

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 415 516**

21 Número de solicitud: 201101355

51 Int. Cl.:

**C07K 19/00** (2006.01)

**C12N 15/30** (2006.01)

**A61K 39/008** (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN PREVIO

B2

22 Fecha de presentación:

**23.12.2011**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**25.07.2013**

Fecha de la concesión:

**21.01.2014**

45 Fecha de publicación de la concesión:

**28.01.2014**

56 Se remite a la solicitud internacional:

**PCT/ES2012/000321**

Fecha de publicación de la mención al informe de  
búsqueda internacional:

**19.08.2013**

73 Titular/es:

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
(100.0%)**

**AVDA SENECA 2  
28040 MADRID (Madrid) ES**

72 Inventor/es:

**CARRIÓN HERRERO, Fco. Javier;  
DOMÍNGUEZ BERNAL, Gustavo;  
ORDEN GUTIERREZ, Jose Antonio y  
FUENTE LÓPEZ, Ricardo De La**

74 Agente/Representante:

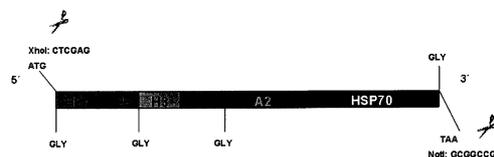
**PLUMET ORTEGA, Joaquín**

54 Título: **QUIMERA MULTICOMPONENTE PARA SU USO COMO VACUNA FRENTE A LA INFECCION POR LEISHMANIA SPP. EN MAMIFEROS.**

57 Resumen:

La presente invención se relaciona con una quimera multicomponente, HISA70, que comprende 6 genes procedentes de *Leishmania infantum*: H2A, H2B, H3, H4, A2 y HSP70. Así mismo, se relaciona con una composición inmunogénica que comprende dicha quimera multicomponente y con el uso de dicha composición en la elaboración de una vacuna frente a *Leishmania spp.*, para conferir protección frente a la leishmaniosis, incluidas la leishmaniosis cutánea y la leishmaniosis visceral, a mamíferos.

Fig. 1



ES 2 415 516 B2

## DESCRIPCIÓN

Quimera multicomponente para su uso como vacuna frente a la infección por *Leishmania* spp. en mamíferos

5

### CAMPO TÉCNICO

La presente invención se encuadra dentro del campo de la Sanidad Animal. De forma más concreta, la invención se refiere a una construcción genética, denominada HISA70, que contiene 6 genes que codifican 6 antígenos de *Leishmania infantum* implicados en la aparición de los síntomas clínicos de la leishmaniosis, y al empleo de dicha construcción en la elaboración de una vacuna para su uso frente a la infección por *Leishmania* spp.

### ESTADO DE LA TÉCNICA

Las leishmaniosis constituyen un grupo de enfermedades con distribución mundial y causadas por parásitos protozoos intracelulares del género *Leishmania*, que son transmitidos por un insecto vector conocido como flebótomo. Esta enfermedad presenta cuadros clínicos y epidemiológicos diversos. Según datos procedentes de la OMS, la prevalencia de la enfermedad es de 12 millones de casos y actualmente amenaza a 350 millones de personas en 88 países diferentes (<http://www.who.int/topics/leishmaniasis/en/index.html>), principalmente en países subdesarrollados de zonas tropicales y subtropicales (Sudán, India, Bangladesh, Nepal y Brasil), pero también en el área mediterránea (700 casos al año en el sur de Europa). Atendiendo a los síntomas clínicos de la enfermedad, las leishmaniosis han sido clasificadas en varios tipos: leishmaniosis visceral (LV) y el resto de leishmaniosis con manifestaciones cutáneas: leishmaniosis cutánea (LC), cutáneo-difusa (LCD) y muco-cutánea (LMC o espundia). *Leishmania infantum* es el principal agente causal de la LV en la región Mediterránea donde, además, el perro doméstico está considerado como el principal reservorio, jugando un papel clave en la transmisión del parásito a seres humanos. Por otro lado, *L. major* es una de

las especies con mayor repercusión en el Viejo Mundo causando LC (Gramiccia M., Gradoni L., The current status of zoonotic leishmaniasis and approaches to disease control. *Int J Parasitol.* 2005. 35:1169-1180).

- 5 En la actualidad, no existe ningún método profiláctico completamente eficaz contra la leishmaniosis. El tratamiento quimioterapéutico, en concreto la terapia con compuestos antimoniales pentavalentes (Glucantime® y Pentostam®) que interfieren con las rutas metabólicas del parásito, es la más ampliamente utilizada por su capacidad de acelerar la curación, disminuir el tamaño de las cicatrices y prevenir posibles recaídas en pacientes con LC. En el caso de la LV, la terapia antimonial alcanza una tasa de curación clínica del 90%. Pero el uso de compuestos antimoniales no está exento de efectos secundarios. La anfotericina B ha demostrado que tiene una alta eficacia, y sus efectos adversos pueden evitarse mediante su administración en liposomas, sin embargo su elevado coste limita su empleo en países en desarrollo.

- Por otro lado, existen evidencias clínicas y experimentales que demuestran que la vacunación puede prevenir la leishmaniosis. De hecho, en los últimos años, los esfuerzos de los laboratorios se centran en la búsqueda de nuevos antígenos y adyuvantes, vacunas vivas-atenuadas, antígenos recombinantes en forma de proteína o en forma de DNA, bacterias que expresan antígenos leishmaniales y estrategias vacunales con células dendríticas (CD). Entre los antígenos que se han ensayado se encuentran: la proteína A2 específica de amastigote, la esterol-24-c-metiltransferasa (SMT), varias histonas, la proteína ribosomal P0, la proteína inducible por estrés LmSTI1 y la proteína homóloga al receptor de la kinasa C activada de mamíferos (LACK) (de Oliveira C.I., Nascimento I.P., Barral A., Soto M., Barral-Netto M., Challenges and perspectives in vaccination against leishmaniasis, *Parasitol Int.* 2009. 58:319-324). En referencia a la leishmaniosis canina, en Brasil se ha empezado a comercializar una vacuna, Leishmune®, compuesta por el ligando Fucosa-Manosa que es administrado en presencia o ausencia del

adyuvante QuilA (WO2006122382A2). También en Brasil, ya registrada, se encuentra otra vacuna, LeishTec®, compuesta por el antígeno recombinante A2 procedente de *L. donovani* (WO2009089605A1). Sin embargo, en el caso de las vacunas desarrolladas en Brasil, no superan el 43-75% de protección y, además, los mecanismos inmunológicos todavía no se conocen en detalle. Finalmente, cabe destacar otra vacuna (CaniLesh) compuesta por antígenos secretados y excretados de promastigotes de *L. infantum* (ES2260440T3), cuya comercialización ha sido autorizada por la Comisión Europea en toda la Unión Europea el 14 de marzo de 2011.

10

De hecho, el desarrollo de vacunas frente a enfermedades parasitarias, no sólo frente a leishmaniosis, tiene que superar grandes obstáculos debido a distintos motivos. Entre ellos, se pueden mencionar los siguientes: se trata de infecciones que tienden a convertirse en crónicas dependiendo del estado inmunitario del hospedador y de la especie de parásito implicada; los parásitos despliegan una enorme variedad de mecanismos de evasión de la respuesta inmunológica; y la localización intracelular del parásito muchas veces dificulta el grado de efectividad de las respuestas efectoras por parte del hospedador.

15

Existe, por tanto, la necesidad de seguir trabajando en el desarrollo de nuevas estrategias de vacunación enfocadas hacia el ámbito mediterráneo de distribución de *L. infantum*. Se trata de inducir un equilibrio adecuado entre las respuestas inmunitarias *Leishmania*-específicas de tipo celular y humoral, así como la generación de células de memoria efectivas frente a posibles reinfecciones. Entre las diversas metodologías de inmunización, la vacunación genética (vacunas de tercera generación) es una de la más eficientes. Es capaz de inducir la síntesis de la proteína que codifica y de generar una respuesta inmunitaria específica en el hospedador de larga duración y, además, no genera reacciones adversas en el sitio de inoculación, a diferencia de las administraciones proteicas. Otra alternativa de gran interés que se ha empezado a analizar recientemente es la vacunación basada en CD para inducir respuestas inmunitarias protectoras frente a leishmaniosis.

25

30

Muchas de estas estrategias se basan en la transferencia adoptiva en ratones BALB/c de CD cargadas con antígenos leishmaniales. Otra alternativa que ha demostrado su eficacia es el empleo de diversos vehículos vacunales recombinantes de carácter atenuado o no patogénico en seres humanos; por ejemplo, *Salmonella* atenuada frente a LC o una especie recombinante de *Leishmania* no patogénica en seres humanos en la que se había integrado el antígeno A2 de *L. donovani* (Costa CH, Peters NC, Maruyama SR, de Brito EC Jr, Santos IK. Vaccines for the leishmaniasis: proposals for a research agenda. PLoS Negl Trop Dis. 2011 Mar 29;5(3):e943.).

10

En el proceso de infección, diversos componentes parasitarios de *Leishmania* pueden desencadenar una respuesta inmunológica como determinantes de superficie o como determinantes intracelulares. Los primeros consiguen ser invisibles para el sistema inmunológico del hospedador para establecer la infección. Los determinantes intracelulares, inicialmente, tampoco son visibles para el sistema inmunitario, y así, logran entrar en el hospedador, sin embargo, quedan expuestos en el momento en el que se produce la lisis de los parásitos. Estos determinantes están muy conservados a lo largo de la evolución y contienen epítomos específicos de células T y células B. Su localización intracelular les hace inaccesibles a los anticuerpos producidos y, además, generan un fenotipo virulento causante de patología, por lo que se denominan "patoantígenos" (Chang KP, Reed SG, McGwire BS, Soong L. *Leishmania* model for microbial virulence: the relevance of parasite multiplication and pathoantigenicity. Acta Trop. 2003 Mar;85(3):375-90.)

25

Existe una necesidad urgente de desarrollar estrategias de vacunación genética o bien empleando CD o usando bacterias vivas atenuadas como vehículo vacunal, que se constituyan como herramientas potenciales de primer orden en la lucha contra las diferentes formas de leishmaniosis.

## DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La invención se enfrenta con el problema de desarrollar nuevos elementos y estrategias con los que elaborar vacunas capaces de conferir protección frente a la infección causada por *Leishmania spp.*

5 La solución proporcionada por esta invención se basa en una quimera, HISA70, que se puede insertar en un plásmido de expresión eucariota o en un plásmido de expresión procariota, y cuya administración confiere protección frente a una posterior infección con *Leishmania spp.* En experimentos realizados con ratones inmunizados con esta quimera, tras una  
10 infección con *L. major*, causante de LC, los animales desarrollan la capacidad de controlar la aparición de las lesiones en el punto de infección (almohadilla plantar), mantienen una baja carga parasitaria en nódulo linfático poplíteo e impiden la visceralización parasitaria. Este último hecho es de una gran relevancia considerando la extrapolación de su capacidad protectora frente a  
15 la forma visceral de leishmaniosis, donde los órganos diana son bazo, hígado y médula ósea. De hecho, otros ensayos llevados a cabo en ratones vacunados de la misma forma pero infectados con *L. infantum*, responsable de LV, muestran cómo la mitad de los animales son capaces de reducir la carga parasitaria visceral (tanto en hígado como en bazo).

20

En la presente invención, se entiende por “quimera multicomponente” una molécula recombinante de ADN que comprende la fusión de distintos genes que codifican los patoantígenos de interés. En el mismo sentido, la expresión de dicha molécula recombinante da lugar a lo que, en la presente invención,  
25 se denomina “proteína quimérica”. Por “genes en fase” se entiende la disposición de los genes de manera que se garantiza la continuidad en la fase de lectura de la secuencia genética lo que garantiza, a su vez, su funcionalidad, es decir la traducción proteica esperada.

30 Un aspecto de la presente invención se refiere, por lo tanto, a una quimera multicomponente, que hemos denominado HISA70, que comprende la fusión en fase de los genes procedentes de *L. infantum* que codifican 6

patoantígenos implicados en el fenotipo de virulencia parasitaria y, como consecuencia, en la aparición de los síntomas clínicos de la leishmaniosis. En concreto, la quimera multicomponente HISA70, comprende los genes que codifican las proteínas histonas nucleosomales (H2A, H2B, H3, H4), el  
5 antígeno A2 y la proteína de choque térmico HSP70, procedentes de *L. infantum*, tal y como se describen en SEQ ID NO: 1. La invención también se refiere a un plásmido, de expresión eucariota o de expresión procariota, en el que se inserta HISA70 para vehiculizarla. En este sentido, si es necesario, se incluyen en los extremos de la quimera multicomponente secuencias diana de  
10 las enzimas de restricción que faciliten el clonaje de dicha quimera en el vector seleccionado.

En otra realización de la invención, la quimera multicomponente comprende una secuencia con un porcentaje de identidad con SEQ ID NO:1 de, al  
15 menos, el 75%, entendiéndose por porcentaje de identidad de la secuencia el porcentaje de coincidencias de los mismos nucleótidos entre dos secuencias alineadas, a lo largo de toda la longitud de ambas secuencias.

A lo largo de la secuencia de la quimera multicomponente, se pueden  
20 introducir tripletes nucleotídicos que codifiquen glicinas, para dar más flexibilidad estructural a la proteína resultante de la expresión de la quimera. En comparación con cualquier otro aminoácido, la glicina tiene la estructura más sencilla (gracias a su grupoR/cadena lateral apolar alifática de carácter hidrofóbico que se une a los grupos –NH<sub>2</sub> y –COOH, repectivamente) que  
25 impone el mínimo impedimento estérico, por lo que resulta el aminoácido de elección para conseguir este efecto. Pueden introducirse entre 1 y 7 tripletes nucleotídicos que codifican glicinas, colocándolos al inicio y/o al final de la quimera multicomponente y/o al inicio de cada uno de los genes que la componen de tal modo que, en la proteína quimérica resultante, las glicinas  
30 se localizarán al principio y/o al final de la proteína quimérica, y/o al inicio del péptido resultante de la traducción de cada gen.

La invención también se refiere a una composición inmunogénica que comprende una quimera multicomponente según se describe en esta memoria descriptiva, o bien un plásmido de expresión eucariota o de expresión procariota que contiene una quimera multicomponente según se describe en esta memoria descriptiva.

Otro aspecto de la invención se refiere a una composición inmunogénica que comprende la proteína quimérica HISA70, caracterizada por SEQ ID NO: 2, o bien una proteína con un porcentaje de identidad con SEQ ID NO: 2 de, al menos, el 85%, para su uso en la elaboración de una vacuna frente a *Leishmania spp.* Se entiende por porcentaje de identidad de la secuencia aminoacídica el porcentaje de coincidencias de los mismos aminoácidos entre las dos secuencias alineadas, a lo largo de la longitud completa de ambas secuencias.

En este sentido, la vacuna elaborada con cualquiera de las composiciones inmunogénicas de la invención se emplea en la protección de mamíferos, más concretamente de perros y seres humanos, frente a cualquiera de las formas de leishmaniosis (cutánea o visceral).

Una ventaja de la invención es el carácter antigénico y de alta especificidad de cada uno de sus componentes (herramienta de gran valor diagnóstico), de manera que los anticuerpos específicos generados están dirigidos hacia los determinantes antigénicos de las regiones divergentes de las histonas nucleosomales, del factor de virulencia A2, y de la proteína HSP70 del parásito, evitando de esta manera una reactividad cruzada con microorganismos causantes de otras enfermedades, así como procesos de autoinmunidad.

DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Para facilitar la comprensión de las principales características de la invención y formando parte integrante de esta memoria descriptiva, se acompaña una serie de figuras. Con carácter ilustrativo se ha representado lo siguiente:

- 5 **Figura 1.** Representación esquemática de la quimera multicomponente HISA70, con indicación de las secuencias diana de las enzimas de inserción utilizadas para el clonaje descrito en el Ejemplo 1, y de los tripletes que codifican glicinas introducidos a lo largo de la secuencia, según el Ejemplo 1.
- 10 **Figura 2.** Progresión de la lesión plantar en los 3 grupos de ratones tras la infección con *L. major* (Fig. 2A). Aspecto de las lesiones después de 7 semanas de infección (Fig. 2B). Los asteriscos indican la existencia de diferencias significativas con respecto a los grupos control (PBS y plásmido vacío) ( $\ast P < 0.05$ ).
- 15 **Figura 3.** Carga parasitaria en nódulo linfático poplíteo ( $\circ$ ) y en bazo ( $\bullet$ ) después de 7 semanas de infección con *L. major*. Los valores promedio se representan con un trazo horizontal. Los asteriscos indican la existencia de diferencias significativas con respecto a los grupos control (PBS y plásmido vacío) ( $\ast P < 0.05$ ).
- 20 **Figura 4.** Actividad arginasa (mU) en la lesión plantar a las 7 semanas de infección con *L. major*. Los valores promedio se representan con un trazo horizontal. Los asteriscos indican la existencia de diferencias significativas con respecto a los grupos control (PBS y plásmido vacío) ( $\ast P < 0.05$ ).
- 25 **Figura 5.** Título humoral anti-*Leishmania* a las 7 semanas de infección con *L. major*. Isotipos IgG1 ( $\square$ ) e IgG2a ( $\blacksquare$ ). Los asteriscos indican la existencia de diferencias significativas con respecto a los grupos control (PBS y plásmido vacío) ( $\ast P < 0.05$ ).
- 30 **Figura 6.** Carga parasitaria en bazo ( $\circ$ ), en hígado ( $\bullet$ ), y sus respectivas medias estadísticas ( $\text{—}$ ) a las 8 semanas de infección con *L. infantum*.

**MODO DE REALIZACIÓN DE LA INVENCION.**

Habiendo descrito la presente invención, se ilustra adicionalmente mediante  
5 los siguientes ejemplos.

**Ejemplo 1. Clonaje de los genes.** Las secuencias codificantes de H2A, H2B, H3, H4, A2 y HSP70 de *L. infantum* se obtuvieron de las bases de datos de secuencias del GeneDB y del GenBank con los siguientes números de  
10 acceso: H2A (Lin J21.V3.1160), H2B (Lin.J09.V3.1410), H3 (LinJ10.V3.0920), H4 (Lin J31.V3.3320), A2 (GenBank S69693) y HSP70 (GenBank CAA69282.1). Las correspondientes regiones codificantes fueron optimizadas para la expresión en células de ratón empleando el GeneOptimizer® expert software system (Geneart AG). Se eliminaron los codones de stop de los  
15 genes situados en la primera posición y en las posiciones intermedias de la quimera, y se introdujeron varios tripletes nucleotídicos codificantes glicinas: al comienzo de H2A, de H3 y de A2, y al final de HSP70, justo delante del codón de stop de la quimera multicomponente (Fig. 1). Finalmente, las secuencias fueron sintetizadas químicamente por GeneArt  
20 (<http://www.geneart.com>) dando lugar a HISA70, caracterizada por SEQ ID NO: 1, que codifica la quimera multicomponente HISA70, caracterizada por SEQ ID NO: 2. Además, se incluyeron los sitios de reconocimiento de las enzimas de restricción *XhoI* y *NotI* para posibilitar las posteriores construcciones plasmídicas. La secuencia HISA70 se incluyó en un plásmido  
25 de expresión eucariota modelo, que en este ejemplo fue pCMV $\beta$ m2A.

**Ejemplo 2. Análisis de la capacidad protectora de HISA70.** La capacidad protectora de HISA70 se ensayó en grupos de ratones hembra BALB/c de 8 semanas de edad (n = 6) que fueron inmunizados tres veces, en intervalos de  
30 2 semanas, por vía subcutánea en la almohadilla plantar izquierda, con 100  $\mu$ g del plásmido de expresión eucariota utilizado para el clonaje en el ejemplo 1 como control (pControl o control plasmídico) o con la quimera

clonada en el plásmido de expresión eucariota (pHISA70). Otro grupo control fue inoculado con PBS siguiendo el mismo esquema. Después de 4 semanas desde la última inmunización, todos los grupos fueron infectados en la almohadilla plantar derecha con  $1 \times 10^3$  promastigotes metacíclicos de *L. major* (clon V1: MHOM/IL/80/Friedlin). Las formas metacíclicas, infectivas, fueron previamente aisladas a partir de cultivos parasitarios en fase estacionaria empleando aglutinina de cacahuete PNA (Vector Laboratories, Burlingame, CA). Siguiendo la normativa ética vigente relativa a animales de experimentación, en el momento en el que aparecieron lesiones plantares necrosadas (a la 7ª semana de infección) en los animales no protegidos, todos los grupos fueron eutanasiados. En el momento del sacrificio, se obtuvieron sueros, nódulos linfáticos poplíteos y bazos con el fin de realizar los cultivos parasitarios y las correspondientes determinaciones inmunológicas. Todos los ensayos con ratones siguieron las condiciones convencionales aprobadas por el comité ético de experimentación animal de la Universidad Complutense de Madrid.

**Ejemplo 3: Evaluación de la capacidad para controlar la aparición de la lesión cutánea.** Con el fin de evaluar la capacidad que confiere la vacuna sobre el control de la inflamación plantar en el punto de infección, se hizo una monitorización semanal de la misma. Para ello, se midió con un calibre el grado de inflamación en la almohadilla plantar infectada (izquierda) comparada con la almohadilla plantar sin infectar (derecha). También se evaluaron los signos clínicos de ulceración. En la figura 2A se representa el tamaño de la inflamación plantar a lo largo de las 7 semanas postinfección y se puede observar que los ratones vacunados con pHISA70 no presentaron lesiones, o fueron de muy pequeño tamaño, y, además, no desarrollaron ulceraciones (Fig. 2B) después de 7 semanas de infección, a diferencia de los grupos control (PBS y pControl).

30

**Ejemplo 4: Valoración de la capacidad de controlar la carga parasitaria tras una infección con *L. major*.** En el momento del sacrificio, se obtuvieron

los nódulos linfáticos poplíteos, drenantes al punto de infección, y los bazos de todos los ratones con el fin de realizar los cultivos parasitarios en medio Schneider (Gibco, BRL) suplementado con 20% (v/v) de FCS inactivado, estreptomycin 0,1 mg/ml y penicilina 100 U/ml. Este medio fue empleado

5 tanto para el cultivo de los parásitos de *Leishmania major* hasta su fase estacionaria ( $2 \times 10^7$  parásitos/ml) como para la diferenciación de amastigotes a promastigotes, a 26°C en ambos casos, para determinar la carga parasitaria mediante dilución límite. Para ello se preparó una suspensión celular mediante el macerado de los órganos en 1ml de medio Schneider.

10 Posteriormente, se realizaron diluciones seriadas 1:4 de la suspensión de tejido homogeneizado en una placa de 96 pocillos y fueron incubadas a 26°C durante 10 días. Los pocillos fueron examinados para detectar promastigotes. El número total de parásitos por tejido se calculó a partir del recíproco de la dilución más alta donde se detectaron promastigotes, teniendo en cuenta el

15 peso del órgano completo. En la figura 3 se observa una reducción significativa de la carga parasitaria en nódulo linfático poplíteo y una ausencia de visceralización parasitaria esplénica en los ratones vacunados con pHISA70, a diferencia de los dos grupos control.

20 **Ejemplo 5: Determinación de la resistencia inmunitaria de los ratones mediada por la actividad arginasa en el punto de infección.** Como ya se ha descrito (Iniesta V., Gomez-Nieto L.C., Corraliza I., The inhibition of arginase by N(omega)-hydroxy-L-arginine controls the growth of *Leishmania* inside macrophages, J Exp Med. 2001. 193:777-784), existe una asociación

25 entre la multiplicación de los parásitos de *Leishmania* dentro de las células fagocíticas infectadas y la actividad arginasa generada en dichas células. La arginasa es una enzima implicada en la síntesis de poliaminas, nutrientes esenciales para la proliferación parasitaria. Por tanto, se analizó la actividad arginasa en las suspensiones celulares resultantes de la maceración de las

30 secciones de las almohadillas plantares de los ratones del ejemplo 2, para determinar el nivel de multiplicación de *Leishmania*. Se usó el siguiente método: para lisar las membranas celulares se añadió a cada muestra 50 µl

de Tritón X-100 (0,1% v/v en agua), se agitó y se añadieron 50 µl de Tris-HCl 200 mM pH 7,4. En los lisados se añadieron 5 µl de MnCl<sub>2</sub> 1 M (coenzima de la arginasa) y se incubó a 56°C durante 10 min. Luego se añadieron 25 µl de arginina 0,5 M, pH 9,7 (sustrato de la arginasa) seguido de incubación a 37°C durante 1 h. En paralelo, se hizo una curva patrón usando cantidades crecientes (1,5- 30 µg) de urea. Posteriormente, se añadieron 400 µl de una mezcla ácida compuesta por H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 18 M, H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 14,7 M y H<sub>2</sub>O (en relación 1: 3: 7). Para cuantificar la urea formada se añadieron 25 µl de isonitropropiofenona (ISPF 3% en etanol absoluto). Las muestras se hirvieron a 99°C durante 30 min. Finalmente, las muestras se trasladaron a placas de fondo plano de 96 pocillos (Nunc) en duplicados de 200 µl y se midió su absorbancia en el correspondiente lector a 540 nm. En la figura 4 se muestra cómo los ratones protegidos pertenecientes al grupo de vacunación con pHISA70 fueron los únicos que tenían unos niveles significativamente bajos de actividad arginasa en el sitio de infección, que se correlacionan con una menor carga parasitaria en comparación a los grupos control.

**Ejemplo 6: Respuesta humoral parásito específica.** Estudios previos de LC en el modelo murino han demostrado que la producción relativa de anticuerpos IgG1 e IgG2a está correlacionada con la inducción de las respuestas Th2-susceptibilidad y Th1-resistencia a *Leishmania*, respectivamente (Scott P. The role of TH1 and TH2 cells in experimental cutaneous leishmaniosis. Exp Parasitol. (1989) 68: 369-372). En este contexto, se realizó la detección, en los sueros de los ratones inmunizados con pHISA70 y de los dos grupos control a las 7 semanas postinfección, de anticuerpos *Leishmania*-específicos mediante ELISA. Se tapizaron placas de tipo estándar con el antígeno soluble de *Leishmania* (SLA: 2 µg/ml) durante 16 h a 4°C en PBS. Todos los periodos de incubación se hicieron en condiciones de agitación a temperatura ambiente. Se realizó una dilución seriada de los sueros para determinar el título de anticuerpos, que fue definido como el inverso del factor de la dilución de suero más alta con una absorbancia > 0.2. Como anticuerpos secundarios se emplearon los isotipos

IgG1 e IgG2a anti-ratón de cabra con peroxidasa (Nordic Immunology, Tilburg, Holanda) diluidos 1/1000. Después de 1 h de incubación, las placas fueron lavadas y reveladas añadiendo el sustrato de la peroxidasa (ABTS, Roche Diagnostics, Spain) y midiendo en el correspondiente lector de placas a 405 nm. Los ratones protegidos que habían sido vacunados con pHISA70 produjeron un bajo título humoral *Leishmania*-específico, de tipo mixto: IgG1 e IgG2a (Fig.5), en comparación con el elevado título de IgG1 parasito-específico que presentan los grupos control. En su conjunto, estos datos muestran la capacidad de la vacuna para cambiar en el hospedador un perfil Th2 de susceptibilidad a *Leishmania* a un equilibrio inmunitario de tipo mixto orientado a un perfil Th1 de resistencia frente a la infección por *L. major*. Lo que significa que pHISA70 suscita la capacidad de controlar la infección en los ratones vacunados.

**Ejemplo 7: Valoración de la capacidad de controlar la carga parasitaria tras una infección con *L. infantum*.** La inmunización de los animales se realizó tal y como se describe en el ejemplo 2 pero utilizando *L. infantum* en vez de *L. major* en la infección. En el momento del sacrificio, se obtuvieron los bazos y los hígados de todos los ratones con el fin de realizar los cultivos parasitarios en medio Schneider (Gibco, BRL) suplementado con 20% (v/v) de FCS inactivado, estreptomycin 0,1 mg/ml y penicilina 100 U/ml. Este medio fue empleado tanto para el cultivo de los parásitos de *Leishmania infantum* hasta su fase estacionaria ( $2 \times 10^7$  parásitos/ml) como para la diferenciación de amastigotes a promastigotes, a 26°C en ambos casos, para determinar la carga parasitaria mediante dilución límite. Para ello se preparó una suspensión celular mediante el macerado de los órganos en 1ml de medio Schneider. Posteriormente, se realizaron diluciones seriadas 1:4 de la suspensión de tejido homogeneizado en una placa de 96 pocillos y fueron incubadas a 26°C durante 10 días. Los pocillos fueron examinados para detectar promastigotes. El número total de parásitos por tejido se calculó a partir del recíproco de la dilución más alta donde se detectaron promastigotes, teniendo en cuenta el peso del órgano completo. En la figura 6

se observa una reducción significativa de las cargas parasitarias en el bazo y en el hígado de los ratones vacunados con pHISA70, a diferencia de los dos grupos control.

5 **TEXTO LIBRE DE LA LISTA DE SECUENCIAS**

El texto libre utilizado en la lista de secuencias se corresponde en español a las siguientes características:

10 **SEQ ID NO: 1**

Secuencia artificial de ADN; construcción genética que comprende los genes H2A, H2B, H3, H4, A2 y HSP70 de *L. infantum*.

Nucleótidos del 7 al 402: gen H2A de *L. infantum* sin codón de stop.

Nucleótidos del 403 al 735: gen H2B de *L. infantum* sin codón de stop.

15 Nucleótidos del 736 al 1125: gen H3 de *L. infantum* sin codón de stop.

Nucleótidos del 1126 al 1425: gen H4 de *L. infantum* sin codón de stop.

Nucleótidos del 1426 al 2133: gen A2 de *L. infantum* sin codón de stop.

Nucleótidos del 2134 al 4095: gen HSP70 de *L. infantum*.

20 Nucleótidos de 1 al 6: sitio de reconocimiento de la enzima de restricción XhoI.

Nucleótidos de 4096 al 4103: sitio de reconocimiento de la enzima de restricción NotI.

**SEQ ID NO: 2**

25 Secuencia artificial, proteína: nucleótidos del 7 al 4095 de SEQ ID NO: 1

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Quimera multicomponente que comprende una secuencia con, al menos, un 75% de identidad con SEQ ID NO: 1.
2. Quimera multicomponente según la reivindicación 1 en que la secuencia es SEQ ID NO: 1.
- 10 3. Quimera multicomponente según cualquiera de las reivindicaciones 1-2 en que los genes comprendidos en la secuencia están en fase.
4. Quimera multicomponente según cualquiera de las reivindicaciones 1-3 en que los genes proceden de *Leishmania* spp.
- 15 5. Quimera multicomponente según la reivindicación 4 en que los genes proceden de *Leishmania infantum*.
6. Quimera multicomponente según cualquiera de las reivindicaciones 1-5 que incluye entre 1 y 7 tripletes que codifican glicina, localizados al principio y/o al final de la quimera, y/o al inicio de cada gen.
- 20 7. Quimera multicomponente según la reivindicación 6 en que el número de tripletes que codifican glicina que se incluyen es de 4.
- 25 8. Plásmido de expresión eucariota o de expresión procariota que comprende la quimera de las reivindicaciones 1-7.
9. Proteína quimérica que comprende una secuencia con, al menos, un 85% de identidad con SEQ ID NO: 2.
- 30 10. Proteína quimérica según la reivindicación 9 en que la secuencia es SEQ ID NO: 2.

11. Proteína quimérica según la reivindicación 10 que incluye entre 1 y 7 glicinas al principio y/o al final de la proteína quimérica, y/o al inicio del péptido resultante de la traducción de cada gen.
- 5
12. Composición inmunogénica que comprende la quimera de las reivindicaciones 1-7 o el plásmido de la reivindicación 8 o la proteína quimérica de las reivindicaciones 9-11.
- 10
13. Uso de la composición inmunogénica de la reivindicación 12 en la elaboración de una vacuna para su administración a un mamífero para conferirle protección frente a enfermedades causadas por *Leishmania* spp.
14. Uso según la reivindicación 13 en que la especie de *Leishmania* es
- 15 *L. infantum* o *L. major*.
15. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 13-14 en que la enfermedad causada por *Leishmania* es leishmaniosis visceral o leishmaniosis cutánea.
- 20
16. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 13-15 en que el mamífero es el perro o el hombre.

Fig. 1

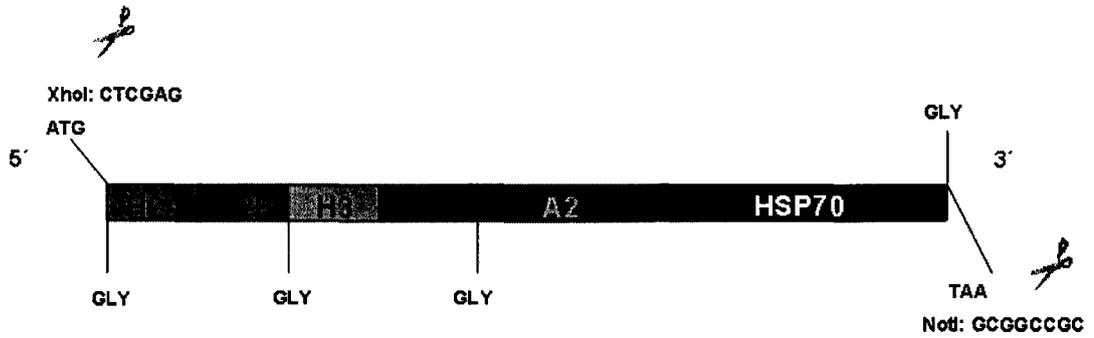
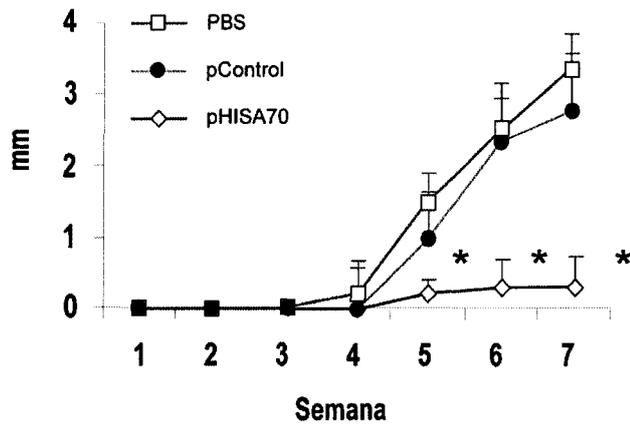


Fig. 2

**A**



**B**

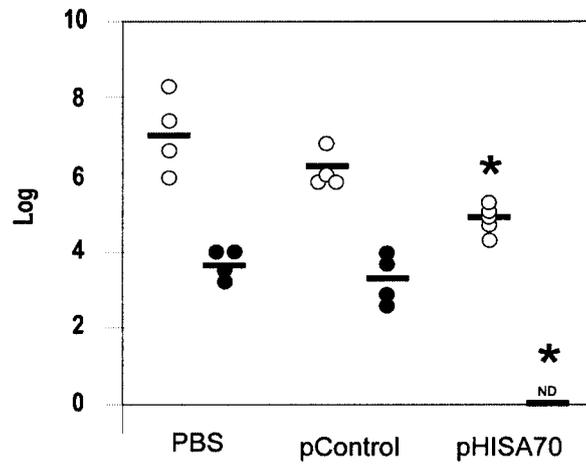


PBS

pControl

pHISA70

**Fig. 3**



**Fig. 4**

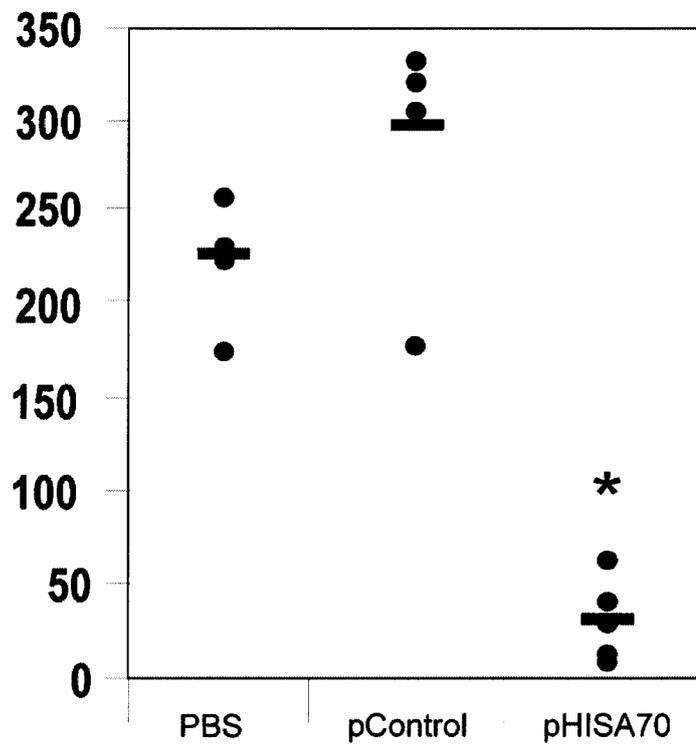


Fig. 5

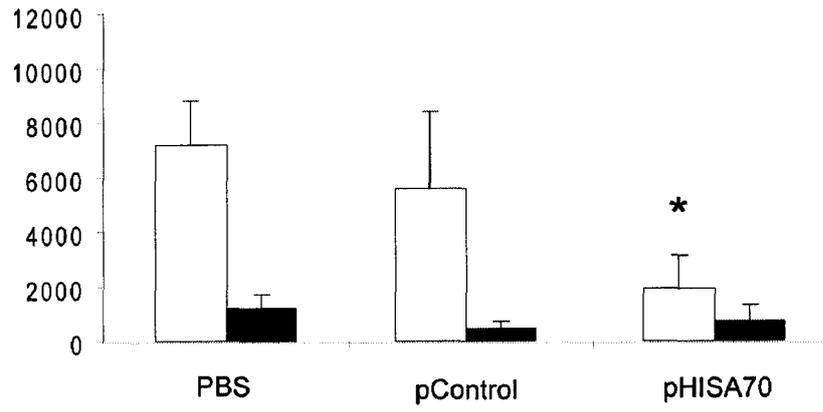
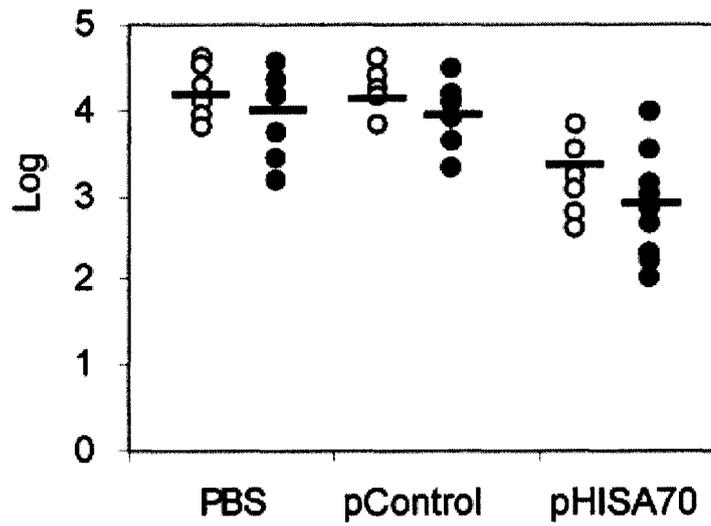


Fig. 6



## LISTA DE SECUENCIAS

- <110> UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
- 5 <120> Quimera multicomponente para su uso como vacuna frente a la infección por *Leishmania* spp en mamíferos
- <130> 2011\_01
- <160> 2
- <170> BISSAP 1.0
- 10 <210> 1  
<211> 4103  
<212> DNA  
<213> artificial sequences
- <220>  
<221> source  
<222> 1..4103  
<223> /mol\_type="DNA"  
/note="genetic construction comprising H2A, H2B, H3, H4, A2 and H  
15 SP70 genes from *L. infantum*"  
/organism="artificial sequences"
- <220>  
<221> CDS  
<222> 7..4095  
<223> /translation="MATPRSAKKSARKSGSKSAKCGLIFPVGVRVGGMMRHGQYARRIGVSGAVYL  
20 TAVLEYLTAELLELSVKAAAQSGKKRCRLNPRTVMLAARHDDDISLLKNVTLSHSGVVPNISKAK  
MAKKKGGKKGKATPSAMASSRSAPRKASNPBKSHRKPRTWNVYVGRSLKAINAQMSMSHRTMKI  
VNSYVNDVMERICTEAASIVRANKKRTLGAREVQTAVRIVLPAELAKHAMAEGTKAVSSASRMSR  
TKETARAKRTITSKSKKAPSAASGVKKSRRRWRPGTCAIREIRKFQKSTSLLIQCAPFQRLVRE  
VSSAQKEGLRFQSSAIMALQEATEAYVVSMLADTNLACIHAKRVTIQPKDIQLALRLRGERHMAK  
GKRSADAKGSQRRQKVLVDNIRGITRGCVRRMARRGGVKRISSEVYEEVRRVLKAYVEDIVRCS  
TAYTEYARKKTVTACDVVNALRKQGHILYGYAMKIRSVRPLVLLVCVAAVLALSASAEPHKA  
25 DVGPLSVGPQSVGPLSVGPQAVGPLSVGPQSVGPLSVGPQAVGPLSVGPQSVGPLSVGPLSVGPQ  
SVGPLSVGSQSVGPLSVGPQSVGPLSVGPQAVGPLSVGPQSVGPLSVGPQAVGPLSVGPQSVGPL  
SVGPQSVGPLSVGSQSVGPLSVGPQSVGPLSVGPQSVGPLSVGPQSVGPLSVGPQSVGPLSVGPQ  
SVDVSPVSMTFEGAIGIDLGTTYSCVGVWQNERVDIANDQGNRTTPSYVAFTDSERLIGDAAKN  
QVAMNPHNTVFDKRLIGRKFNDSSVQSDMKHWPFKVTTKGADKPVISVQYRGEKFTPEEISS  
30 MVLLKMKETAEAYLGKQVKKAVVTPAYFNDSQRQATKDAGTIAGLEVLRINEPTRAIAYGLDK  
GDDGKERNVLIFDLGGGTFDVTLLTIDGGIFEVKATNGDTHLGGEDFDNRLVTFTEEFKRKNKG  
KNLASSHRALARLRTACERAKRTLSSATQATIEIDALFENVDFQATITRARFEELCGDLFRSTIQ  
PVERVLQDAKMDKRSVHDVVLVGGSTRIPKVQSLVSDFFGGKELNKSINPDEAVAYGAAVQAFIL  
TGGKSKQTEGLLLLDVTPLTLGIETAGGVMTALIKRNTTIPTKKSQIFSTYADNPQGVHIVQFEG  
ERAMTKDCHLLGTFDLSGIPPAPRGLPQIEVTFDLANGILNVSAEEKGTGKRNQITITNDKGR  
35 SKDEIERMVNDAMKYEEDDKAQRDRVEAKNGLENYAYSMKNTLSDSNVSGKLESDKATLNKEID  
VVLEWLSSNQEAAKEEYEHKQKELESVCNPIMTKMYQSMGGAAGGMPGGMPGMSGMSGGAGPAGG  
ASSGPKVEEVD"
- <220>  
<221> gene  
<222> 7..402  
<223> /note="H2A gene from *L. infantum* without STOP codon"
- <220>  
<221> gene  
<222> 403..735  
<223> /note="H2B gene from *L. infantum* without STOP codon"
- 35 <220>  
<221> gene  
<222> 736..1125  
<223> /note="H3 gene from *L. infantum* without STOP codon"

```

<220>
<221> gene
<222> 1126..1425
5 <223> /note="H4 gene from L. infantum without STOP codon"

<220>
<221> gene
<222> 1426..2133
<223> /note="A2 gene from L. infantum without STOP codon"

<220>
<221> gene
<222> 2134..4095
10 <223> /note="HSP70 gene from L. infantum"

<220>
<221> misc_feature
<222> 1..6
<223> /note="XhoI restriction enzyme recognition site"

<220>
<221> misc_feature
<222> 4096..4103
15 <223> /note="NotI restriction enzyme recognition site"

<400> 1
ctcgagatgg ctactcctcg cagcgccaag aagtccgccc gcaagagcgg ctccaagtcc      60
gcgaaatgtg gtctgatctt cccggtgggc cgcggtggcg ggatgatgcg ccacggccag      120
tacgctcgcc gcatcggtgt ctctggcgcc gtgtacctga cagccgtgct ggagtacctg      180
20 acagcggagc tgctggagct gtccgtgaag gcggcggcgc agagcgggaa gaagcgggtgc      240
cgctgaacc cgcgcaccgt gatgctggct gcgcgccacg acgatgacat cagctcgctt      300
ctgaagaacg tgacctgtc tcacagcggc gttgtgccga acatcagcaa ggcgatggcg      360
aagaagaagg gcggcaagaa gggcaaggcg acaccgagcg cgatggcctc ttctcgctct      420
gctccccgca aggcttcaa cccgcacaag tcgcaccgta agcctaagcg cacgtggaac      480
25 gtgtacgtgg gccgctcgct gaaggcgatc aacgcccaga tgtcgatgtc gcaccgcacg      540
atgaagatcg tgaactcgta cgtgaacgac gtgatggagc gcatctgcac tgaggccgcg      600
tcgattgttc gcgcaacaa gaagcgcacg ctgggtgcbc gcgaggtgca gacggcggtg      660
cgtattgtgc tgccggcgga gctcgcgaag cacgccatgg ctgagggcac gaaggccgtg      720
tcgagcgcgt cgcgtatgtc ccgcaccaag gagaccgccc gcgcaagcgc caccatcacg      780
30 tcgaagaaga gcaagaaggc gccgagcgcg gcgtccggcg tgaagaagtc gcaccgccgc      840
tggcgcccgg gcacctgcbc gatccgcgag atccgcaagt tccagaagag tacgagcctg      900
ctgatccagt gcgcgccgtt ccagcgcctg gtgcgcgagg tgtcgagcgc gcagaaggag      960
ggctctgcbt tccagagcag cgctatcatg gcgctgcagg aggcgacgga ggcgtacgtt     1020
gtgtcgctga tggcggacac gaacctcgcc tgcattcacg cgaagcgcgt gacgatccag     1080
35 ccgaaggaca tccagctggc gctgcgcctg cgcggtgagc gccacatggc caagggcaag     1140
cgctccgctg atgccaaggg cagccagagg cgccagaaga aggtgctgcb cgacaacatc     1200
cggggcatca ctcgcggtcg cgtccgccgc atggcgcgcc ggggtggcgt gaagcgcac     1260

```

ES 2 415 516 B2

	tcaagcgagg	tgtacgaaga	ggtgcgccgc	gtgctgaagg	cctacgtgga	ggacattgtg	1320
	cgctgcagca	cggcctacac	cgagtacgcg	cgcaagaaga	cggtgacggc	gtgctgatgtt	1380
	gtgaacgcgc	tgcgcaagca	aggccacatc	ctctacggct	acgcgatgaa	gatccgcagc	1440
	gtgctgccgc	ttgtggtggt	gctggtgtgc	gtcgcggcgg	tgctcgcact	cagcgcctcc	1500
5	gctgagccgc	acaaggcggc	cgttgacgtc	ggcccgtctc	ccgttggccc	gcagtcctgc	1560
	ggcccgtctc	ctgttggccc	gcaggctggt	ggcccgtctc	ccgttggccc	gcagtcctgc	1620
	ggcccgtctc	ctgttggccc	gcaggctggt	ggcccgtctc	ctgttggccc	gcagtcctgtt	1680
	ggcccgtctc	ccgttggccc	gctctccggt	ggcccgcagt	ctgttggccc	gctctccggt	1740
	ggctcgcagt	ccgtcggccc	gctctctggt	ggctcgcagt	ccgtcggccc	gctctccggt	1800
10	ggcccgcagg	ctgttggccc	gctctccggt	ggcccgcagt	ccgtcggccc	gctctctggt	1860
	ggcccgcagg	ctgttggccc	gctctctggt	ggcccgcagt	ccgttggccc	gctctccggt	1920
	ggcccgcagt	ctgttggccc	gctctccggt	ggctcgcagt	ccgtcggccc	gctctctggt	1980
	ggctcgcagt	ccgtcggccc	gctctccggt	ggcccgcagt	ctgtcggccc	gctctccggt	2040
15	ggcccgcagt	ccgtcggccc	gctctccggt	ggctcgcagt	ccgttggccc	gctctccggt	2100
	ggcccgcagt	ccgttgacgt	ttctccggtg	tctatgacat	tcgaaggcgc	catcggcatc	2160
	gacctgggca	cgacgtactc	gtgctggtggc	gtgtggcaga	acgaacgcgt	ggacatcatc	2220
	gcgaacgacc	agggtaaccg	cacgacaccg	tcgtacgttg	cgttcacgga	ctcggagcgg	2280
	ctgatcggcg	atgccgcaaa	gaaccaggtg	gcaatgaacc	cgacaacac	ggtgttcgac	2340
20	gcgaagcgcc	tgattggccg	caagttcaac	gactcgggtg	tgagtcgga	catgaagcac	2400
	tggccgttca	aggtgacgac	gaagggcgcc	gacaagcccg	tgatttcggt	gcagtaccgg	2460
	ggcgaggaga	agaccttcac	gccggaggag	atcagctcga	tggtgctgct	gaagatgaag	2520
	gagacggcgg	agcgctacct	gggcaagcag	gtgaagaagg	ccgtggtgac	ggtgccggcg	2580
	tacttcaacg	actcgcagcg	ccaggcaacg	aaggacgccg	gcacgattgc	tggcctggag	2640
25	gtgctgcgca	tcatcaacga	gccgacgcgc	gccatcgcgt	acggcctgga	caagggcgac	2700
	gacggcaagg	agcgcacagc	gctgatcttc	gaccttggcg	gcggcacggt	cgatgtgacg	2760
	ctgctgacga	tcgacggcgg	catcttcgag	gtgaaggcga	cgaacggcga	cacacacctt	2820
	ggcggcgagg	acttcgacaa	ccgcctcgtc	acgttcttca	ccgaggagtt	caagcgcaag	2880
	aacaagggta	agaacctggc	gtcgagccac	cgcgcgctgg	cgctctcgcg	cacggcgtgc	2940
30	gagcgcgca	agcgcacgct	gtcgtccgcg	acgcaggcga	cgatcgagat	cgacgcgctg	3000
	ttcgagaacg	ttgacttcca	ggccaccatc	acgcgcgcgc	gcttcgagga	gctgtgcggc	3060
	gacctgttcc	gcagcacgat	ccagccggtg	gagcgcgtgc	tgaggacgc	gaagatggac	3120
	aagcgtccg	tgacacgacg	ggtgctggtg	ggcgggtcaa	cgcgcatccc	gaaggtgcag	3180
	tccctcgtgt	cggacttctt	cggcggcaag	gagctgaaca	agagcatcaa	ccccgacgag	3240
35	gctgtcgcgt	acggcgcgtc	ggtgcaggcc	ttcatcctga	cgggcggcaa	gagcaagcag	3300

```

acggagggcc tgctgctgct ggacgtgaca ccgctgacgc tgggcatcga gacagccggc 3360
ggcgtgatga cggcgctgat caagcgcaac acgacgatcc cgaccaagaa gagccagatt 3420
ttctcaacgt acgcgggaaa ccagcccggc gtgcacatcc aggtcttcga gggcgagcgc 3480
gcgatgacga aggactgcca cctgctgggc acgttcgacc tgtccggcat cccgccggcg 3540
5 ccgcgcgggc taccgcagat cgaggtgacg ttcgacctgg acgcgaacgg catcctgaac 3600
gtgtccgccg aggagaaggg caccggcaag cgcaaccaga tcaccatcac caacgacaag 3660
ggccggctga gcaaggacga gatcgagcgc atggtgaacg acgcgatgaa gtacgaggag 3720
gacgacaagg cgcagcgcga ccgctggag gcaaagaacg gcctggagaa ctacgcgtac 3780
tcgatgaaga acacgctcag cgactcgaac gtgtccggca agctggaaga tagcgacaag 3840
10 gccacgctga acaaggagat cgacgtggtg ctggagtggc tgagcagcaa ccaggaggcg 3900
gcgaaggagg agtacgagca caagcagaag gagctggaga gcgtatgcaa cccgatcatg 3960
accaagatgt accagagcat gggcggtgct gcgggcggca tgcccggcgg tatgccgggc 4020
atgagcggca tgagcgggtg tgcaggcccg gccggcggtg cgtcctccgg cccaaggtc 4080
gaggaggtcg actaagcggc cgc 4103

```

15

```

<210> 2
<211> 1362
<212> PRT
<213> artificial sequences

```

```

<220>
<221> SOURCE
<222> 1..1362

```

```

20 <223> /mol_type="protein"
    /note="[CDS]:7..4095 from SEQ ID NO 1"
    /organism="artificial sequences"

```

<400> 2

```

Met Ala Thr Pro Arg Ser Ala Lys Lys Ser Ala 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
25 Met Met Arg His Gly Gln Tyr Ala Arg Arg Ile Gly Val Ser Gly Ala
35 40 45
Val Tyr Leu Thr 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 Ser
85 90 95
Ser Leu Leu Lys Asn Val Thr Leu Ser His Ser Gly Val Val Pro Asn
100 105 110
30 Ile Ser Lys Ala Met Ala Lys Lys Lys Gly Gly Lys Lys Gly Lys Ala
115 120 125
Thr Pro Ser Ala Met Ala Ser Ser Arg Ser Ala Pro Arg Lys Ala Ser
130 135 140
Asn Pro His Lys Ser His Arg Lys Pro Lys Arg Thr Trp Asn Val Tyr
145 150 155 160
Val Gly Arg Ser Leu Lys Ala Ile Asn Ala Gln Met Ser Met Ser His
165 170 175
Arg Thr Met Lys Ile Val Asn Ser Tyr Val Asn Asp Val Met Glu Arg
180 185 190
35 Ile Cys Thr Glu Ala Ala Ser Ile Val Arg Ala Asn Lys Lys Arg Thr
195 200 205

```

Leu Gly Ala Arg Glu Val Gln Thr Ala Val Arg Ile Val Leu Pro Ala  
 210 215 220  
 Glu Leu Ala Lys His Ala Met Ala Glu Gly Thr Lys Ala Val Ser Ser  
 225 230 235 240  
 5 Ala Ser Arg Met Ser Arg Thr Lys Glu Thr Ala Arg Ala Lys Arg Thr  
 245 250 255  
 Ile Thr Ser Lys Lys Ser Lys Lys Ala Pro Ser Ala Ala Ser Gly Val  
 260 265 270  
 Lys Lys Ser His Arg Arg Trp Arg Pro Gly Thr Cys Ala Ile Arg Glu  
 275 280 285  
 Ile Arg Lys Phe Gln Lys Ser Thr Ser Leu Leu Ile Gln Cys Ala Pro  
 290 295 300  
 Phe Gln Arg Leu Val Arg Glu Val Ser Ser Ala Gln Lys Glu Gly Leu  
 305 310 315 320  
 10 Arg Phe Gln Ser Ser Ala Ile Met Ala Leu Gln Glu Ala Thr Glu Ala  
 325 330 335  
 Tyr Val Val Ser Leu Met Ala Asp Thr Asn Leu Ala Cys Ile His Ala  
 340 345 350  
 Lys Arg Val Thr Ile Gln Pro Lys Asp Ile Gln Leu Ala Leu Arg Leu  
 355 360 365  
 Arg Gly Glu Arg His Met Ala Lys Gly Lys Arg Ser Ala Asp Ala Lys  
 370 375 380  
 15 Gly Ser Gln Arg Arg Gln Lys Lys Val Leu Arg Asp Asn Ile Arg Gly  
 385 390 395 400  
 Ile Thr Arg Gly Cys Val Arg Arg Met Ala Arg Arg Gly Gly Val Lys  
 405 410 415  
 Arg Ile Ser Ser Glu Val Tyr Glu Glu Val Arg Arg Val Leu Lys Ala  
 420 425 430  
 Tyr Val Glu Asp Ile Val Arg Cys Ser Thr Ala Tyr Thr Glu Tyr Ala  
 435 440 445  
 Arg Lys Lys Thr Val Thr Ala Cys Asp Val Val Asn Ala Leu Arg Lys  
 450 455 460  
 20 Gln Gly His Ile Leu Tyr Gly Tyr Ala Met Lys Ile Arg Ser Val Arg  
 465 470 475 480  
 Pro Leu Val Val Leu Leu Val Cys Val Ala Ala Val Leu Ala Leu Ser  
 485 490 495  
 Ala Ser Ala Glu Pro His Lys Ala Ala Val Asp Val Gly Pro Leu Ser  
 500 505 510  
 Val Gly Pro Gln Ser Val Gly Pro Leu Ser Val Gly Pro Gln Ala Val  
 515 520 525  
 Gly Pro Leu Ser Val Gly Pro Gln Ser Val Gly Pro Leu Ser Val Gly  
 530 535 540  
 25 Pro Gln Ala Val Gly Pro Leu Ser Val Gly Pro Gln Ser Val Gly Pro  
 545 550 555 560  
 Leu Ser Val Gly Pro Leu Ser Val Gly Pro Gln Ser Val Gly Pro Leu  
 565 570 575  
 Ser Val Gly Ser Gln Ser Val Gly Pro Leu Ser Val Gly Pro Gln Ser  
 580 585 590  
 Val Gly Pro Leu Ser Val Gly Pro Gln Ala Val Gly Pro Leu Ser Val  
 595 600 605  
 Gly Pro Gln Ser Val Gly Pro Leu Ser Val Gly Pro Gln Ala Val Gly  
 610 615 620  
 30 Pro Leu Ser Val Gly Pro Gln Ser Val Gly Pro Leu Ser Val Gly Pro  
 625 630 635 640  
 Gln Ser Val Gly Pro Leu Ser Val Gly Ser Gln Ser Val Gly Pro Leu  
 645 650 655  
 Ser Val Gly Pro Gln Ser Val Gly Pro Leu Ser Val Gly Pro Gln Ser  
 660 665 670  
 Val Gly Pro Leu Ser Val Gly Pro Gln Ser Val Gly Pro Leu Ser Val  
 675 680 685  
 35 Gly Pro Gln Ser Val Gly Pro Leu Ser Val Gly Pro Gln Ser Val Asp  
 690 695 700  
 Val Ser Pro Val Ser Met Thr Phe Glu Gly Ala Ile Gly Ile Asp Leu  
 705 710 715 720  
 Gly Thr Thr Tyr Ser Cys Val Gly Val Trp Gln Asn Glu Arg Val Asp  
 725 730 735  
 Ile Ile Ala Asn Asp Gln Gly Asn Arg Thr Thr Pro Ser Tyr Val Ala  
 740 745 750

Phe Thr Asp Ser Glu Arg Leu Ile Gly Asp Ala Ala Lys Asn Gln Val  
 Ala Met 755 Asn Pro His Asn Thr Val Phe Asp Ala Lys Arg Leu Ile Gly  
 770  
 5 Arg Lys Phe Asn Asp Ser Val Val Gln Ser Asp Met Lys His Trp Pro  
 785 790 795 800  
 Phe Lys Val Thr Thr Lys Gly Ala Asp Lys Pro Val Ile Ser Val Gln  
 805 810 815  
 Tyr Arg Gly Glu Glu Lys Thr Phe Thr Pro Glu Glu Ile Ser Ser Met  
 820 825 830  
 Val Leu Leu Lys Met Lys Glu Thr Ala Glu Ala Tyr Leu Gly Lys Gln  
 835 840 845  
 Val Lys Lys Ala Val Val Thr Val Pro Ala Tyr Phe Asn Asp Ser Gln  
 850 855 860  
 10 Arg Gln Ala Thr Lys Asp Ala Gly Thr Ile Ala Gly Leu Glu Val Leu  
 865 870 875 880  
 Arg Ile Ile Asn Glu Pro Thr Arg Ala Ile Ala Tyr Gly Leu Asp Lys  
 885 890 895  
 Gly Asp Asp Gly Lys Glu Arg Asn Val Leu Ile Phe Asp Leu Gly Gly  
 900 905 910  
 Gly Thr Phe Asp Val Thr Leu Leu Thr Ile Asp Gly Gly Ile Phe Glu  
 915 920 925  
 Val Lys Ala Thr Asn Gly Asp Thr His Leu Gly Gly Glu Asp Phe Asp  
 930 935 940  
 15 Asn Arg Leu Val Thr Phe Thr Glu Glu Phe Lys Arg Lys Asn Lys  
 945 950 955 960  
 Gly Lys Asn Leu Ala Ser Ser His Arg Ala Leu Ala Arg Leu Arg Thr  
 965 970 975  
 Ala Cys Glu Arg Ala Lys Arg Thr Leu Ser Ser Ala Thr Gln Ala Thr  
 980 985 990  
 Ile Glu Ile Asp Ala Leu Phe Glu Asn Val Asp Phe Gln Ala Thr Ile  
 995 1000 1005  
 20 Thr Arg Ala Arg Phe Glu Glu Leu Cys Gly Asp Leu Phe Arg Ser Thr  
 1010 1015 1020  
 Ile Gln Pro Val Glu Arg Val Leu Gln Asp Ala Lys Met Asp Lys Arg  
 1025 1030 1035 1040  
 Ser Val His Asp Val Val Leu Val Gly Gly Ser Thr Arg Ile Pro Lys  
 1045 1050 1055  
 Val Gln Ser Leu Val Ser Asp Phe Phe Gly Gly Lys Glu Leu Asn Lys  
 1060 1065 1070  
 Ser Ile Asn Pro Asp Glu Ala Val Ala Tyr Gly Ala Ala Val Gln Ala  
 1075 1080 1085  
 25 Phe Ile Leu Thr Gly Gly Lys Ser Lys Gln Thr Glu Gly Leu Leu Leu  
 1090 1095 1100  
 Leu Asp Val Thr Pro Leu Thr Leu Gly Ile Glu Thr Ala Gly Gly Val  
 1105 1110 1115 1120  
 Met Thr Ala Leu Ile Lys Arg Asn Thr Thr Ile Pro Thr Lys Lys Ser  
 1125 1130 1135  
 Gln Ile Phe Ser Thr Tyr Ala Asp Asn Gln Pro Gly Val His Ile Gln  
 1140 1145 1150  
 Val Phe Glu Gly Glu Arg Ala Met Thr Lys Asp Cys His Leu Leu Gly  
 1155 1160 1165  
 30 Thr Phe Asp Leu Ser Gly Ile Pro Pro Ala Pro Arg Gly Leu Pro Gln  
 1170 1175 1180  
 Ile Glu Val Thr Phe Asp Leu Asp Ala Asn Gly Ile Leu Asn Val Ser  
 1185 1190 1195 1200  
 Ala Glu Glu Lys Gly Thr Gly Lys Arg Asn Gln Ile Thr Ile Thr Asn  
 1205 1210 1215  
 Asp Lys Gly Arg Leu Ser Lys Asp Glu Ile Glu Arg Met Val Asn Asp  
 1220 1225 1230  
 Ala Met Lys Tyr Glu Glu Asp Asp Lys Ala Gln Arg Asp Arg Val Glu  
 1235 1240 1245  
 35 Ala Lys Asn Gly Leu Glu Asn Tyr Ala Tyr Ser Met Lys Asn Thr Leu  
 1250 1255 1260  
 Ser Asp Ser Asn Val Ser Gly Lys Leu Glu Asp Ser Asp Lys Ala Thr  
 1265 1270 1275 1280  
 Leu Asn Lys Glu Ile Asp Val Val Leu Glu Trp Leu Ser Ser Asn Gln  
 1285 1290 1295

Glu Ala Ala Lys Glu Glu Tyr Glu His Lys Gln Lys Glu Leu Glu Ser  
                   1300                                  1305                  1310  
 Val Cys Asn Pro Ile Met Thr Lys Met Tyr Gln Ser Met Gly Gly Ala  
                   1315                                  1320                  1325  
 5 Ala Gly Gly Met Pro Gly Gly Met Pro Gly Met Ser Gly Met Ser Gly  
           1330                                  1335                  1340  
 Gly Ala Gly Pro Ala Gly Gly Ala Ser Ser Gly Pro Lys Val Glu Glu  
 1345                                  1350                  1355                  1360  
 Val Asp

10

15

20

25

30

35