

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad Intelectual
Oficina internacional



(10) Número de Publicación Internacional
WO 2013/011184 A2

(43) Fecha de publicación internacional
24 de enero de 2013 (24.01.2013) **WIPO | PCT**

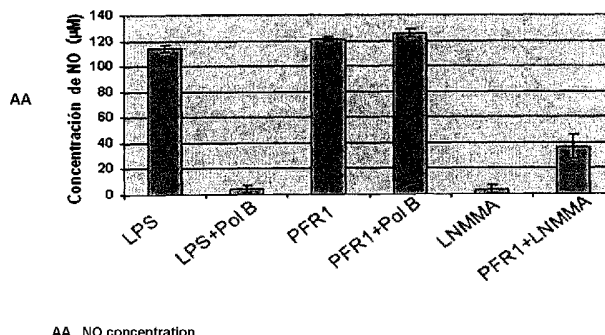
- (51) Clasificación Internacional de Patentes: Sin clasificar
- (21) Número de la solicitud internacional: PCT/ES2012/070541
- (22) Fecha de presentación internacional: 17 de julio de 2012 (17.07.2012)
- (25) Idioma de presentación: español
- (26) Idioma de publicación: español
- (30) Datos relativos a la prioridad: P201131257 21 de julio de 2011 (21.07.2011) ES
- (71) Solicitante (para todos los Estados designados salvo US): **CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS (CSIC)** [ES/ES]; Serrano, 117, E-28006 Madrid (ES).
- (72) Inventores; e
- (75) Inventores/Solicitantes (para US solamente): **THOMAS CARAZO, María del Carmen** [ES/ES]; Instituto de Parasitología y Biomedicina López Neyra, Parque Tecnológico de Ciencias de la Salud., Avda. del Conocimiento s/n, E-18100 Armilla (Granada) (ES). **LÓPEZ LÓPEZ, Manuel Carlos** [ES/ES]; Instituto de Parasitología y Biomedicina López Neyra, Parque Tecnológico de Ciencias de la Salud., Avda. del Conocimiento s/n, E-18100 Armilla (Granada) (ES).
- (74) Mandatario: **UNGRÍA LÓPEZ, Javier**; Avenida Ramón y Cajal, 78, E-28043 Madrid (ES).
- (81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible): 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) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), europea (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,

[Continúa en la página siguiente]

(54) Title: CHIMERIC MOLECULE USEFUL IN IMMUNOTHERAPY FOR LEISHMANIASIS, WHICH INCLUDES A FRAGMENT OF THE PFR1 PROTEIN OF LEISHMANIA INFANTUM WITH SPECIFIC IMMUNODOMINANT EPITOPES

(54) Título : MOLÉCULA QUIMÉRICA UTIL EN INMUNOTERAPIA FRENTE A LA LEISHMANIOSIS, QUE COMPRENDE UN FRAGMENTO DE LA PROTEINA PFR1 DE LEISHMANIA INFANTUM CON EPITOPES ESPECIFICOS INMUNODOMINANTES

FIG. 2



AA NO concentration

(57) Abstract: The invention relates to an isolated nucleotide sequence characterized in that it codes for the PFR1 protein of Leishmania infantum or a fragment of same, said PFR1 protein or a fragment of same includes at least one immunodominant epitope selected from the following group: SEQ ID No: 1, SEQ ID No: 2, SEQ ID No: 3, SEQ ID No: 4, SEQ ID No: 5, SEQ ID No: 6, SEQ ID No: 7 and SEQ ID No: 8, wherein said immunodominant epitope is able to induce a T cytotoxic immune response specific to the antigen of an animal, with respect to the kinetoplastids that cause leishmaniasis. Said immunodominant epitopes activate T cytotoxic lymphocytes and show high bonding affinity for the class I, type A2 MHC molecule.

(57) Resumen:

[Continúa en la página siguiente]

WO 2013/011184 A2

RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG). **Publicada:**

— *sin informe de búsqueda internacional, será publicada nuevamente cuando se reciba dicho informe (Regla 48.2(g))*

La presente invención se refiere a una secuencia nucleotídica aislada caracterizada por codificar para la proteína PFR1 de *Leishmania infantum* o un fragmento de la misma, dicha proteína PFR1 o un fragmento de la misma comprende al menos un epítipo inmunodominante seleccionado entre el siguiente grupo: SEQ ID No: 1, SEQ ID No: 2, SEQ ID No: 3, SEQ ID No: 4, SEQ ID No: 5, SEQ ID No: 6, SEQ ID No: 7 y SEQ ID No: 8, donde dicho epítipo inmunodominante es capaz de inducir una respuesta inmunológica T citotóxica específica de antígeno en un animal, frente a los kinetoplastidos que causan la enfermedad de la leishmaniosis. Dichos epítopes inmunodominantes son activadores de linfocitos T citotóxicos y presentan alta afinidad de unión por la molécula MHC de clase I de tipo A2.

MOLECULA QUIMERICA UTIL EN INMUNOTERAPIA FRENTE A LA LEISHMANIOSIS, QUE COMPRENDE UN FRAGMENTO DE LA PROTEINA PFR1 DE LEISHMANIA INFANTUM CON EPITOPES ESPECIFICOS INMUNODOMINANTES.

5

La presente invención se encuentra dentro del sector químico, farmacéutico, y en las áreas de la medicina, la biología molecular, la inmunología, la veterinaria y la parasitología, y se refiere a una herramienta inmunológica para la lucha contra la leishmaniosis, enfermedad provocada por diferentes especies pertenecientes al

10 género *Leishmania*.

ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR

15 Las especies del género *Leishmania*, protozoos parásitos intracelulares, pertenecen al orden Kinetoplastida familia *Trypanosomatidae*, se distribuyen por regiones tropicales y subtropicales del viejo y nuevo mundo, causando un amplio espectro de manifestaciones clínicas denominadas leishmaniosis. Según la especie causante, la leishmaniosis puede ser clasificada como cutánea,

20 mucocutánea o visceral (en referencia a su tropismo tisular y a las manifestaciones clínicas que provocan). La incidencia de la leishmaniosis ha aumentado enormemente en los últimos años, de tal forma que actualmente es endémica en 88 países repartidos por todos los continentes y se considera que hay 350 millones de personas en riesgo de contraer la enfermedad (WHO report,

25 <http://who.int/ctd/html/leisdis.html>). Se estima que hay en el mundo unos 12 millones de personas afectadas de leishmaniosis, incluyendo aquellos que no presentan la enfermedad de forma aparente. Del total de 2 millones anuales de nuevos casos, 500.000 son de leishmaniosis visceral (LV). Esta enfermedad es causada por *L. infantum* y *L. donovani* y los síntomas de la enfermedad incluyen

30 fiebre intermitente, anemia, esplenomegalia, hepatomegalia y linfadenopatía. El desenlace de la LV suele ser la muerte, generalmente causada por una infección concomitante, dado el débil estado inmunológico del paciente. La coinfección *Leishmania/VIH* se ha revelado en los últimos años como un importante problema de salud para los países del área mediterránea. En estos países, el principal

hospedador es el perro, actuando como reservorio de la enfermedad en humanos (Alvar et al. 2004. *Adv Parasitol.* 57: 1-88).

La vacunación es el tratamiento médico más eficiente para prevenir la mortalidad y morbilidad debida a agentes infecciosos. Pese a ello, actualmente son muy pocos los microorganismos patógenos contra los que se dispone de una vacuna eficaz. Frente a las diferentes especies de *Leishmania*, en los últimos años, se ha probado la utilización de vacunas elaboradas con antígenos o fragmentos de los mismos, tanto en forma purificada como recombinante, con resultados dispares (Kedzierski et al. 2010. *J Glob Infect Dis.* 2(2): 177-85; Kedzierski et al. 2006. *Parasitology*, 133: 87-112; Requena et al. 2004. *Expert Opin Biol Ther.* 4(9): 1505-17). No obstante, ninguno de los intentos para la obtención de una vacuna en humanos ha sido satisfactorio y ha culminado con éxito.

Otra opción interesante en la lucha contra la enfermedad es la inmunoterapia terapéutica o, en su defecto, la inmunoquimioterapia. Se han realizado intentos con parásitos completos pasteurizados con un adyuvante (Convit et al. 2003. *Med Hyg*, 97: 469-72), así como con una mezcla de antígenos propios del parásito (Badaro et al. 2006. *J Infect Dis*, 194: 1151-9), pero, al igual que ocurre con la vacunación, no se ha logrado ningún éxito definitivo (El-On J. 2009. *Isr Med Assoc J*, 11(10): 623-8).

Como antes se introdujo, el perro constituye el principal reservorio de la enfermedad, luego también se han realizado numerosos intentos desde el punto de vista inmunológico en la lucha frente a este problema sanitario, pero también veterinario. De hecho, la leishmaniosis constituye una enfermedad parasitaria grave en el perro. La sintomatología clínica más habitual es la pérdida de pelo, sobre todo alrededor de los ojos, orejas y la nariz. En una fase más avanzada de la enfermedad el perro pierde peso aunque no el apetito y son habituales la presencia de heridas en la piel, especialmente en la cabeza y las patas, así como síntomas relacionados con insuficiencia renal. Esta enfermedad es endémica en amplias zonas de España, así como en la mayoría de los países de la región mediterránea.

Al igual que ocurre con la enfermedad humana, se han realizado numerosos intentos desde diferentes perspectivas, tanto en vacunas como en inmunoterapia, sin que, hasta el momento, se disponga de moléculas que muestren una adecuada eficacia (Alvar et al. 2004. *Adv Parasitol.* 57: 1-88; Reis et al. 2010.

Trends Parasitol. 26(7): 341-9).

En cualquier caso, ya se hable de leishmaniosis canina o humana, se apunta a la posibilidad de que una de las más prometedoras vías de control de la leishmaniosis es la utilización de vacunas DNA que portan múltiples genes
5 codificantes de específicos antígenos de *Leishmania* o proteínas recombinantes quiméricas que contengan diferentes antígenos propios del parásito (de Oliveira et al. 2009. *Parasitol Int.* 58(4): 319-24; Palatnik-de-Sousa, 2008. *Vaccine* 26: 1709-1724).

10 Las proteínas PFR o paraflagelares representan una familia de relevantes antígenos específicos de tripanosomátidos que se localizan en la región paraflagelar de estos parásitos (Fouts et al., 1998 *J Biol Chem*, 273(34): 21846-21855; Clark et al., 2005. *Parasitol Res.* 96(5): 312-320). Algunos miembros de esta familia de antígenos, proteínas PFR1-3, destacan por su alta capacidad
15 inmunogénica (Michailowsky et al., *Infect Immun* 71(6): 3165-3171). La inmunización de ratones con las proteínas PFR1 y PFR2 purificadas de *T. cruzi* induce una respuesta inmunológica Th1 capaz de reducir, en ensayos experimentales de infección, los niveles de *T. cruzi* en el tejido cardiaco de los ratones inmunizados e infectados con el parásito *T. cruzi* (Morell et al. 2006.
20 *Vaccine*, 24: 7046–7055). Estos resultados, permiten postular que las proteínas PFR pueden ser adecuadas candidatas para ser utilizadas como vacunas. De acuerdo con estos resultados, se ha encontrado que linfocitos CD4+ aislados de ratones inmunizados con PFR son capaces de activar macrófagos parasitados provocando la muerte del parásito mediante la producción de NO (Wrightsmann et.
25 al. 2000. *Vaccine* 18 (14): 1419–27, Miller et. al. 1997. *J Immunol* 158 (11): 5330–7), y ser capaces de reducir el nivel de parásitos en sangre, en ensayos experimentales de infección, en ausencia de células B, pero no en ausencia de linfocitos T CD4+ y CD8+ funcionales. Desde el punto de vista de la inmunización génica, diferentes proteínas paraflagelares de diversos kinetoplastidos han sido
30 estudiadas. Se ha demostrado la capacidad inmunogénica y protectora de la proteína PFR2 de *L. mexicana* tras su inoculación tanto como DNA o proteína recombinante (Saravia et. al. 2005. *Vaccine* 23: 984-995). La inmunización de ratones con vectores DNA conteniendo el gen que codifica la PFR2 de *T. cruzi* o fusionada a la Hsp70 de dicho patógeno induce altos niveles de IgG2a anti-PFR,

sin embargo sólo la inmunización con la vacuna quimérica estimula la producción de IL-12 e IFN- γ y provoca la disminución de células productoras de IL-4, permitiendo una respuesta protectora contra *T. cruzi* (Morell et al. 2006. *Vaccine* 24: 7046–7055).

5

Con respecto a la proteína Hsp70, pertenece a la familia de las proteínas de choque térmico (*heat shock proteins*, Hsp). Éstas forman una amplia familia de proteínas de tamaño heterogéneo, las cuales están altamente conservadas entre las diferentes especies (eucariotas y procariotas). Las mismas son fundamentales
10 en el mantenimiento de la homeostasis celular por su papel de chaperonas (Smith, Whitesell et al. 1998. *Pharmacological Reviews* 50(4): 493-513). En cuanto a su papel inmunológico, resultan muy interesantes por su capacidad de activación del sistema inmunitario, destacando la familia Hsp70 por su versatilidad inmunológica. La Hsp70 procedente de células tumorales o de células infectadas
15 por virus tiene la capacidad de activar respuesta CTL CD8+ *in vivo* e *in vitro* contra distintos antígenos expresados en las células de las cuales se ha purificado la proteína inmunogénica (Srivastava. 2002. *Nat Rev Immunol* 2: 185-194; Wu et al., 2005. *Cancer Res.* 65(11): 4947-4954). Así, la Hsp70 extracelular puede formar complejos con péptidos antigénicos y simultáneamente activar
20 APCs. Esta interacción desencadena una cascada de eventos, en los que se incluirían procesos de cross-presentación de péptidos a MHC I restringida a CD8+ y MHC II restringido a células T CD4+, secreción de citocinas proinflamatorias y maduración fenotípica y funcional de células dendríticas (DCs) (Asea et al. 2000. *Nat Med* 6: 435-442; Basu et al. 2001. *Immunity* 14: 303-313; Harmala et al. 2002. *J Immunol* 169: 5622-5629; Tobian et al. 2004. *J Immunol* 173: 5130-5137).

En cuanto a la proteína Hsp70 de *Trypanosoma cruzi*, ensayos de nuestro laboratorio han mostrado *in vitro* que tiene *per se* un singular efecto estimulador sobre células de bazo y ganglio de ratones *naive* (Marañón et al., 2000. *Int. Immunol.* 12(12): 1685-1693), el cual da lugar a una rápida e intensa estimulación
30 de células T. Además, esta misma proteína es capaz de inducir *in vivo* e *in vitro*, frente al hapteno asociado, una respuesta inmunológica mixta (IgG1 e IgG2a) la cual, interesantemente, resulta ser independiente de los receptores TLR2 y TLR4 (Qazi et al. 2007. *Vaccine* 25(6): 1096-1103). Esta Hsp70 de *T. cruzi* también ha resultado ser capaz de generar una respuesta específica frente a la proteína

KMP11 cuando se realiza una inmunización con un vector vacuna que porta las secuencias de ambas proteínas, activando la producción de IgG2a específicas frente a la KMP11 (Thomas, García-Pérez et al. 2000. *DNA and Cell Biology* 19(1): 47-57; Thomas, Olivares et al. 2000. *Acta Tropica* 75(2): 203-210).

5 Además, los ratones inmunizados con la proteína de fusión KMP11-HSP70, pero no los inmunizados con la proteína KMP11 aislada, inducen una respuesta de linfocitos citotóxicos frente a células Jurkat-A2/Kb expresando la proteína KMP11 así como frente a dichas células cargadas con distintos péptidos de KMP11 de probada unión a la molécula A2. También se han conseguido hitos de este tipo
10 con el propio género *Leishmania*, administrando Hsp70 junto a la metaloproteasa gp63 propia de *Leishmania donovani* (Kaur et al. 2011. *Parasite Immunol.* 33(2): 95-103).

Frente a las diferentes especies de *Leishmania*, en los últimos años, se ha probado la utilización de vacunas elaboradas con parásitos completos inactivados
15 y/o modificados, antígenos o fragmentos de los mismos, tanto en forma purificada como recombinante, con resultados dispares. Así, según nuestros datos, ninguno de los intentos para la obtención de una vacuna para humanos y/o perros ha sido satisfactorio ni se ha culminado con éxito. La quimioterapia actualmente en uso, aunque muestra cierta efectividad en numerosos casos es incapaz de generar un
20 aclaramiento del parásito, aspecto necesario para su completo control.

En el 2009, propusimos como proyecto la identificación de epítopes T y de unión a la molécula A*0201 de la proteína PFR1, así como la obtención de unas moléculas quiméricas (vacunas DNA) formadas por la secuencia codificante de proteínas antigénicas identificadas de *L. infantum* PFR1, utilizadas de forma
25 aislada y asociadas a la proteína HSP70 y/o fragmentos de la misma, como molécula *carrier*. También propusimos la determinación de la respuesta inmunológica antígeno específica inducida frente a dichas proteínas antigénicas de *L. infantum* PFR1 tras la inmunización de ratones con las moléculas quiméricas construidas a tal efecto.

30 Existen estudios en contra del empleo de péptidos aislados de las proteínas PFR de *T. cruzi* para la inducción de una respuesta CTL. En concreto, Wrightsman R.A. et al., publicaron un artículo en 2002 donde analizan distintos péptidos aislados de las proteínas PFR de *T. cruzi* y evalúan si estos péptidos son eficientemente procesados y presentados, en el contexto del MHC-clase I, en el

curso de una infección experimental con dicho parásito y si son reconocidos por los linfocitos T citotóxicos (CTLs) en los animales inmunizados (*Wrightsmann et al. 2002. Parasite Immunol. 24(8): 401-12*). En dicho estudio, se identifican en PFR1 epítopes con capacidad de unión a las moléculas HLA de clase I murinas H-2Kb y H-2Db, pero se concluye que la inmunización de ratones con las proteínas PFR1 o PFR3 no generan CTLs frente a las mismas, ni frente a los péptidos en cuestión.

Por tanto, a la vista de la información del estado de la técnica, actualmente existe la necesidad de demostrar la eficiencia de moléculas quiméricas (vacunas DNA y /o recombinantes) formadas por la secuencia codificante de proteínas antigénicas de *L. infantum* PFR1 comprendiendo epítopes específicos capaces de inducir una respuesta CTL, utilizadas de forma aislada y asociadas a la proteína HSP70 y/o fragmentos de la misma, como molécula *carrier*. Así como su uso como moléculas eficaces como vacuna preventiva y terapéutica frente a la infección por *Leishmania*, tanto en humanos como en perros.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

20

La presente invención representa una útil herramienta en la lucha contra la leishmaniosis humana y animal. Se trata de la utilización de secuencias nucleotídicas codificantes para la proteína PFR1 de *Leishmania infantum* y/o fragmentos de la misma conteniendo una serie de péptidos, solos o en conjunción con la proteína Hsp70 de *Trypanosoma cruzi*, así como de plásmidos conteniendo sus secuencias genéticas codificantes. Dichos péptidos contenidos en la proteína PFR1 de *L. infantum* se corresponden con epítopes inmunodominantes, reconocidos de forma específica por linfocitos T CD8+ con capacidad citotóxica, inducidos por la citada proteína usada como inmunógeno.

En un caso preferente, los epítopes identificados son presentados por la molécula HLA humana HLA-A*0201. Con estas moléculas genéticas y proteicas la presente invención consigue una respuesta inmunitaria, celular y humoral, en el hospedador frente al protozoo parásito, con capacidad para controlar, de forma significativa, la infección por *Leishmania* y/o prevenir la misma. Dichas moléculas

objeto de la presente invención son relevantes por su papel en inmunoterapia frente a la leishmaniosis tanto usadas como vacuna preventiva, como terapéutica (aisladas o en combinación con diferentes quimioterápicos). Así, representan una seria ventaja, sobre todo, si tenemos en cuenta la inexistencia de vacunas preventivas eficaces frente a esta enfermedad parasitaria y las dificultades e inconvenientes que presentan los tratamientos farmacológicos tradicionalmente utilizados que, aunque de cierta efectividad en la mayoría de los casos, en muchos otros (especialmente en perros) no producen el aclaramiento del parásito para el completo control de la enfermedad y que, además, son bastante costosos y suelen presentar bastantes efectos adversos, amén de la aparición cada vez más frecuente de casos de resistencia.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención protege una secuencia nucleotídica aislada caracterizada por codificar para la proteína PFR1 de *Leishmania infantum* o un fragmento de la misma. Dicha proteína PFR1 o un fragmento de la misma comprende, al menos, un epítipo inmunodominante seleccionado entre el siguiente grupo: SEQ ID No: 1, SEQ ID No: 2, SEQ ID No: 3, SEQ ID No: 4, SEQ ID No: 5, SEQ ID No: 6, SEQ ID No: 7 y SEQ ID No: 8, donde dicho epítipo inmunodominante es capaz de inducir una respuesta inmunológica T citotóxica específica de antígeno en un animal, frente a los kinetoplástidos que causan la enfermedad de la leishmaniosis. Dichos epítipos inmunodominantes son activadores de linfocitos T citotóxicos y presentan alta afinidad de unión por la molécula MHC de clase I de tipo A2.

25

En la presente invención se considera "epítipo inmunodominante" a un fragmento peptídico capaz de ser reconocido por los receptores linfocitarios y de generar una respuesta inmunitaria celular específica de epítipo. Suele depender, en gran medida, del repertorio de moléculas MHC del individuo puesto que, de ellas depende en gran parte la presentación de los antígenos a los linfocitos T.

La expresión "animal" referida en la presente invención, hace referencia a un humano o un animal de compañía, y más preferentemente a un perro.

En la presente invención el término “secuencia nucleotídica” se refiere a cualquier secuencia nucleotídica que incluye ADN, preferentemente ADN genómico, ADN sintético, ARN, ARN transcrito *in vitro*, ARN mensajero, dichas secuencias pueden ser secuencias sentido o antisentido. Por tanto, la presente invención hace
5 referencia a estas secuencias independientemente de sus condiciones de obtención, por lo que se incluyen secuencias tanto extraídas de una muestra biológica como por clonación o síntesis mediante procesos químicos o enzimáticos.

10 En la presente invención el término “secuencia nucleotídica que codifica para una proteína o un fragmento de la misma” se refiere a una secuencia nucleotídica que es capaz, bajo un control adecuado de expresión por parte de sus correspondientes elementos de regulación (promotores, *enhancers*, sitios de transcripción, etc.), de transcribir y traducir una secuencia aminoacídica de la
15 proteína de interés o un fragmento de la misma. La proteína de interés así como los fragmentos de la misma referidos en la presente invención se caracterizan por la secuencia de aminoácidos que comprenden pero, además, se pueden caracterizar también por la célula donde se expresa, su proceso de maduración y por las condiciones medioambientales existentes.

20

En la presente invención el término “secuencia de aminoácidos” se refiere a una secuencia de un oligopéptido, péptido, proteína, o sus fragmentos, que se producen de manera natural o bien se generan de forma sintética. Cuando en la presente invención se hace referencia a una secuencia codificada por una
25 secuencia nucleotídica, el término no se limita a las secuencias de aminoácidos completas, o a las secuencias de aminoácidos nativas asociadas con la citada molécula proteica, sino que además también se está refiriendo a las variaciones que puede sufrir dicha secuencia de aminoácidos nativa.

30 En una realización particular, la presente invención protege la secuencia nucleotídica definida anteriormente, caracterizada porque dicha secuencia codifica para los aminoácidos 1-595 de la proteína PFR1 de *Leishmania infantum*, determinada por la SEQ ID No: 12. Dicho fragmento codifica para la proteína completa.

En otra realización particular, la presente invención protege la secuencia nucleotídica definida anteriormente, caracterizada porque dicha secuencia codifica para el fragmento correspondiente a los aminoácidos 160-595 de la
5 proteína PFR1 de *Leishmania infantum* determinada por la SEQ ID No: 9.

En una realización particular, la presente invención protege la secuencia nucleotídica definida anteriormente, caracterizada porque dicha secuencia codifica para el fragmento correspondiente a los aminoácidos 160-548 de la
10 proteína PFR1 de *Leishmania infantum* determinada por la SEQ ID No: 10.

En otra realización particular, la presente invención protege la secuencia nucleotídica definida anteriormente, caracterizada porque dicha secuencia codifica para el fragmento correspondiente a los aminoácidos 160-385 de la
15 proteína PFR1 de *Leishmania infantum* determinada por la SEQ ID No: 11.

La presente invención protege también una molécula quimérica caracterizada por comprender:

- 20 a) una secuencia nucleotídica definida anteriormente, que preferentemente se encuentra fusionada a
b) una secuencia nucleotídica que codifica para la proteína Hsp70 de *Trypanosoma cruzi*, o fragmentos de la misma;

25 donde dicha molécula quimérica es capaz de inducir una respuesta inmunológica T citotóxica específica de antígeno en un animal frente a los kinetoplastidos que causan la enfermedad de la leishmaniosis.

En la presente invención el término “molécula quimérica” se refiere a una
30 molécula de ADN que contiene secuencias nucleotídicas procedentes de dos especies diferentes, preferentemente dichas especies son *Leishmania infantum* y *Trypanosoma cruzi*.

En una realización particular, la presente invención protege la molécula quimérica definida anteriormente, caracterizada porque porta la secuencia nucleotídica que codifica para la proteína Hsp70 de *Trypanosoma cruzi*, determinada por SEQ ID No: 13, o fragmentos de la HSP70 con actividad *carrier*.

5

En otra realización particular, la presente invención protege la molécula quimérica definida anteriormente, caracterizada porque incorpora en el extremo 3' del fragmento génico codificante para el fragmento de la proteína PFR1 correspondiente a los aminoácidos 160 a 595, caracterizado por SEQ ID No: 9, y
10 la secuencia nucleotídica que codifica para la proteína Hsp70 de *Trypanosoma cruzi*, determinada por la SEQ ID No: 13 o fragmentos de la HSP70 con actividad *carrier*.

En otra realización particular, la presente invención protege la molécula quimérica
15 definida anteriormente, caracterizada porque incorpora en el extremo 3' del fragmento génico codificante para el fragmento de la proteína PFR1 correspondiente a los aminoácidos 160 a 548, caracterizado por SEQ ID No: 10, y la secuencia nucleotídica que codifica para la proteína Hsp70 de *Trypanosoma cruzi*, determinada por la SEQ ID No: 13 o fragmentos de la HSP70 con actividad
20 *carrier*.

En otra realización particular, la presente invención protege la molécula quimérica definida anteriormente, caracterizada porque incorpora en el extremo 3' del fragmento génico codificante para el fragmento de la proteína PFR1
25 correspondiente a los aminoácidos 160 a 365 caracterizado por SEQ ID No: 11, y la secuencia nucleotídica que codifica para la proteína Hsp70 de *Trypanosoma cruzi*, determinada por la SEQ ID No: 13, o fragmentos de la HSP70 con actividad *carrier*.

30 En una realización particular, la presente invención protege la molécula quimérica definida anteriormente, caracterizada porque incorpora en el extremo 3' del fragmento génico codificante para la proteína PFR1, la secuencia nucleotídica que codifica para la proteína Hsp70 de *Trypanosoma cruzi*, la cual es SEQ ID No: 13 o fragmentos de la HSP70 con actividad *carrier*.

La presente invención protege también un vector de expresión o recombinante caracterizado por comprender:

- a) una secuencia nucleotídica definida anteriormente, o
- 5 b) una molécula quimérica definida anteriormente.

La presente invención protege también un plásmido recombinante caracterizado por comprender el vector definido anteriormente.

10 Otro aspecto protegido por la presente invención concierne a una composición, preferentemente farmacéutica o inmunogénica, caracterizada por comprender:

- a) una secuencia nucleotídica definida anteriormente, o
- b) una molécula quimérica definida anteriormente.

15 Otro aspecto protegido por la presente invención concierne al uso de la composición farmacéutica o inmunogénica definida anteriormente, para el tratamiento y/o prevención de una infección de los kinetoplástidos que causan la enfermedad de la leishmaniosis en un animal.

20 Otro aspecto protegido por la presente invención concierne al método para la fabricación de vacunas terapéuticas o preventivas para el tratamiento y/o prevención de una infección de los kinetoplástidos que causan la enfermedad de la leishmaniosis, mediante el uso de la composición farmacéutica o inmunogénica definida anteriormente. Dicho uso o método se caracteriza por comprender las

25 siguientes etapas:

- a) identificar las secuencias codificantes de interés, preferentemente identificar al menos una secuencia nucleotídica definida anteriormente,
- b) amplificar al menos una secuencia nucleotídica identificada en a) mediante
- 30 PCR empleando DNA genómico del kinetoplástido que causa la enfermedad de la leishmaniosis y oligonucleótidos que contienen dianas de enzimas de restricción que permitirán el clonaje dirigido del amplicón tras la digestión del mismo con dichas enzimas en vectores de expresión procariota y eucariota,

- c) clonar en fase al menos una secuencia nucleotídica amplificada en b) para la producción de la proteína codificada por dicha secuencia nucleotídica,
d) purificar al menos una de las proteínas obtenidas en c), también denominadas proteínas recombinantes (quimeras o no), mediante cromatografía de afinidad, y
5 e) producir al menos un vector de DNA libre de endotoxinas para la inoculación segura como vacuna terapéutica o preventiva para el tratamiento y/o prevención de una infección de los kinetoplástidos que causan la enfermedad de la leishmaniosis.
- 10 Otro aspecto protegido por la presente invención concierne al uso de una secuencia nucleotídica, una molécula quimérica, un vector recombinante, un plásmido recombinante, o una composición farmacéutica o inmunogénica, definidos anteriormente, como marcadores en métodos de control del grado de
15 infección de los kinetoplástidos que causan la enfermedad de la leishmaniosis en un animal.

Preferentemente, la presente invención hace referencia al uso de una secuencia nucleotídica, una molécula quimérica, un vector recombinante, un plásmido recombinante, o una composición farmacéutica o inmunogénica, definidos
20 anteriormente, para generar memoria inmunológica protectora frente a la infección de los kinetoplástidos que causan la enfermedad de la leishmaniosis en un animal no infectado.

Más preferentemente, la presente invención hace referencia al uso de una
25 secuencia nucleotídica, una molécula quimérica, un vector recombinante, un plásmido recombinante, o una composición farmacéutica o inmunogénica, definidos anteriormente, para aclarar o generar el aclaramiento parcial o total de los kinetoplástidos que causan la enfermedad de la leishmaniosis de los tejidos en un animal infectado.

30

La invención tiene principalmente dos claras opciones de aplicación inmunoterapéutica, la vacunación preventiva y la utilización en terapias inmunes frente a la infección por *Leishmania*. Así mismo, presenta la posibilidad de que las moléculas/productos objeto de la invención puedan ser utilizadas en forma de

proteínas recombinantes, como plásmidos DNA (vacuna genética), o en forma combinada.

Así, una primera aplicación de los productos a patentar sería la utilización de
5 estas moléculas para generar memoria inmunológica protectora frente a la
infección por el mencionado protozoo parásito, ya sea en humanos o en perros,
consiguiendo el control de la enfermedad en zonas endémicas (vacunación). Otra
aplicación es el uso de estas moléculas como inmunoterapia en individuos ya
infectados, con objeto de potenciar la respuesta inmunitaria del hospedador frente
10 al parásito y controlar el mismo. Este tratamiento puede ser aislado o en
combinación con otros quimioterápicos ya existentes, sobre todo, persiguiendo el
aclaramiento total del parásito que tan difícil resulta en la actualidad con los
medios disponibles. Así, activando y modulando la respuesta inmunitaria del
hospedador frente al parásito y especialmente induciendo una respuesta T
15 citotóxica antígeno-específica podemos conseguir que el sistema inmunológico
acabe con los parásitos acantonados en tejidos, como médula ósea o bazo, que
la mayoría de tratamientos quimioterápicos no consiguen aclarar.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus
20 variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos,
componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y
características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en
parte de la práctica de la invención. Las siguientes figuras y ejemplos se
proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la
25 presente invención.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

30 **FIGURA 1.** Electroforesis en gel de acrilamida al 10% SDS-PAGE
correspondiente a la purificación de la proteína recombinante PFR1 de
Leishmania infantum expresada en un sistema de expresión procariota *in vitro* y
purificada por cromatografía de afinidad. MW: Marcador de peso molecular.

FIGURA 2. Producción de NO en macrófagos alveolares de rata estimulados con la proteína PFR1, LPS (control de estimulación) y diferentes inhibidores.

FIGURA 3. *Western blots* de extractos de las células COS-7 transfectadas con los 5 diferentes plásmidos ensayo. Membrana A: *Western* empleando el suero frente a la PAR-2 de *T. cruzi*. Membrana B: *Western* empleando el suero frente a la Hsp70 de *T. cruzi*. Membrana C: *Western blot* empleando anticuerpo anti-Th70. Pocillo 1: Extracto total de células COS-7. Pocillo 2: Extracto total de células COS-7 transformadas con el plásmido pCMV4. Pocillo 3: Extracto total de células COS-7 10 transformadas con el plásmido pCMV4-PFR1. Pocillo 4: Extracto total de células COS-7 transformadas con el plásmido pCMV4-PFR1-Hsp70. Pocillo 5: Extracto total de células COS-7 transformadas con el plásmido pCMV4-PFR1-T70. Pocillo 6: Marcador de peso molecular.

15 **FIGURA 4.** Respuesta humoral frente a la proteína PFR1 y a diferentes tiempos post-inmunización (14 y 40 días) de los ratones C57BL/6 inmunizados con los distintos plásmidos a ensayo (pCMV4-PFR1; pCMV4-PFR1-Hsp70) y control negativo (Solución salina). Se representan los valores obtenidos de IgG (panel superior A) y de los isotipos IgG1 e IgG2a (panel inferior B).

20

FIGURA 5. Respuesta humoral frente a la proteína PFR1 y antígeno soluble de Leishmania (SLA) de los diferentes ratones C57BL/6 inmunizados con los distintos plásmidos y retos con *Leishmania infantum* (SS. Solución salina; pCMV4; PFR1. pCMV4 PFR1; 70c. pCMV4 PFR1-Hsp70 completa; 70t. pCMV4 25 PFR1-Hsp70 truncada) A: IgG/anti-SLA, B: IgG_{2a}/anti-SLA, C: IgG₁/anti-SLA, y D: IgG/anti-PFR1.

FIGURA 6. Índice de estimulación frente a la proteína PFR1 en ensayos de linfoproliferación con esplenocitos de ratones C57BL/6 inmunizados con los 30 distintos plásmidos a estudio (SS. Solución salina; pCMV4; PFR1. pCMV4 PFR1; 70c. pCMV4 PFR1-Hsp70 completa; 70t. pCMV4 PFR1-Hsp70 truncada)

FIGURA 7. Producción de NO por parte de los macrófagos del peritoneo de ratones C57BL/6 tras el reto con *Leishmania infantum* (SS. Solución salina;

pCMV4; PFR1. pCMV4 PFR1; 70c. pCMV4 PFR1-Hsp70 completa; 70t. pCMV4 PFR1-Hsp70 truncada).

FIGURA 8. Carga parasitaria en los diferentes órganos tras la infección con *Leishmania infantum* de los ratones C57BL/6 inmunizados con los distintas moléculas a estudio y ratones control (SS. Solución salina; pCMV4; PFR1. pCMV4 PFR1; 70c. pCMV4 PFR1-Hsp70 completa; 70t. pCMV4 PFR1-Hsp70 truncada).

10 **FIGURA 9.** Porcentaje de unión a células T2 de los diferentes péptidos de la proteína PFR1 de *L. infantum* correspondientes a los epítopes inmunodominantes identificados. Valores referidos al péptido control (HB-ENV₃₃₄₋₃₄₂).

FIGURA 10. Determinación del número de células expresando Granzima B en ratones control (*S. salina*) y ratones inmunizados con los plásmidos *pCMV4-PFR1* y *pCMV4 PFR1-Hsp70*), medida mediante ensayo de ELISPOT, Las cifras mostradas se obtienen restando del numero de células determinado para cada pocillo problema y control salino (estimulados con el péptido en cuestión), el valor obtenido en el control negativo (fondo). Se considera positivo toda aquella cifra superior al doble del control negativo más dos desviaciones standards y cuyo resultado tenga un valor mínimo de 150 células por millón. En los pocillos negativos no se representa el valor correspondiente. Se muestra un valor representativo de al menos tres diferentes ensayos.

25 **FIGURA 11.** Determinación del número de células expresando Granzima B medida mediante ensayo de ELISPOT en esplenocitos de ratones infectados y controles no infectados. Las cifras mostradas se obtienen restando del número de células determinado para cada pocillo problema (ratón infectado) y control no infectado, el valor obtenido en el control negativo (esplenocitos sin presencia de antígeno). Se considera positivo toda aquella cifra superior al doble del control negativo más dos desviaciones standards y cuyo resultado tenga un valor mínimo de 250 células por millón. En los pocillos negativos no se representa el valor correspondiente. Se muestra un valor representativo de al menos tres diferentes ensayos.

FIGURA 12. Determinación del número de células expresando Granzima B medida mediante ensayo de ELISPOT en células no parenquimales del hígado de ratones infectados y controles no infectados. Las cifras mostradas se obtienen restando del número de células determinado para cada pocillo problema (ratón infectado) y control no infectado, el valor obtenido en el control negativo (esplenocitos sin presencia de antígeno). Se considera positivo toda aquella cifra superior al doble del control negativo más dos desviaciones standards y cuyo resultado tenga un valor mínimo de 750 células por millón. En los pocillos negativos no se representa el valor correspondiente. Se muestra un valor representativo de al menos tres diferentes ensayos.

FIGURA 13 Tablas 1 y 2. Predicciones teóricas de unión al HLA-A*0201 de potenciales epítopes T CD8+. En negrita y subrayados se señalan los aminoácidos implicados en la unión a la molécula HLA-A*0201. Entre paréntesis se indica la denominación de los péptidos que se sintetizaron.

FIGURA 14 Respuesta humoral frente a la proteína 436aaPFR1 y a diferentes tiempos post-inmunización (14 y 40 días) de los ratones C57BL/6 inmunizados con los distintos plásmidos a ensayo (pCMV4-436aaPFR1; pCMV4-436aaPFR1-Hsp70) y control negativo (Solución salina). Se representan los valores obtenidos de IgG (panel superior A) y de los isotipos IgG1 e IgG2a (panel inferior B).

FIGURA 15 Índice de estimulación frente a la proteína PFR1 en ensayos de linfoproliferación con esplenocitos de ratones C57BL/6 inmunizados con los plásmidos pCMV4-436aaPFR1, pCMV4-436aaPFR1-HSP70 y Solución salina (SS).

FIGURA 16 Determinación del número de células expresando Granzima B en ratones control (*S. salina*) y ratones inmunizados con los plasmidos pCMV4-436aaPFR1 y pCMV4-436aaPFR1-Hsp70), medida mediante ensayo de ELISPOT, Las cifras mostradas se obtienen restando del numero de células determinado para cada pocillo problema y control salino (estimulados con el péptido en cuestión), el valor obtenido en el control negativo (fondo). Se considera

positivo toda aquella cifra superior al doble del control negativo más dos desviaciones standards y cuyo resultado tenga un valor mínimo de 150 células por millón. En los pocillos negativos no se representa el valor correspondiente. Se muestra un valor representativo de al menos tres diferentes ensayos.

5

BIBLIOGRAFÍA

- 10 1- Alvar et al. 2004. *Adv Parasitol.* 57: 1-88
- 2- Kedzierski et al. 2010. *J Glob Infect Dis.* 2(2): 177-85
- 3- Kedzierski et al. 2006. *Parasitology*, 133: 87-112
- 4- Requena et al. 2004. *Expert Opin Biol Ther.* 4(9): 1505-17
- 5- Convit et al. 2003. *Med Hyg*, 97: 469-72
- 15 6- Badaro et al. 2006. *J Infect Dis*, 194: 1151-9
- 7- El-On J. 2009. *Isr Med Assoc J*, 11(10): 623-8
- 8- Alvar et al. 2004. *Adv Parasitol.* 57: 1-88
- 9- Reis et al. 2010. *Trends Parasitol.* 26(7): 341-9
- 10- de Oliveira et al. 2009. *Parasitol Int.* 58(4): 319-24
- 20 11- Palatnik-de-Sousa, 2008. *Vaccine* 26: 1709-1724
- 12- Fouts et al., 1998 *J Biol Chem*, 273(34): 21846-21855
- 13- Clark et al., 2005. *Parasitol Res.* 96(5): 312-320
- 14- Michailowsky et al., *Infect Immun* 71(6): 3165-3171
- 15- Morell et al. 2006. *Vaccine*, 24: 7046–7055
- 25 16- Wrightsman et. al. 2000. *Vaccine* 18 (14): 1419–27
- 17- Miller et. al. 1997. *J Immunol* 158 (11): 5330–7
- 18- Saravia et. al. 2005. *Vaccine* 23: 984-995
- 19- Morell et. al. 2006. *Vaccine* 24: 7046–7055
- 20- Smith, Whitesell et al. 1998. *Pharmacological Reviews* 50(4): 493-513
- 30 21- Srivastava. 2002. *Nat Rev Immunol* 2: 185-194
- 22- Wu et al., 2005. *Cancer Res.* 65(11): 4947-4954
- 23- Asea et al. 2000. *Nat Med* 6: 435-442
- 24- Basu et al. 2001. *Immunity* 14: 303-313
- 25- Harmala et al. 2002. *J Immunol* 169: 5622-5629

- 26- Tobian et al. 2004. J Immunol 173: 5130-5137
27- Marañón et al., 2000. Int. Immunol. 12(12): 1685-1693
28- Qazi et al. 2007. Vaccine 25(6): 1096-1103
29- Thomas, García-Pérez et al. 2000. DNA and Cell Biology 19(1): 47-57
5 30- Thomas, Olivares et al. 2000. Acta Tropica 75(2): 203-210
31- Kaur et al. 2011. Parasite Immunol. 33(2): 95-103
32- Wrightsman R.A. et al. 2002. Parasite Immunol. 24(8): 401-12
33- Buffet et. al., 1995, Antimicrob. Agents Chemother. 39(9): 2167-2168

10

EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos específicos que se proporcionan en este documento de patente sirven para ilustrar la naturaleza de la presente invención. Estos ejemplos
15 se incluyen solamente con fines ilustrativos y no han de ser interpretados como limitaciones a la invención que aquí se reivindica. Por tanto, los ejemplos descritos más adelante ilustran la invención sin limitar el campo de aplicación de la misma.

20 EJEMPLO 1

1.1 *La proteína PFR1 induce la expresión de óxido nítrico.*

La proteína PFR1 de *Leishmania infantum* se engloba dentro de la familia de las
25 proteínas paraflagelares característica de kinetoplastidos. En la **figura 1**, mostramos la proteína recombinante PFR1 de *L. infantum* expresada en un sistema de expresión procariota y purificada mediante cromatografía de afinidad. Para esta proteína hemos demostrado que, *per se*, tiene la capacidad de activar la producción de óxido nítrico (NO), uno de los principales mecanismos que tienen
30 los macrófagos para eliminar los patógenos que han fagocitado en macrófagos alveolares de rata *naive*, es decir, sin ningún tipo de tratamiento o infección previa. Esta activación de la producción de óxido nítrico confiere a la mencionada proteína una característica inmunológica relevante pues el NO favorece el

aclaramiento de los amastigotes de *Leishmania* que se multiplican en los macrófagos del hospedador. En la **figura 2**, se recogen los valores de producción de NO por estos macrófagos alveolares al estimularlos con LPS (control) y la proteína PFR1. Interesantemente, la activación observada para LPS, y no aquella detectada para la proteína PFR1, queda inhibida por la presencia de polimixina B (inhibidor de la actividad inducida por LPS), lo cual descarta cualquier contaminación con LPS de la proteína recombinante PFR1. Por otra parte, la adición de L-nitromonometilarginina (LNMMA), inhibidor de la enzima óxido nítrico sintasa sí inhibe la activación de NO inducida por la proteína PFR1, indicando el mecanismo de acción de esta proteína. Similares resultados son obtenidos por la proteína de fusión PFR1-HSP70.

1.2 *Expresión de la proteína PFR1 en células eucariotas.*

La determinación de la correcta expresión de las proteínas a estudio en células eucariotas se determina mediante el análisis de células COS-7 transfectadas con los genes codificantes para la proteína PFR1, y proteínas quiméricas de fusión PFR1-HSP70 y PFR1-H70T clonados en el plásmido pCMV4. La visualización de las distintas proteínas se realiza mediante ensayos de Western blots sobre extractos de las células transfectadas con los respectivos plásmidos anteriormente mencionados y anticuerpos policlonales generados frente a la proteína PFR1. Así, en la **figura 3** se observa, respectivamente, la presencia de bandas de reconocimiento con tamaños de 70 kDa (correspondiente a la proteína PFR1, en el carril de las células con el pCMV4 PFR1), de 140 kDa en el carril de las células COS-7 transfectadas con el plásmido pCMV4 PFR1-Hsp70 y de 96 kDa en el carril de las células con el plásmido pCMV4 PFR1-Hsp70T; no detectándose reconocimiento en el carril de las células portadoras del pCMV4 vacío.

1.3 *Respuesta humoral antígeno-específica inducida por las moléculas a ensayo.*

A modo de ejemplo mostramos los resultados obtenidos tras la inmunización por vía intramuscular de grupos de 12 ratones de la cepa C57BL/6, con 100 µg de los

diferentes plásmidos a ensayo, así como con los controles negativos (plásmido vacío y solución salina). Cada ratón fue inmunizado 4 veces con un tiempo entre cada inmunización de dos semanas. Seis semanas tras la cuarta inmunización, seis ratones de cada grupo fueron retados con 10^5 promastigotes infectivos de la cepa JPCM5 (MCAN/ES/98/LLM-724) de *L. infantum* por vía intravenosa.

Para analizar la respuesta humoral generada en los diferentes grupos de ratones, se realizaron sangrías dos semanas después de cada inmunización y se midieron los niveles de anticuerpos en suero. Los resultados obtenidos indican que la presencia de anticuerpos IgG anti-PFR1 aparece 15 días post-segunda inmunización en el grupo inmunizado con el gen PFR1 aislado y dos semanas tras la tercera inmunización en aquellos que portan los genes fusionados PFR1-HSP70 ó PFR1-HSP70T. En la **figura 4** mostramos los resultados obtenidos para cada molécula a ensayo 14 y 40 días post-cuarta inmunización. Los niveles de IgG determinados en sueros procedentes de los ratones inmunizados con el gen PFR1 fusionado al gen HSP70 fueron superiores a aquellos detectados en los ratones inmunizados con el gen PFR1 aislado, observándose un máximo de anticuerpos a las dos semanas post-cuarta inmunización. En todos los casos el nivel de anticuerpos anti-PFR1 levemente desciende a las seis semanas post-cuarta inmunización. El análisis de isotipos refleja que los anticuerpos generados muestran una clara polarización de la respuesta hacia el isotipo IgG2a (respuesta inmunológica de tipo Th1). Resultados similares a los referidos para la molécula pPFR1-HSP70 son obtenidos con la molécula pPFR1-H70T.

Los resultados obtenidos en los ensayos de respuesta humoral frente a la proteína PFR1 y antígenos totales de *Leishmania* (SLA) existente en los ratones inmunizados con las referidas moléculas a ensayo y retados con *L. infantum* quedan mostrados en la **figura 5**. El análisis de dichos resultados indica que la infección con *Leishmania* no induce variación significativa en los niveles de IgG frente a PFR1 y se mantiene la tendencia hacia el isotipo IgG2a observado previo a la infección.

1.4 Respuesta celular antígeno-específica inducida por las moléculas a ensayo.

Ensayos de linfoproliferación se realizaron tres semanas después de la cuarta inoculación. Los bazos fueron extraídos en esterilidad y los esplenocitos obtenidos se cultivaron *in vitro*, con concentraciones crecientes de la proteína rPFR1 (0.4, 2 y 10 $\mu\text{g/ml}$). Además, en este ensayo se incluyó como control 5 positivo un mitógeno (ConA) y, como control negativo, los esplenocitos sin estimular. De los resultados obtenidos, mostrados en la **figura 6**, se puede afirmar que existe un índice de proliferación celular significativo frente a la proteína recombinante PFR1 y, además, esta estimulación es dosis dependiente en esplenocitos de los ratones inmunizados con las moléculas recombinantes a 10 estudio. Interesantemente, dicho índice fue significativamente mayor en los grupos que recibieron el gen PFR1 fusionado a la HSP70 y HSP70T. Los índices de proliferación (IE) para el caso de los esplenocitos procedentes de los ratones inoculados con estas moléculas de fusión, son aproximadamente de 25, mientras que los esplenocitos obtenidos de los ratones inmunizados con el plásmido 15 conteniendo el gen PFR1 aislado se sitúan en torno a 20. En ambos casos, por encima de los controles; ratones inoculados con el plásmido vacío, IE=13 y con solución salina, IE=4. Estos índices de proliferación de las células esplénicas de los ratones inmunizados con las moléculas a ensayo se mantienen con similares valores ocho semanas post-cuarta inmunización. Además, la capacidad de 20 estimulación se mantiene tras el reto, observando un máximo índice de proliferación (respuesta celular) en los ratones inmunizados con el gen PFR1 aislado y tras estimular con 2 $\mu\text{g/ml}$ de la proteína recombinante PFR1.

1.5 *Expresión de óxido nítrico en ratones inmunizados e infectados con L.*
25 *infantum.*

Como queda reflejado en la **Figura 7**, se observa una significativa mayor capacidad de producir óxido nítrico (NO) en los macrófagos peritoneales de los ratones inmunizados con las moléculas problema, especialmente con las 30 construcciones fusionadas (PFR1-HSP70 o PFR1-HSP70T) relativa a los ratones control, tanto estimulados como sin estimular. Además, esta capacidad de los macrófagos peritoneales de los mencionados grupos de ratones a estudio de producir óxido nítrico (NO) aumenta significativamente tras la estimulación con la proteína recombinante PFR1. Por otra parte, mostramos que dicha producción fue

significativamente mayor en los ratones infectados *versus* aquella detectada en los no retados.

1.6 *Determinación de la capacidad de inducir protección frente a la infección*
5 *por L. infantum de las moléculas a ensayo.*

La carga parasitaria fue analizada mediante dilución límite (*Buffet et. al., 1995, Antimicrob. Agents Chemother. 39(9): 2167-2168*), en el hígado, bazo y médula ósea (tejidos diana de dicho parásito), los días 14 y 28 post-infección, mostrando
10 en la **figura 8** un resumen de los resultados obtenidos. Así, a los 14 días post-infección, todos los grupos de ratones presentaban parásitos en el hígado, sin embargo, en los grupos control (ss y pCMV4) la carga de parásitos es significativamente mayor que la detectada en los grupos inmunizados con las diferentes moléculas a ensayo, mostrando valores superiores en al menos un
15 orden de magnitud. Además, a diferencia de lo que ocurre en los grupos control, los ratones vacunados con las moléculas a ensayo no muestran un incremento de la carga parasitaria hepática a los 28 días post-infección. De hecho, los ratones inmunizados con el gen PFR1 fusionado al gen HSP70 completo (pPFR1-HSP70), lograron aclarar el mencionado órgano de parásitos. El análisis de la tasa de
20 parásitos en bazo, muestra un comportamiento similar al anteriormente descrito. Así, a los 14 días post-infección observamos una significativa mayor tasa de parásitos (al menos un orden de magnitud) en el tejido esplénico de los ratones controles (ss y pCMV4) relativo al mostrado por los ratones inmunizados con las moléculas a ensayo. De hecho, los ratones inmunizados con el gen PFR1
25 fusionado al gen HSP70T (pPFR1-H70T) no muestran parásitos en bazo a las dos semanas post-infección. A nivel de médula ósea, únicamente los grupos control (ss y pCMV4) presentan parásitos, detectándose éstos a los 28 días post-infección. Interessantemente, ninguno de los ratones inmunizados con las moléculas problema presenta parásitos en dicho tejido. En resumen, todos los
30 grupos inmunizados con el gen PFR1 aislado o fusionado a la molécula *carrier* Hsp70 ó H70T, presentan a lo largo del periodo de infección y tejidos analizados, una carga parasitaria significativamente menor que la hallada en los grupos control (disminución entre dos a cuatro órdenes de magnitud), indicando que

estas moléculas inducían un elevado nivel de protección frente a la infección por *L. infantum*, inoculado por vía intravenosa.

El análisis del patrón de expresión de citocinas de esplenocitos de los ratones 5 inmunizados y ratones control (medidas por citometría en el sobrenadante de cultivo celular empleando el kit *Mouse Th1/Th2 Cytokine CBA -BD Biosciences*) muestra la existencia de niveles de TNF- α e IFN- γ mayores y con significancia estadística en los ratones inmunizados con las construcciones quiméricas PFR1-HSP70 y PFR1-H70T, estimulados o sin estimular con rPFR1 y/o SLA, *versus* los 10 grupos control ($P < 0.01$). Sin embargo, no se observa variación estadísticamente significativa entre los grupos a evaluar en los niveles de IL-2 ó IL-4. Así mismo, el análisis tras el reto con *Leishmania* del nivel de activación de los macrófagos esplénicos de ratones de los distintos grupos problema y control es medido por el patrón de expresión de las moléculas de superficie CD80, CD86 y CD40. Los 15 resultados obtenidos mostraban que a los 21 días post-infección la expresión de CD86 y CD40 era significativamente mayor en el grupo de ratones inmunizados con las construcciones quiméricas PFR1-HSP70 y PFR1-H70T relativo a los grupos control ($P < 0.01$).

20 1.7 Identificación de epítopes T CD8+ en la proteína PFR1 de *L. infantum*.

La identificación de epítopes contenidos en la secuencia de la proteína PFR1 de *L. infantum* capaces de ser reconocidos por linfocitos T CD8+ y, consecuentemente de activar en el hospedador una respuesta antígeno- 25 específica citotóxica, se llevó a cabo mediante la búsqueda de epítopes con capacidad de unión al HLA de clase I. Para ello, se seleccionaron *in silico* diferentes péptidos susceptibles de unirse a HLA-A*0201 (el más frecuente, expresado por la mitad de la población humana), utilizando tres programas: SYFPEITHI, RANKPEP y BIMAS. Para ello, se introdujo la secuencia deducida de 30 la proteína PFR1 de *Leishmania infantum* (*gene number*: AY702344) en cada uno de los programas y se seleccionó el algoritmo de unión a HLA-A*0201. Los dos primeros programas dan una puntuación a cada uno de los péptidos en base a su afinidad teórica a esta molécula HLA. El programa BIMAS puntúa la estabilidad de unión, indicando el tiempo de unión teórico de cada uno de los péptidos a la

molécula HLA. Combinando los resultados obtenidos, se seleccionaron ocho teóricos epítopes de alta afinidad de unión a la molécula HLA de clase I y se sintetizaron los péptidos correspondientes: SEQ ID No: 1 - 1864 (FMDIIGVKKV), SEQ ID No: 2 - 1865 (QLDATQLAQV), SEQ ID No: 3 - 1866 (KLELTVYNC),
5 SEQ ID No: 4 - 1868 (KMMEDIMNA), SEQ ID No: 5 - 1869 (AMHDGETQV), SEQ ID No: 6 - 1871 (QLQERLIEL), SEQ ID No: 7 - 1872 (MLYLTLGSL) y SEQ ID No: 8 - 1873 (KMVEYKSHL). En las **figura 13, tablas 1 y 2**, se recogen las puntuaciones obtenidas por los diferentes péptidos en los citados programas informáticos.

10

Para determinar la capacidad de unión de los mencionados péptidos a la molécula HLA-A*0201 llevamos a cabo ensayos de unión a células T2, deficientes en la expresión de moléculas transportadoras de antígenos (TAP). Los resultados obtenidos, mostrados en la **figura 9** indican que todos los péptidos a ensayo
15 presentan buena o muy buena afinidad de unión a la citada molécula HLA-A*0201, siendo la afinidad en algunos casos superior al péptido HB-ENV₃₃₄₋₂₄₂ usado como control, para el que se refiere un porcentaje de unión del 100%.

El análisis de la capacidad de presentación efectiva de estos epítopes en el
20 contexto de una inmunización experimental con las moléculas a ensayo, se llevó a cabo en ratones transgénicos C57BL/6-A2/K^b (expresan el producto del gen quimérico HLA-A2.1/K^b, donde los dominios alfa1 y alfa2 son iguales a los de la molécula HLA-A*0201 humana y los dominios alfa3, transmembrana y citoplasmático correspondientes a la molécula murina H-2K^b) inmunizados por vía
25 intramuscular con las moléculas pPFR1 y pPFR1-HSP70. Como control negativo, se utilizaron ratones a los que se inyectó solución salina (*Sigma*). Seis semanas tras la cuarta inmunización los esplenocitos de los ratones pertenecientes a los distintos grupos son estimulados con los diferentes péptidos en el contexto de un ensayo ELISPOT usando como sonda un anticuerpo anti-granzima B. Los
30 resultados obtenidos (**figura 10**) muestran que cinco de los péptidos ensayados dieron una respuesta positiva de granzima B (activación de CTLs antígeno específicos) en los ratones inmunizados con la molécula quimérica pPFR1-HSP70 y uno en aquellos inmunizados con la molécula conteniendo el gen PFR1 aislado. Estos resultados demuestran que las mencionadas moléculas a ensayo son

eficientemente procesadas y presentadas en el contexto del MHC-clase I. Además indican que en concreto esos epítopes para los que se obtienen valores positivos son reconocidos por los linfocitos T citotóxicos (CTLs) de los ratones inmunizados.

5

El análisis de la capacidad de generar respuesta citotóxica de estos mismos péptidos en el curso de una infección experimental con *L. infantum* se evaluó en ratones transgénicos C57BL/6-A2/K^b infectados por vía i.v. con 10⁶ promastigotes infectivos de *L. infantum* (cepa JPCM5). A los 170 días tras la infección, los
10 ratones fueron sacrificados y sus esplenocitos o sus células no parenquimales del hígado se expusieron a los diferentes péptidos en el contexto de un ensayo ELISPOT con un anticuerpo detector de Granzima B. Los resultados obtenidos muestran (**figuras 11 y 12**) que cuatro de los péptidos ensayados dieron una respuesta positiva de Granzima B en esplenocitos de bazo y tres de ellos también
15 en células no parenquimales de hígado. Por lo tanto, estos péptidos son presentados a los CTLs en el curso de la infección experimental por el parásito. Interesantemente, sólo uno de estos cuatro péptidos también dio positivo en el ensayo con los ratones inmunizados, lo que evidencia que la presentación antigénica difiere entre la inmunización con los plásmidos y el curso de la
20 infección experimental.

Conclusión EJEMPLO 1: Los resultados obtenidos muestran que los ratones inmunizados con las moléculas problema a ensayo y posteriormente infectados, no muestran tener parásitos en medula ósea, mientras que aquellos ratones
25 control inoculados con el plásmido vacío pCMV4 o con solución salina presentan una alta tasa de parásitos en dicho tejido a los 28 días post-infección. Además, la tasa de parásitos en bazo e hígado de los ratones inmunizados con las mencionadas moléculas problema son entre dos a cuatro órdenes de magnitud inferiores a las detectadas en los ratones control inoculados con el plásmido vacío
30 (pCMV4) o solución salina. Los ratones inmunizados con la molécula pPFR1-H70T e infectados con *Leishmania*, no muestran tener parásitos en bazo a los 14 días post-infección.

EJEMPLO 2

2.1 *Respuesta humoral antígeno-específica inducida por las moléculas a ensayo.*

5 A modo de ejemplo mostramos los resultados obtenidos tras la inmunización por vía intramuscular de grupos de 12 ratones de la cepa C57BL/6, con 100 µg de los diferentes plásmidos a ensayo, así como con los controles negativos (solución salina). En este caso, los plásmidos utilizados contenían la secuencia correspondiente al fragmento de la proteína PFR1 de *Leishmania infantum* de 436
10 aminoácidos de longitud comprendido entre los aminoácidos 160 y 595 de la misma. Cada ratón fue inmunizado 4 veces con un tiempo entre cada inmunización de dos semanas.

Para analizar la respuesta humoral generada en los diferentes grupos de ratones, se realizaron sangrías dos semanas después de cada inmunización y se midieron
15 los niveles de anticuerpos en suero. Los resultados obtenidos indican que la presencia de anticuerpos IgG anti-PFR1 aparece 15 días post-segunda inmunización en el grupo inmunizado con el gen 436aaPFR1 aislado y dos semanas tras la tercera inmunización en aquellos que portan los genes fusionados 436aaPFR1-HSP70. En la **figura 14 (A)** mostramos los resultados
20 obtenidos para cada molécula a ensayo 14 y 40 días post-cuarta inmunización. Los niveles de IgG determinados en sueros procedentes de los ratones inmunizados con el gen 436aaPFR1 fusionado al gen HSP70 fueron superiores a aquellos detectados en los ratones inmunizados con el gen 436aaPFR1 aislado, observándose un máximo de anticuerpos a las dos semanas post-cuarta
25 inmunización. En todos los casos, el nivel de anticuerpos anti-PFR1 levemente desciende a las seis semanas post-cuarta inmunización. El análisis de isotipos (**B**) muestra en los anticuerpos generados una clara polarización de la respuesta hacia el isotipo IgG2a (respuesta inmunológica de tipo Th1).

30 1.4 *Respuesta celular antígeno-específica inducida por las moléculas a ensayo.*

Ensayos de linfoproliferación se realizaron tres semanas después de la cuarta inoculación. Los bazos fueron extraídos en esterilidad y los esplenocitos

obtenidos se cultivaron *in vitro*, con concentraciones crecientes de la proteína rPFR1 (0.4, 2 y 10 µg/ml). Además, en este ensayo se incluyó como control positivo un mitógeno (ConA) y, como control negativo, los esplenocitos sin estimular. De los resultados obtenidos, mostrados en la **figura 15**, se puede
5 afirmar que existe un índice de proliferación celular significativo frente a la proteína recombinante PFR1 y, además, esta estimulación es dosis dependiente en esplenocitos de los ratones inmunizados con las moléculas recombinantes a estudio. Interesantemente, dicho índice fue significativamente mayor en los grupos que recibieron el gen 436aaPFR1 fusionado a la HSP70. Los índices de
10 proliferación (IE) para el caso de los esplenocitos procedentes de los ratones inoculados con esta molécula de fusión, son aproximadamente de 22, mientras que los esplenocitos obtenidos de los ratones inmunizados con el plásmido conteniendo el gen 436aaPFR1 aislado se sitúan en torno a 18. En ambos casos, por encima de los controles; con solución salina, IE=4. Estos índices de
15 proliferación de las células esplénicas de los ratones inmunizados con las moléculas a ensayo se mantienen con similares valores ocho semanas post-cuarta inmunización.

El análisis de la capacidad de presentación efectiva de estos epítopes en el
20 contexto de una inmunización experimental con las moléculas a ensayo, se llevó a cabo en ratones transgénicos C57BL/6-A2/K^b (expresan el producto del gen quimérico HLA-A2.1/Kb, donde los dominios alfa1 y alfa2 son iguales a los de la molécula HLA-A*0201 humana y los dominios alfa3, transmembrana y citoplasmático correspondientes a la molécula murina H-2K^b) inmunizados por vía
25 intramuscular con las moléculas 436aaPFR1 y 436aaPFR1-HSP70. Como control negativo, se utilizaron ratones a los que se inyectó solución salina (*Sigma*). Seis semanas tras la cuarta inmunización los esplenocitos de los ratones pertenecientes a los distintos grupos son estimulados con los diferentes péptidos en el contexto de un ensayo ELISPOT usando como sonda un anticuerpo anti-
30 granzima B. Los resultados obtenidos (**figura 16**) muestran que cinco de los péptidos ensayados dieron una respuesta positiva de granzima B (activación de CTLs antígeno específicos) en los ratones inmunizados con la molécula quimérica 436aaPFR1-HSP70 y uno en aquellos inmunizados con la molécula conteniendo el gen 436aaPFR1 aislado. Estos resultados demuestran que las mencionadas

moléculas a ensayo son eficientemente procesadas y presentadas en el contexto del MHC-clase I. Además, indican que en concreto esos epítopes para los que se obtienen valores positivos son reconocidos por los linfocitos T citotóxicos (CTLs) de los ratones inmunizados.

5

Conclusión EJEMPLO 2: Los resultados obtenidos muestran que el fragmento de la proteína PFR1 de 436 aminoácidos se comporta de forma muy similar a la proteína completa, consiguiendo unos datos de respuesta inmunológica (humoral, celular y citotóxica) similares. Por tanto, dado que estos parámetros son los
10 implicados en la protección frente al parásito, podemos concluir que este fragmento se comporta en todos los términos a estudio como la proteína completa.

REIVINDICACIONES

1. Una secuencia nucleotídica caracterizada por codificar para la proteína PFR1 de *Leishmania infantum* o un fragmento de la misma que comprende al
5 menos un epítoto inmunodominante seleccionado entre el siguiente grupo: SEQ ID No: 1, SEQ ID No: 2, SEQ ID No: 3, SEQ ID No: 4, SEQ ID No: 5, SEQ ID No: 6, SEQ ID No: 7 y SEQ ID No: 8, donde dicho epítoto inmunodominante es capaz de inducir una respuesta inmunológica T citotóxica específica de antígeno en un animal frente a los kinetoplástidos que causan la enfermedad de la leishmaniosis.
- 10
2. La secuencia nucleotídica según la reivindicación 1 caracterizada porque codifica para los aminoácidos 1-595 de la proteína PFR1 de *Leishmania infantum* determinada por la SEQ ID No: 12.
- 15
3. La secuencia nucleotídica según la reivindicación 1 caracterizada porque codifica para los aminoácidos 160-595 de la proteína PFR1 de *Leishmania infantum* determinada por la SEQ ID No: 9.
4. La secuencia nucleotídica según la reivindicación 1 caracterizada porque
20 codifica los aminoácidos 160-548 de la proteína PFR1 de *Leishmania infantum* determinada por la SEQ ID No: 10.
5. La secuencia nucleotídica según la reivindicación 1 caracterizada porque codifica los aminoácidos 160-385 de la proteína PFR1 de *Leishmania infantum*
25 determinada por la SEQ ID No: 11.
6. Una molécula quimérica caracterizada por comprender:
- a) una secuencia nucleotídica definida en las reivindicaciones 1-5, fusionada a
b) una secuencia nucleotídica que codifica para la proteína Hsp70 de
30 *Trypanosoma cruzi*, o fragmentos de la misma;
- donde dicha molécula quimérica es capaz de inducir una respuesta inmunológica T citotóxica específica de antígeno en un animal frente a los kinetoplástidos que causan la enfermedad de la leishmaniosis.

7. La molécula quimérica según la reivindicación 6, caracterizada porque porta la secuencia nucleotídica que codifica para la proteína Hsp70 de *Trypanosoma cruzi* determinada por la SEQ ID No: 13 o fragmentos de la misma.
- 5 8. Un vector recombinante caracterizado por comprender:
- a) una secuencia nucleotídica definida en las reivindicaciones 1-5, o
 - b) una molécula quimérica definida en las reivindicaciones 6-7.
9. Un plásmido recombinante caracterizado por comprender el vector definido
- 10 en la reivindicación 8.
10. Una composición farmacéutica caracterizada por comprender:
- a) una secuencia nucleotídica definida en las reivindicaciones 1-5, o
 - b) una molécula quimérica definida en las reivindicaciones 6-7.
- 15
11. Uso de una secuencia nucleotídica definida en las reivindicaciones 1-5, para el tratamiento y/o prevención de una infección de los kinetoplástidos que causan la enfermedad de la leishmaniosis en un animal.
- 20 12. Uso de una secuencia nucleotídica definida en las reivindicaciones 1-5, caracterizada porque el animal es un humano o un perro.
13. Uso de una secuencia nucleotídica definida en las reivindicaciones 1-5, para la fabricación de vacunas terapéuticas o preventivas.
- 25
14. Uso de una secuencia nucleotídica según la reivindicación 13, caracterizada porque comprende las siguientes etapas:
- a) identificar al menos una secuencia nucleotídica definida en las reivindicaciones 1-5,
- 30
- b) amplificar al menos una secuencia nucleotídica identificada en a) mediante PCR empleando DNA genómico del kinetoplástido que causa la enfermedad de la leishmaniosis y oligonucleótidos que contienen dianas de enzimas de restricción que permitirán el clonaje dirigido del amplicón tras la

digestión del mismo con dichas enzimas en vectores de expresión procariota y eucariota,

c) clonar en fase al menos una secuencia nucleotídica amplificada en b) para la producción de la proteína codificada por dicha secuencia nucleotídica,

d) purificar al menos una de las proteínas obtenidas en c) mediante cromatografía de afinidad, y

e) producir, al menos, un vector de DNA libre de endotoxinas para la inoculación segura.

10

15. Uso de una secuencia nucleotídica definida en las reivindicaciones 1-5, como marcadores en métodos de control del grado de infección de los kinetoplástidos que causan la enfermedad de la leishmaniosis en un animal.

15 16. Uso de una secuencia nucleotídica, según la reivindicación 15, caracterizada porque el animal es un humano o un perro.

17. Uso de una secuencia nucleotídica definida en las reivindicaciones 1-5, para generar memoria inmunológica protectora frente a la infección de los kinetoplástidos que causan la enfermedad de la leishmaniosis en un animal no infectado.

18. Uso de una secuencia nucleotídica, según la reivindicación 17, caracterizada porque el animal es un humano o un perro.

25

19. Uso de una secuencia nucleotídica definida en las reivindicaciones 1-5, para aclarar parcial o totalmente los kinetoplástidos que causan la enfermedad de la leishmaniosis de los tejidos en un animal infectado.

30 20. Uso de una secuencia nucleotídica, según la reivindicación 19, caracterizada porque el animal es un humano o un perro.

FIG. 1

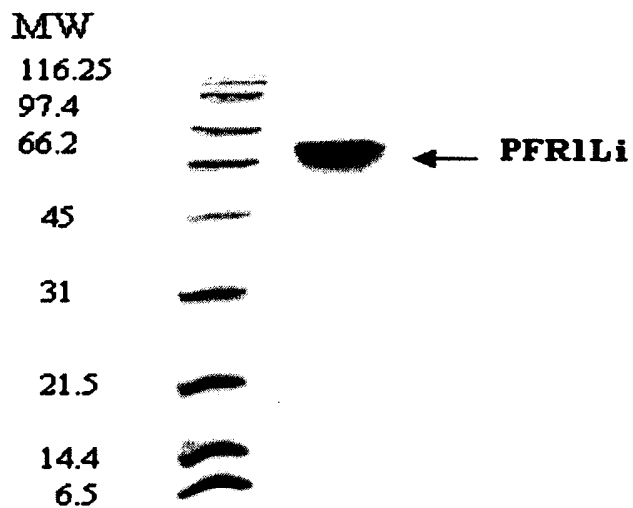


FIG. 2

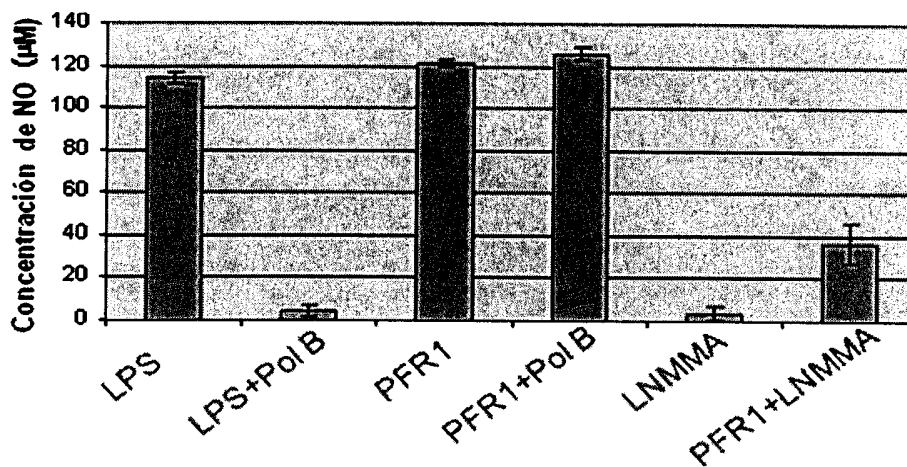


FIG. 3

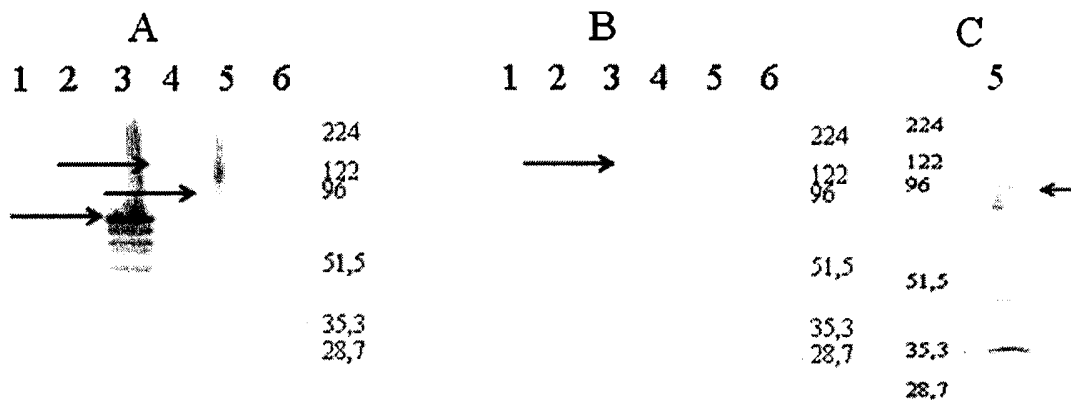


FIG. 4

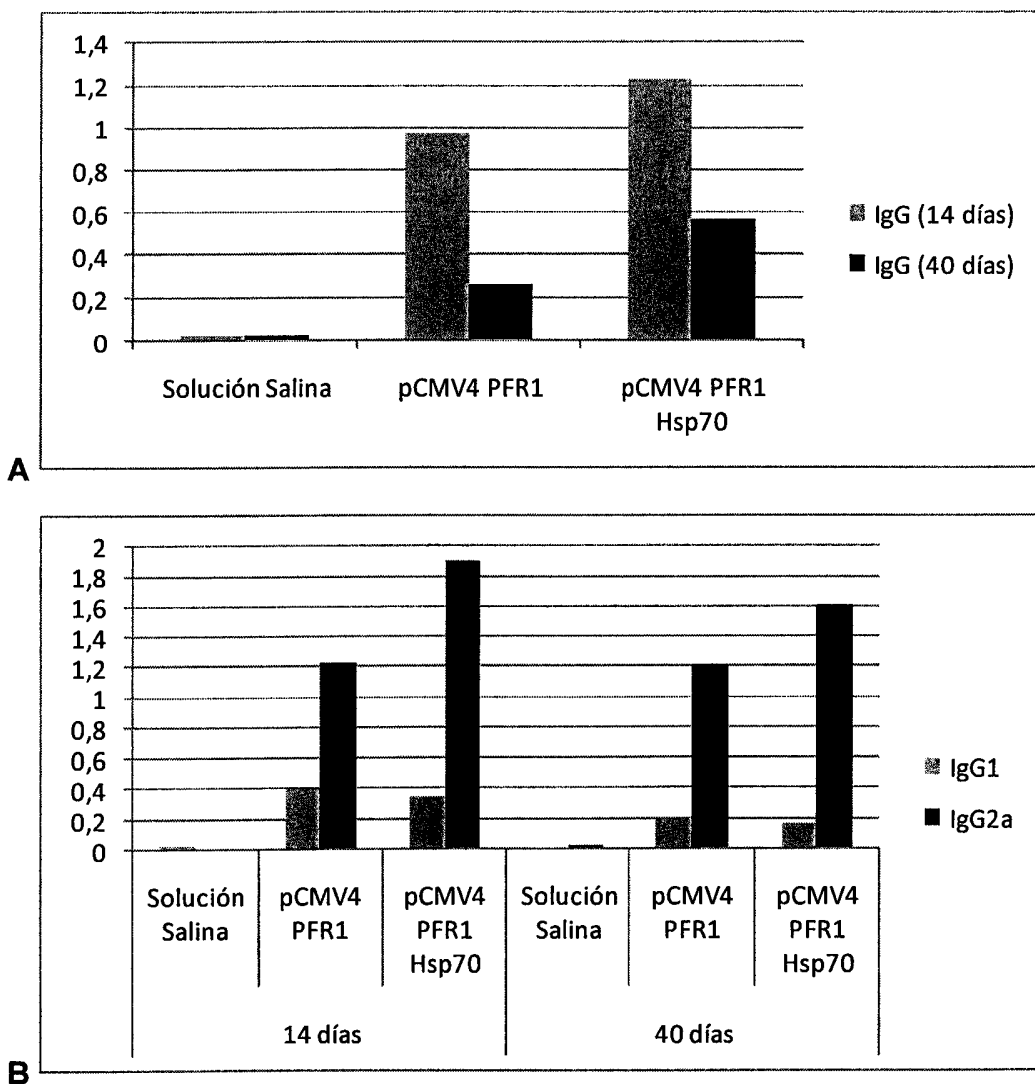


FIG. 5

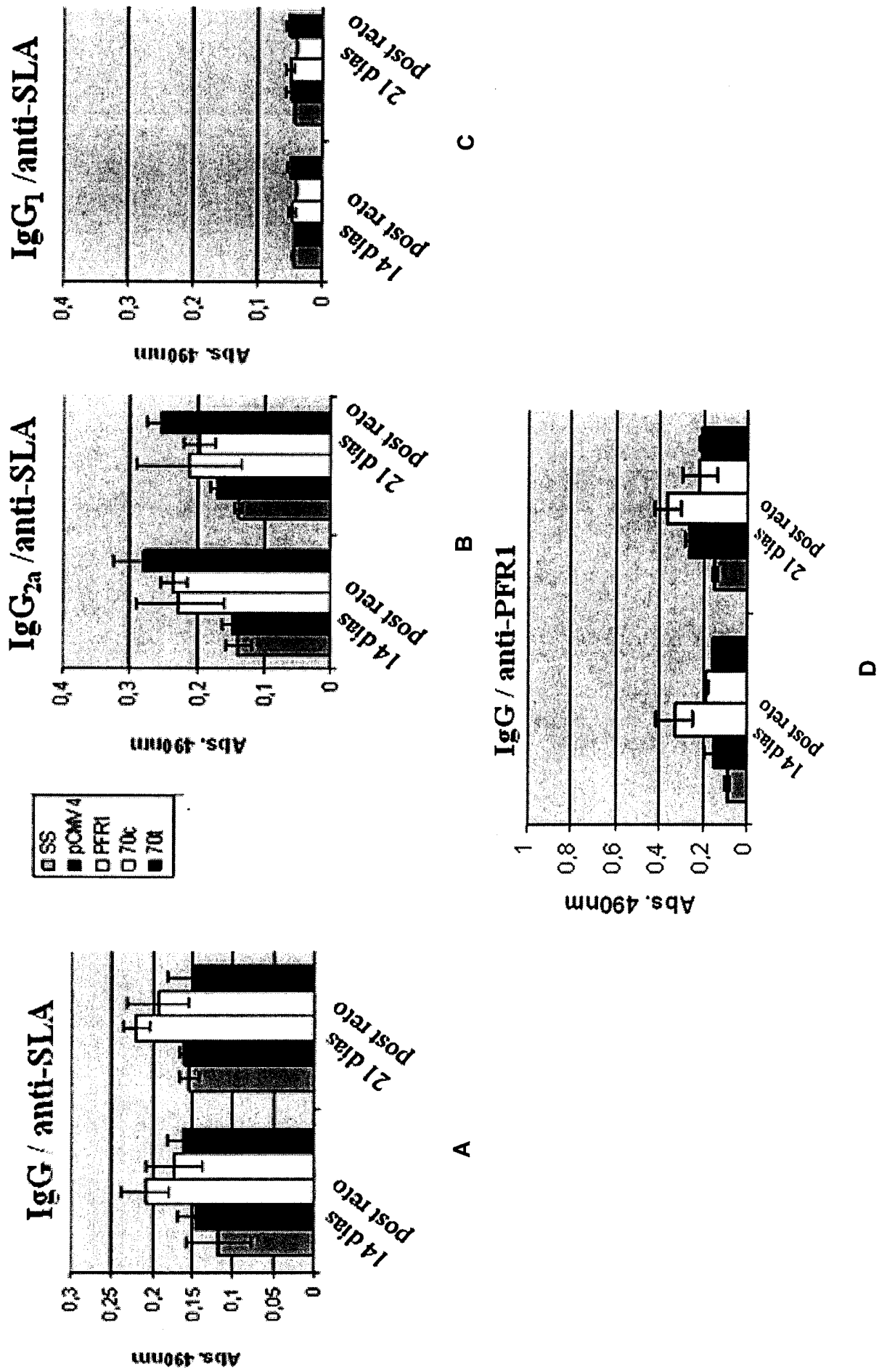


FIG. 6

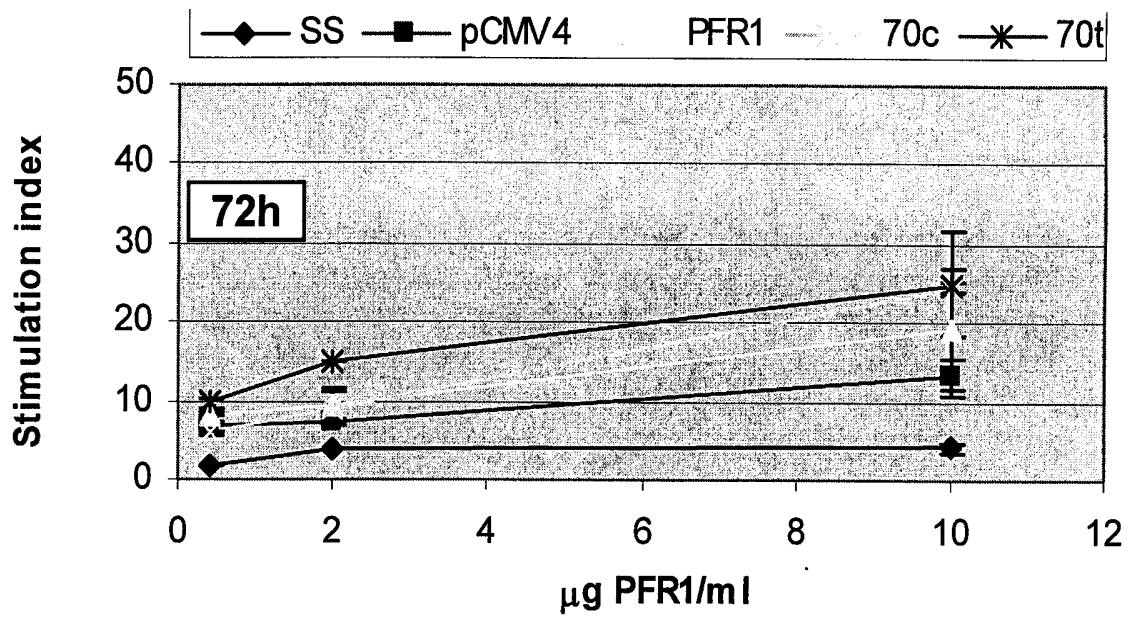


FIG. 7

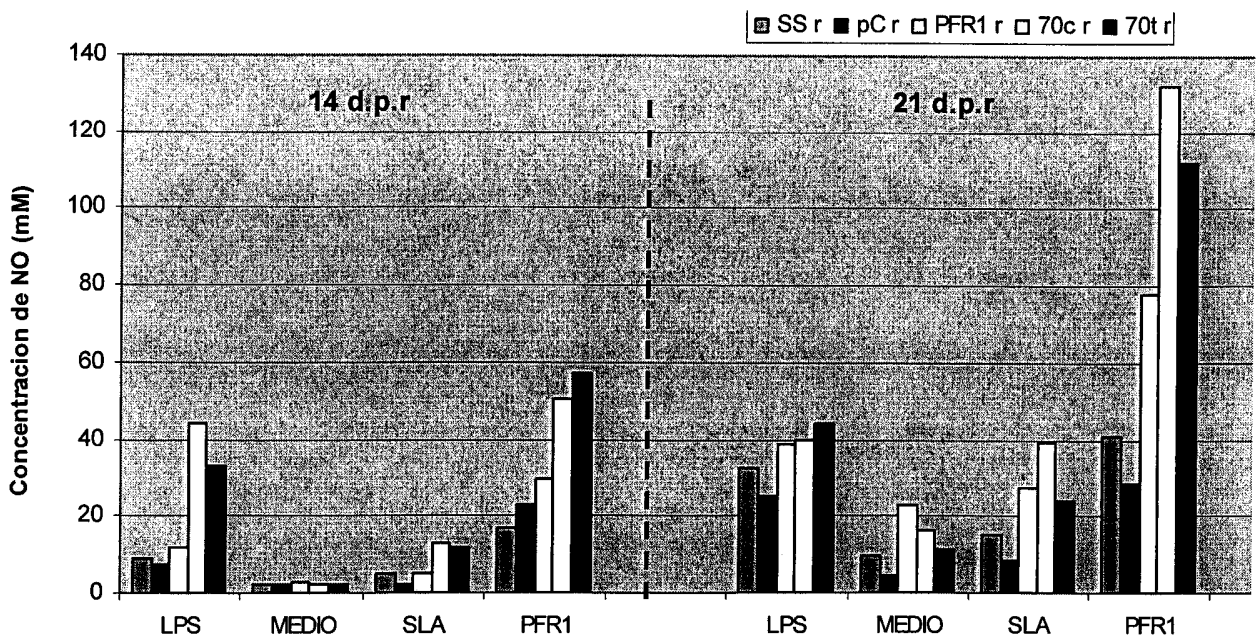


FIG. 8

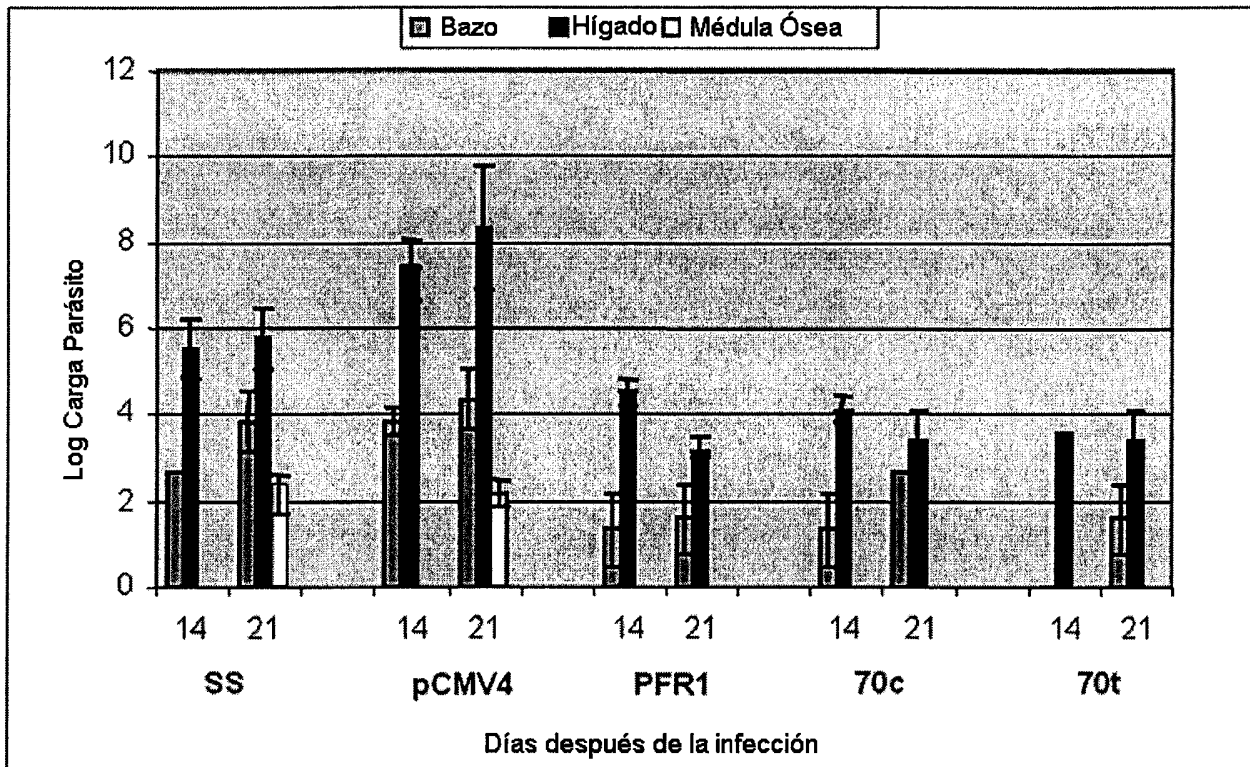


FIG. 9

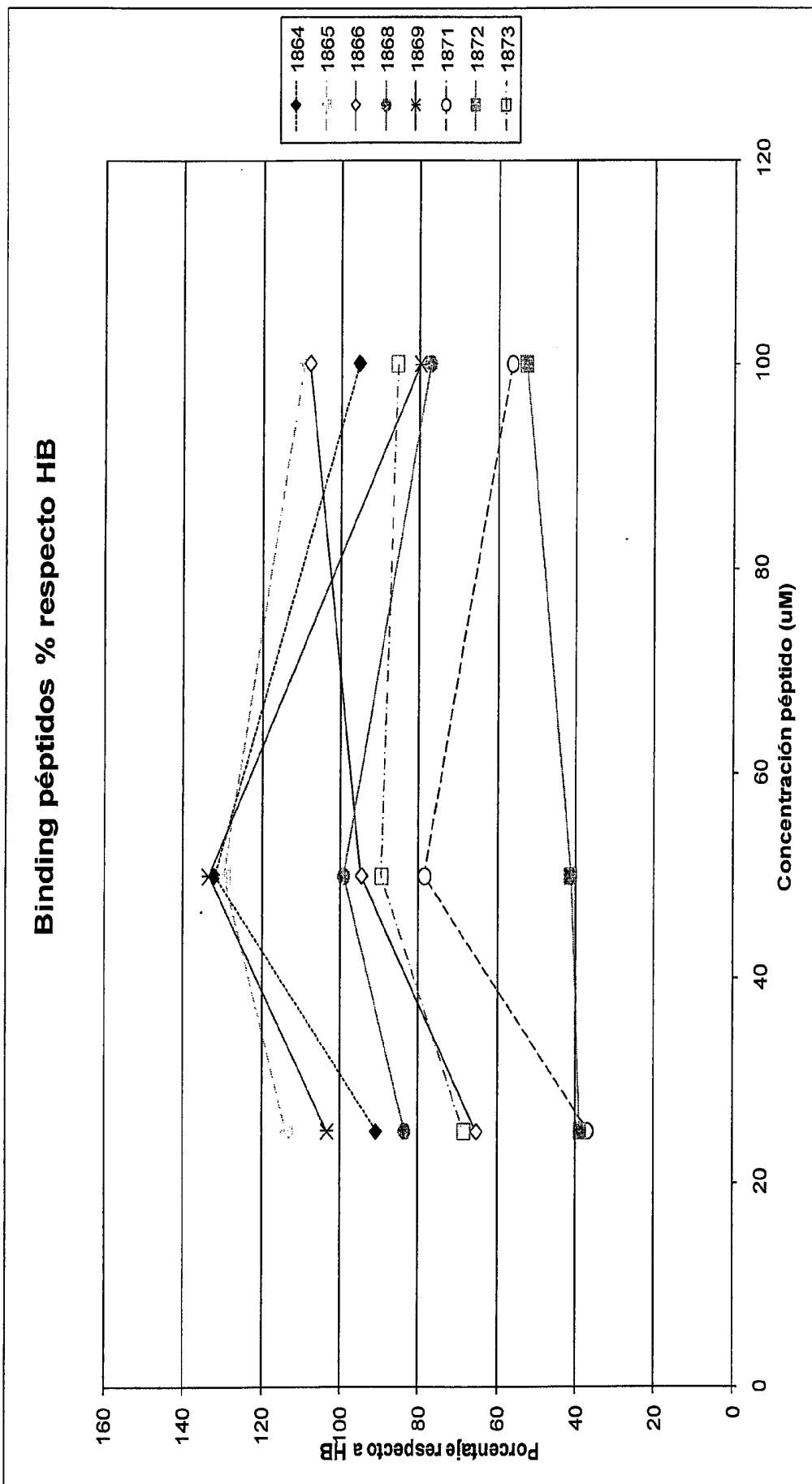


FIG. 10

Péptido	S. salina	pCMV4 PFR1	pCMV4 PFR1-Hsp70
1864	-	-	-
1865	-	-	-
1866	-	-	430
1868	-	-	386
1869	-	-	452
1871	-	164	-
1872	-	-	230
1873	-	-	442

FIG. 11

Péptido	No infectado	Infectado
1864	-	266
1865	-	-
1866	-	-
1868	-	-
1869	-	-
1871	-	376
1872	-	390
1873	-	466

FIG. 12

Péptido	Ratón no infectado	Ratón infectado
1864	-	-
1865	-	-
1866	-	-
1868	-	-
1869	-	-
1871	-	104
1872	-	87
1873	83	98

FIG. 13

Tabla 1- Nonámeros:

Posición	SECUENCIA	SYFPEITHI	RANKPEP	BIMAS (min)
165 (1868)	K M M E D <u>I</u> M N A	20	54%	438
186	Q M Q T Q <u>L</u> A Q L	24	64%	35
204 (1869)	A M H D G <u>E</u> T Q V	23	59%	206
222 (1871)	Q L Q E R <u>L</u> I E L	28	68%	201
229	E L L K D <u>K</u> F G L	20	24%	34
395	L V S E G <u>C</u> A G V	21	29%	42
431 (1872)	M L Y L T <u>L</u> G S L	27	64%	35
532	V L T R R <u>S</u> K M V	19	62%	118
538 (1873)	K M V E Y <u>K</u> S H L	22	57%	222

Tabla 2- Decámeros:

Posición	SECUENCIA	SYFPEITHI	RANKPEP	BIMAS (min)
1	M M T P E <u>D</u> A T G L	20	23%	26
103 (1864)	F M D I I <u>G</u> V K K V	24	25%	213
130	Q L I D N <u>S</u> I A K M	25	N.D.	47
150 (1865)	Q L D A T <u>Q</u> L A Q V	26	31%	64
165	K M M E D <u>I</u> M N A T	18	22%	657
222	Q L Q E R <u>L</u> I E L L	26	29%	99
373 (1866)	K L L E L <u>I</u> V Y N C	20	N.D.	606

FIG. 14

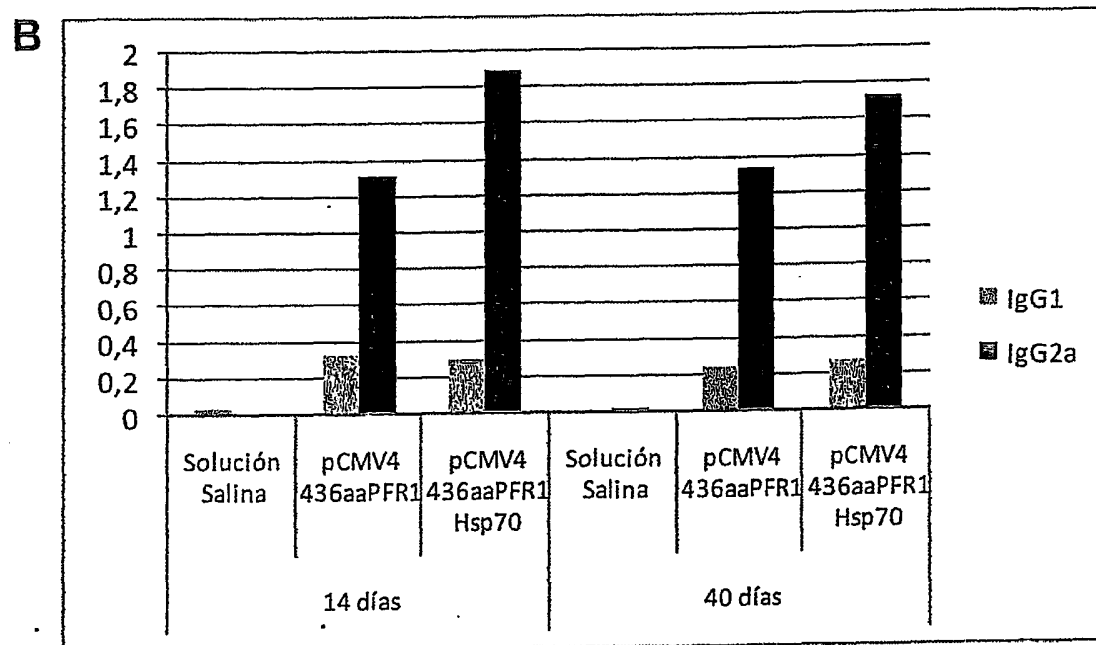
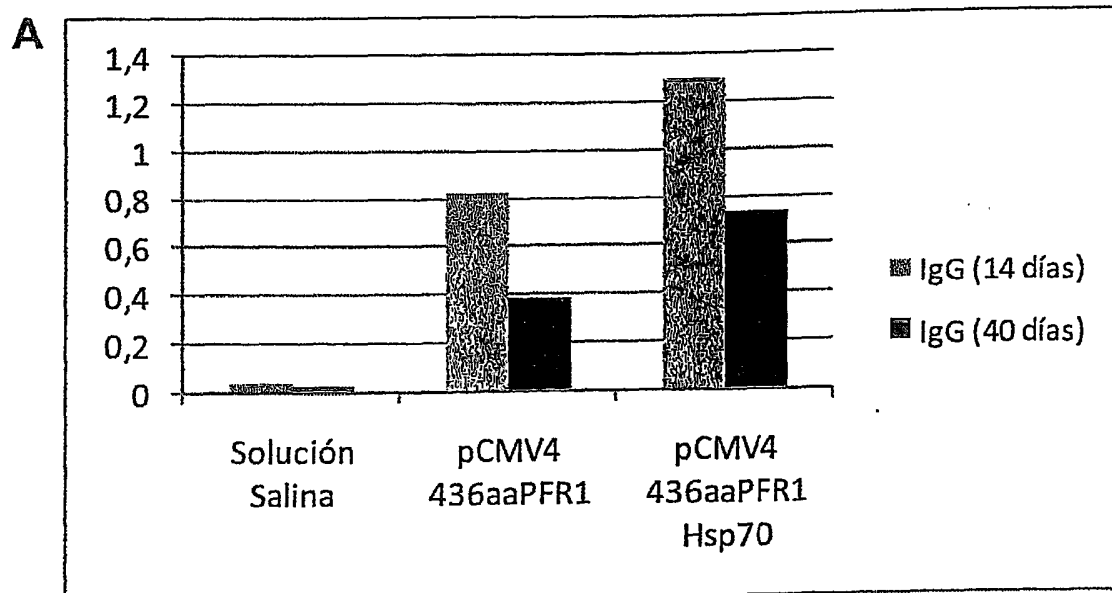


FIG. 15

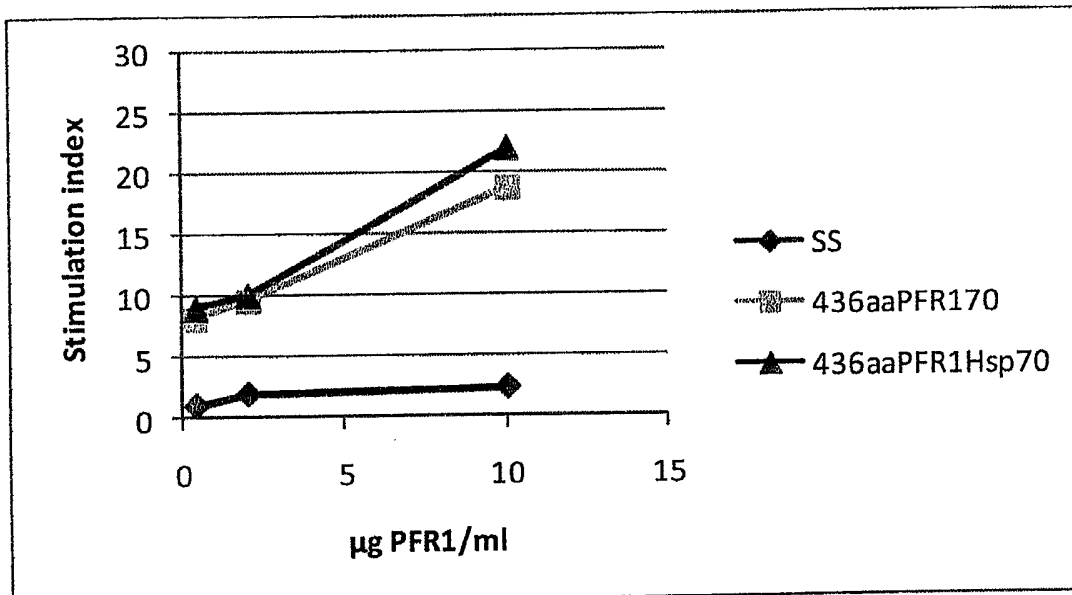


FIG. 16

Péptido	S. salina	pCMV4 436aaPFR1	pCMV4 436aaPFR1-Hsp70
1864	-	-	-
1865	-	-	-
1866	-	-	419
1868	-	-	401
1869	-	-	466
1871	-	171	-
1872	-	-	233
1873	-	-	418