authority	☒ the designated Offices concerned	
☐ the Authority(ies) specified for supplementary search	☐ the elected Offices concerned	
☐ other:		

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer Neuling Harriet e-mail pt05.pct@wipo.int Telephone No. +41 22 338 74 05
Facsimile No. +41 22 338 89 75	

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCTNOTIFICATION OF THE RECORDING
OF A CHANGE(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

To:

PALLARD, Caroline
Nederlandsch Octrooibureau
J.W. Frisolaan 13
NL-2517 JS The Hague
PAYS-BAS

Date of mailing (day/month/year) 22 April 2013 (22.04.2013)	
Applicant's or agent's file reference P6031289PCT	IMPORTANT NOTIFICATION
International application No. PCT/EP2011/069849	International filing date (day/month/year) 10 November 2011 (10.11.2011)

1. The following indications appeared on record concerning:

☒ the applicant ☒ the inventor ☐ the agent ☐ the common representative

Name and Address PARODY"- DE LA FUENTE, Nuria C/Carlos Muñoz Ruiz 3, portal 5, 3ºB ES-28100 Alcobendas Spain	State of Nationality ES	State of Residence ES
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	E-mail address	

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☐ the person ☒ the name ☐ the address ☐ the nationality ☐ the residence

Name and Address PARODY - DE LA FUENTE, Nuria C/Carlos Muñoz Ruiz 3, portal 5, 3ºB ES-28100 Alcobendas Spain	State of Nationality ES	State of Residence ES
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	E-mail address ☐ Notifications by e-mail authorized	

3. Further observations, if necessary:

4. A copy of this notification has been sent to:

☒ the receiving Office	☐ the International Preliminary Examining Authority
☐ the International Searching Authority	☒ the designated Offices concerned
☐ the Authority(ies) specified for supplementary search	☐ the elected Offices concerned
	☐ other:

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Authorized officer

Neuling Harriet

Facsimile No. +41 22 338 89 75

e-mail pt05.pct@wipo.int

Telephone No. +41 22 338 74 05

Figura 1

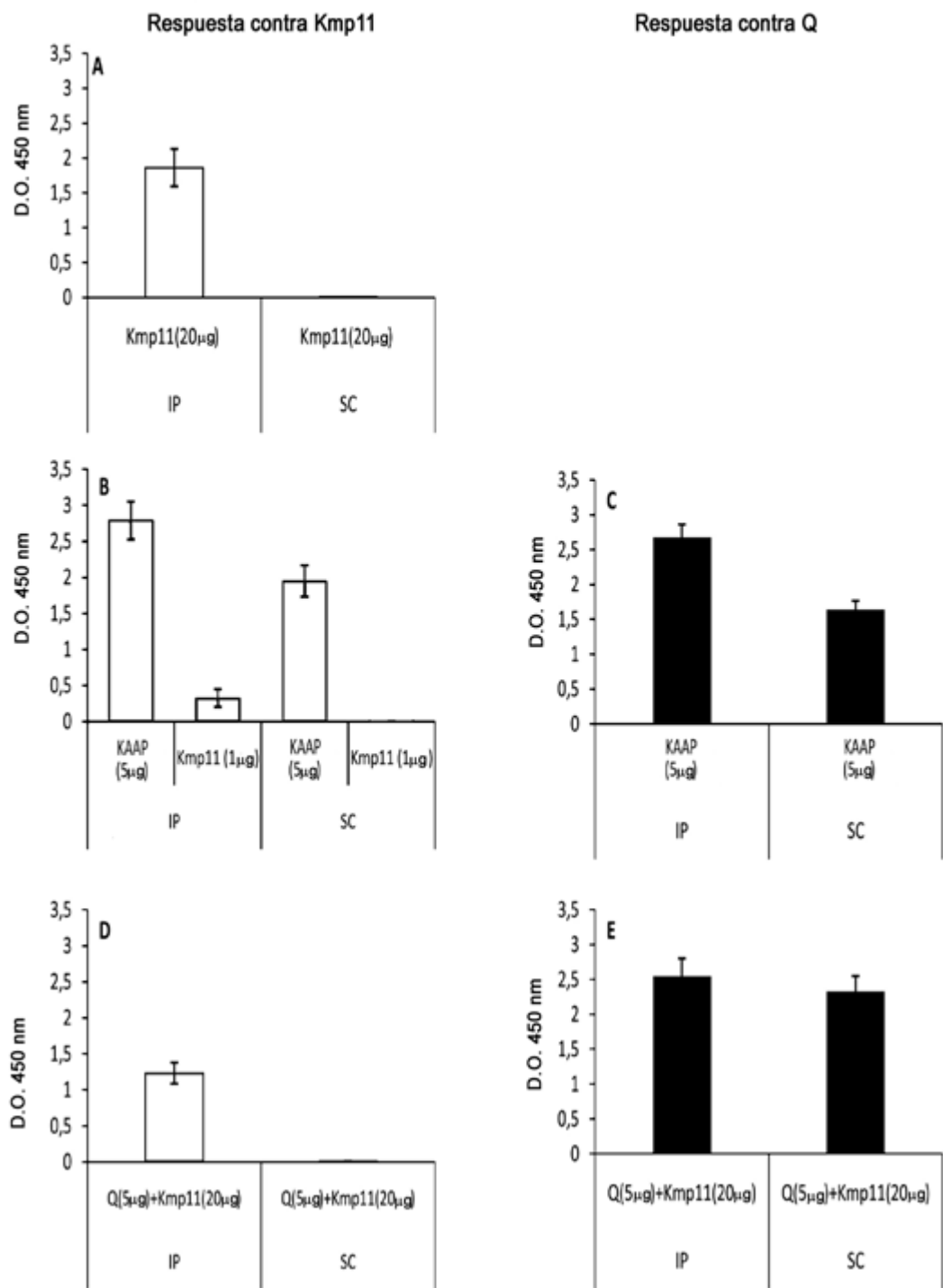


Figura 2

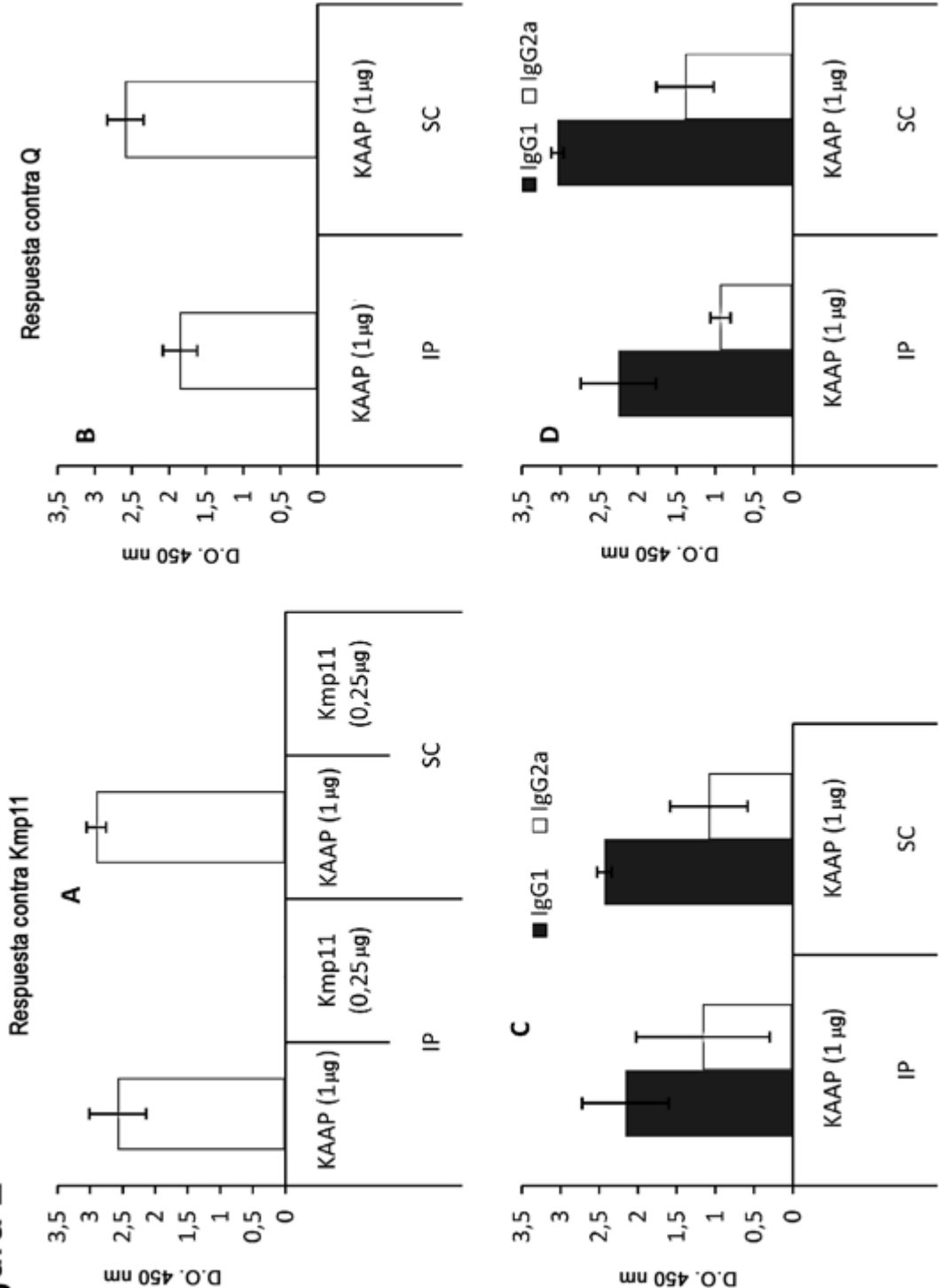


Figura 3

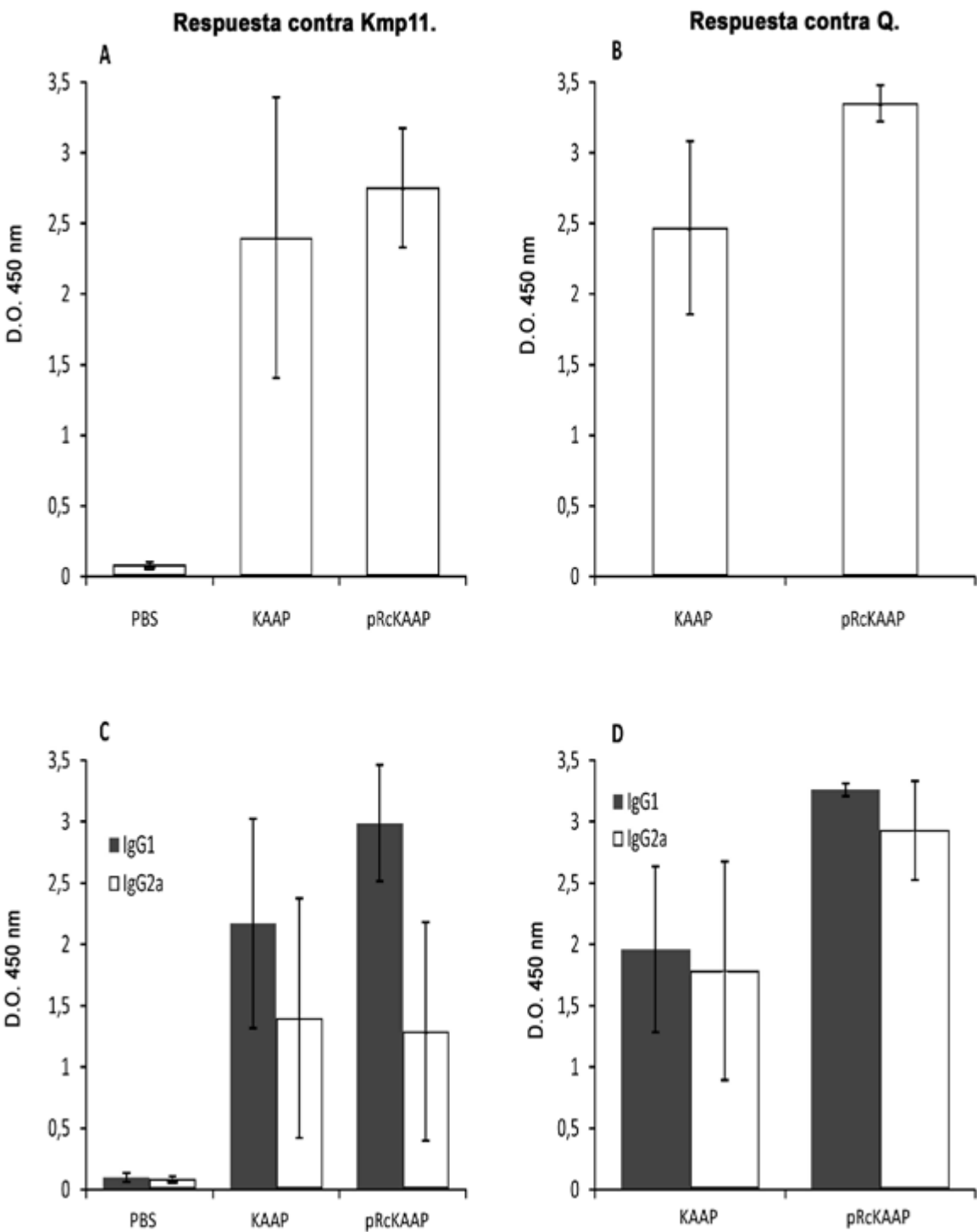
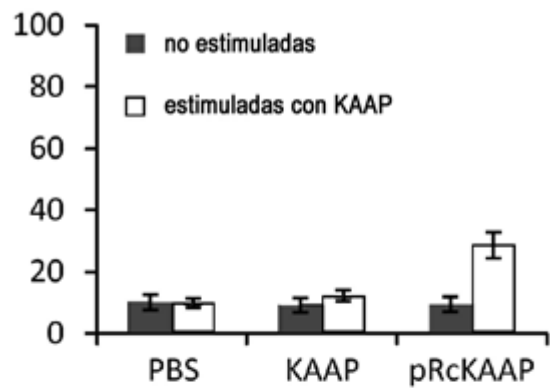
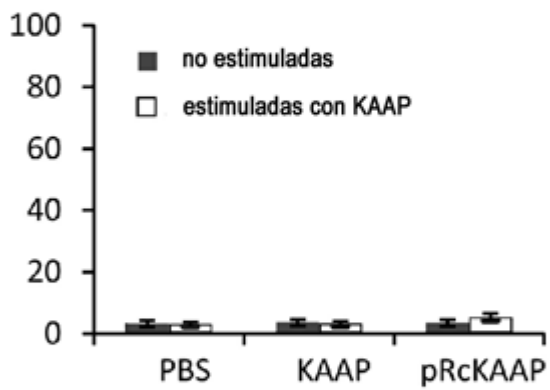


Figura 4.1.
IL-2



IL-4



IL-6

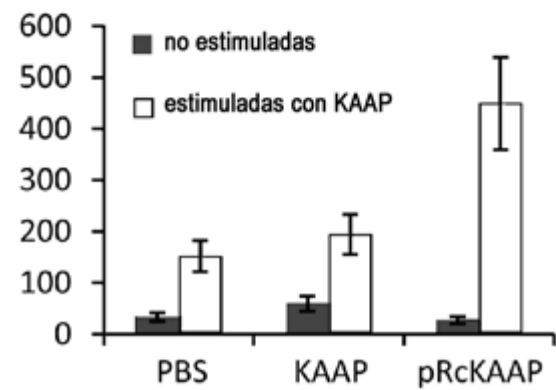


Figura 4.2.

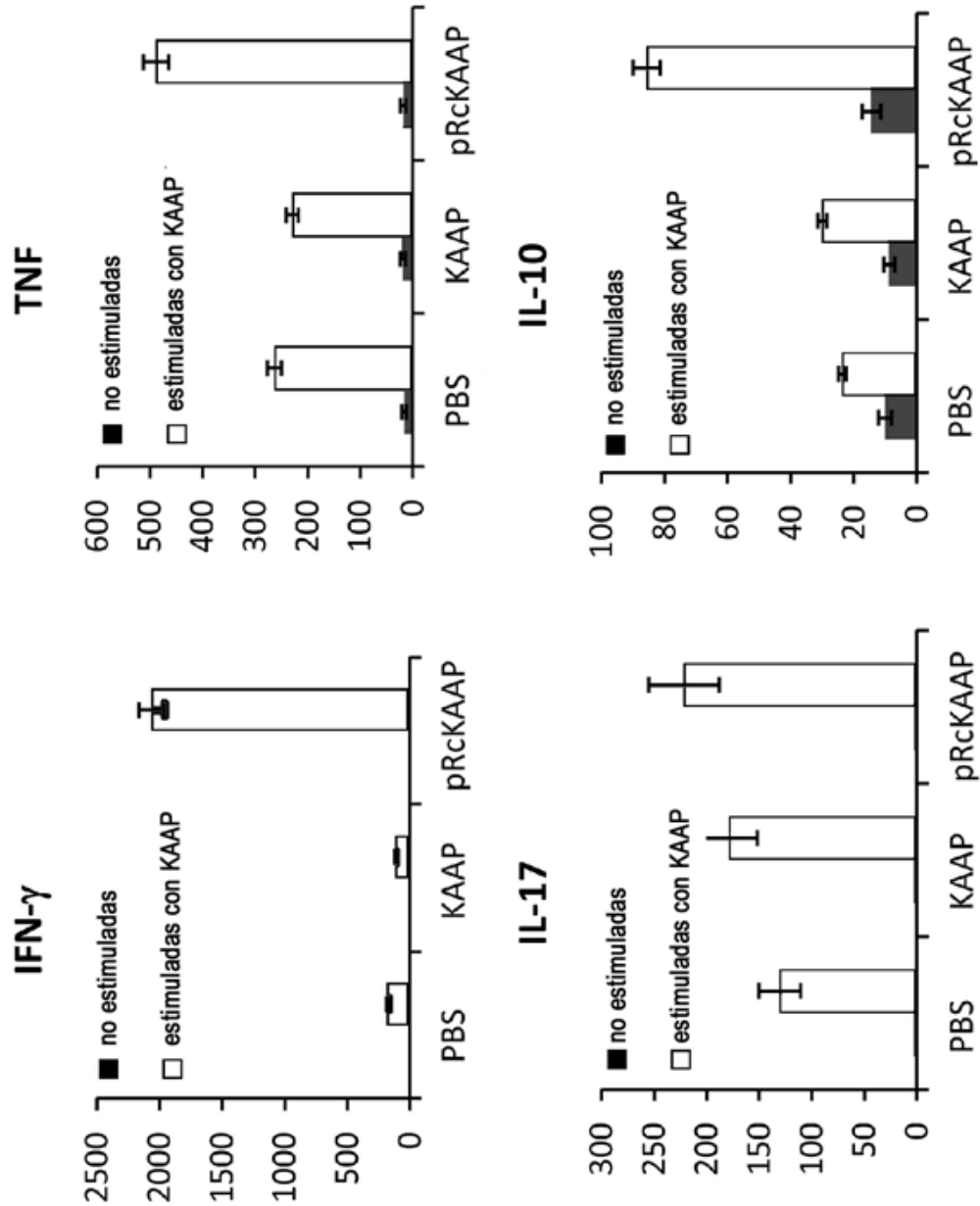


Figura 5.1

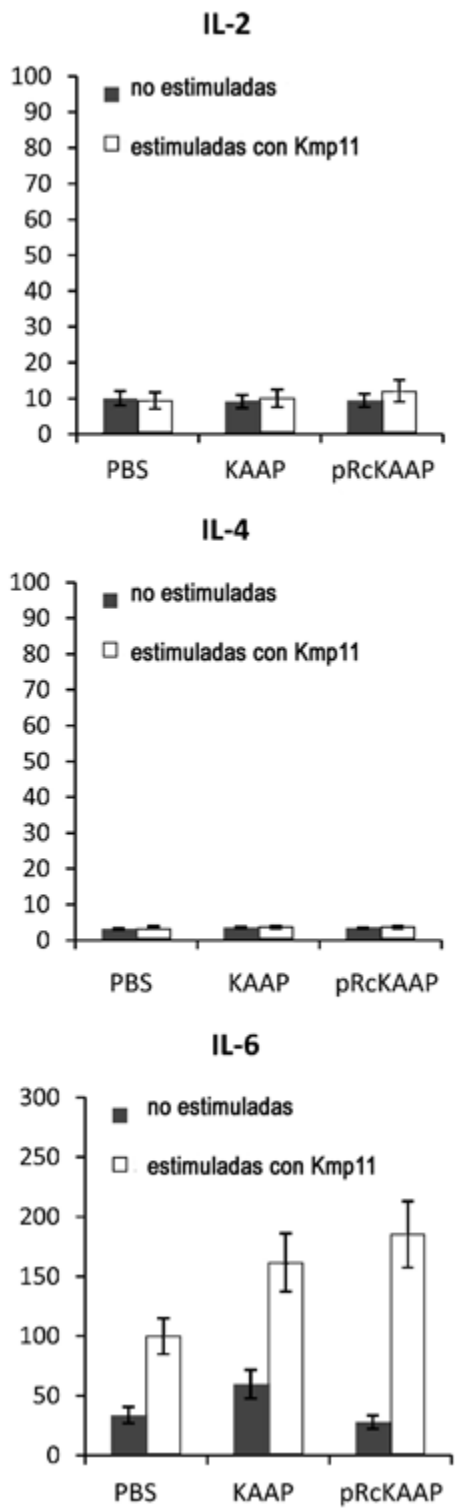


Figura 5.2

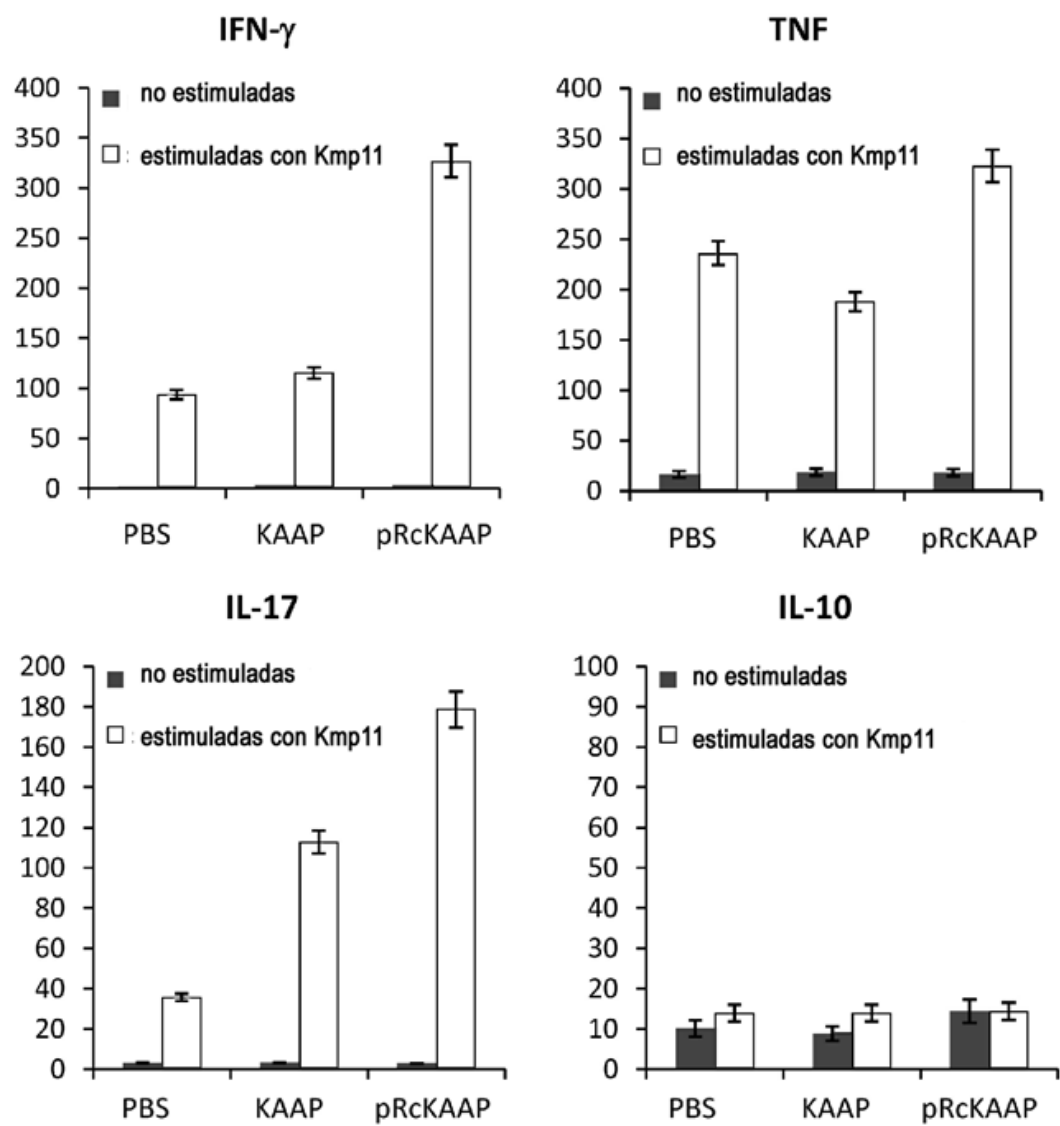


Fig 6

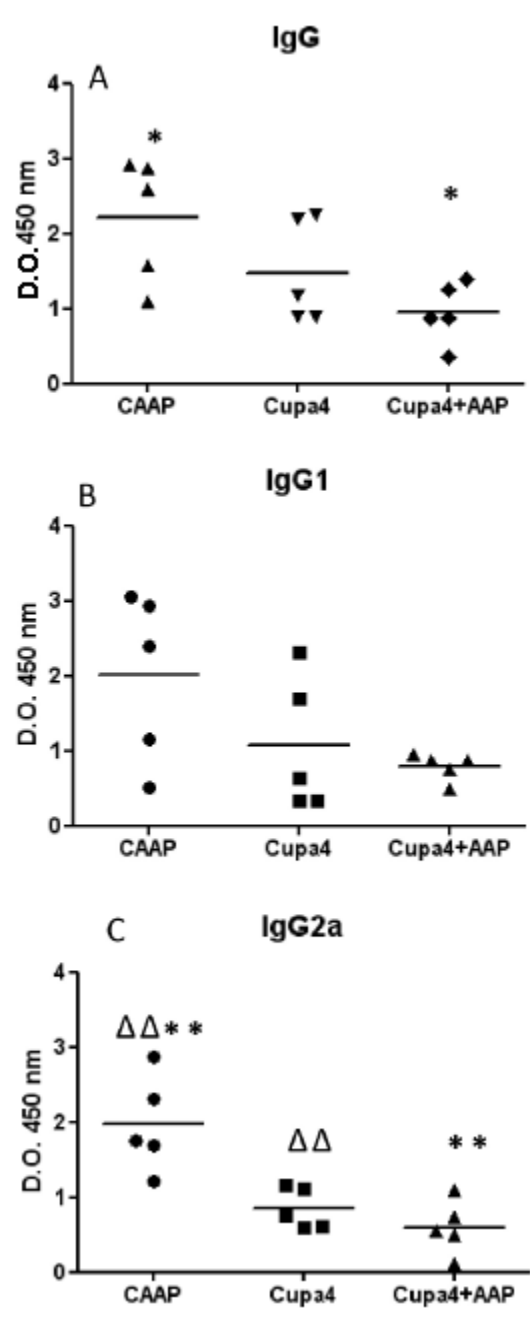


Fig 7

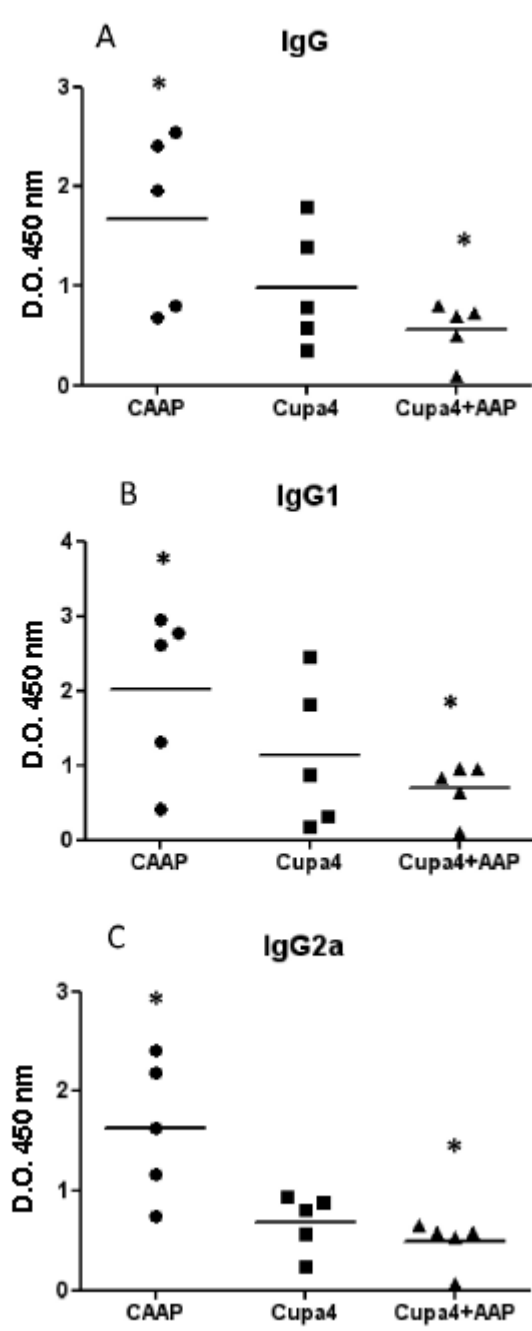


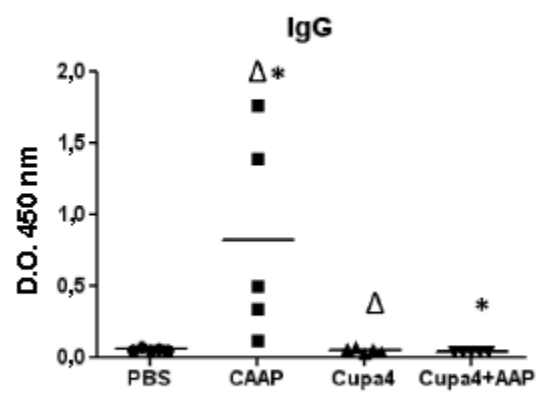
Fig 8

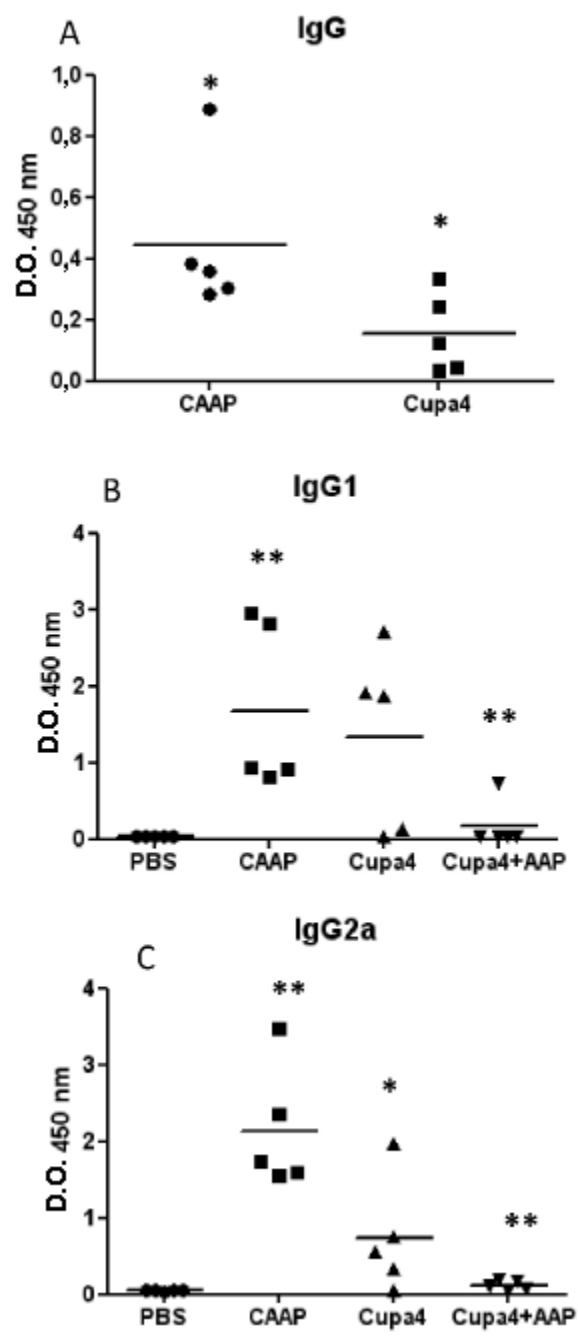
Fig 9

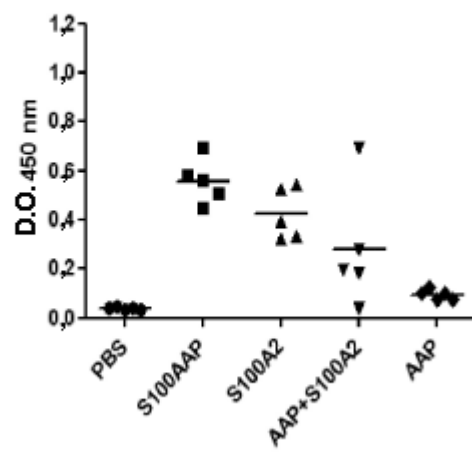
Fig 10

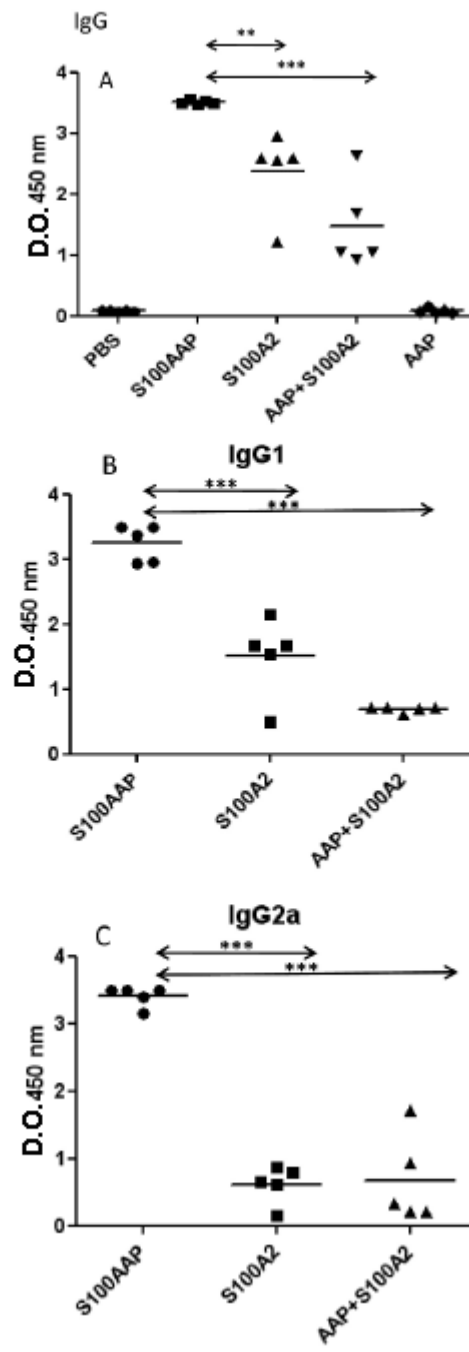
Fig 11

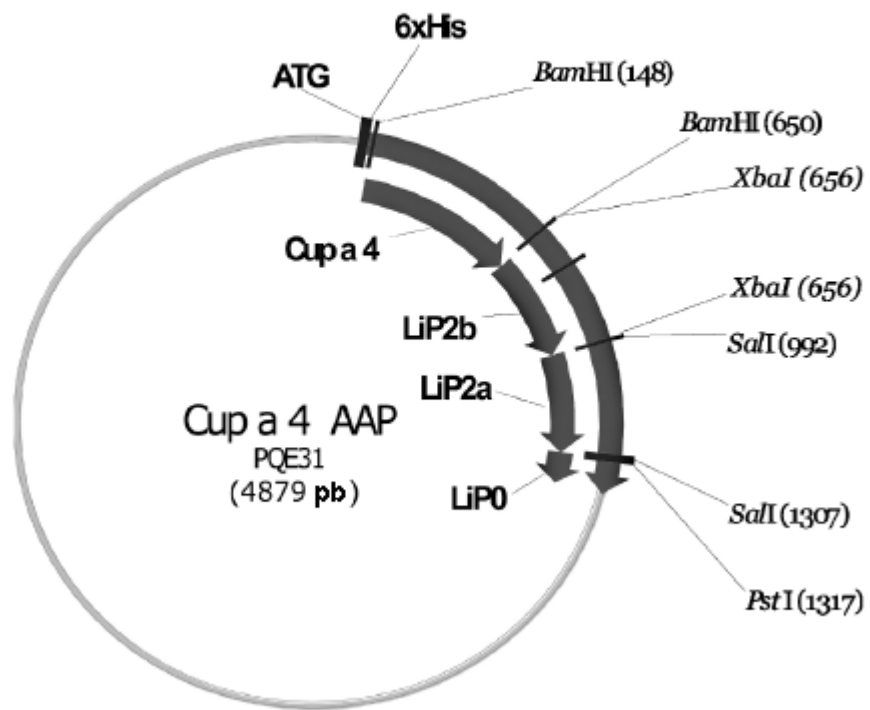
Fig 12

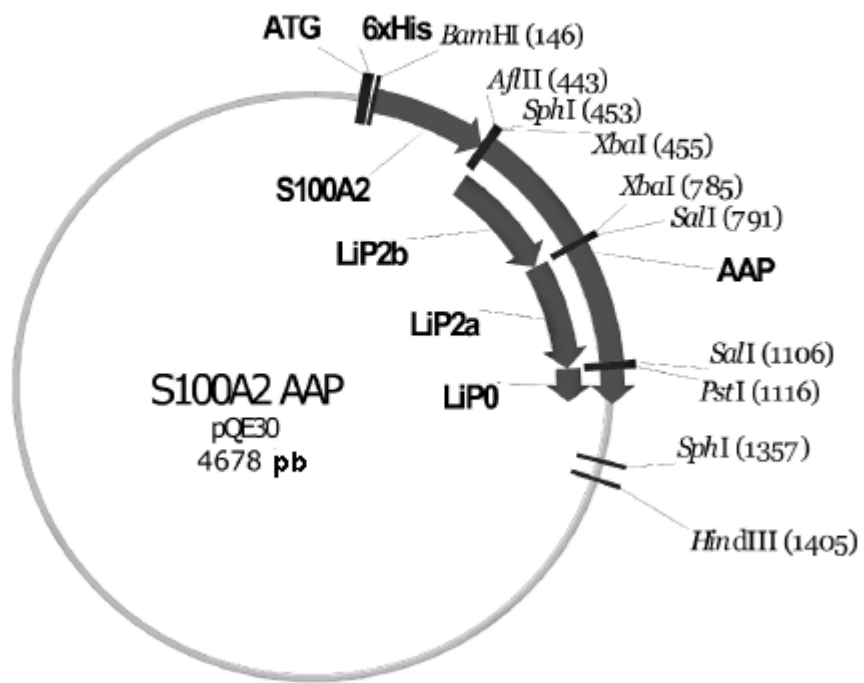
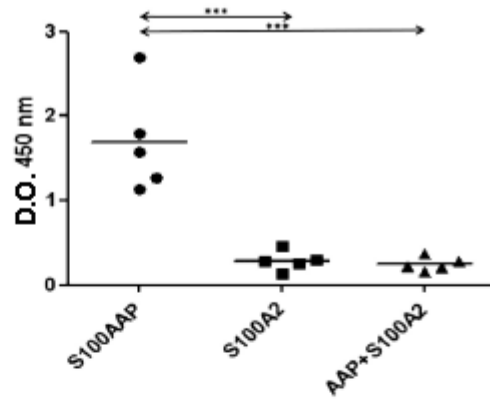
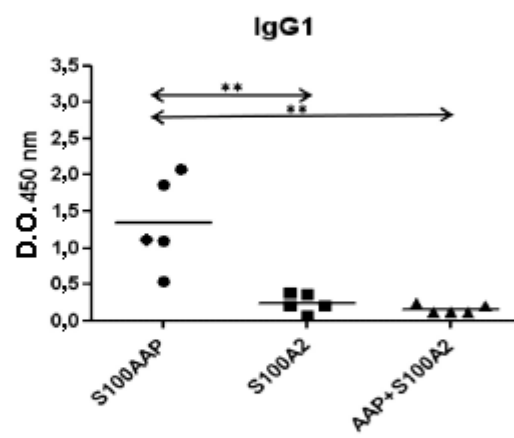
Fig 13

Fig 14 a



b



c

