

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: <b>2010.11.12</b>	(73) Titular(es): <b>LABORATORIOS LETI, S.L.</b> <b>CALLE DEL SOL, 5 ES-28760 TRES CANTOS -</b> <b>MADRID</b> <b>ES</b>
(30) Prioridade(s): <b>2009.11.13 EP 09175929</b> <b>2009.11.13 US 261020 P</b>	
(43) Data de publicação do pedido: <b>2012.09.19</b>	(72) Inventor(es): <b>CARLOS ALONSO BEDATE</b> <b>ES</b> <b>MANUEL SOTO ALVAREZ</b> <b>ES</b> <b>LAURA RAMIREZ GARCIA</b> <b>ES</b>
(45) Data e BPI da concessão: <b>2016.11.02</b> <b>017/2017</b>	(74) Mandatário: <b>EVANGELINO MARQUES RIBEIRO</b> <b>AVENIDA LUÍSA TODI, Nº 33 - 1º B 2900-460 SETÚBAL</b> <b>PT</b>

(54) Epígrafe: **RESUMO**

(57) Resumo:

A INVENÇÃO REFERE-SE A UMA COMPOSIÇÃO QUE COMPREENDE UMA FONTE L3 E/OU L5 E OPCIONALMENTE UM ADJUVANTE PARA A PREPARAÇÃO DE UM MEDICAMENTO PARA O TRATAMENTO OU PREVENÇÃO DE UMA DOENÇA PARASITÁRIA E PARA O SEU USO E DIAGNÓSTICO DA REFERIDA DOENÇA PARASITÁRIA.

## Resumo

A invenção refere-se a uma composição que compreende uma fonte L3 e/ou L5 e opcionalmente um adjuvante para a preparação de um medicamento para o tratamento ou prevenção de uma doença parasitária e para o seu uso e diagnóstico da referida doença parasitária.

## Descrição

A utilização de uma fonte L3 e/ou L5 como vacina ou como um diagnóstico para uma doença parasitária

### Campo de invenção

A invenção refere-se a uma fonte de L3 e/ou L5 para a preparação de um medicamento ou de um medicamento para o tratamento, prevenção e/ou diagnóstico de uma doença parasitária.

### Antecedentes da invenção

A leishmaniose compreende várias doenças causadas por parasitas de protozoários intracelulares pertencentes ao género *Leishmânia* que infetam principalmente macrófagos de uma variedade de mamíferos incluindo humanos e cães. Dependendo em grande parte da espécie do parasita e do estado de imunocompetência do hospedeiro humano, o espectro da doença varia desde a leishmaniose cutânea Auto cicatrizante (CL) até a leishmaniose visceral fatal (VL) ou kalaazar (18). A leishmaniose viscerocutaneas canina (VCL) causada por *Leishmânia infantum* e *L. Chagasi* é uma importante zoonose emergente encontrada em países ao redor da bacia do Mediterrâneo, no Oriente Médio e na América Latina (16); sendo os cães o maior reservatório destes parasitas desempenhando um papel central na transmissão para os seres humanos por flebotomíneos moscas da areia (44). O resultado da infeção é determinado pelas interações entre o sistema imunitário do hospedeiro e as diferentes espécies de parasitas, no entanto a patogénese da leishmaniose permanece obscura e o conhecimento sobre os mecanismos envolvidos na resposta imunitária à *Leishmânia*

em seres humanos e cães é ainda limitado. Geralmente, a imunidade protetora está associada a uma resposta imunitária mediada por células clássicas que induz a ativação de macrófagos por citocinas derivadas de células T. Por outro lado, a doença não cicatrizante está associada à geração de fortes respostas humorais (15,24).

A investigação para o desenvolvimento de vacinas de segunda geração, com base em frações de parasitas brutos ou em antigénios de parasitas definidos, foi dirigida à identificação de diferentes moléculas de parasitas de superfície ou segregadas que foram testadas como vacinas candidatas em vários modelos experimentais utilizando diversos adjuvantes (1, 17, 20, 43, 45, 46, 49, 50). O rastreio de bibliotecas de expressão com soro de animais infetados ou humanos também permitiu a seleção de alguns antigénios como vacinas candidatas (revisto em (9)). Entre eles, aqueles que provocam primariamente uma resposta imune tipo Th1 em camundongos infetados ou células de pacientes humanos, independentemente da sua localização celular, têm sido implicados na geração de respostas protetoras em diferentes modelos animais (48, 51, 52). Por outro lado, alguns dos antígenos isolados são proteínas intracelulares conservadas que estimulam predominantemente respostas humorais em humanos ou cães que sofrem respostas humorais mediadas por VL ou Th2 em ratos experimentalmente infetados (3, 33, 35, 37, 39). Acredita-se que a resposta humoral inadequada induzida contra eles em cães com leishmaniose resulte em imunopatologia, principalmente devido aos efeitos adversos de complexos imunes como uveíte (13), lesões do sistema nervoso central (14) ou nefrite (21, 22, 30, 31). Foi também recentemente demonstrado que a presença de imunes complexos de IgG em seres humanos com VL correlaciona-se com a incapacidade de resolver infeções,

demonstrando que os complexos imunitários podem ser prejudiciais para o hospedeiro infetado (27).

Apesar de não serem consideradas inicialmente como boas vacinas candidatas, as proteínas que induzem uma elevada resposta humoral durante o processo infeccioso têm sido associadas à indução de uma resposta protetora. Por exemplo, as tubulinas parasitas e a histona H2B foram reconhecidas por clones de células T derivados de um doador imunitário (36). Além disso, a rK39 causa proliferação e produção de IFN- $\gamma$  por células T a partir de camundongos imunes (23). Foi também demonstrado que a imunização genética com os genes H2B, H3 e H4 do parasita induz proteção em modelos de leishmaniose visceral murina (62). Além disso, a imunização do recetor para C-quinase ativada (LACK) (29), algumas proteases de cisteína de parasita (38, 41) ou as histonas formadoras de nucleossoma de parasita (11, 19) administradas com adjuvantes promotores de Th1 geram respostas imunes que se correlacionam com a proteção contra a leishmaniose cutânea em modelos murinos.

Entre os antígenos conservados evolutivos de Leishmânia, várias linhas de evidência sugerem que as proteínas ribossômicas são moléculas imunologicamente relevantes durante a infecção por Leishmânia. Em alguns casos, os constituintes ribossômicos podem contribuir para a disfunção do sistema imunitário do hospedeiro através da sua capacidade de modular atividades celulares e libertação de citocinas durante a infecção. Assim, a injeção da proteína ribossômica L3 principal em ratinhos BALB/c induziu a expansão policlonal de clones de células B e inibiu a proliferação de células T (10). Além disso, a imunização genética com uma vacina de DNA codificando a proteína L3s ribossomal 60S putativa exacerbou a doença em

modelos de ratinhos pela indução de citocinas IL-10 e Th2 (41, 63). Além disso, algumas proteínas ribossomais parasitas, como as proteínas parasitas ácido P, têm sido relacionadas à geração de fortes respostas humorais em cães e humanos que sofrem de leishmaniose (revisto em (39)). No entanto, também foi demonstrado que várias proteínas ribossômicas testadas não foram capazes de induzir uma resposta protetora imunogénica ou, a resposta protetora imunogénica obtida foi subóptima (55, 41).

A Referência 55 (Iborra et al., 2008) descreve o uso da Proteína Ribossômica de Leishmânia (LRP) na prevenção da leishmaniose. D1 revela a utilização de uma mistura de proteínas ribossômicas não identificadas como uma vacina.

A Referência 61 (Soto et al., 1998) divulga a utilização de epitopo seleccionados derivados das proteínas ribossômicas LiP2a, LiP2b e LiPQ e da histona H2A no diagnóstico de leishmaniose.

Base de dados UniProt (2005-08-30) UNIPROT: Q4FWT2 "SubName: Full = 60S ribossomal proteína L5, putativo" revela uma sequência de um ribossomal proteína L5.

Apesar de todas as tentativas até agora, ainda não existem vacinas valiosas contra uma doença parasitária tal como a leishmaniose. Portanto, ainda há uma necessidade importante de tal vacina.

Descrição da invenção

Neste trabalho, surpreendentemente mostramos que duas proteínas L3 e L5 ribossômicas de *L. major* são antigénicas. Isto significa que cada uma destas duas proteínas foi

reconhecida pelos soros de indivíduos afetados com leishmaniose. Além disso, no modelo murino de leishmaniose cutânea, foram encontrados anticorpos anti-L3 e anti-L5 do isótipo IgG1. A imunização de ambas as proteínas em ratinhos BALB/c, na presença de CpG-ODN, induziu uma resposta Th1 contra elas. Como resultado da vacinação, os ratinhos foram protegidos contra o desenvolvimento de CL após o desafio com *L. major*. Demonstramos ainda que as proteínas L principais também podem conferir proteção contra a infecção por *L. braziliensis*. Demonstramos também que as proteínas ribossômicas L3 e L5 são altamente conservadas, pelo menos, entre diferentes espécies de Leishmânia. Tais composições são muito atraentes para serem utilizadas como uma composição farmacêutica preferencialmente como um diagnóstico, uma vacina ou uma aplicação terapêutica.

A invenção é ainda descrita a seguir.

#### Uso

Num primeiro aspeto da invenção, é proporcionada a utilização de uma fonte de L5, ou de uma fonte de L5 e L3, e opcionalmente um adjuvante para a preparação de um medicamento ou um medicamento para o tratamento ou prevenção de uma doença parasitária num indivíduo.

As proteínas L3 e L5 são proteínas ribossômicas. As proteínas ribossômicas são proteínas citosólicas bem conservadas. Por conseguinte, uma fonte L3 e/ou L5 pode ser preparada a partir de qualquer organismo eucariótico, quer seja planta ou animal, seja de mamíferos, répteis, peixes, insetos ou qualquer outro organismo portador de cromossomas, tais como protozoários. De preferência, uma

fonte de L3 e/ ou L5 é obtida a partir de um organismo que está próximo da doença, de preferência uma doença parasitária que causa o organismo na árvore evolutiva. Por conseguinte, de particular interesse como fonte de uma fonte de L3 e/ou L5 a ser utilizada na prevenção e/ou tratamento de uma doença parasitária são protozoários como Plasmodium e em particular membros da família de tripanosomatídeos, mais em particular espécies diferentes da Protozoário tripanossomático de Leishmânia. Existem mais de 20 espécies conhecidas de *Leishmânia*, incluindo espécies do subgênero *Leishmânia*, compreendendo o complexo L. *major*, incluindo L. *major*, o complexo L. *donovani*, incluindo L. *chagasi*, L. *donovani* e L. *infantum*, o complexo L. incluindo L. *amazonenses* e L. *mexicana*, bem como a subespécie *Viannia*, compreendendo o complexo L. *braziliensis*, incluindo L. *braziliensis* e L. *peruviana* e o complexo L. *guianenses*, incluindo L. *guianenses* e L. *panamenses*. As espécies de Plasmodium de interesse particular são Plasmodium *falciparum* e Plasmodium *vivax*. Numa forma de realização preferida, uma fonte de L3 e/ou L5 é obtida a partir de uma espécie de Leishmânia, de preferência Leishmânia *major*, Leishmânia *infantum*, Leishmânia *donovani*, Leishmânia *mexicana*, Leishmânia *chagasi* e/ou Leishmânia *braziliensis*. Mais preferencialmente, uma fonte de L3 é obtida a partir de uma espécie de Leishmânia, de preferência Leishmânia *major*, Leishmânia *infantum* e/ou Leishmânia *Mexicana*. Mais preferencialmente, uma fonte de L5 é obtida de uma espécie de Leishmânia, de preferência Leishmânia *major*, Leishmânia *infantum*, Leishmânia *braziliensis* e/ou Leishmânia *mexicana*. No Exemplo 2, demonstrou-se a existência de homólogos L3 e L5 altamente conservados (identidade de pelo menos 90%, ver tabela 1) em pelo menos três espécies distintas de Leishmânia. Noutra forma de realização preferida, uma fonte de L5 ou uma fonte

de L3 e L5 é obtida a partir de uma espécie de Plasmodium. O especialista compreenderá que uma fonte de L3 e/ou L5 pode também ser preparada por mistura de uma fonte L3 e/ou L5 de vários organismos distintos como aqui identificados. A utilização de uma fonte L3 e/ou L5 numa vacina foi aqui demonstrada como tendo propriedades imunogénicas atraentes, uma vez que se demonstrou induzir uma resposta imunológica protetora num sujeito tratado.

O termo "uma fonte L3 e/ou L5" pode ser substituído por "uma fonte de um L3 e/ou de um L5". Uma fonte L3 e/ou L5 compreende preferencialmente uma proteína L3 e/ou L5, um péptido ou fragmento de proteína L3 e/ou L5 derivado e/ou um ácido nucleico que codifica uma proteína L3 e/ou L5 ou péptido derivado ou Fragmento de proteína. Uma proteína L3 preferida é representada pela SEQ ID NO: 1. Esta proteína L3 preferida origina-se a partir de *Leishmânia major* e é preferencialmente codificada pela SEQ ID NO: 2. Outra proteína L3 preferida é representada pela SEQ ID NO: 48. Esta proteína L3 preferida origina-se de *Leishmânia infantum* e é de preferência codificada pela SEQ ID NO: 49. Outra proteína L3 preferida é representada pela SEQ ID NO: 50. Esta proteína L3 preferida origina-se de *Leishmânia mexicana* e é de preferência codificada pela SEQ ID NO: 51.

Uma proteína L5 preferida é representada pela SEQ ID NO: 3. Esta proteína L5 preferida origina-se de *Leishmânia major* e é de preferência codificada pela SEQ ID NO: 4. Outra proteína L5 preferida é representada pela SEQ ID NO: 52. Esta proteína L5 preferida origina-se de *Leishmânia infantum* e é de preferência codificada pela SEQ ID NO: 53. Outra proteína L5 preferida é representada pela SEQ ID NO: 54. Esta proteína L5 preferida origina-se de *Leishmânia mexicana* e é de preferência codificada pela SEQ ID NO: 55.

Outra proteína L5 preferida é representada pela SEQ ID NO: 56. Esta proteína L5 preferida origina-se de *Leishmânia braziliensis* e é de preferência codificada pela SEQ ID NO: 65.

Ao longo deste pedido, cada vez que se refere a uma sequência de nucleótidos específica SEQ ID NO (tomar SEQ ID NO: 2 ou 4 ou 49 ou 51 ou 53 ou 55 ou 65 como exemplo), pode-se substituí-la por uma sequência nucleotídica compreendendo um nucleótido que tem pelo menos 60% de identidade de sequência com SEQ ID NO: 2 ou 4 ou 49 ou 51 ou 53 ou 55 ou 65. Ao longo deste, cada vez que se refere a uma sequência de aminoácidos específicos de SEQ ID NO (tomar SEQ ID NO: 1 ou 3 ou 48 ou 50 ou 52 ou 54 ou 56 como exemplo), pode-se substituí-lo por um polipéptido compreendendo uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 60% de identidade da sequência ou similaridade com a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 1 ou 3 ou 48 ou 50 ou 52 ou 54 ou 56.

Em conformidade, numa forma de realização preferida, uma fonte L3 é um polipéptido compreendendo uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 60% de identidade da sequência ou similaridade com a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 1 ou 48 ou 50 e/ou que é codificada por um nucleótido qe tem pelo menos 60% de identidade com SEQ ID NO: 2 ou 49 ou 51.

Em conformidade, numa forma de realização preferida, uma fonte de L5 é um polipéptido que compreende uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 60% de identidade de sequência ou similaridade com a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 3 ou 52 ou 54 ou 56 e/ou codificado por um de acordo com uma forma de realização preferida, uma fonte de

L3 é um ácido nucleico que compreende uma sequência de nucleótidos que tem pelo menos 60% de identidade da sequência com o nucleótido que possui uma sequência de nucleótidos que tem pelo menos 60% de identidade com SEQ ID NO: 4 ou 53 ou 55 ou 65. SEQ ID NO: 2 ou 49 ou 51 e/ou que codifica uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 60% de identidade ou similaridade com SEQ ID NO: 1 ou 48 ou 50.

Em conformidade, numa forma de realização preferida, uma fonte de L5 é um ácido nucleico compreendendo uma sequência de ácido nucleico que tem pelo menos 60% de identidade de sequência ou similaridade com a sequência de nucleótidos SEQ ID NO: 4 ou 53 ou 55 ou 65 e/ou que codifica um aminoácido que tem pelo menos 60% de identidade com SEQ ID NO: 3 ou 52 ou 54 ou 56. De preferência, a referida sequência de aminoácidos ou sequência de nucleótidos possuindo pelo menos 60% de identidade ou similaridade com uma sequência de aminoácidos ou nucleótidos identificada específica são abrangidas por a presente invenção e são consideradas funcionais quando a proteína codificada ou o polipéptido, o fragmento de proteína, o péptido é ainda capaz de induzir pelo menos a resposta imunitária obtida por SEQ ID NO: 1 ou 3 ou 48 ou 50 ou 52 ou 54 ou 56 a pelo menos em certa medida. De preferência, pelo menos até certo ponto, significa que pelo menos 50%, pelo menos 60%, 70%, 80%, pelo menos 90% ou 100%. A elicitación de uma resposta imunitária é mais tarde aqui definida: um composto é funcional quando é capaz de induzir uma resposta imunitária num indivíduo tratado que preferencialmente significa que é capaz de promover ou desencadear uma resposta imunitária Th1 contra um dado antigénio L3 e/ou L5 e/ou que é capaz de prevenir e/ou retardar o desenvolvimento de uma lesão dérmica ou mucosa e/ou induz uma redução significativa da

carga parasitária numa lesão dérmica e/ou mucosa e/ou numa orelha e/ou um nódulo linfático drenante (DLN) que drena preferencialmente qualquer uma destas regiões infetadas (região dérmica, mucosa, orelha), bem como num órgão interno tal como fígado, baço, medula óssea, rim, cérebro, etc. Uma sequência de aminoácidos abrangidos pela presente invenção podem compreender uma, duas, três, quatro, cinco ou mais substituições e/ou inserções e/ou deleções e/ou aminoácidos N- ou C-terminais adicionais ou porções químicas para aumentar a estabilidade, solubilidade e imunogenicidade.

Um fragmento de proteína L3 e/ou L5 ou um péptido derivado de L3 e/ou L5, como aqui definido, é de preferência um fragmento compreendendo pelo menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 ou mais aminoácidos contíguos de uma proteína L3 e/ou L5 correspondente e que é capaz de desencadear uma resposta imunitária conforme anteriormente aqui definido. Numa forma de realização preferida, por conseguinte, um fragmento de proteína L3 e/ou L5 ou um péptido derivado de L3 e/ou L5 como aqui definido é preferencialmente um fragmento compreendendo pelo menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 ou mais aminoácidos contínuos de SEQ ID NO:1 ou 3 ou 48 ou 50 ou 52 ou 54 ou 56.

Como uma forma de realização preferida, um fragmento de proteína L3 preferido ou um péptido preferido derivado de L3 que compreende ou consiste nos últimos 40, 39, 38, 37, 36, 35, 34, 33, 32, 31, 30, 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20 aminoácidos contíguos da parte C-terminal de uma proteína L3. Ainda mais preferencialmente, compreende ou

consiste nos últimos 40, 39, 38, 37, 36, 35, 34, 33, 32, 31, 30, 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20 aminoácidos contíguos de SEQ ID NO:1 ou 48 ou 50. Ainda mais preferencialmente, compreende ou consiste no aminoácido 394-419 de SEQ ID NO:1. Como outra forma de realização preferida, um fragmento de proteína L5 preferido ou um péptido derivado de L5 preferido, compreende ou consiste nas primeiras 40, 39, 38, 37, 36, 35, 34, 33, 32, 31, 30, 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20 aminoácidos contíguos da parte N-terminal de uma proteína L5. Ainda mais preferencialmente, compreende ou consiste nos primeiros 40, 39, 38, 37, 36, 35, 34, 33, 32, 31, 30, 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20 aminoácidos contíguos de SEQ ID NO:3 ou 52 ou 54 ou 56. Ainda mais preferencialmente, compreende ou consiste no aminoácido 1-23 de SEQ ID NO: 3. Como outra forma de realização preferida, um fragmento de proteína L5 preferido ou um péptido derivado de L5 preferido, compreende ou consiste nos últimos 40, 39, 38, 37, 36, 35, 34, 33, 32, 31, 30, 29, 28, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6 aminoácidos contíguos do ácido C- Terminal de uma proteína L5. Ainda mais preferencialmente, compreende ou consiste nos últimos 40, 39, 38, 37, 36, 35, 34, 33, 32, 31, 30, 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6 aminoácidos contíguos de SEQ ID NO:3 ou 52 ou 54 ou 56. Ainda mais preferencialmente, compreende ou consiste no aminoácido 322-328 da SEQ ID NO:3. Noutra forma de realização preferida, uma fonte L3 e L5 compreende uma proteína compreendendo pelo menos um fragmento de proteína de um L3 e pelo menos um fragmento de proteína de uma proteína L5. Mais preferencialmente, um fragmento de proteína L3 e um fragmento de proteína L5 tinham sido fundidos em conjunto para formar uma proteína quimérica. Em

conformidade, a invenção também engloba um ácido nucleico ou um ácido nucleico que codifica uma tal fonte L3 e L5.

Numa concretização preferida, uma fonte L5 ou uma fonte L3 e L5 compreende pelo menos uma proteína L3 e/ou L5 e/ou pelo menos um fragmento de proteína de L3 e/ou L5. Numa forma de realização mais preferida, uma fonte de L3 e/ou L5 compreende pelo menos duas proteínas L3 e/ou L5 e/ou pelo menos dois fragmentos de proteína de L3 e/ou L5. Esta forma de realização refere-se a uma fonte à base de proteína, de preferência uma vacina à base de proteína.

Deve ser mencionado que, numa forma de realização preferida, uma fonte L3 e/ou L5 tal como aqui identificada não poderia ser entendida como englobando um Extrato de Proteína Ribossomal (RPE) como identificado na WO 2009/090175. Um RPE pode ser obtido executando as seguintes etapas utilizando uma célula parasita que causa uma doença parasitária quando presente num sujeito:

- a. misturando uma célula parasita com um tampão de lise,
- b. centrifugar a mistura obtida para se obter um extrato citosólico,
- c. preparando um RPE a partir do extrato citosólico obtido.

Por conseguinte, numa realização preferida, uma fonte L3 e/ou L5 não é um RPE como definido acima.

Noutra realização preferida, uma fonte L5 ou uma fonte L3 e uma fonte L5 compreende pelo menos um ácido nucleico que codifica L3 e/ou L5 e/ou pelo menos um ácido nucleico que codifica um fragmento proteico de L3 e/ou L5. Numa forma de realização mais preferida, uma fonte L5 ou uma fonte L3 e L5 compreende pelo menos dois ácidos nucleicos que

codificam uma proteína L3 e/ou L5 e/ou pelo menos dois ácidos nucleicos que codificam fragmentos de proteína de L3 e/ou L5. Esta forma de realização refere-se a uma fonte à base de ácido nucleico, de preferência uma vacina à base de ácido nucleico.

A fonte de L3 e/ou L5 pode ser uma proteína, uma digestão da proteína e/ou um seu fragmento, que pode estar numa forma purificada ou pode estar compreendida dentro de uma composição bruta, de preferência de origem biológica, tal como uma bactéria lizada, lizado de levedura, lizado de fungos, sonicato ou fixado. Alternativamente, uma fonte L5 ou uma fonte L3 e uma fonte L5 podem ser sintetizadas quimicamente ou produzidas enzimaticamente *in vitro*. A fonte de uma proteína L3 e/ou L5, ou um seu fragmento, também pode ser um ácido nucleico que codifica a referida proteína, ou um seu fragmento, a partir de um molde de ARN ou ADN. As moléculas de ARN ou de ADN podem ser ADN "nus", de preferência incluídas em vesículas ou lipossomas, ou podem estar incluídas num vetor.

O vetor pode ser qualquer vetor de ADN ou ARN (recombinante) conhecido na técnica e, de preferência, é um plasmídeo; em que os genes que codificam antígenos de latência estão operacionalmente ligados a sequências reguladoras que conferem expressão e tradução dos mensageiros codificados. O vetor pode também ser qualquer vírus de ADN ou ARN, tal como, mas não limitado a, Adenovírus, Vírus Adeno Associado (AAV), um retrovírus, um lentivírus, vírus Vaccinia Ankara modificado (MVA) ou vírus Fowl Pox ou qualquer outro viral capaz de conferir a expressão de polipéptidos a um indivíduo escolhido. Os vetores de ADN podem ser não-integradores, tais como vetores que replicam episomalmente, ou podem ser vetores

que se integram no genoma do hospedeiro por integração aleatória ou por recombinação homóloga.

As moléculas de ADN compreendendo genes que codificam uma proteína L3 e/ou L5, ou seus fragmentos de acordo com a presente invenção, opcionalmente incorporados num vetor tal como um vírus ou plasmídeo, podem ser integrados num genoma de um sujeito. Numa forma de realização preferida da invenção, tal hospedeiro pode ser um microrganismo. De preferência, um tal microrganismo recombinante é um *Mycobacterium*, por exemplo da espécie *M. tuberculosis* *M. smegmatis* (Yue, Y. et al., (2007), *J. Virol. Meth.*, 141: 41-48, Cayabiyab Y. et al. (2006), *J. Virol.*, 80: 1645-1652) ou *M. bovis* e mais preferencialmente *M. bovis* Bacillus Calmette Guerin (BCG) ou *M. Smegmatis*, capazes de fornecer a um hospedeiro os polipéptidos ou os seus fragmentos de acordo com a invenção. A BCG recombinante e os métodos para a recombinação são conhecidos na técnica; por exemplo, em WO2004094469. Tal micro-organismo recombinante pode ser formulado como uma vacina viva recombinante viva e/ou atenuada viva, como por exemplo em Jacobs et al. 1987, *Nature*, 327 (6122): 532-5). O vetor pode também estar compreendido num hospedeiro de origem bacteriana, tal como, mas não limitado a, bactérias vivas-atenuadas e/ou recombinantes de *Shigella* ou *Salmonella*.

Qualquer adjuvante conhecido pode ser utilizado na presente invenção. O especialista em conhecimentos conhece vários adjuvantes adequados. Os adjuvantes são mais preferencialmente seleccionados a partir da seguinte lista de adjuvantes: péptidos catiónicos (antimicrobianos), saponina e ligandos do recetor tipo Toll (TLR) tais como, mas não se limitando a, poli (I:C), motivos CpG, LPS, lípido A , Lipopéptido Pam3Cys e flagelinas bacterianas ou

suas partes, e os seus derivados com modificações químicas. Outros adjuvantes preferidos para utilização no método e nas composições de acordo com a invenção são: misturas com BCG vivos ou mortos, complexos de imunoglobulina com os referidos antigénios de latência ou partes destes, IC31 (de [www.intercell.com](http://www.intercell.com), WO03047602), QS21/MPL (US2003095974), DDA/MPL (WO2005004911), DA/TDB (WO2005004911; Holten-Andersen et al, 2004 Infect Immun.2004 Mar; 72 (3): 1608-17) e LAG3 solúvel (CD223) (de [www](http://www) Além disso, outro adjuvante preferido inclui a utilização de *Corynebacterium parvum* ou *Propionobacterium acnes* (64, 65, 66).

Os adjuvantes particularmente preferidos são aqueles que são conhecidos por atuarem através dos recetores tipo Toll. Os adjuvantes que são capazes de ativação do sistema imunitário inato, podem ser particularmente ativados através de recetores tipo Toll (TLR's), incluindo TLR's 1 - 10 e/ou através de uma proteína RIG-1 (proteína indocível no ácido retinóico-1) e/ou através de um recetor de endotelina. Os compostos capazes de ativar recetores de TLR, e suas modificações e derivados, estão bem documentados na técnica. TLR1 pode ser ativado por lipoproteínas bacterianas e formas acetiladas, TLR2 pode ser ativado por glicolípidos bacterianos Gram positivos, LPS, LPA, LTA, fimbriai, proteínas de membrana externa, proteínas heatshock de bactérias ou do hospedeiro, e Mico bacterial lipoarabinomannans. TLR3 pode ser ativado por dsRNA, em particular de origem viral, ou pelo composto químico poli (I: C). TLR4 pode ser ativado por LPS Gram negativo, LTA, proteínas de choque térmico do hospedeiro ou de origem bacteriana, revestimento viral ou proteínas de envelope, taxol ou seus derivados, hialuronano contendo oligossacáridos e fibronectinas. O TLR5 pode ser ativado com flagelos bacterianos ou flagelina. O TLR6 pode ser

ativado por lipoproteínas micobactérias e fator Streptococcus solúvel ao calor (GBS-F) ou Staphylococcal modulins do grupo B. TLR7 pode ser ativado por imidazoquinolinas e derivados. TLR9 pode ser ativado por ADN CpG não metilado ou complexos cromatina - IgG. Em particular TLR3, TLR4, TLR7 e TLR9 desempenham um papel importante na mediação de uma resposta imune inata contra infeções virais, e os compostos capazes de ativar estes recetores são particularmente preferidos para utilização na invenção. Os adjuvantes particularmente preferidos compreendem, mas não estão limitados a, compostos produzidos sinteticamente compreendendo dsRNA, poli (I:C), ADN CpG não metilado que ativam recetores TLR3 e TLR9, IC31, um agonista de TLR9, IMSAVAC, um agonista de TLR4. Noutra realização preferida, os adjuvantes estão fisicamente ligados a uma fonte L3 e/ou L5 tal como definido aqui. A ligação física de adjuvantes e compostos co estimuladores ou grupos funcionais ao epitopo de HLA classe I e HLA classe II compreendendo péptidos proporciona uma resposta imunitária aumentada por estimulação simultânea de células apresentadoras de antigénio, em particular células dendrídicas, que internalizam, metabolizam e exibem antigénio. Outro composto de modificação imunitária preferido é um inibidor de adesão de células T, mais preferencialmente um inibidor de um recetor de endotelina tal como BQ-788 (67). BQ-788 é N-cis-2,6-dimetilpiperidinocarbonil-L-gama-metil-leucil-D-1-metoxicarboniltriptofanil-D-norleucina. Contudo, qualquer derivado de BQ-788 ou composto BQ-788 modificado está também englobado dentro do âmbito desta invenção.

Outros adjuvantes incluem MPL-SE (Glaxo Smithkline Biologicals, Bélgica) ou EM005 (IDRI America).

Numa realização preferida, um adjuvante é um adjuvante promotor de Th1 (como um adjuvante compreendendo um motivo CpG ODN). Um adjuvante promotor de Th1 foi definido na literatura (68) como um adjuvante que é capaz de promover ou desencadear uma resposta imunitária Th1 contra um dado antigénio quando utilizado em conjunto com este antigénio (aqui uma fonte L3 e/ou L5) como detetado em sobrenadantes de esplenócitos de um sujeito tratado quando cultivado com o antigénio. Como controlo, a promoção ou desencadeamento de uma resposta imunitária Th1 é avaliada numa população de esplenócitos do mesmo indivíduo que não foi tratada com o antigénio e o adjuvante, ou com a mesma população apenas tratada com o antigénio. O desencadeamento ou a promoção de uma resposta imunitária Th1 é preferencialmente definido pela indução de IFN $\gamma$  como detetado por cultura de esplenócitos de um sujeito tratado com o antigénio e/ou induzindo a produção de imunoglobulinas IgG2a específicas de antigénio. A avaliação da indução desta citocina é realizada preferencialmente por ELISA em esplenócitos como descrito no exemplo. A avaliação da indução de IgG2a é realizada preferencialmente por ELISA ou Western Blot como descrito no exemplo 1. A indução de IFN $\gamma$  e/ou IgG2a por estimulação de esplenócitos com uma fonte L3 e/ou L5 e um adjuvante que significa preferencialmente que o adjuvante é qualificado como adjuvante promotor de Th1.

Alternativamente ou em combinação com a primeira definição de desencadeamento ou promoção de uma resposta imunitária Th1 dada acima, desencadear ou promover uma resposta imunitária Th1 pode ainda ser definida pela ausência (ou ausência de uma indução) de uma resposta imunitária Th2. Uma resposta imunitária Th2 é caracterizada por um aumento detetáveis na indução de IL-4, IL-10 e/ou na produção de

imunoglobulinas IgG1 detetáveis em comparação com esplenócitos não tratados.

A avaliação da indução de IL-4 e/ou IL-10 é preferencialmente realizada por ELISA em esplenócitos como descrito no exemplo. A avaliação da indução de uma IgG1 é preferencialmente realizada por ELISA ou Western Blot como descrito no exemplo 1.

Alternativamente ou em combinação com as duas primeiras definições de desencadeamento ou promoção de uma resposta imunitária Th1 acima indicada, o desencadeamento ou a promoção de uma resposta imunitária Th1 pode ainda ser definido pela geração de um aumento na proporção IFN $\gamma$ /IL-10 e/ou IFN  $\gamma$ /IL-4 e/ou uma diminuição da razão IgG1/IgG2a contra um antígeno definido, nesse caso uma fonte de L3 e /ou L5. Numa realização preferida, uma alteração (aumento ou diminuição como indicado acima) em qualquer uma destas proporções de mais do que 2 indica que um adjuvante tem propriedades Th1. A avaliação da indução de cada uma das citocinas mencionadas é realizada preferencialmente por ELISA em esplenócitos como descrito no exemplo. A avaliação da indução de uma imunoglobulina IgG1 ou IgG2a é preferencialmente realizada por ELISA ou Western Blot como descrito no exemplo 1.

Numa forma de realização preferida, um adjuvante promotor de Th-1 é, ou compreende, ou consiste em, um oligodesoxinucleótido. Mais preferencialmente, um oligodesoxinucleótido (ODN) compreende ou consiste em CpG em que o C não é metilado (CpG ODN): 3'purina-CpG-5'pirimidina. Um oligodesoxinucleótido preferido é, ou compreende, ou consiste em, uma sequência ODN fosforotioato modificada. A utilização de oligodesoxinucleótido possuindo

tal modificação é vantajosa uma vez que os oligodesoxinucleótidos utilizados deste modo são mais estáveis do que os oligonucleótidos não modificados e, portanto, não serão facilmente degradados uma vez que estão na corrente sanguínea. Um adjuvante promotor de Th-1 preferido consiste em, ou compreende, pelo menos um motivo CpG, pelo menos dois, ou pelo menos três. As sequências preferidas do ODN imune estimulador (5' a 3') foram TCAACGTTGA (SEQ ID NO: 5) e GCTAGCGTTAGCGT (SEQ ID NO: 6). O especialista na técnica não está limitado às sequências aqui explicitamente descritas. Ele/ela pode desenhar outras sequências e posteriormente testá-las para a sua propriedade promotora de Th-1 como definido anteriormente neste documento. Este CpG ODN adjuvante identificado preferido é altamente atraente uma vez que foi demonstrado no exemplo que a co inoculação de LRPE com este adjuvante promotor de Th1 induz proteção contra um desafio com *L. parasitos* maiores em estirpes de rato BALB/c e C57BL/6. Em ambos os modelos, a proteção correlaciona-se a uma produção específica de IFN- $\gamma$ . Em BALB/c, foi também detetada uma restrição na produção de IL-4 e IL-10.

A invenção proporciona uma utilização de uma fonte L5 ou uma fonte L3 e uma fonte L5 adequada como 1) preventiva (profilática), 2) pós-exposição/infeção ou 3) vacina terapêutica/curativa. Uma vantagem da presente invenção é que permite a preparação de uma preparação médica para o tratamento de um espectro mais amplo de doenças parasíticas, isto é, uma preparação médica com especificidade de espécies cruzadas. Em muitas doenças parasitárias, uma vacina contra uma espécie específica, só funciona contra essa espécie específica. Um exemplo de uma doença parasitária em que neste caso é a leishmaniose. No momento, a doença é controlada por drogas, mas o tratamento

medicamentoso não previne a propagação da doença e, em muitos casos, não é muito eficaz. Numa forma de realização preferida, uma doença parasitária é a leishmaniose ou a malária. Mais preferencialmente, uma doença parasitária é causada por uma espécie de Leishmânia ou por uma espécie de Plasmodium. Numa outra forma de realização preferida, uma doença parasitária é causada por uma espécie diferente da espécie a partir da qual se origina uma fonte L3 e/ou L5. Em particular, a leishmaniose causada por uma espécie do género Leishmânia pode ser tratada utilizando uma composição baseada numa fonte L3 e/ou L5 de outra espécie de Leishmânia uma vez que como demonstrado na parte experimental (ver exemplo 2) homólogos L3 e L5 de Várias espécies de Leishmânia são altamente conservadas (pelo menos 90% de identidade, ver tabela 1). Além disso, já demonstramos na parte experimental (ver exemplos 1 e 3) que as proteínas L3 e L5 de Leishmânia major são capazes de proteger contra uma infeção por Leishmânia major ou Leishmânia braziliensis. Numa realização, a leishmaniose causada por L. major é tratada com sucesso com uma composição compreendendo uma fonte L3 e/ou L5 de L. infantum, L. chagasi, L. amazonenses ou L. braziliensis. Noutra realização, a leishmaniose causada por L. chagasi ou L. amazonenses é tratada com sucesso com uma composição compreendendo uma fonte L3 e/ou L5 de L. infantum. Noutra realização, a leishmaniose causada por L. major ou L. braziliensis é tratada com sucesso com uma composição compreendendo uma fonte L3 e/ou L5 de L. major. Alternativamente, outras doenças parasitárias, tais como a malária, podem ser tratadas com sucesso com uma composição baseada numa fonte L3 e/ou L5 de outra espécie, por exemplo com base numa fonte L3 e/ou L5 de L. infantum ou L. Major ou L. mexicana ou L. braziliensis.

No contexto da invenção, um sujeito significa um ser humano ou um animal. Um animal que está englobado no âmbito da invenção inclui um mamífero, de preferência um cão.

Numa realização preferida, é utilizado um medicamento (ou preparação médica ou composição farmacêutica ou medicamento) como aqui definido para aumentar a capacidade de um sistema imunitário humano ou animal para lutar contra uma infecção e/ou uma doença, mais preferencialmente uma infecção parasitária e/ou uma doença parasitária. Em particular, pode ser utilizado para administração a um indivíduo humano ou animal. Um medicamento tal como aqui definido é preferencialmente administrado por via parentérica, por exemplo por injeção ou infusão por via intravenosa, subcutânea, intra peritoneal, intramuscular, intra-arterial ou intralesional. Um modo de administração preferido é subcutâneo. A invenção não se limita a um modo específico de administração de uma fonte L5 ou uma fonte L3 e uma fonte L5. Um modo de administração preferido é a administração oral utilizando uma cápsula ou um comprimido. Alternativamente, uma fonte L5 ou uma fonte L3 e uma fonte L5 podem ser administradas localmente através de um cateter ou uma bomba, ou um supositório. Alternativamente, uma fonte L5 ou uma fonte L3 e uma fonte L5 podem ser administradas topicamente. A formulação de uma fonte L5 ou de uma fonte L3 e L5 ou de uma composição compreendendo uma fonte L5 ou uma fonte L3 e uma fonte L5 depende do modo de administração pretendido e da aplicação (terapêutica). Um veículo farmacêutico pode ser qualquer substância compatível, não tóxica, adequada para fornecer uma fonte L5 ou uma fonte L3 e uma fonte L5 a um indivíduo. Por exemplo estéril, água ou sólidos ou excipientes inertes podem ser utilizados como transportadores, habitualmente complementados com adjuvantes, agentes tampão, agentes

dispersantes e semelhantes, farmacologicamente aceitáveis. As composições estarão quer em líquido, quer uma suspensão estabilizada de uma fonte L5 ou uma fonte L3 e L5, ou uma composição compreendendo uma fonte L5 ou uma fonte L3 e uma fonte L5, ou sob formas sólida e/ou seca; em pó. Para administração oral e rectal, uma fonte L5 ou uma fonte L3 e uma fonte L5 podem ser administradas em formas de dosagem sólidas, tais como cápsulas, comprimidos, supositórios e pós, ou em formas de dosagem líquidas, tais como elixires, xaropes, cremes, pomadas e suspensões. Outra forma pode ser uma forma semi-sólida ou semilíquida em que uma fonte L5 ou uma fonte L3 e uma fonte L5 estão presentes sob a forma líquida num suporte sólido tal como um penso.

Um medicamento pode ser combinado com um meio farmacologicamente aceitável ou veículo de entrega por técnicas convencionais conhecidas na técnica. Por exemplo, uma fonte L5 ou uma fonte L3 e uma fonte L5 e opcionalmente um adjuvante podem ser dissolvidos em tampão fosfato salino (PBS). Os métodos para preparar composições administráveis por via parentericamente são bem conhecidos na técnica e descritos em mais pormenores em várias fontes, incluindo, por exemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, Ed. AR Gennaro, 20<sup>a</sup> edição, 2000, Williams & Wilkins, PA, EUA. Um medicamento é de preferência administrado numa dose terapêuticamente eficaz, isto é, uma que irá aumentar a capacidade do sistema imunitário humano ou animal para combater uma infeção e/ou uma doença tal como aqui definida. Preferencialmente, uma dose terapêuticamente eficaz de uma preparação médica da invenção é capaz de desencadear uma resposta imunitária como aqui definida: uma dose é terapêuticamente eficaz quando é capaz de provocar uma resposta imunitária num sujeito tratado que preferencialmente significa que é capaz de promover ou

desencadear uma resposta imunitária Th1 contra um determinado antigénio L3 e/ou L5 e/ou que incapaz de prevenir e/ou atrasar o desenvolvimento de uma lesão dérmica ou mucosa e/ou induz uma redução significativa da carga parasita cutânea e/ou mucosa e/ou num ouvido e/ou num nódulo linfático drenante (DLN) que preferencialmente drena qualquer uma destas regiões infetadas (região dérmica, mucosa, orelha), bem como num órgão interno tal como fígado, baço, medula óssea, rim, cérebro, etc. A avaliação da presença de uma lesão dérmica é descrita no exemplo 1 (ver figura 4: inchaço da almofada da pata). A avaliação de uma carga parasitária é descrita no exemplo (ver figura 4). Uma dose terapêuticamente eficaz de um medicamento da invenção evitará de preferência o desenvolvimento de uma lesão dérmica e/ou induz preferencialmente uma redução da carga parasitária numa orelha de aproximadamente 3 ordens de grandeza e/ou de aproximadamente uma magnitude semelhante num DLN após um período de tempo compreendendo uma primeira vacinação utilizando uma composição da invenção seguida de uma infeção sequencial com um parasita e um tempo de espera de aproximadamente 6 semanas. Numa forma de realização preferida, um medicamento tal como aqui definido é uma vacina. Numa realização mais preferida, pelo menos 12µg de uma fonte L5 ou uma fonte L3 e uma fonte L5 está a ser utilizada numa vacina. A quantidade de uma fonte L5 ou uma fonte L3 e L5 utilizada refere-se à quantidade total de L3 e L5 utilizados. Numa concretização ainda mais preferida, pelo menos 12-20 mg de uma fonte L5 ou uma fonte L3 e uma fonte L5 devem ser utilizadas para proporcionar uma resposta imunitária opcionalmente em combinação com pelo menos 50 mg de um adjuvante, de preferência um adjuvante promotor de Th1 tal como por exemplo, CpG ODN. Uma vacina como aqui definida pode ser uma vacina profilática ou terapêutica. O volume em que uma fonte L5 ou uma fonte L3 e

uma L5 e opcionalmente um adjuvante, de preferência um adjuvante promotor de Th1 pode ser dissolvido pode variar de 100-500 microlitros.

### Composição

Num outro aspeto, é proporcionada uma composição compreendendo uma fonte L5 ou uma fonte L3 e uma fonte L5 e opcionalmente um adjuvante, de preferência um adjuvante promotor de Th<sub>1</sub>. Uma fonte L5 ou uma fonte L3 e uma fonte L5 e um adjuvante já foram aqui definidos. Numa realização preferida, uma composição consiste numa fonte L5 ou uma fonte L3 e uma L5 e um adjuvante promotor de Th1. Um adjuvante promotor de Th<sub>1</sub> preferido é um CpG ODN. Uma composição preferida compreende ou consiste numa fonte L5 ou uma fonte L3 e L5 e opcionalmente um adjuvante, preferencialmente um adjuvante promotor de Th1 dissolvido em PBS. Numa outra forma de realização preferida, é também abrangido pela presente invenção que uma fonte L5 ou uma fonte L3 e uma L5 e um adjuvante, preferencialmente um adjuvante promotor de Th<sub>1</sub> são administrados sequencialmente. Por conseguinte, ambos os componentes não necessitam estar fisicamente presentes numa única composição desde que ambos sejam administrados a um indivíduo.

Tal composição pode ainda compreender um adjuvante e/ou veículo farmacologicamente aceitável.

Tal composição é de preferência para uso como um medicamento. O medicamento é de preferência uma vacina. A medicina, o adjuvante e a vacina já foram aqui amplamente definidos. Uma composição pode estar na forma líquida, sólida ou semilíquida ou semi-sólida, como aqui definido.

Numa realização preferida, são utilizados outros compostos sequencialmente ou simultaneamente com uma fonte L5 ou uma fonte L3 e uma fonte L5 para melhorar a especificidade do tratamento terapêutico ou profilático. É vantajoso, por exemplo, utilizar outros compostos que irão aumentar ainda mais a resposta imunitária do indivíduo tratado. Mais preferencialmente, tais compostos não estão presentes numa única composição em conjunto com uma fonte L5 ou uma fonte L3 e uma fonte L5. Por exemplo, os referidos compostos são seleccionados de um grupo constituído por uma fonte de outras proteínas de um parasita que causa uma doença parasitária (19) tal como a Leishmaniose. Uma fonte de uma determinada proteína é dada o mesmo significado que uma fonte de L3 ou L5 como definido anteriormente neste documento. Uma proteína preferida é neste contexto outra proteína ribossómica tal como S6 ou S4. As proteínas divulgadas neste contexto são uma histona tal como H2A, H2B, H3, H4 ou outra proteína ribossómica tal como Li2A (LiP), LiP2b (LiP'), LiP0, L2, L7, L8, L16 e L19.

Uma proteína H2A descrita é representada pela SEQ ID NO: 7. Um ácido nucleico revelado que codifica um H2A é representado pela SEQ ID NO: 8. Uma proteína H2B revelada é representada pela SEQ ID NO: 9. Um ácido nucleico revelado que codifica um H2B é representado pela SEQ ID NO: 10. Uma proteína H3 revelada é representada pela SEQ ID NO: 11. Um ácido nucleico divulgado que codifica um H3 é representado pela SEQ ID NO: 12. Uma proteína H4 revelada é representada pela SEQ ID NO: 13. Um ácido nucleico revelado codificando um H4 é representado pela SEQ ID NO: 14. Uma Li2A revelada, também denominada proteína LiP2a, é representada por SEQ ID NO: 15 ou 16. Um ácido nucleico revelado codificando um Li2A é representado pela SEQ ID NO: 17. A SEQ ID NO: 17 é

uma sequência genómica. O especialista na técnica pode derivar sequências de codificação a partir desta sequência genómica. Tais sequências de codificação correspondem a um ácido nucleico que codifica um ARNm que codifica para uma proteína Li2A representada por SEQ ID NO: 15 ou 16: uma do nucleótido 791 a 1111 e uma de 1662 a 1982 da SEQ ID NO: 17.

Uma proteína LiP2b revelada é representada pela SEQ ID NO: 18. Um ácido nucleico revelado que codifica um LiP2b é representado pela SEQ ID NO: 19. Uma proteína LiP0 revelada é representada pela SEQ ID NO: 20. Um ácido nucleico revelado codificando um LiP0 é representado pela SEQ ID NO: 21.

SEQ ID NO: 8, 10, 12, 14, 19 e 21 são sequências genómicas. O especialista poderá derivar outras codificando sequências a partir destas sequências genómicas. Tais outras sequências de codificação correspondem a um ácido nucleico que codifica um ARNm que codifica a respetiva proteína: Estas sequências de ácido nucleico são representadas pelas SEQ ID NO: 68, 69, 70, 71, 72 e 73, respetivamente.

Uma proteína L2 revelada é representada pela SEQ ID NO: 22. Um ácido nucleico revelado que codifica L2 é representado por SEQ ID NO: 23. Uma proteína L7 revelada é representada pela SEQ ID NO: 24. Um ácido nucleico revelado codificando um L7 é representado pela SEQ ID NO: 25. Uma proteína L8 revelada é representada pela SEQ ID NO: 26. Um ácido nucleico revelado codificando um L8 é representado pela SEQ ID NO: 27. Uma proteína L16 revelada é representada pela SEQ ID NO: 28. Um ácido nucleico revelado que codifica um L16 é representado pela SEQ ID NO: 29. Uma proteína L19 revelada é representada pela SEQ ID NO: 30. Um

ácido nucleico revelado codificando um L19 é representado pela SEQ ID NO: 31. Uma proteína S4 preferida é representada pela SEQ ID NO: 32. Um ácido nucleico preferido que codifica um S4 é representado pela SEQ ID NO: 33. Uma proteína S6 preferida é representada por SEQ ID NO: 34. Um ácido nucleico preferido que codifica um S6 é representado pela SEQ ID NO: 35. Outro exemplo é o uso de poli proteínas contendo vários antígenos parasitários (63, 65). Um exemplo de uma poliproteína é a proteína Q tal como identificada em EP1141305. Uma molécula de ácido nucleico que codifica a proteína Q é representada pela SEQ ID NO:36 o correspondente codificado a proteína Q é representada pela SEQ ID NO: 37. A proteína Q ou uma parte ou um seu fragmento ou uma fonte de proteína Q ou uma fonte de um fragmento de proteína Q pode ser utilizada em combinação com uma fonte L5 ou uma fonte L3 e uma fonte L5. Outro exemplo de uma poliproteína é Leish-110f (69). Leish-110f ou uma parte ou um seu fragmento ou uma fonte de Leish-110f ou uma fonte de um fragmento de Leish-110f pode ser utilizado em combinação com uma fonte L5 ou uma fonte L3 e uma fonte L5.

No próximo parágrafo, uma fonte de uma proteína de histona é tomada como um exemplo de uma proteína que pode ser usada em uma fonte L5 ou uma fonte L3 e uma fonte L5. O mesmo é válido para outras proteínas definidas acima, de preferência outras proteínas ribossômicas que L3 e/ou L5. Os compostos preferidos incluem uma proteína de histona ou um seu fragmento, ou um nucleico ácido que codifica a referida histona ou o referido fragmento de histona. Mais preferencialmente, uma proteína histona é H2A, H2B, H3 e/ou H4 como identificado em EP 1 687 023. As histonas H2A, H2B, H3 e H4 são proteínas nucleares bem conservadas e a sua sequência é bem conhecida na técnica, ver referência 39. De

preferência, as histonas são obtidas a partir de um organismo que está próximo da doença que causa o organismo na árvore evolucionária. Portanto, de particular interesse como fonte de histonas a serem utilizadas no tratamento de doenças parasitárias tais como a leishmaniose são os protozoários e, em particular, os membros do tripanossomático da família, mais em particular espécies diferentes do protozoário tripanossomático Leishmânia.

Outros compostos preferidos incluem outra proteína ribossômica ou um seu fragmento ou uma molécula de ácido nucleico codificado da referida proteína ou seu fragmento. Exemplos de outras proteínas ribossômicas incluem S6 e S4.

Outras composições divulgadas incluem um extrato de proteína ribossômica como identificado na WO 2009/090175.

Cada um dos compostos ou fontes de cada um destes compostos pode ser utilizado em combinação com uma fonte de L5 ou de L3 e L5. A utilização combinada pode ser sequencial ou simultânea.

Numa forma de realização preferida, é utilizada uma fonte L5 ou uma fonte L3 e uma fonte L5 em combinação com um S4 e/ou um S6. Mais preferencialmente uma fonte L3, uma L5, uma S4 e uma fonte S6 são utilizadas em combinação. Noutra solução mais preferida, uma fonte L3, uma L5 e uma fonte S4 são utilizadas em combinação. Numa outra forma de realização mais preferida, um L3, um L5 de uma fonte S6 são usados em combinação. Demonstrou-se (ver exemplo 5) que a utilização combinada de L3, L5 e S4 estava proporcionando proteção sinérgica em comparação com a utilização de L3 ou L5 ou S4 sozinho. Neste contexto, uma proteína S4 preferida é representada pela SEQ ID NO: 32. Um ácido nucleico

preferido que codifica um S4 é representado pela SEQ ID NO: 33. Uma proteína S6 é representada pela SEQ ID NO: 34. Um ácido nucleico preferido que codifica um S6 é representado pela SEQ ID NO:35. O termo "fonte" quando usado em "uma fonte S4 e/ou S6" tem o mesmo significado que o termo "fonte" quando usado em "Fonte L5 ou uma fonte L3 e L5".

Em conformidade, numa forma de realização preferida, uma fonte S4 é um polipéptido compreendendo uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 60% de identidade de sequência ou similaridade com a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 32 e/ou que codificada por uma sequência nucleotídica que tem pelo menos 60% de identidade com SEQ ID NO: 33.

Em conformidade, numa forma de realização preferida, uma fonte S6 é um polipéptido que compreende uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 60% de identidade de sequência ou similaridade com a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 34 e/ou que é codificada por uma sequência de nucleicos que tem pelo menos 60% de identidade com a SEQ ID NO: 35.

De acordo com isto, numa forma de realização preferida, uma fonte S4 é um ácido nucleico compreendendo uma sequência nucleotídica que tem pelo menos 60% de identidade de sequência com a sequência de nucleótidos SEQ ID NO: 33 e/ou que codifica um aminoácido que tem pelo menos 60% de identidade ou similaridade com SEQ ID NO: 32.

Dependendo do tipo de fonte utilizada (baseada em proteínas ou baseada em ácido nucleico), o especialista tipo de formulação. Uma fonte pode ser administrada como tal (proteína nua ou ácido nucleico). Alternativamente, uma

fonte baseada em ácido nucleico pode ser administrada utilizando uma construção de ácido nucleico como aqui definido.

Fonte S6

Num outro aspeto da divulgação é proporcionada uma fonte S6 ou uma composição compreendendo ou consistindo numa fonte S6 mas não compreendendo uma fonte L3 e/ou uma fonte L5 e/ou uma fonte S4. Demonstrámos (ver exemplo 4) que a utilização de S6 sozinho proporcionava proteção contra a infeção por Leishmânia.

O termo "fonte" quando usado em "uma fonte S6" tem o mesmo significado que o termo "fonte" quando usado em "um L5 ou uma fonte L3 e L5".

Cada uma da utilização ou método ou tipos de composições aqui definidos compreendendo uma fonte L5 ou uma L3 e uma L5 Fonte também se aplicam a uma fonte S6.

De acordo com isto, é revelada uma fonte S6 que é um polipéptido compreendendo uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 60% de identidade de sequência ou similaridade com a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 34 e/ou que é codificado por um nucleotídica que tem pelo menos 60% de identidade com SEQ ID NO: 35.

De acordo com isto, é revelada uma fonte S6 que é um ácido nucleico compreendendo uma sequência de ácido nucleico que tem pelo menos 60% de identidade de sequência com a sequência de nucleótidos SEQ ID NO: 35 e/ou que codifica

uma sequência de aminoácidos que possui pelo menos 60% de identidade ou similaridade com SEQ ID NO: 34.

#### Método

Noutro aspeto, a invenção proporciona um método para prevenir e/ou tratar uma doença parasitária e/ou atraso a sua progressão e/ou capacidade de induzir uma resposta imunitária como aqui definida: um método é terapêuticamente eficaz quando é capaz de provocar uma resposta imunitária num indivíduo tratado que preferencialmente significa que é capaz de promover ou desencadear um Th1 contra um dado antigénio L5 ou L3 e L5 e/ou contra uma dada fonte L5 ou um L3 e um L5 origem e/ou que é capaz de prevenir e/ou retardar o desenvolvimento de uma lesão dérmica ou mucosa e/ou induz uma redução significativa da carga parasitária numa lesão dérmica e/ou mucosa e/ou numa orelha e/ou numa linfa drenante (DLN) que, preferencialmente, drena qualquer uma destas regiões infetadas (região dérmica, mucosa, orelha), bem como num órgão como fígado, baço, medula óssea, rim, cérebro, etc. Neste método, uma vacina da invenção funciona como uma vacina terapêutica. Tipicamente, existe um período de tempo entre infeção e doença. Neste caso, uma vacina atuar como um produto imunológico farmacológico que preveniria e/ou trataria a doença e/ou retardaria a sua progressão provocando no hospedeiro uma resposta imunitária que neutraliza o efeito patológico da infeção. Uma vacina terapêutica difere de uma vacina profilática em que uma vacina terapêutica irá induzir a proteção num doente que já tem a infeção ou a doença. A invenção abrange uma vacina terapêutica ou uma vacina profilática. Nesse método, Opcionalmente uma fonte S4 e/ou S6 pode ser utilizada em combinação com uma fonte L5 ou uma fonte L3 e uma fonte L5.

## Uso

Num outro aspeto, é proporcionada uma utilização adicional de uma fonte L5 ou uma fonte L3 e uma fonte L5 para diagnosticar uma parasitária num indivíduo. Uma doença parasitária, uma fonte L5 ou uma fonte L3 e uma fonte L5 e um qui anteriormente definido. Nesta utilização, opcionalmente, uma fonte S4 e/ou S6 pode ser utilizada em combinação com uma fonte L5 ou uma fonte L3 e uma fonte L5.

Uma vantagem da presente invenção é que permite atingir um diagnóstico específico e precoce de um espectro de doenças parasitárias. Um exemplo de uma doença parasitária em que este é o caso é a leishmaniose. Em um uma doença parasitária é a leishmaniose ou a malária. Mais preferencialmente, uma doença parasitária é causada por uma Leishmânia ou por uma espécie de Plasmodium. Numa outra forma de realização preferida, uma doença parasitária é causada por uma espécie diferente das espécies das quais é derivada uma fonte L5 ou uma fonte L3 e uma fonte L5. Em particular, a leishmaniose causada por uma espécie do género Leishmânia pode ser diagnosticada utilizando uma composição baseada numa fonte L5 ou uma fonte L3 e L5 de outra espécie de Leishmânia. Numa realização, a leishmaniose causada por *L. major* é diagnosticado com sucesso com uma composição compreendendo uma fonte L5 ou uma fonte L3 e uma fonte L5 de *L. major*, *L. infantum*, *L. Braziliensis* ou *L. mexicana*. Alternativamente, outras doenças parasitárias, como a malária, podem ser diagnosticadas com sucesso com uma composição baseada numa fonte L5 ou uma fonte L3 e uma fonte L5 de outra espécie, por exemplo com base em uma fonte L5 ou uma fonte L3 e L5 de *L. infantum*, *L. major*, *L. braziliensis* ou *L. mexicana*.

Em princípio, qualquer indivíduo poderia ser diagnosticado utilizando a invenção. O método de diagnóstico pode ser aplicado frequentemente como necessário em um assunto. De preferência, um indivíduo diagnosticado é um indivíduo suspeito de ter um risco de ter sido infectado com o referido parasita causando a referida doença parasitária. Um indivíduo suspeito de ter o risco de ter sido infectado com o referido parasita pode viver numa zona endêmica ou ter visitado uma área endêmica. Uma área endêmica inclui África da Argélia para a Arábia Saudita, Quênia, Sudão, Etiópia. Também inclui o Sul da Europa: países mediterrânicos Espanha, França, Grécia, etc., também inclui Central (Todos os países) e América do Sul: Brasil, Venezuela, Peru, Bolívia, Colômbia Norte da Argentina, Paraguai, Uruguai, Central para o Sudeste Asiático: Índia, Irã, Iraque, Mongólia, Afeganistão, Nepal, Bangladesh.

No contexto da invenção, uma utilização como aqui definida é preferencialmente uma utilização *in vitro* ou *ex vivo*. De preferência, significa que a referida utilização realizada numa amostra do referido indivíduo. As amostras preferidas incluem sangue, soro, plasma, saliva, líquido cefalorraquidiano ou urina. Mais preferencialmente, a amostra é uma amostra de sangue ou de soro obtida de um indivíduo.

Numa realização preferida, um diagnóstico é alcançado antes da aparição de um sintoma da referida doença parasitária, o chamado diagnóstico pré-sintomático ou o diagnóstico de um indivíduo assintomático. Neste contexto, "pré-sintomático" preferencialmente significa pelo menos um dia, pelo menos dois dias, pelo menos três dias, pelo menos quatro dias, pelo menos cinco dias, pelo menos seis

dias, pelo menos sete dias, pelo menos oito dias, pelo menos nove dias, pelo menos dez dias, pelo menos, 15 dias, pelo menos 20 dias, pelo menos 30 dias ou mais antes da aparição de um primeiro sintoma. Um primeiro sintoma ou um primeiro sinal clínico associada a uma doença parasitária tal como a leishmaniose pode ser selecionada da seguinte lista: febre, esplenomegalia, hepatomegalia, linfadenopatia, conjuntivite, dermatite onicográfica, queratoconjuntivite, apatia e caquexia. A maioria deles pode ser simples detetada por exame físico externo. Cada um de conjuntivite, dermatite, onicogrifose, queratoconjuntivite é uma forma de alteração cutânea.

Um primeiro sintoma preferido ligado à leishmaniose é a linfadenopatia. Pode ser detetado por exame como palpação.

Noutra realização preferida, é alcançado um diagnóstico antes da aparição de alguns dos sintomas de doença parasitária, o chamado diagnóstico de um indivíduo oligo sintomático. Neste contexto, "oligo sintomático" preferencialmente significa um indivíduo com um mínimo de três dos sintomas tal como definido acima.

Noutra forma de realização preferida, é alcançado um diagnóstico antes da aparição de todos os sintomas da referida parasita doença, o chamado diagnóstico de um indivíduo sintomático. Neste contexto, "sintomático" significa preferencialmente um pelo menos quatro dos sintomas tal como definidos acima incluindo uma forma de alteração cutânea tal como definida acima.

O especialista compreenderá que o tipo de diagnóstico mais importante é o diagnóstico de doença assintomática uma vez que ajudará a prevenir a propagação da doença e os

sujeitos assintomáticos que podem ser curados mais eficientemente se eles são diagnosticados em tal fase.

Neste uso, uma fonte L5 ou uma fonte L3 e uma fonte L5 e/ou uma fonte S4 e/ou S6 podem ser uma proteína L5 ou Uma proteína L3 e uma proteína L5 e/ou uma proteína S4 e/ou S6 ou um fragmento de proteína que são utilizados para detetar a presença de um anticorpo numa amostra como explicado na próxima secção.

Alternativamente, uma fonte L5 ou uma fonte L3 e uma fonte L5 e/ou uma fonte S4 e/ou S6 podem ser um ácido nucleico molécula que são utilizadas para detetar a presença de um ácido nucleico L3 e/ou L5 e/ou S4 e/ou S6 numa amostra como explicado na próxima secção.

#### Método

Num outro aspeto é proporcionado um método para diagnosticar uma doença parasitária num indivíduo utilizando uma fonte de L5 ou uma fonte L3 e uma fonte L5, compreendendo o método determinar se um anticorpo que reconhece uma fonte L5 ou um L3 é uma fonte L5 que está presente numa amostra obtida a partir do sujeito. Opcionalmente, uma fonte S4 e/ou S6 pode também ser utilizada em combinação com uma fonte L5 ou uma fonte L3 e uma fonte L5. Um método preferido da invenção é como para um a utilização da invenção de preferência realizada in vitro ou ex vivo. Uma definição foi dada anteriormente neste documento.

Num método preferido, uma fonte L5 ou uma fonte L3 e uma fonte L5 estão presentes numa composição. Numa outra preferência, a forma de realização, outro composto está

presente que é a referida composição. Alternativamente, nenhum outro composto está presente na referida composição.

Numa realização preferida, são utilizados outros compostos sequencialmente ou simultaneamente com uma fonte L5 ou uma L3 e uma fonte L5 para melhorar a especificidade do método. É vantajoso, por exemplo, utilizar outros compostos que serão capazes de discriminar entre sujeitos assintomáticos, oligo sintomáticos ou sintomáticos e vacinado. Mais preferencialmente, tais compostos não estão presentes numa única composição em conjunto com uma fonte de L5 ou uma fonte L3 e uma fonte L5. Cada uma das proteínas identificadas na secção intitulada composição pode ser utilizada neste contexto. Por exemplo, os referidos compostos são seleccionados de um grupo constituído por uma fonte de outras proteínas de um parasita que causa uma doença parasitária (19), como a leishmaniose. Uma fonte de uma determinada proteína é dada o mesmo significado que uma fonte L5 ou uma fonte L3 e uma fonte L5 como definido anteriormente neste documento. Uma proteína preferida é neste contexto S6 ou S4. Proteínas divulgadas são uma histona tal como H2A, H2B, H3, H4, outra proteína ribossómica tal como Li2A (LiP), LiP2b (LiP '), LiP0, L2, L7, L8, L16 e L19.

Outro exemplo é o uso de poli proteínas contendo vários antígenos parasitários (59, 61). Um exemplo de uma poliproteína é a proteína Q como identificada na EP 1 141 305. A proteína Q ou uma parte ou um seu fragmento ou uma fonte de proteína Q ou uma fonte de um fragmento de proteína Q pode ser utilizada em combinação com uma fonte L5 ou uma fonte L3 e uma fonte L5. Preferidos, os antigénios são S4 e S6 ou seus fragmentos, ou uma

molécula de ácido nucleico que codifica S4 ou S6. Os antigénios divulgados incluem uma proteína de histona ou um seu fragmento ou uma molécula de ácido nucleico que codifica a referida histona, em que uma proteína de histona é H2A, H2B, H3 e/ou H4 como identificados em EP 1 687 023. As histonas H2A, H2B, H3 e H4 são proteínas nucleares bem conservadas e a sua sequência é bem conhecida na técnica, ver referência 39. Numa parte da descrição, as histonas são obtidas a partir de um organismo que está próximo do organismo causador da doença na árvore evolutiva. Por conseguinte, de particular interesse uma fonte de histonas a ser utilizada no tratamento de doenças parasitárias tais como a leishmaniose são protozoários e em determinados membros da família dos tripanossomídeos, como por exemplo o plasmódio, tal como *Plasmodium falciparum* ou mais em particular espécies diferentes do protozoário tripanossomático *Leishmânia*.

Num método de diagnóstico mais preferido, uma doença parasitária é diagnosticada quando uma quantidade detetável de um anticorpo reconhecendo uma fonte L5 ou uma fonte L3 e uma fonte L5, de preferência a proteína ou péptido ou parte proteica está presente e/ou quando está presente um aumento da quantidade do referido anticorpo. Num indivíduo o controlo saudável, o referido anticorpo não está geralmente detetável.

A deteção da presença do referido anticorpo é realizada utilizando métodos conhecidos do especialista, tais como um ELISA. As formas preferidas de deteção estão descritas no exemplo 1.

Um anticorpo que reconhece uma fonte L5 ou uma fonte L3 e L5, de preferência uma proteína ou péptido ou proteína

preferencialmente significa que está presente pelo menos um anticorpo que é capaz de reconhecer pelo menos um composto presente numa fonte L5 ou uma fonte L3 e uma fonte L5. O referido composto pode ser uma proteína L5, ou uma proteína L3 e uma proteína L5, ou um L5 ou um L3 e um fragmento de proteína L5 ou parte de proteína ou péptido. O mesmo vale para um anticorpo que reconhece um S4 e/ou uma fonte S6.

Num outro método, uma molécula de ácido nucleico L5, ou L3 e L5 é detetada utilizando outro ácido nucleico molécula. Uma molécula de ácido nucleico L5, ou L3 e L5 é de preferência uma molécula de ácido nucleico que codifica um L5, ou um L3 e uma molécula L5 como identificada anteriormente neste documento ou uma parte do mesmo. Outra molécula de ácido nucleico é de preferência um iniciador concebido para ser capaz de detetar a presença de uma molécula de ácido nucleico L5, ou L3 e L5 numa reação de PCR ou por uma molécula de ácido nucleico L5 borrão. O mesmo é válido para um iniciador capaz de detetar a presença de uma molécula de ácido nucleico S4 e/ou S6.

Iniciadores preferidos para detetar a presença de uma molécula de ácido nucleico L5 ou L3 e L5 compreendem ou consistem nos seguintes Sequências:

Sequências de iniciadores para detetar especificamente um L3 por PCR

Sense, 5'- AACACGAAGGAGGGCAAGGTC-3 '(nucleótidos 418 a 438 da sequência LmL3) (SEQ ID NO: 38) Anti sentido 5'- CTTCTTCGCGGCCTTTGCCTTG-3 '(reverso e complementar aos nucleótidos 1242 a 1263 da sequência LmL3) (SEQ ID NO: 39)

Sequências de iniciadores para detetar especificamente um L5 por PCR

Sense, 5'- TGCACGCTGGCAAATTGGGTAC -3 '(nucleótidos 10 a 31 da sequência LmL5) (SEQ ID NO: 40) anti sentido 5'-CTT CTT CGT GCG CAC AGC AG -3 '(reverso e complementar aos nucleótidos 464 a 483 de A sequência LmL5) (SEQ ID NO: 41)

As sequências de iniciadores para detetar especificamente um L3 por Northern blot

5'- CTTCTTCGCGCCTTTGCCTTG-3 '(inversa e complementar aos nucleótidos 1242 a 1263 da proteína LmL3 (SEQ ID NO: 42)

Sequências de iniciadores para detetar especificamente um L5 por Northern blot

5'-CTT CTT CGT GCG CAC AGC AG -3 '(reverso e complementar aos nucleótidos 464 a 483 da proteína LmL5 (SEQ ID NO: 43). A deteção ou um aumento do nível de expressão de um nucleótido L5 ou L3 e L5 é de preferência definida como sendo uma alteração detetável do nível de expressão do referido ácido nucleico em comparação com o nível de expressão da referida molécula de ácido nucleico num indivíduo de controlo.

Normalmente, um indivíduo de controlo não compreenderia uma tal molécula de ácido nucleico L5, ou L3 e L5. De preferência, um aumento do nível de expressão de uma molécula de ácido nucleico L5 ou L3 e L5 significa um aumento de pelo menos 5% expressão da sequência nucleotídica utilizando PCR.

## Ensaio

Num outro aspeto, é proporcionado um dispositivo de ensaio para diagnosticar uma doença parasitária num indivíduo, em que o dispositivo compreende uma fonte L5 ou uma fonte L3 e uma fonte L5. Opcionalmente, uma fonte S4 e/ou S6 pode também estar presente neste dispositivo de ensaio em combinação com uma fonte L5 ou uma fonte L3 e uma fonte L5. A presença de um anticorpo especificamente o reconhecimento da referida fonte pode ser detetado por quaisquer métodos convencionais conhecidos pelos especialistas na técnica (ver, por exemplo, Harlow E Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988). Os métodos adequados incluem afinidade Ensaio de co eletroforese de cromatografia (ACE) e ELISA de Ensaio de Soro de Imunoensaio ligado a Enzima. De preferência, o Ensaio compreende uma ELISA. Vários ensaios são descritos mais extensivamente abaixo.

Numa realização preferida, um ensaio envolve a utilização de uma fonte L5 ou uma fonte L3 e uma fonte L5 imobilizada sobre um suporte sólido para ligar e remover um anticorpo da amostra. O referido anticorpo ligado pode então ser detetado utilizando um reagente de deteção que se liga ao complexo [anticorpo] / [fonte L5 ou um L3 e um L5 fonte] e contém um complexo detetável do grupo repórter. Os reagentes de deteção adequados incluem anticorpos que se ligam ao [anticorpo] / [fonte L5 ou um L3 e um L5 Fonte] e polipéptido livre marcado com um grupo repórter (por exemplo, num ensaio semi-competitivo). Alternativamente, um pode ser utilizado num ensaio competitivo, no qual um anticorpo que se liga a uma fonte L5 ou a uma fonte L3 e L5 é marcado com um grupo repórter e

deixou-se ligar à fonte L5 imobilizada ou às fontes L3 e L5 imobilizadas após incubação da fonte com a amostra. A extensão à qual os componentes da amostra inibem a ligação do anticorpo marcado á referida fonte L5 ou às referidas fontes L3 e L5 é indicativa da reatividade da amostra com a fonte L5 imobilizada, ou fontes L3 e L5 imobilizadas.

Um suporte sólido pode ser qualquer material conhecido dos especialistas na técnica, ao qual uma fonte L5 ou uma fonte L3 e uma fonte L5 podem estar ligadas. Por exemplo, um suporte pode ser um poço de teste numa placa de microtítulo ou uma placa de nitrocelulose ou outra membrana adequada. Alternativamente, um suporte pode ser um talão ou disco, tal como vidro, fibra de vidro, látex ou um plástico como poliestireno ou cloreto de polivinilo. Um suporte pode também ser uma partícula magnética ou um sensor de fibra como os descritos, por exemplo, na Patente U.S. N ° 5 359 681.

Uma fonte L5 ou uma fonte L3 e uma fonte L5 podem ser ligadas ao suporte sólido utilizando uma variedade de técnicas conhecidas para aqueles na arte. No contexto da presente invenção, o termo "ligado" refere-se tanto à associação não covalente, tal como adsorção e ligação covalente (que pode ser uma ligação direta entre o antigénio e os grupos funcionais no suporte ou pode ser uma ligação por meio de um agente de reticulação). A ligação por adsorção a um poço numa placa de microtitulação ou a uma membrana. Em tais casos, a adsorção pode ser conseguida contactando uma fonte L5 ou uma L3 e uma L5 fonte, num tampão adequado, com o suporte sólido durante um período de tempo adequado. O tempo de contato varia com a temperatura, mas é tipicamente entre 1 hora e 1 um dia. Em geral, o contacto de um poço de uma placa de microtítulo de plástico (tal como poliestireno ou polivinil-quioreto) com

uma quantidade de uma fonte L5 ou uma fonte L3 e uma fonte L5 variando de 10ng a 1g e de preferência 100ng, é suficiente para ligar uma quantidade adequada de uma fonte L5 ou uma fonte L3 e uma fonte L5. Aqui também, quando uma quantidade ou quantidade de uma fonte L5 ou uma fonte L3 e uma fonte L5, define a quantidade total de uma fonte L5 ou uma fonte L3 e uma fonte L5 utilizada.

A ligação covalente de uma fonte L5 ou uma fonte L3 e uma fonte L5 a um suporte sólido pode geralmente ser conseguida fazendo primeiro reagir o suporte com um reagente bifuncional que reagirá tanto com o suporte como com um grupo funcional, tal como um grupo hidroxilo ou amino, no polipéptido. Por exemplo, uma fonte L5 ou uma fonte L3 e uma fonte L5 podem ser ligadas a um suporte tendo um revestimento de polímero apropriado usando benzo quinona ou por condensação de um grupo aldeído em que o suporte com uma amina e um hidrogénio ativo no polipéptido (ver, por exemplo, Pierce Immunotechnology Catalog and Handbook (1991) em A12-A13).

Em certas formas de realização, um ensaio é um ensaio imune enzimático ligado (ELISA). Este ensaio pode ser realizado pela primeira ligação de uma fonte L5 ou uma fonte L3 e uma fonte L5 que foi imobilizada num suporte sólido, geralmente o poço de uma placa de microtítulo, com a amostra, de modo que os anticorpos específicos para a referida fonte L5 ou um L3 e uma fonte L5 dentro da amostra é deixada ligar-se à fonte L5 imobilizada ou a uma fonte L3 e L5. Não consolidada a amostra é então removida da fonte imobilizada e um reagente de deteção capaz de se ligar às células imobilizadas [Anticorpo] / [L5 fonte ou um L3 e um L5 fonte] complexo é adicionado. A quantidade de reagente de deteção que permanece ao suporte sólido é então

determinado utilizando um método apropriado para o reagente de deteção específico.

Uma vez que a fonte L5, ou a fonte L3 e L5 foram imobilizadas no suporte, a proteína restante os locais de ligação no suporte são tipicamente bloqueados. Qualquer agente de bloqueio adequado conhecido dos especialistas na técnica, tal como albumina de soro bovino (BSA) ou Tween 20 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO). O sistema imobilizado L5, ou o L3 imobilizado e as fontes L5 imobilizadas, são então incubadas com a amostra, e anticorpo (se presente na amostra) é permitido ligar-se à referida fonte. Uma amostra pode ser diluída com um diluente adequado, tal como solução salina tamponada com fosfato (PBS) antes da incubação. Em geral, um tempo de contacto apropriado (i.e., incubação tempo) é aquele período de tempo que é suficiente para permitir detetar a presença de anticorpo dentro de uma amostra. De preferência, o tempo de contacto é suficiente para atingir um nível de ligação que seja pelo menos 95% do alcançado no equilíbrio entre a ligação e os anticorpos não ligados. Os especialistas na técnica reconhecerão que o tempo necessário para alcançar o equilíbrio pode ser facilmente determinada por ensaio do nível de ligação que ocorre durante um período de tempo. À temperatura ambiente, um tempo de incubação de cerca de 30 minutos é geralmente suficiente.

A amostra não ligada pode então ser removida por lavagem do suporte sólido com um tampão apropriado, tal como PBS contendo 0,1% de Tween 20 o reagente de deteção pode então ser adicionado a um suporte sólido. Um reagente de deteção apropriado é qualquer composto que se liga ao complexo imobilizado [anticorpo] / [fonte L5 ou um L3 e um L5 fonte] e que pode ser detetado por qualquer um de uma variedade de

meios conhecidos pelos especialistas na técnica. De preferência, o reagente de detecção contém uma ligação (tal como, por exemplo, Proteína A, Proteína G, imunoglobulina, litina ou antigénio livre) conjugado com um grupo repórter.

Grupos repórter preferidos incluem enzimas (tais como peroxidase de rábano), substratos, cofatores, inibidores, Corantes, radionuclídeos, grupos luminescentes, grupos fluorescentes e biotina. A conjugação do agente de ligação com o repórter pode ser conseguida utilizando métodos padrões conhecidos pelos especialistas na técnica. Agentes de ligações comuns podem também serem adquiridos conjugados a uma variedade de grupos repórter de muitas fontes (por exemplo, Zymed Laboratories, San Francisco, CA e Pierce, Rockford, IL).

O reagente de detecção é então incubado com a fonte imobilizada [anticorpo] / [fonte L5 ou uma L3 e uma L5 fonte] durante uma quantidade de tempo suficiente para detetar o anticorpo ligado. Uma quantidade apropriada de tempo pode geralmente ser determinado a partir das instruções do fabricante ou através do ensaio do nível de ligação que ocorre ao longo de um período de tempo. O reagente de detecção não ligado é então removido e o reagente de detecção ligado é detetado utilizando o grupo repórter.

O método utilizado para detetar o grupo repórter depende da natureza do grupo repórter. Para grupos radioativos, contagem de cintilação ou métodos autorradiográficos são geralmente adequados. Métodos espectroscópicos podem ser utilizados para detetar corantes, grupos luminescentes e grupos fluorescentes. A biotina pode ser detetada utilizando avidina, acoplada a um grupo repórter diferente (vulgarmente um grupo radioativo ou fluorescente

ou uma enzima). Grupos de repórteres enzimáticos podem ser geralmente detetada pela adição de substrato (geralmente durante um período de tempo específico), seguida por espectroscopia ou outra análise dos produtos da reação.

Para determinar a presença ou ausência de um anticorpo específico para uma doença parasitária tal como a leishmaniose numa amostra, o sinal detetado a partir do grupo repórter que permanece ligado ao suporte sólido é geralmente comparado a um sinal que corresponde a um valor de corte predeterminado. Numa realização preferida, o valor de corte é preferencialmente o sinal médio obtido quando a fonte L5 imobilizada, ou as fontes L3 e L5 imobilizadas são incubadas com uma amostra de um indivíduo não infetado. Em geral, uma amostra que gera um sinal que é três desvios padrão acima do valor de corte predeterminado é considerado positivo (i.e., reactivo com uma fonte L5, ou L5 e L3). Numa alternativa, o valor de corte é determinado usando uma curva de operador de recetor, de acordo com o Método de Sackett et al., *Epidemiology Clínica: A Basic Science for Clinical Medicine*, p. 106-7 (Little Brown and Co., 1985). Resumidamente, nesta concretização, o valor de corte pode ser determinado a partir de um gráfico de pares de taxas positivas verdadeiras (isto é, sensibilidade) e taxas de falsos positivos (100% -especificidade) que correspondem a cada valor de corte possível para o resultado do teste de diagnóstico.

O valor de corte no gráfico que está mais próximo do canto superior esquerdo (ou seja, o valor de maior área) é o valor de corte mais preciso e uma amostra gerando um sinal que é maior do que o valor de corte determinada por este método pode ser considerada positiva. Alternativamente, o valor de corte pode ser deslocado para a esquerda ao longo

do gráfico, para minimizar a taxa de falsos positivos, ou para a direita, para minimizar a taxa de falsos negativos.

Numa realização relacionada, é realizado um ensaio num formato de teste de passagem ou de tira, em que uma fonte L3 e uma fonte L5 é imobilizada numa membrana tal como nitrocelulose. No teste de fluxo contínuo, os anticorpos da amostra ligam-se à fonte L5 imobilizada, ou fonte L3 e L5 à medida que a amostra passa através da membrana. (Por exemplo, proteína A-ouro coloidal), em seguida, liga-se ao complexo [anticorpo] - [fonte L5 ou fontes L3 e L5] à medida que a solução contendo o reagente de deteção flui através da membrana. A deteção do reagente de deteção ligado pode então ser realizada como descrito acima. No formato de teste de tira, uma extremidade da membrana à qual a fonte está ligada é imerso numa solução contendo a amostra. A amostra migra ao longo da membrana através de uma região contendo deteção e à área do polipéptido imobilizado. Concentração do reagente de deteção numa fonte L5 ou num L3 e uma fonte L5 indica a presença de um anticorpo específico para um antigénio de um parasita que causa um parasita como a leishmaniose na amostra. Tipicamente, a concentração do reagente de deteção nesse local gera um padrão, como uma linha, que pode ser lido visualmente. A ausência de tal padrão indica um resultado negativo. Em geral, a quantidade de uma fonte L5 ou uma fonte L3 e uma fonte L5 imobilizada numa membrana é selecionada para gerar uma fonte visualmente padrão discernível quando uma amostra contém um nível de anticorpo que seria suficiente para gerar um sinal ELISA, como discutido acima. De preferência, a quantidade de uma fonte L5 ou uma fonte L3 e L5 imobilizada numa membrana que varia de 25ng a 500ng. Tais testes podem

tipicamente ser realizados com uma quantidade muito pequena (por exemplo, uma gota) do soro ou sangue do sujeito.

A divulgação de cada elemento do dispositivo de ensaio quando aplicado a uma fonte L5 ou uma fonte L3 e uma fonte L5 pode também ser aplicado para uma fonte S4 e/ou S6 se uma fonte S4 e/ou S6 for utilizada em combinação com uma fonte L5 ou uma fonte S5 L3 e uma fonte L5 neste dispositivo de ensaio.

Qualquer indivíduo ou médico pode usar este dispositivo no escritório/casa, repetir o uso de tal dispositivo, Necessário.

Usualmente, moléculas adicionais são utilizadas num ensaio como um controlo positivo ou negativo. Um controlo positivo típico pode ser um anticorpo que reconhece uma molécula que se sabe estar presente numa amostra a ser testada. Um negativo típico controlo pode ser um anticorpo que reconhece uma molécula que se sabe estar ausente numa amostra a ser testada.

#### Definições gerais

No contexto da invenção, uma proteína ou um fragmento de proteína é representado por uma sequência de aminoácidos.

No contexto da invenção, uma molécula de ácido nucleico é representada por uma sequência de ácido nucleico ou nucleótido que codifica uma proteína ou um polipéptido ou um fragmento de proteína. Uma molécula de ácido nucleico pode compreender uma região reguladora.

#### Definições gerais

No contexto da invenção, uma proteína ou um fragmento de proteína é representada por uma sequência de aminoácidos.

No contexto da invenção, uma molécula de ácido nucleico é representada por uma sequência de ácido nucleico ou nucleótido que codifica uma proteína ou um polipéptido ou um fragmento de proteína. Uma molécula de ácido nucleico pode compreender uma região reguladora.

Deve ser entendido que cada molécula de ácido nucleico ou proteína ou fragmento de proteína como aqui identificado por um dado do Número de Identidade de Sequência (SEQ ID NO) não se limita a esta sequência específica como divulgada. Cada sequência de genes ou sequência de nucleótidos como aqui identificada codifica uma dada proteína ou fragmento de polipéptido ou proteína ou é ela própria uma proteína ou um fragmento de proteína. Ao longo desta aplicação, cada vez que se refere a uma sequência de nucleótidos SEQ ID NO (tomar a SEQ ID NO: 2 ou 4 como exemplo), pode-se substituir por:

i.a sequência de nucleótidos compreendendo uma sequência de nucleótidos que tem pelo menos 60% de identidade de sequência ou similaridade com SEQ ID NO: 2 ou 4 ou 49 ou 51 ou 53 ou 55 ou 65 (como exemplo).

ii.a sequências nucleótidos cuja cadeia complementar híbrida com uma molécula de ácido nucleico de sequência de (i);

iii. Uma sequência de nucleótidos cuja sequência difere da sequência de uma molécula de ácido nucleico de (iii) devido a degenerescência do código genético.

iv. Uma sequência de nucleótidos que codifica uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 60% de identidade ou similaridade de aminoácidos com uma sequência de aminoácidos codificada por uma sequência de nucleótidos SEQ ID NO: 2 ou 4 ou 49 ou 51 ou 53 ou 55 ou 65.

Ao longo deste pedido, cada vez que se refere a uma sequência de aminoácidos específica SEQ ID NO (tome SEQ ID NO: 1 ou 3 ou 48 ou 50 ou 52 ou 54 ou 56 como exemplo), pode-se substituir por:

Um polipéptido compreendendo uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 60% de identidade de sequência ou similaridade com amino SEQ ID NO: 1 ou 3 ou 48 ou 50 ou 52 ou 54 ou 56.

Cada sequência de nucleótidos ou sequência de aminoácidos aqui descrita em virtude da sua percentagem de identidade ou similaridade (pelo menos 60%) com uma dada sequência de nucleótidos ou sequência de aminoácidos, respetivamente, tem, de um modo preferido, uma identidade ou uma similaridade de, pelo menos, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% ou mais de identidade ou similaridade com a dada sequência de nucleótidos ou de aminoácidos, respetivamente. Numa realização preferida, a identidade de sequência ou a similaridade é determinada comparando todo o comprimento das sequências como aqui identificadas.

"Identidade de sequência" é aqui definida como uma relação entre dois ou mais aminoácidos (polipéptido ou proteína) sequências ou duas ou mais sequências de ácido nucleico (poli nucleótido), como determinado por comparação das

sequências. Numa preferida, a identidade da sequência é calculada com base no comprimento total de dois dados da SEQ ID NO ou parte deles. Preferencialmente, parte do mesmo significa pelo menos 50%, 60%, 70%, 80%, 90% ou 100% de ambas as SEQ ID NO. Na arte, a "identidade" significa também o grau de relação de sequência entre sequências de aminoácidos ou de ácido nucleico, conforme o caso, como determinado pela correspondência entre cadeias de tais sequências.

A "similaridade" entre duas sequências de aminoácidos é determinada comparando a sequência de aminoácidos conservados de um polipéptido para a sequência de um segundo polipéptido. "Identidade" e "similaridade" podem ser facilmente calculados por métodos conhecidos, incluindo mas não limitados aos descritos em (Computational Molecular Biology, Lesk, A. M., ed., Oxford University Press, Nova Iorque, 1988; Biocomputing: Projetos de Informática e Genoma, Smith, D. W., ed., Academic Press, New York, 1993; Análise por Computador de Dados de Sequência, Parte I, Griffin, A. M., and Griffin, H.G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994; Análise de Sequência em Biologia Molecular, von Heine, G., Academic Press, 1987; E Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. e Devereux, J., eds., M Stockton Press, New York, 1991; E Carillo, H., e Lipman, D., SIAM J. Applied Math., 48: 1073 (1988).

Métodos preferidos para determinar a identidade são concebidos para dar a maior correspondência entre as sequências testadas. Métodos para determinar identidade e similaridade são codificados em programas de computador disponíveis publicamente. Computador preferido os métodos de programa para determinar identidade e

similaridade entre duas sequências incluem por exemplo o pacote do programa GCG (Devereux, J., et al., Nucleic Acids Research 12 (1): 387 (1984)), BestFit, BLASTP, BLASTN e FASTA (Altschul, S.F. et al., J. Mol. Biol. 215: 403-410 (1990)). O programa BLAST X está disponível publicamente no NCBI e em outras fontes (BLAST Manual, Altschul, S., et al., NCBI NLM NIH Bethesda, MD 20894, Altschul, S., et al., J. Mol. Biol. 215: 403-410 (1990)). O conhecido algoritmo Smith Waterman também pode ser usado para determinar a identidade.

Os parâmetros preferidos para a comparação de sequências de polipéptidos incluem o seguinte: Algoritmo: Needleman e Wunsch, J. Mol. Biol. 48: 443-453 (1970); Matriz de comparação: BLOSUM62 de Hentikoff e Hentikoff, Proc. Natl. Acad. Sei. EUA. 89: 10915-10919 (1992); Penalidade de Gap: 12; e penalidade de comprimento de intervalo: 4. Um programa útil com estes parâmetros está disponível publicamente como o programa "Ogap" da Genetics Computer Group, localizado em Madison, WI. Os referidos parâmetros são os parâmetros padrão para as comparações de aminoácidos (juntamente com nenhuma penalidade para os intervalos finais).

Os parâmetros preferidos para a comparação de ácidos nucleicos incluem o seguinte: Algoritmo: Needleman e Wunsch, J. Mol. Biol. 48: 443-453 (1970); Matriz de comparação: correspondências = + 10, incompatibilidade = 0; Penalidade de Gap: 50; Comprimento Penalidade: 3. Disponível como o programa Gap da Genetics Computer Group, localizado em Madison, Wisconsin, para comparações de ácidos nucleicos.

Opcionalmente, para determinar o grau de similaridade de

aminoácidos, o especialista pode também ter em conta as substituições de aminoácidos "conservadoras", como será claro para o especialista na matéria. Substituições de aminoácidos conservadoras referem-se à permutabilidade de resíduos com cadeias laterais semelhantes. Por exemplo, um grupo de aminoácidos possuindo grupos alifáticas cadeias laterais é glicina, alanina, valina, leucina e isoleucina; um grupo de aminoácidos possuindo um lado alifático-hidroxilo de cadeias é serina e treonina; um grupo de aminoácidos possuindo cadeias laterais contendo amida é asparagina e glutamina; um grupo de aminoácidos possuindo cadeias laterais aromáticas é fenilalanina, tirosina e triptofano; um grupo de aminoácidos tendo cadeias laterais básicas é lisina, arginina e histidina; e um grupo de aminoácidos tendo um lado contendo enxofre é cisteína e metionina. Os grupos de substituição de aminoácidos conservativos preferidos são: valina-leucina-isoleucina, Fenilalanina-tirosina, lisina-arginina, alanina-valina e asparagina-glutamina. As variantes de substituição do grupo amino de ácido aqui descrito são aquelas em que pelo menos um resíduo nas sequências reveladas foi removido e um resíduo diferente inserido em seu lugar. De preferência, a alteração de aminoácidos é preferencialmente conservadora. As substituições para cada um dos aminoácidos que ocorrem naturalmente são as seguintes: Ala a Ser; Arg a Lys; Asn para Gln ou His; Asp para Glu; Cys a Ser ou Ala; Gln para Asn; Glu para Asp; Gly para Pro; Seu para Asn ou Gln; Ile para Leu ou Val; Leu para Ile ou Val; Lys a Arg; Gln ou Glu; Met para Leu ou Ile; Phe a Met, Leu ou Tyr; Ser para Thr; Thr a Ser; Trp para Tyr; Tyr a Trp ou Phe; e Val a Ile ou Leu.

Construção de ácido nucleico

Uma construção de ácido nucleico compreende uma sequência de nucleótidos que codifica uma proteína ou um fragmento de proteína tal como aqui definido. Uma construção de ácido nucleico compreendendo uma molécula de ácido nucleico que codifica para uma dada proteína ou fragmento de proteína como aqui definido irão assegurar a expressão da molécula de ácido nucleico, e da proteína ou proteína correspondente num indivíduo tratado. Numa realização mais preferida, uma construção de ácido nucleico compreende mais do que um nucleico de molécula de ácido, cada molécula de ácido nucleico codificando para uma dada proteína ou fragmento de proteína. Em um ainda mais preferido, uma construção de ácido nucleico compreende duas, três, quatro moléculas de ácido nucleico, cada molécula de ácido nucleico codificação para uma dada proteína ou fragmento de proteína. Numa forma de realização preferida, uma construção de ácido nucleico compreende uma expressão cassete, compreendendo a referida cassete de expressão cada molécula de ácido nucleico necessária. Cada molécula de ácido nucleico está operacionalmente ligado com outra molécula de ácido nucleico presente. Mais preferencialmente, um promotor adequado está operacionalmente ligado a cassete de expressão para assegurar a expressão da molécula de ácido nucleico num sujeito.

Neste documento e nas suas reivindicações, o verbo "compreender" e as suas conjugações são utilizadas no seu sentido não limitativo para significar que os itens que seguem a palavra estão incluídos, mas itens não especificamente mencionados não são excluídos. Além do verbo "consistir" pode ser substituído por "consistir essencialmente em" o que significa que um produto ou uma composição ou um L3 ou uma fonte de L5 tal como aqui

definida pode compreender componente (s) adicional (es) do que os especificamente identificados, componente (s) não alterando a característica única da invenção.

Além disso, a referência a um elemento pelo artigo indefinido "a" ou "um" não exclui a possibilidade de que mais de um elemento estiver presente, a menos que o contexto exija claramente que exista um e apenas um dos elementos. O artigo indefinido "a" ou "an" geralmente significa "pelo menos um".

A invenção é ilustrada adicionalmente pelo exemplo seguinte, que não deve ser interpretado para limitar o âmbito de aplicação da presente invenção.

Descrição das figuras

**Figura 1. Expressão e purificação de proteínas recombinantes Leishmânia major rLmL3 e rLmL5.** Coomassie-azul manchado de poliacrilamida com 13% corados com azul de lizados de células pQELmL3 (painel L3) ou pQELmL5 (panelL5) transfetadas com vetor os lizados de Escherichia cóli após indução (linhas 1), após passagem por colunas de agarose Ni-NTA (linhas 2) e RLmL3 recombinante purificada e rLmL5 (linhas 3).

**Figura 2. Antigenicidade das proteínas L3 e L5.**

(a) Doze ratinhos BALB/c foram s.c. infetados com  $5 \times 10^4$  L. promastigotes de fase estacionária maior na esquerda da almofada e soros foram obtidos oito semanas após o desafio. IgG1 e IgG2a dos soros de murganhos com leishmaniose cutânea (MCL) contra rLmL3 e rLmL5 foram determinados individualmente ELISA A falta de reatividade

dos soros dos mesmos ratinhos antes da infecção também está representada. Reatividade de ELISA de soros de cães com CVL sintomática e soros de controlo contra proteínas recombinantes rLmL3 (b) e rLmL5 (c).

**Figura 3. Produção de citocinas induzida por vacinação em ratinhos BALB/c.** Ratinhos BALB/c (seis por grupo) foram s.c. imunizados três vezes com 10µg de rLmL3+50µg de CpG-ODN (L3 +CpG) ou 10µg de rLmL5+50µg de CpGODN (L5+CpG), com 50µg de CpG-ODN (CpG) ou com PBS (Salino). As células do baço foram obtidas quatro semanas após a Vacinação e cultivadas in vitro durante 48h na presença de rLmL3 (a, c e e), rLmL5 (b, d e f) e em meio sozinho. O nível de IFN- $\gamma$  (a e b), IL-4 (c e d) e IL-10 (e e f) foram avaliados por ELISA em sobrenadantes de cultura. Cada barra representa a média  $6 \pm$ SD de dados de ratinhos individuais.

**Figura 4. Curso de infecção por L. major em ratinhos vacinados com BALB/c após desafio.** (Um inchamento da almofada é dado como a diferença de espessura entre os a almofada e as contra laterais infetados e não infetados. B o número de parasitas viáveis no gânglio linfático de drenagem popliteal da perna e baço infetados foram determinados individualmente por limitando a diluição na semana oito pós-desafio. (\*,  $P < 0,01$ )

**Figura 5. Respostas imunitárias celulares provocadas por infecção em ratinhos vacinados com L3 + CpG ODN.** Células do baço foram estabelecidas na semana oito após o desafio do parasita. As células não foram estimuladas (meio) ou separadamente estimuladas com LRP (Leishmânia Ribossomal Proteínas) (12µg ml<sup>-1</sup>), SLA (Antígenos de Leishmânia Solúvel) (12µg Ml<sup>-1</sup>), MRP (Proteínas Ribossómicas de Rato) (12µg ml<sup>-1</sup>) ou L3 (6 µg ml<sup>-1</sup>) durante 48 horas em CO<sub>2</sub> a 5%,

a 37°C. IFN- $\gamma$  (a,) Os níveis de IL-4 (b) e IL-10 (c) foram medidos em sobrenadantes de cultura por ensaio de imuno adsorção ligado a enzima de captura. Cada barra representa a média mais o desvio padrão dos níveis de citocinas determinados em seis ratinhos individuais por grupo.

**Figura 6. Respostas imunitárias celulares provocadas por infecção em ratinhos vacinados com L5 + CpG ODN.** Culturas de Células do baço foram estabelecidas na semana oito após o desafio do parasita. As células não foram estimuladas (meio) ou separadamente estimulado com LRP (12 $\mu$ g ml<sup>-1</sup>), SLA (12 $\mu$ g ml<sup>-1</sup>), MRP (12 $\mu$ g ml<sup>-1</sup>) ou L5 (6 $\mu$ g ml<sup>-1</sup>) durante 48 horas em 5% de CO<sub>2</sub> 37°C. Os níveis de IFN- $\gamma$  (a), IL-4 (c) e IL-10 (b) foram medidos em sobrenadantes de cultura por enzimas ligadas a enzima de captura Imunossorvente. Cada barra representa a média mais o desvio padrão dos níveis de citocinas determinados em seis ratinhos individuais por grupo.

**Figura 7 Curso de infecção por L. braziliensis em ratinhos vacinados com BALB/c após desafio.** (A) Lesões Inflamatórias nas orelhas infetadas. Os tamanhos das lesões (em milímetros) são expressos como a média  $\pm$  SD de uma experiência realizado com cinco ratinhos. \*P<0,05 entre os ratinhos vacinados com rLmL5 + CpG-ODN ou rLmL3 + CpG-ODN e ambos os grupos de controlo. (B) Carga parasitária na derme da orelha quantificada na quinta semana pós-infecção. Os resultados são expressos como a média  $\pm$  DP de cinco orelhas por grupo. \*P<0,05 diminuição significativa entre rLmL5 + CpG-ODN e ambos os grupos de ratinhos controlados.

**Figura 8 localização ribossômica das proteínas LmL3 e LmL5.** Um  $\mu$ g da proteína rLmL3 (A), 1  $\mu$ g da proteína rLmL5 (B) e 10 $\mu$ g de extratos de LRP de Leishmânia major (A e B) foram

submetidos a eletroforese em 10-13% gradiente de SDS-PAGE. A coloração azul Coomassie dos géis é mostrada nos painéis esquerdos (A e B). Equivalentes os geles foram transferidos e sondados com os soros de murganhos imunizados com rLmL3 (painel (-LmL3) (A) e com o soro purificado por afinidade uma fração de anticorpo anti LmL5 de cinco soros de leishmaniose visceral canina (painel (-LmL5) (B).

**Figura 9 Análise dos parâmetros de infecção em ratinhos vacinados com as proteínas ribossômicas S6, L2, L7, L8 E L6 na presença de CpG.** (A) O desenvolvimento da lesão nos grupos infetados foi monitorizado semanalmente até t semana oito após a infecção. As diferenças no inchamento da almofada entre S6 mais CpG ODN e controlo (solução salina e adjuvante) os grupos foram estatisticamente significativos na semana oito após a infecção (\* $P < 0,05$ ). B) Determinação da carga parasitária em os DLNs e baços analisados oito semanas após a infecção. As diferenças nas cargas parasitárias nos baços dos grupos vacinados S6 mais CpG ODN e o baço dos grupos controlo (salino e adjuvante) foram estatisticamente significativos (\* $P < 0,05$ ). Para maior clareza, apenas o SD do grupo salino e o grupo vacinado S6 mais CpG ODN é mostrado.

**Figura 10. Respostas imunitárias provocadas por vacina S6 mais CpG ODN.** As amostras de soro foram obtidas de ratinhos imunizados com S6 mais CpG ODN, CpG ODN e solução salina quatro semanas após a administração da última dose. Os soros foram individualmente testados por ELISA para determinar a presença de anticorpos IgG, IgG1 e IgG2a específicos anti-S6. (\* $P < 0,05$ ) diferenças estatísticas significativas entre o grupo S6 mais CpG ODN e o controlo (salino e CpG) grupos. (B) As células do baço não foram estimuladas (meio) ou estimuladas com S6 durante 48 horas

em CO<sup>2</sup> a 5%, a 37°C. Os níveis de IFN- $\gamma$ , IL-4 e IL-10 foram medidos em sobrenadantes de cultura por ensaio imune sorvente ligado a enzima de captura. Cada barra representa a média mais o desvio padrão dos níveis de citocinas determinados em quatro ratinhos individuais por grupo. (\*P<0,05) diferenças estatísticas significativas entre o grupo S6 mais CpG ODN e o controle (salino e CpG) grupos.

**Figura 11. Desenvolvimento da lesão em ratinhos imunizados com L3, L5 e S4 individualmente ou em preparações misturadas na ausência ou presença de CpG.** As lesões foram monitorizadas semanalmente até à semana seis após a infecção. (A) Ratinhos de controlo de grupos e grupos de ratinhos vacinados com as proteínas recombinantes sem adjuvante. (B) Grupos de ratinhos de controlo e ratinhos vacinados com as proteínas recombinantes mais CpG ODN. (\*P<0,05) Diferenças no edema da almofada entre L3 mais CpG ODN, L5 mais CpG ODN, L3 mais L5 mais CpG ODN ou L3 mais L5 mais S6 mais CpG ODN e os grupos controlo (salino e adjuvante) foram estatisticamente significativos na semana seis após a infecção.

**Figura 12. Carga de parasitas nos camundongos vacinados.** As cargas parasitárias foram determinadas no baço e no DLN na semana sete após a infecção. (A) Grupos de ratinhos de controlo e grupos de ratinhos vacinados com o Proteínas sem adjuvante. (B) Grupos de ratinhos de controlo e grupos de ratinhos vacinados com as proteínas recombinantes mais CpG ODN. (\* P <0,05) Diferenças na carga do parasita do baço entre L3 mais CpG ODN, L5 mais CpG ODN, L3 mais L5 mais CpG ODN ou L3 mais L5 mais S6 mais CpG ODN e grupos controlo (salino e adjuvante) foram

estatisticamente significativa. (\*P <0,05) Diferenças nas cargas de parasitas poplíteos entre L3 mais L5 mais CpG ODN ou os grupos L3 mais L5 mais S6 mais CpG ODN e controlo (salino e adjuvante) foram estatisticamente significativos.

**Figura 13. Representação esquemática das construções quiméricas propostas.** Os iniciadores são mostrados os locais de corte seleccionados para a clonagem.

### **Exemplos**

**Exemplo 1: clonagem de proteínas L3 e L5 de *Leishmânia major* e efeito protetor conferido por estas proteínas contra a infeção por *Leishmânia major***

Material e métodos

*Estirpes de ratos e parasitas.*

Foram adquiridos ratinhos BALB/c fêmeas (6-8 semanas de idade) da Harlan Interfauna Ibérica S.A. (Barcelona, Espanha).

L. principais parasitas (WHOM/IR/-/173) foram mantidos em estado virulento por passagem em ratinhos BALB/c. L. major amastigotes foram obtidos e transformados em promastigotes por cultura a 26°C em meio de Schneider (Gibco, BRL, Grand Island, NY, EUA) suplementado com 20% de soro fetal de vitelo.

*CpG-ODN.*

CpG-ODN modificados com fosforotioato (5'-TCAACGTTGA-3' e 5'-GCTAGCGTTAGCGT-3') (SEQ ID NO: 5,6) foram sintetizados por Isogen (Holanda).

*Clonagem de sequências de ADN que codificam para as proteínas L3 e L5 ribossômicas da L. major.*

O enquadramento de leitura aberta (ORF) para as proteínas L3 e L5 maiores de *L. major* foram obtidos a partir do *L. major* Genoma ([www.genedb.org/genedb/leish](http://www.genedb.org/genedb/leish)) utilizando as sequências de proteínas L3 e L5 de *S. cerevisiae* como sondas (56). Para a expressão das proteínas rLmL3 e rLmL5, as suas regiões de codificação (CR) foram amplificadas por PCR utilizando como molde o ADN de *L. major* (MHOM/IL/80 (Friedlin)). Os ADNs amplificados foram clonados no plasmídeo pBluescript (Stratagene, La Jolla CA) e sequenciadas antes da clonagem no vetor de expressão pQE30 (QIAGEN, Hilden, Alemanha).

Para a clonagem do CR LmL3 os iniciadores utilizados foram: sentido, 5'-CGGGATCCATGTCTCACTGCAAGTTCGAG-3' (posições 1 a 20 do LmL3 CR (LmjF34.2880)) (SEQ ID NO:44); Antisense, 5'-AACTGCAGTTACTTCTTCGCGCCTTTG-3' (inversa e complementar às posições 1241 a 1260 da LmL3 CR (LmjF34.2880)) (SEQ ID NO:45). Os locais de restrição BamHI e PstI (sublinhados) foram incluídos para fins de clonagem.

Para a clonagem do CR LmL5 os iniciadores utilizados foram: sentido, 5'-CGGGATCCATGTGCACGC TGGCAAATTG-3' (posições 1 a 20 da LmL5 CR (LmjF35.1890)) (SEQ ID NO:46); Antisense, 5'-CCCAAGCTTTTACTTGCCGAGGCGCTCGC-3' (inversa e complementar às posições 968-987 da LmL5 CR (LmjF35.1890.319)) (SEQ ID NO:47). Os locais de restrição BamHI e HindIII (sublinhados) foram incluídos para fins de clonagem.

*Purificação de proteínas.*

As proteínas rLmL3 e rLmL5 foram sobre expressas em *Escherichia coli* transformadas com pQE-LmL3 ou com pQE-LmL5 e purificadas em condições de desnaturação em colunas de agarose de ácido Ni-nitrilotriacético (Ni-NTA) (Qiagen). Após a ligação as proteínas recombinantes de agarose Ni-NTA foram redobradas na coluna de afinidade como descrito (57). As proteínas recombinantes foram passadas através de uma coluna de polimixina-agarose (Sigma, St. Louis, Mo.). Residual. O teor de endotoxina (<12pg/µg de proteína recombinante) foi medido pelo Quantitative Chromogenic Limulus Amebocyte Ensaio QCL-1000 (BioWhittaker, Walkersville, Md.).

*Imunizações, desafio parasitário e quantificação parasitária.*

Dois grupos de ratinhos BALB/c independentes (seis por grupo) foram inoculados subcutaneamente (s.c.) na almofada da pata direita com 10µg de rLmL3 ou 10µg de rLmL5 misturados com 25µg de cada CpG-ODN. Como controlo, dois grupos de ratinhos adicionais foram inoculadas com 25µg de cada CpG-ODN sozinho, ou com tampão fosfato salino (PBS). Cada grupo recebeu dois e quatro semanas mais tarde com a mesma dose utilizada para a iniciação. O desafio do parasita foi realizado por s.c. por inoculação com 5 3 10<sup>4</sup> promastigotes em fase estacionária de *L. major* (WHOM/IR/-/173) na almofada da pata esquerda (não tratada) quatro semanas após a última inoculação. O inchamento do pé foi medido com um calibre métrico e calculado como espessura do pé esquerdo menos espessura do pé direito. O número de parasitas foi determinado nas orelhas, drenando os gânglios linfáticos (DLN) e o baço por limitação do ensaio de diluição como descrito (70).

*Antígenos de Leishmânia e proteínas ribossômicas de camundongo.*

Para a preparação de LRP de *L. major*,  $10^9$  promastigotes foram colhidos, lavados duas vezes em PBS pré-arrefecido e Re-suspensos em 1 ml de tampão de lise NP40 (Tris HCl 10 mM, pH 8,0, NaCl 150 mM, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM e NP40 a 0,5%) e Pipetado para cima e para baixo 10 vezes. Após listras, as amostras foram micro fugadas a 3000xg durante 2 min a 4°C para sedimentar os núcleos. O sobrenadante foi micro fugado duas vezes a 13000 x 3g durante 15 min a 4°C e os ribossomas foram preparados a partir do citosólico sobrenadante como descrito em [57]. Resumidamente, o citosol foi submetido a centrifugação a alta velocidade a 90.000 rpm durante 30 min a 4°C num rotor Beckman TL100.3. O sedimento ribossomal bruto foi re-suspensos em tampão A (Tris-HCl 20 mM, pH 7,4, 500 mM de AcNH<sub>4</sub>, 100 mM de MgCl<sub>2</sub>, 5 mM de β-mercaptoetanol) e centrifugou-se através de um gradiente de sacarose descontínuo (20/40%) em tampão A a 90.000 rpm a 4°C num rotor TL100.3. O sedimento de ribossomas lavados foi dissolvido em PBS e sonicated até a degradação completa do RNA ribossomal. Foram preparados extratos de proteínas ribossômicas de ratinho (MRP) a partir de  $5 \times 10^7$  RAW 264,7 células de macrófagos murinos usando o mesmo procedimento.

As proteínas totais de *L. major* (antigénio de Leishmânia solúvel [SLA]) foram preparadas como descrito (70). Resumidamente, *L. major* Promastigotes ( $10^{10}$ ) foram lavados duas vezes em PBS, re-suspensos em 500 ml de PBS e lizados por três congelamentos e descongelamentos ciclos. Após a lise celular, os antigénios solúveis foram separados da fração insolúvel por centrifugação durante 15 min a 12 000

X g utilizando uma micro centrífuga. Os sobrenadantes foram alíquotas e armazenados a  $-70^{\circ}\text{C}$ .

#### *Medição de citocinas em sobrenadantes*

A libertação de IFN- $\gamma$ , IL-10 e IL-4 foram medidas nos sobrenadantes de culturas de células de esplenócitos estimuladas com as proteínas recombinantes utilizando kits ELISA comerciais (Diacclone, Besançon, França). Resumidamente,  $3 \times 10^6$  células da bacia foram semeadas em placas de 48 poços durante 48h a  $37^{\circ}\text{C}$  na presença de rLmL3 ( $6\mu\text{g ml}^{-1}$ ) ou rLmL5 ( $6\mu\text{g ml}^{-1}$ ) ou meio sozinho.

#### *Deteção de respostas de anticorpos anti-L3 e anti-L5 em ratinhos e cães*

Amostras de soro canino foram coletadas de 20 cães clinicamente sintomáticos naturalmente infetados com *Leishmânia Infantum* na região da Extremadura (Espanha). Os animais infetados foram avaliados clinicamente e analisados pela Parasitologia da Escola Veterinária, Universidade de Extremadura, Cáceres, Espanha. Todos os soros foram positivos quando testados por imunofluorescência indireta, e a presença de formas amastigotes do parasita foi confirmada por observação direta em gânglios linfoides poplíteia e prés-capsular. Os soros de controlo foram obtidos a partir de 8 animais saudáveis mantidos no Departamento de Parasitologia (Universidade de Extremadura).

Os soros de 12 ratinhos BALB/c experimentalmente infetados com  $5 \times 10^4$  promastigotes de fase L. estacionária (WHOM/IR/-/173) foram coletados na semana oito após a infeção. Como controlo, os soros dos mesmos ratinhos foram

recolhidos antes da infecção. As placas ELISA padrão foram revestidas durante a noite à temperatura ambiente com 100 ml de cada uma das proteínas ribossômicas recombinantes (2  $\mu\text{g ml}^{-1}$  em PBS). As amostras de soro canino e murino foram ensaiadas a diluição 1/200 em PBS -Tween 20 (0,5%) - caseína (5%). Como anticorpos secundários anti-IgG de cão conjugado com peroxidase de rábano (1/1000), anti-muse-IgG1 (1/1000) e anti-IgG2a de ratinho (1/500) adquirida a Nordic Immunological Laboratories (Tilburg, Holanda). O dicloridrato de ortofenil diamina (OPD) (Dako, A/S, Glostrup, Dinamarca) foi utilizado como substrato de peroxidase para ensaios ELISA. Após 15 min, a reação foi parada com a adição de 100  $\mu\text{l}$  de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  1M e a absorvência foi lida a 450 nm.

#### *Análise estatística*

A análise estatística foi realizada por um teste t de estudante. As diferenças foram consideradas significativas quando  $P < 0,05$ .

#### Resultados e discussão

##### *Identificação, clonagem e expressão das proteínas LmL3 e LmL5.*

Para a identificação das regiões de codificação L3 e L5 maiores de L, realizou-se uma pesquisa BLASTP utilizando como sondas as sequências de aminoácidos L3 e L5 de *S. cerevisiae* (YOR063w e YPL131w, respectivamente) [58]. Duas entradas diferentes (LmjF34.2880 e LmjF35.1890) anotadas como proteínas putativas LmL3 e LmL5 foram resgatadas com valores significativos das classificações BLAST. Com base nos dados da sequência de bases de dados, os iniciadores de

PCR foram concebidos para amplificar o LmL3 e LmL5 CR, incluindo local de corte para diferentes enzimas de restrição para fins de clonagem. Os ADNs amplificados foram sub clonados em pBluescript e sequenciadas. A proteína putativa L3 de *L. major* possui 419 aminoácidos com um peso molecular de 47,5 kDa e um ponto isoelétrico previsto de 11,67. A proteína putativa L5 de *L. major* possui 328 aminoácidos, com um peso molecular de 36,6 kDa e um ponto isoelétrico previsto de 10,69. A comparação do aminoácido deduzido L3 e L5 de *L. major* sequências com as suas contrapartes de *S. cerevisiae* revelaram um elevado grau de homologia: 57% de identidade, 73,5% de semelhança para a proteína L3; 51,2% de identidade, 66,3% de similaridade para a proteína L5 (ver alinhamentos). O alinhamento aqui apresentado mostra que as proteínas Leishmânia L3 e L5 contêm domínios com um elevado grau de semelhança. Isso foi também notável observar que ambas as proteínas do parasita eram mais longas que as proteínas de levedura, apresentando aminoácidos extra resíduos na extremidade carboxi-terminal para a LmL3 e em ambas as extremidades para a LmL5. A estrutura primária das proteínas de Leishmânia pertencentes a famílias de proteínas conservadas parecem ser imunologicamente relevantes, uma vez que as proteínas humorais e respostas celulares induzidas contra estas proteínas durante a infecção são específicas contra o parasita sem reatividade cruzada com as proteínas homólogas das contrapartes hospedeiras (39, 36, 58).

LmL3 e LmL5 CR foram subclonado no vetor de expressão pQE30. As sequências de aminoácidos das proteínas recombinantes são mostradas nas Partes C e D do alinhamento. Ambas as proteínas apresentam-se como um marcador N-terminal que inclui as 6 histidinas utilizadas para purificação por

cromatografia de afinidade. Subsequentemente, ambas as proteínas foram sobre expressas em culturas de *E. coli* e purificadas. Como está ilustrado na Figura 1, as proteínas rLmL3 e rLmL5 purificadas mostraram uma massa molecular de 48 kDa e 38 kDa, respetivamente, de acordo com a presença de 12 aminoácidos extra his-tag esticar nas suas regiões N-terminais. A pureza da proteína foi demonstrada, uma vez que foi observada uma única banda para ambas purificadas em um gel SDS-PAGE corado com azul de Coomassie (Figura 1) LmL3 e LmL5 são reconhecidos por soros de leishmaniose visceral canina (CVL) e por soros de ratinhos BALB/c infetados com *L. major* (MCL).

Para determinar a antigenicidade das proteínas L3 e L5 maiores de *L.* em cães afetados por VL, o rLmL3 recombinante e as proteínas rLmL5 foram utilizadas como antigénios em ensaios ELISA utilizando os soros de cães infetados com 20 *L. infantum*. Como controlo, a reatividade de soros obtidos a partir de 8 cães saudáveis contra ambas as proteínas recombinantes foi ensaiada. Do CVL SERA 75% (15/20) reconheceram a proteína rLmL3 (Figura 2b) e 90% (18/20) reconheceram a proteína rLmL5 com reatividade valores superiores ao valor de corte (Figura 2c). O espectro dos valores de absorvência entre aquele contra rLmL3 e rLmL5 foram diferentes, uma vez que a reatividade dos soros CVL contra rLmL5 foi mais elevada (média = 0,61 ± 0,36) do que a obtida para rLmL3 (média = 0,28 ± 0,10). Pode-se concluir que ambas as proteínas parasitas são expostas ao sistema imunológico.

Durante a leishmaniose natural canina, sendo a proteína LmL5 um imunógeno mais prevalente do que LmL3. Embora uns números de soros foram aqui empregados, os dados obtidos podem ser tomados como uma indicação de que tanto o

parasita recombinante pode ser utilizada proteínas, em combinação com outros antigénios, para o desenvolvimento de testes serodiagnósticos de CVL.

Em seguida, analisamos a antigenicidade das proteínas LmL3 e LmL5 usando os soros de camundongos BALB/c que sofriam Leishmaniose cutânea (MCL) devido à infeção de *L. major*. Para o efeito, a presença de IgG1 e IgG2a anticorpos contra ambas as proteínas recombinantes foi analisado por ELISA. Ambas as proteínas foram reconhecidas pelos soros de MCL sendo os anticorpos induzidos contra eles predominantemente do isótipo IgG1 (Figura 2a). Nenhuma reatividade contra eles foi observada nos mesmos ratinhos antes da infeção (Figura 2a. Uma vez que a indução dos anticorpos IgG1 e IgG2a é marcador de respostas imunes tipo Th2 e Th1, respetivamente (8), podemos concluir que durante a infeção por *L. major* a resposta humoral de tipo Th2 é induzida contra estes antigénios em ratinhos BALB/c. A imunização com as proteínas ribossómicas recombinantes rLmL3 e rLmL5 na presença de CpG ODN induz uma proteína Th1-tipo respostas contra eles em ratos BALB/c.

Uma vez que uma resposta humoral mediada por Th2 contra eles é provocada em ratinhos BALB/c infetados, analisou-se o efeito da imunização de rLmL3 e rLmL5 na presença de um adjuvante indutor de Th1 (CpG-ODN). Para aquele propósito Grupos de seis ratinhos foram imunizados independentemente com rLmL3 e rLmL5 em combinação com CpG-ODN. Como controlo, Grupos de seis ratinhos foram imunizados com CpG-ODN sozinho e com PBS (tampão utilizado como excipiente). Após três doses as respostas celulares provocadas pela imunização foram analisadas. As células do baço foram obtidas e cultivadas na presença e na ausência dos correspondentes antigénios rLmL3 ou rLmL5. As células do

baço de camundongos imunizados com rLmL3 + CpG-ODN produziram um elevado nível de IFN-gama após estimulação com o antigénio rLmL3 (Figura 3a). Semelhante o nível de IFN-gama foi detetado nos sobrenadantes de culturas de células de baço de ratinhos imunizados com rLmL5 + CpGODN após estimulação de rLmL5 (Figura 3b). Em contraste, as células do baço de murganhos imunizados com o adjuvante ou o excipiente produziram baixos níveis de IFN-gama em resposta à estimulação rLmL3 ou rLmL5 (Figura 3ab). Com relação à produção de IL-4 foram detetados níveis muito baixos desta citocina após a estimulação de rLmL3 ou rLmL5 de células de baço obtido de ratinhos imunizados com rLmL3 +CpG-ODN (Figura 3c) ou rLmL5 + CpG-ODN (Figura 4d), respetivamente. Finalmente, não há a produção foi detetada em qualquer grupo (Figura 3ef). Assim, pode concluir-se que o adjuvante CpG-ODN resposta imunitária contra os antigénios recombinantes para uma resposta Th1. A vacinação com rLmL3 + CpG-ODN e rLmL5 + CpG-ODN protege ratinhos BALB/c contra o desafio de *L. major*.

Analisou-se se a administração de ambas as proteínas recombinantes era capaz de induzir proteção contra *L. Infeção* grave nos murganhos BALB/c susceptíveis. Inchaço do pé de rLmL3 + CpG-ODN ou rLmL5 + CpG-ODN vacinado Camundongos foi significativamente mais baixa comparada com o inchamento da almofada da coluna dos grupos de controlo PBS ou CpG-ODN (Figura 4a). Além disso, observou-se uma redução de aproximadamente 2 log na carga de parasitas nas células de drenagem de nódulos linfáticos de murganhos imunizados com CML-CpG-ODN ou rLmL5 + CpG-ODN. Finalmente, não se detetaram parasitas no baço, parasitas foram detetados no baço dos ratinhos de ambos os grupos de controlo (Figura 3b) Pode concluir-se que os ratinhos imunizados com as proteínas parasita LmL3 e LmL5 expressas

como proteínas recombinantes misturadas com CpG-ODN foram protegidas contra uma infecção por *L. major*. Nos camundongos vacinados, a patologia dérmica estava ausente ou era muito baixa. Nestes ratos a presença de parasitas foi restrita ao gânglio linfático drenante poplítea. A proteção observada foi semelhante àquela obtida pela imunização de ratinhos com um cocktail de ADN plasmídeo que codifica as histonas nucleossomas de Leishmânia (19), a proteína P0 administrada como uma vacina de ADN (54) e extratos de LRP combinados com CpG-ODN (55). Assim, nós caracterizámos dois constituintes ribossómicos cuja imunização pode contribuir para um desenvolvimento mais racional da eficácia contra a leishmaniose.

#### *Análise dos parâmetros imunológicos associados à proteção.*

Para determinar os parâmetros imunológicos associados à proteção a produção de citocinas (IFN- $\gamma$ , IL-4 e IL-10) conduzida pelo SLA, LRP, MRP e a proteína recombinante correspondente (L3 e L5) foram analisadas em ratos vacinados e ratos de controlo na semana 8 após desafio. As células de baço de murganhos vacinados L3 e L5 produzidos mais SLA, LRP e IFN- $\gamma$  específico do antigénio recombinante do que aqueles de ratinhos de controlo na semana oito após desafio (Fig. 5a) para L3 e Fig. 6a para L5). Verificou-se que a produção de IFN- $\gamma$  é induzida especificamente por Leishmânia ribossomal proteínas, uma vez que a estimulação de culturas de células de baço com MRP não resultou na produção desta citocina (Fig. 5a para L3 e Fig. 6a para L5). Além disso, níveis mais baixos de SLA e IL-10 específica de LRP (Fig. 5b para L3 e Fig. 6b para L5) e IL-4 (Fig. 5c para L3 e Fig. 6c para L5) foram encontrados nos sobrenadantes de células de baço obtido de ratinhos protegidos quando em comparação com ratinhos de

controle (CpG e solução salina). Adicionalmente, a produção dependente de L3 e L5 específica de MRP de IL-10 e a IL-4 era muito baixa nos ratinhos protegidos. Assim, pode-se concluir que após a infecção o fenótipo protetor foi associado com a indução de respostas Th1 de L3 e L5 que eram capazes de controlar as respostas de IL-4 e IL-10 induzidas pelo parasita.

Alinhamento dos dados da sequência LmL3 e LmL5. Os alinhamentos de sequências de aminoácidos de *Leishmania major* L3 (A) e L5 (B) com os seus ortólogos de *Saccharomyces cerevisiae*. Os aminoácidos conservados são sombreados. O número de aminoácidos da LmL3 e da LmL5. As sequências de aminoácidos de *L. major* foram preditas a partir das sequências de ADN correspondentes. (C e D) as sequências de aminoácidos ou as sequências de aminoácidos previstas do recombinante LmL3 (rLmL3) (C) e LmL5 (rLmL5) (D) expressas em bactérias.

A sequência de his-tag extra localizada no N-terminal está indicada em negrito e sublinhado. O número de aminoácidos das proteínas rLmL3 e rLmL5 é indicado

A

LmL3 ~~NSNCKPFRPPFNGHIGLFLRKKSSQCIQGRAPNIEEDDATQNPFLITSEWVFLAGMTMNSDVRSSSSVNRK~~  
ScL3 ~~NSNPFYEAPFRGNIGLFLRKNAAQTRAVYKATFDDRSKPYALDDELGYRAGPTTIVPDLRPPGDFHR~~

~~EVNRPVILEAPPNIVGIVGIPQTPVNGKTEIGTVRHHITSVEFTKRYEIMWKOQAOLAFCRQCFQNTK~~  
~~EVNLAIVVDTRFVIVGVNIVYETENGIRSLTINQAEILSDVVKRPFVLDIVYKRRKIST--EYSNYA~~

~~EGKVAAEATINAPAKKNSVITVIAITGLLHLNHRVGVKARVQELVNGGVAANIALKELLECPV~~  
~~QDGAGIEELARIKRYESTVYELVNTIISTP---PLAGKHAHLARTQLNGGIDEKVDVAKREKFTAV~~

~~DSVPLQSEACVCCVTEGRTIDVVTGSSVACLPEFTNPGLPVACIDAWHAPDPTTYAPRASHHSHR~~  
~~DSVTECHMIIHIAIAITGHSFEGVTNRSGTKLIRKTRNGLEHYACIGARHEARHNSGVARAGQPSHSE~~

~~QQLNPKIQIERSVAVEPNCAETTYDLTANITENGGFGVGTVRNIVVNLKGSVECPPEVMTLRMA~~  
~~ESISHHILRVNG-DEEANG-SCFDRKSTSTENGDFVHGEIKNSDFIVKICIPGHRKIVYLRKSLY~~

~~POEFLKKEKIVREIETCSKIRGRKQKPKRQWQFPELIRKIRPEERLPKEFAAPAVERKAKAAFK~~  
~~THTEKALEVGLKAWIDAKRIPORFQTPAKHAFMTEIKDL~~

B

LmL5 ~~NCTLANWVRAIIKHHSTLARTLEPFTVQVDRKAFKKEGVKYSREKGLDTHARPNMLDITKFGGS~~  
ScL5 ~~NAPQDASSSAYSSGCTPPFNSPEKRETYCEKRLTYHAKYNTS~~

~~KYRLEWRIITHEDIAQEVQAKVDEEVMASAHLEAPCTERGLNYSAAVATGSELARTPEAKESID~~  
~~KYRLEWRIITHEDIAQEVQAKVDEEVMASAHLEAPCTERGLNYSAAVATGSELARTPEAKESID~~

~~KFQSAPEADSSAVRTKKDDEGDDEERFPEAILEVSLARTTSAFVPGVLAGAVESMAVENPPRVE~~

~~TYRQVEEVESEELTEAVEGVR-----EKVFLNIGLSTITGNEVLAENASDGLNVEHGENEFT~~

~~GVNKESSLAKVNHDRIFKKAADLKVQKESASNEDEKCVQ-GRYMAAVLPEEIEGKKNAAE~~  
~~WDFTEEIEPELLSGYFEGVGGQNM-----EELADDEERFSELEKGLLDDIDADELEDIETSAREE~~

~~PAKPS-KSLPFAKNEGVA--HNGYKTKGEGGAPFAAMKAVAIHEPLGK~~  
~~KADSAFPTEPTEPTEQVAADEKKEKQTEKTEPAAKPVAAKIAL~~

C

```
rLmL3 MRGSHHHHHHSGSMHCKFERFERHGHGFLPPEPSEQIRGRARAFFPKLIDATQKPHLTSFNV 60
PKAGNTHIVRDVDRPGSKVNKKEVVEPYTILEAPPVIVQIVGYRQTPVGLKTIQTVWAR 120
HTSVVEFEBRYEKNWQSAQLAFSRQEQFANTKEGKVAEARTLNAPAKKASVIRVIASTQL 180
PKLENRHSVGVKKAHVQEIQVNGGSSVAAKIALANSLLEKEVVRVDSVVFQQSEACDVCSTKG 240
HGTEGVVKKRQVACLPRKTHRGLEKVAEIGAWHEARVNYTVAPAGQHGYHHRTQLNKKIY 300
QIGRSVAVEFNQATTTYDLTAKTITHMGGFVGYQTVPNIDYVMLRGSVSGPFRPRVMTLRRP 360
MAPQTSRQLKEKIVLRFIDTSSKIGHGRFQTRKEKNQWFGPLKKDRIIPREERLAKERAAR 420
AVERRKAKAAAK 481
```

D

```
rLmL5 MRGSHHHHHHSGSMCTLANWVRAI IKKHSTLAHTLEMPFVKVKNKAYEKPFQVKYRRRE 60
GKTDYHARRQMVLDQTKFESFEYRLVVRITNKDIIAQIVQAKIVGDEVVMAAYANHELPA 120
FGIENGLTNYAAAVATGILLAKKTLAKLGIADKFGQAKEAGGSYSAVRTKKDDEGDDEER 180
FFPKAILDVGGLARTTTGARVFGVLEKGAVDGGNAVPHRFNRFPFGYNKEKSSLDKAVHEDRI 240
EGKHVADYLGQVKEEASSNPEDEKCVQFSKYNAAKVLPESEIEGMYEFAHAAATRADPSKSLP 300
KPAKKEGVAAKSYRTKFLSCAEKRAAAKAKVAAIPIERIGK 360
```

## **Exemplo 2: análise de homólogos L3 e L5**

### Alinhamento de homólogos L3 e L5

Analisamos o grau de conservação das proteínas ribossômicas L3 e L5 entre diferentes Leishmânia espécies. Para o efeito, as sequências de aminoácidos da proteína L3 de *L. infantum* e *L. mexicana* (SEQ ID NO: 48 e 50) e a proteína L5 de *L. infantum* (clone JPCM5 [MCAN/ES/98/LLM-877]), *L. braziliensis* (MHOM/BR/75/M2904) e *L. mexicana* (MHOM/GT/2001/U1103) (SEQ ID NO: 52, 56 e 54) foram resgatados por um in Silício a partir da base de dados do genoma ([www.genedb.org](http://www.genedb.org)) e comparada com as sequências de aminoácidos de *L. Ortólogos* principais (SEQ ID NO: 1 para L3 e SEQ ID NO: 3 para L5) (confere alinhamentos na página seguinte, parte A e B). Com exceção da existência de uma extensão N-terminal na proteína *L. maior* L5, observou-se um

alto grau de conservação entre as diferentes espécies. A Tabela 1A-B mostra as percentagens de identidade e similaridade entre os grupos L3 e L5 ortólogos, respetivamente.

#### Localização da *Leishmânia major* L3 e L5 nas ribossomas.

De modo a demonstrar que as LmL3 e LmL5 recombinantes utilizadas neste trabalho correspondem às proteínas localizados nas ribossomas do parasita, foram empregues anticorpos específicos para as proteínas recombinantes em western blot contendo as proteínas recombinantes e os extratos de LRP. A Figura 8A mostra que anticorpos anti-LmL3 obtidos de ratinhos imunizados com a proteína recombinante reconheceram uma única banda com o peso molecular esperado (47,5 kDa) no LRP. Foi observado um resultado semelhante para a proteína L5 (Fig. 8B). Uma única banda de 36,6 kDa foi observada nos extratos de LRP quando se utilizaram anticorpos anti-LmL5 purificados a partir de soros de cães infetados naturalmente de *L. infantum* por afinidade cromatografia em uma coluna rLmL5-Shepharose 4B como anteriormente descrito (71). Como controlo positivo, em ambos os casos, a proteína recombinante correspondente foi reconhecida pelos anticorpos específicos. **Sequência de *Leishmânia* L3 e L5 comparações.** Os alinhamentos de sequências de aminoácidos de *L. major*, *L. infantum* e *L. mexicana* L3 (A) (SEQ ID NO: 1, 48 e 50) e *L. major*, *L. braziliensis*, *L. infantum* e *L. mexicana* L5 (B) (SEQ ID NO: 3, 56, 52 e 54). O LmL3, as sequências putativas da proteína L3 de *L. infantum* (identificador GeneDB LinJ32\_V3.3320) e *L. Mexicana* (GeneDB Identificador LmxM33.2900), e a proteína LmL5 e as sequências putativas da proteína L5 de *L. braziliensis* (identificador GeneDB LbrM34\_V2.1790), *L.*

infantum (identificador GeneDB LinJ35\_V3.1870) e *L. mexicana* (identificador GeneDB LmxM34.1880) foram alinhados usando as configurações padrão do ClustalW (programa DNASTAR). As substituições de aminoácidos são sombreadas.

A

<i>L. major</i>	MSHCKFEHPRRHGHLGFLPRKRSRQIRGRARAFPKDDATQKPHLTSFMVF
<i>L. infantum</i>	MSHCKFEHPRRHGHLGFLPRKRSRQIRGRARAFPKDDATQKPHLTSFMVF
<i>L. mexicana</i>	MSHCKFEHPRRHGHLGFLPRKRSRQIRGRARAFPKDDATQKPHLTSFMVF
<i>L. major</i>	KAGMTHIVRDVDRPGSKVNKKEVVEPVILEAPPMMVIVGIVGYRQTPVGL
<i>L. infantum</i>	KAGMTHIVRDVDRPGSKVNKKEVVEPVILEAPPMMVIVGIVGYRQTPVGL
<i>L. mexicana</i>	KAGMTHIVRDVDRPGSKVNKKEVVEPVILEAPPMMVIVGIVGYRQTPVGL
<i>L. major</i>	KTIGTVWAHHTSVEFRRRYYKNWKQSAQLAFSRQKQFANTKEGKVAEART
<i>L. infantum</i>	KTIGTVWAHHTSVEFRRRYYKNWKQSAQLAFSRQKQFANTKEGKVAEART
<i>L. mexicana</i>	KTIGTVWAHHTSVEFRRRYYKNWKQSAQLAFSRQKQFANTKEGKVAEART
<i>L. major</i>	LNAFAKKASVIRVIAHTQLRKLNRNHRVGVKKAHVQEIQVNGGSVAAKIAL
<i>L. infantum</i>	LNAFAKKASVIRVIAHTQLRKLNRNHRVGVKKAHVQEIQVNGGSVAAKIAL
<i>L. mexicana</i>	LNAFAKKASVIRVIAHTQLRKLNRNHRVGVKKAHVQEIQVNGGSVAAKIAL
<i>L. major</i>	AKSLEKEVRVDSVDFQOSEACDVC SVTKGHGTEGVVVKRWGVACLPRKTHR
<i>L. infantum</i>	AKSLEKEVRVDSVDFQOSEACDVC SVTKGHGTEGVVVKRWGVACLPRKTHR
<i>L. mexicana</i>	AKSLEKEVRVDSVDFQOSEACDVC SVTKGHGTEGVVVKRWGVACLPRKTHR
<i>L. major</i>	GLRKVACIGAWHPARVMYTVARAGQHGYHHRTQLNKKIYQIGRSVAVEPN
<i>L. infantum</i>	GLRKVACIGAWHPARVMYTVARAGQHGYHHRTQLNKKIYQIGRSVAVEPN
<i>L. mexicana</i>	GLRKVACIGAWHPARVMYTVARAGQHGYHHRTQLNKKIYQIGRSVAVEPN
<i>L. major</i>	QATTTYDLTAKTITPMGGFVGYGTVRNDYVMLKGSVSGPRRRVMTLRRPM
<i>L. infantum</i>	QATTTYDLTAKTITPMGGFVGYGTVRNDYVMLKGSVSGPRRRVMTLRRPM
<i>L. mexicana</i>	QATTTYDLTAKTITPMGGFVGYGTVRNDYVMLKGSVSGPRRRVMTLRRPM
<i>L. major</i>	APQTSRQLKEKIVLKFIDTSSKIGHGRFQTKKEKNQWFGPLKKDRIRREE
<i>L. infantum</i>	APQTSRQLKEKIVLKFIDTSSKIGHGRFQTKKEKNQWFGPLKKDRIRREE
<i>L. mexicana</i>	APQTSRQLKEKIVLKFIDTSSKIGHGRFQTKKEKSQWFGPLKKDRIRREE
<i>L. major</i>	RLRKERAARAVERKAKAAKK
<i>L. infantum</i>	RLRKERAARAVERKAKAAKK
<i>L. mexicana</i>	RLRKERAARAVERKAKAAKK

B

<i>L. major</i>	NCITLAKVRAITIKKHSILANTLLENPFVKVVKNK
<i>L. braziliensis</i>	MPFVKVVKNK
<i>L. infantum</i>	MPFVKVVKNK
<i>L. mexicana</i>	MPFVKVVKNK
<i>L. major</i>	AYFKRFQVKYRRRREGKTDYHARRQMVLDKTKFGSPKYRLVVRITNKDI
<i>L. braziliensis</i>	AYFRRFQVKYRRRREGKTDYHARRQMVLDKTKFGSPKYRLVVRITNKDI
<i>L. infantum</i>	AYFKRFQVKYRRRREGKTDYHARRQMVLDKTKFGSPKYRLVVRITNKDI
<i>L. mexicana</i>	AYFKRFQVKYRRRREGKTDYHARRQMVLDKTKFGSPKYRLVVRITNKDI
<i>L. major</i>	IAQIVQAKIVGDEVVMAAYAHHELPAFGIEHGLTNYAAAYATGLLLARRTL
<i>L. braziliensis</i>	IAQIVQAKIIGDEVLMAYAHHELPAFGIEHGLTNYAAAYATGLLLARRTL
<i>L. infantum</i>	IAQIVQAKIVGDEVVMAAYAHHELPAFGIEHGLTNYAAAYATGLLLARRTL
<i>L. mexicana</i>	IAQIVQAKIVGDEVVMAAYAHHELPAFGIEHGLTNYAAAYATGLLLARRTL
<i>L. major</i>	AKLGIADKFOGAKEADGSSAVRTKKDDEGDDEERFPFKAILDVGLARTT
<i>L. braziliensis</i>	AKLGIADKFOGAKEADGSSAVRTKKDDGDEERFPFKAILDVGLARTT
<i>L. infantum</i>	AKLGIADKFOGAKEADGSSAVRTKKDDEGDDEERFPFKAILDVGLARTT
<i>L. mexicana</i>	AKLGIADKFOGAKEADGSSAVRTKKDDEGDDEERFPFKAILDVGLARTT
<i>L. major</i>	TGARVFGVLKGAVDGGMAVPHRPNRFPGYNKEKSSLDKAVHRDRIFGKHV
<i>L. braziliensis</i>	TGARVFGVLKGAVDGGIIVPHRPNRFPGYNKEKSSLDKAVHRDRIFGKHV
<i>L. infantum</i>	TGARVFGVLKGAVDGGMAVPHRPNRFPGYNKEKSSLDKAVHRDRIFGKHV
<i>L. mexicana</i>	TGARVFGVLKGAVDGGMAVPHRPNRFPGYNKEKSSLDKAVHRDRIFGKHV
<i>L. major</i>	AEYLKQVKEEASSNPDEKCVQFSKYMAAKVLPESIEGMYKKAHAAIRADP
<i>L. braziliensis</i>	AEYLKQVKEEASSNPDEKCVQFSKYMMAAKVLPESIEGMYKKAHAAIRADP
<i>L. infantum</i>	AEYLKQVKEEASSNPDEKCVQFSKYMAAKVLPESIEGMYKKAHAAIRADP
<i>L. mexicana</i>	AEYLKQVKEEASSNPDEKCVQFSKYMAAKVLPESIEGMYKKAHAAIRADP
<i>L. major</i>	SKSLPKKAKKEGVANHSYKTKKLSGAEKRAAAKAKVAAIRERLGG
<i>L. braziliensis</i>	SKSLPKKAKKEGVANHSYKTKKLSGAEKRAAAKAKVAAIRERLGG
<i>L. infantum</i>	SKSLPKKAKKEGVANHSYKTKKLSGAEKRAAAKAKVAAIRERLGG
<i>L. mexicana</i>	SKSLPKKAKKEGVANHSYKTKKLSGAEKRAAAKAKVAAIRERLGG

TABELA 1

A			
LmL3			
	<i>L. major</i>	<i>L. infantum</i>	<i>L. mexicana</i>
<i>L. major</i>	100.0% (100.0%)	99.5% (99.5%)	98.6% (99.5%)
<i>L. infantum</i>		100.0% (100.0%)	98.1% (99.0%)

L. mexicana				100.0% (100.0%)
B				
Os valores de identidade e similaridade (entre parênteses) são mostrados.				
LmL5				
	L. major	L. infantum	L. braziliensis	L. mexicana
L. major	100.0% (100.0%)	99.3% (100.0%)	94.8% (97.4%)	99.3% (99.7%)
L. infantum		100.0% (100.0%)	94.8% (97.4%)	99.3% (99.7%)
L. braziliensis			100.0% (100.0%)	94.8% (97.0%)
L. mexicana				100.0% (100.0%)

**Exemplo 3: A vacinação com rLmL3 + CpG-ODN e rLmL5 + CpG-ODN protege ratinhos BALB/c contra L. braziliensis desafio.**

Analisou-se o efeito da imunização das proteínas recombinantes L. major rLmL3 e rLmL5 combinado com um adjuvante indutor de Th1 (CpG-ODN) no desenvolvimento de leishmaniose cutânea causada por infecção com L. braziliensis. Para esse efeito, grupos de cinco murganhos foram imunizados independentemente com 10µg de rLmL3 ou 10 µg de rLmL5 em combinação com 50µg de CpG-ODN (25µg de CpG-1 [5'-TCAACGTTGA-3'] mais 25µg de CpG-2 [5'-GCTAGCGTTAGCGT-3']) (SEQ ID NO: 5 e 6)). Como controlo, grupos de cinco murganhos foram imunizados com 50µg de CpGODN isoladamente ou com PBS (tampão utilizado como excipiente). Os ratinhos foram inoculados na derme da orelha (orelha esquerda). Cada grupo foi reforçado duas e quatro semanas mais tarde com a mesma dose utilizada para a iniciação. O desafio dos parasitas foi injetada na orelha direita (não tratada) com 105 promastigotes estacionários de L. braziliensis (MHOM/BR/01/BA788) combinados com dois pares de Lutzomyia intermedia sand fly salivary glândulas. Neste modelo de infecção, após o desafio do

parasita BALB/c Camundongos desenvolveram lesão inflamatória nas orelhas infetadas que progrediu de forma constante e atingiu um na semana 5. Posteriormente, o tamanho da lesão regredida e a cicatriz de orelha completa foi observada aproximadamente à semana 9 pós-infeção (72). Analisamos o desenvolvimento de lesão cutânea nos quatro grupos de camundongos até 5 semanas após desafio do parasita medindo a espessura da lesão com um calibre métrico. Como se mostra na Figura 7A, as lesões orais de rLmL3 os ratos vacinados CpG-ODN ou rLmL5 + CpG-ODN foram significativamente mais baixos comparados com PBS no controlo de CpG-ODN grupos. Além disso, as cargas parasitárias foram analisadas na semana 5 após infeção nas orelhas infetadas. O número de parasitas foi determinado pelo ensaio de diluição limitante como descrito (73). Observou-se uma diminuição da carga parasitária vacinada quando comparados com os grupos de controlo. Verificou-se que as diferenças eram significativas no rLmL5 + CpG-ODN Grupo com respeito a ambos os grupos controle ( $P < 0,05$ , teste de T-estudante). Além disso, não foram detetados parasitas no ouvido em quatro de cinco ratos (grupo rLmL5 + CpG-ODN) e um de cinco ratinhos no grupo rLmL3 + CpG-ODN (Figura 7B). Assim, concluiu-se que os ratinhos vacinados com as proteínas ribossômicas L3 e L5 maiores de *L.* expressas como proteínas recombinantes e combinados com CpG-ODN foram protegidos contra um desafio heterólogo com *L. braziliensis*.

#### **Exemplo 4: Proteção parcial conferida pela Leishmânia major S6 contra a infeção por Leishmânia major**

Cinco grupos de ratinhos (n=4 por grupo) foram imunizados independentemente com 10µg de S6 (SEQ ID NO:34), L2 (SEQ ID NO:22), L7 (SEQ ID NO:24), L8 (SEQ ID NO:26) e L16 (SEQ

ID NO:28) na presença de CpG ODN como identificado anteriormente por SEQ ID NO: 5 e 6 (50µg). Como controlo, um grupo de ratinhos foi imunizado com o adjuvante e outro grupo foi imunizado com o excipiente (PBS-solução salina). Foram administradas três doses com intervalos de 2 semanas. Todas as imunizações foram realizadas no pé direito. Um mês após a última dose, os ratinhos foram infetados com 10<sup>5</sup> células estacionárias promastigotes de *L. major* injetado subcutaneamente no pé esquerdo. O desenvolvimento da lesão dérmica foi avaliado por medição do inchamento da almofada até a semana oito pós-desafio (Fig. 9A). Os camundongos de todos os grupos desenvolveram lesões, embora o inchaço da almofada da pata de camundongos que foram vacinados com S6 mais CpG ODN foi significativamente menor para quem observou em controlos e em ratinhos imunizados com as outras quatro proteínas. Além disso, o parasita dos linfonodos (DLN) e nos baços dos camundongos foram analisados. Os animais imunizados com S6 mais CpG ODN mostraram uma redução de 2 log no número de parasitas no baço em comparação com os grupos salino e CpG ODN, respetivamente (Fig.9B). No entanto, as cargas parasitárias encontradas no DLN do grupo S6 mais CpG ODN foram semelhantes às observadas em controlos. A partir deste ensaio, pode concluir-se que a vacinação com a proteína recombinante S6 na presença do adjuvante CpG ODN estava a induzir um estado imunitário que resulta numa proteção parcial contra CL devida a infeção por *L. major* nos camundongos BALB/c: presença de lesões inflamatórias inferiores no local de infeção e menor carga parasitária no baço do que os controlos. Por outro lado, a vacinação com os outros quatro antígenos (L5, L7, L8 e L16) não resultou em alterações significativas na progressão do CL em relação aos controlos.

A fim de analisar a resposta imune induzida por vacinação, as respostas humoral e celular suscitadas em ratinhos por vacinação com S6 + CpG ODN foram comparados com ratinhos imunizados com o adjuvante e a vacina diluente. A Figura 10 mostra que a formulação da vacina induzia uma resposta mista Th1/Th2 contra a proteína S6, uma vez que foram detetados anticorpos IgG2a e IgG1 anti-S6 específicos nos soros dos ratinhos vacinados (ver figura 10A). Além disso, embora o IFN $\gamma$  tenha sido produzido após a estimulação *in vitro* S6 das células do baço estabelecidas a partir da vacina de Camundongos a presença de citocina de IL-4 detetável também foi observada nos sobrenadantes da cultura (ver figura 10B).

Pode concluir-se que a vacinação induziu uma resposta Th1 predominante contra a proteína S6, mas também uma foi observada ligeiramente a estimulação de uma resposta de Th2 contra a proteína (níveis detetáveis de IL-4 e S6-Anticorpos IgG1 específicos).

**Exemplo 5: Vacinas baseadas em proteínas recombinantes principais de *Leishmânia major* L3, L5 e S4.**

De modo a analisar mais detalhadamente a proteção induzida pelas proteínas ribossômicas L3, L5 e S4 uma nova vacina-Infeção foi realizada. Foram incluídos na análise 12 grupos de ratinhos (n = 4 por grupo). Em todos os casos os ratinhos foram imunizados subcutaneamente três vezes (duas semanas de intervalo) no pé direito. Os grupos seguintes foram ensaiados:

- Excipiente de vacina: solução salina.

- Adjuvante de vacina: CpG-ODN. Por dose: 50 mg de CpG ODN (25µg de CpG-ODN-1 [5'-TCAACGTTGA-3'] (SEQ ID NO: 5) e 25µg de CpG-ODN-2 [5'-GCTAGCGTTAGCGT-3'] (SEQ ID NO: 6).
- L3 (SEQ ID NO: 1). Por dose: 10µg de proteína recombinante.
- L3 + CpG ODN. Por dose. 10µg de proteína recombinante e 50µg de CpG ODN.
- L5 (SEQ ID NO: 3). Por dose: 10µg de proteína recombinante.
- L5 + CpG ODN. Por dose. 10µg de proteína recombinante e 50µg de CpG ODN.~
- S4 (SEQ ID NO: 32). Por dose: 10 mg de proteína recombinante.
- S4 + CpG ODN. Por dose. 10µg de proteína recombinante e 50µg de CpG ODN.
- L3 + L5. Por dose: 10µg de proteínas recombinantes totais; 5µg cada proteína.
- L3 + L5 + CpG ODN. Por dose. 10µg de proteína recombinante total e 50µg de CpG ODN.
- L3 + L5 + S4. Por dose: 10µg de proteínas recombinantes totais; 3,3µg de cada proteína.
- L3 + L5 + S4 + CpG ODN. Por dose. 10µg de proteína recombinante total e 50µg de CpG ODN.

Resumidamente, os três antigénios foram ensaiados na presença ou na ausência de CpG ODN. Além disso, as combinações de L3 + L5 e L3 + L5 + S4 foram analisados na presença e na ausência de CpG ODN. Um mês após a última dose, os ratinhos foram infetados com 10<sup>5</sup> promastigotes de fase L. estacionária de *L. major* injetados subcutaneamente na almofada da pata esquerda.

O desenvolvimento da lesão dérmica foi avaliado por medição do inchamento da almofada até a semana 6 pós-desafio.

Na Fig. 11A ambos os grupos de controlo (soro fisiológico e CpG ODN) e os cinco grupos vacinados com os antigénios sem o adjuvante. Não foram observadas diferenças nas lesões inflamatórias entre os grupos de controlo e os cinco ratinhos dos Grupos vacinados com as proteínas na ausência de adjuvante. Na Fig. 11B ambos os grupos de controlo (soro fisiológico e CpG ODN) e os cinco grupos vacinados com os antigénios combinados com o adjuvante são mostrados. Neste caso, todos os grupos de ratinhos Vacinados com as proteínas recombinantes na presença do adjuvante mostraram uma redução no inchaço da almofada exceto o grupo S4 + CpG ODN. As lesões inflamatórias inferiores foram observadas no ODN L5 + CpG, L3 + L5 + CpG ODN e grupos L3 + L5 + S4 + CpG ODN.

As cargas parasitárias na DLN e nos baços de todos os grupos de ratinhos foram analisadas na semana sete após a infeção. Não foram encontradas diferenças estatísticas entre os murganhos incluídos nos grupos de controlo e os murganhos imunizados com o grupo ribossomal de proteínas sem adjuvante (Fig. 12A). Por outro lado, os ratinhos imunizados com as proteínas ribossómicas mais CpG ODN mostraram uma diminuição significativa na carga parasitária no baço, exceto no grupo S4 mais CpG ODN (Fig. 12B). Quanto às cargas parasitárias no linfo nodo poplíteo, verificou-se apenas uma diminuição significativa nos grupos que foram Vacinados com a combinação de duas proteínas ribossómicas (L3 + L5) ou três (L3 + L5 + S4) mais CpG ODN. Ratos Vacinados com L3 mais CpG ODN e L5 mais CpG ODN também mostraram cargas parasitas mais baixas do que os controlos. Contudo, devido ao alto grau de variabilidade encontrado entre os diferentes animais, os resultados não foram estatisticamente significativos. Estes ensaios devem ser repetidos com um maior número de ratinhos, a fim de

analisar a influência das vacinas no local parasita, uma vez que em ensaios anteriores, encontramos diferenças estatísticas entre os ratos vacinados com L3 mais CpG ODN e L5 mais CpG ODN e controlos.

Quanto à utilização de vacinas baseadas em antígenos individuais ou coadministração de diferentes antígenos, nossos resultados indicam que as vacinas combinatórias estão induzindo um grau de proteção mais elevado do que as vacinas antigénios.

**Exemplo 6: Conceção de procedimentos de clonagem para a construção de moléculas recombinantes combinando os quatro já caracterizados antígenos ribossómicos protetores (L3, L5, S4 e S6 de Leishmânia major).**

Com base nos resultados anteriores, temos planejado preparar novos produtos recombinantes baseados em Leishmânia major L3 (SEQ ID NO:1), L5 (SEQ ID NO:3), S4 (SEQ ID NO:32) e S6 (SEQ ID NO:34).

Em primeiro lugar, as inserções de ADN que codificam para as quatro proteínas serão clonadas num vetor de expressão eucariótico (pcDNA-3;Stratagene). Este vetor, que permite a expressão das proteínas de Leishmânia em células de mamífero, pode ser empregue para testar as vacinas de DNA. Em segundo lugar, desenhamos um procedimento para a clonagem de diferentes proteínas quiméricas com combinação dos quatro antígenos (Fig. 13). As quimeras genéricas serão primeiro clonadas em pBluescript (um plasmídeo de análise) E depois as inserções de ADN será clonado em dois plasmídeos de expressão diferentes:

1 pQE30; Um plasmídeo de expressão procariótica.

1 pcDNA3, um plasmídeo de expressão eucariótica.

Esta estratégia de clonagem permitirá que tenhamos tanto vacinas de ADN como proteínas recombinantes expressas em *E. coli*, com as combinações antigénicas propostas.

Utilizaram-se os seguintes iniciadores:

LmL3 Forward 5'-CGGGATCCATGTCTCACTGCAAGTTCGAG-3 '(SEQ ID NO: 57)  
5'-GCGATATCTCCCTTCTTCGCGGCCCTTGCC-3 'inverso (SEQ ID NO: 58) LmS4  
Forward 5'-GCGATATCGGGATGGCCAAGAAGCACCTCAAG-3 '(SEQ ID NO: 59)  
5'-CGGAATTCTCCCTTGC GGCCCTGCGGG-3 'inverso (SEQ ID NO: 60)  
LmS6 Forward 5'-CGGAATTCGGGATGAAGCTCAACATCGCGTAC-3 '(SEQ ID NO:  
61)  
5'-GCGATATCTCCCTTCTTCTGGAATGCTGCCAC-3 'inverso (SEQ ID NO: 62)  
LmL5 Avançar 5'-GCGATATCGGGATGTGCACGCTGGCAAATTG3 '(SEQ ID NO:  
63)  
5'-GGGGTACCGGATCCTTACTTGCCGAGGCGCTCGC-3 'inverso (SEQ ID NO: 64)

A proteína quimérica resultante é representada por uma sequência de aminoácidos consistindo em SEQ ID NO: 67. Esta proteína quimérica é codificada por um ácido nucleico representado por uma molécula de ácido nucleico que consiste em SEQ ID NO: 66.

Lisboa, 12 de Janeiro de 2017

## REFERÊNCIAS

1. Aguilar-Be, I., R. da Silva Zardo, E. Paraguai de Souza, G. P. Borja- Cabrera, M. Rosado-Vallado, M. Mut-Martin, R. Garcia-Miss Mdel, C.B. Palatnik de Sousa, e E.Dumonteil. 2005. Eficácia protetora de uma profilaxia *Leishmania donovani* DNA vacina contra a leishmaniose murina visceral e cutânea. *Infect Immun* 73: 812-9.
2. Anderson, C. F., M. Oukka, V. J. Kuchroo e D. Sacks. 2007. CD4 (+) CD25 (-) Foxp3 (-) Th1 células são a fonte De imunossupressão mediada por IL-10 na leishmaniose cutânea crônica. *J Exp Med* 204: 285-97.
3. Badaro, R., D. Benson, M. C. Eulalio, M. Freire, S. Cunha, E. M. Netto, D. Pedral- Sampaio, C. Madureira, J. M. Burns, R.L. Houghton, J.R. David e S.G. Reed. 1996. rK39: um antigénio clonado de *Leishmânia chagasi* que Prediz a leishmaniose visceral ativa. *J Infect Dis.* 173: 758-61.
4. Belkaid, Y., K. F. Hoffmann, S. Mendez, S. Kamhawi, M. C. Udey, T. A. Wynn e D. L. Sacks. 2001. O papel da interleucina (IL)-10 na persistência de *Leishmânia major* na pele após a cicatrização e o potencial terapêutico Do anticorpo recetor antiIL-10 para a cura estéril. *J Exp Med* 194: 1497-506.
5. Belkaid, Y., S. Kamhawi, G. Modi, J. Valenzuela, N. Noben-Trauth, E. Rowton, J. Ribeiro e D. L. Sacks. 1998. Desenvolvimento de um modelo natural de leishmaniose cutânea: poderosos efeitos da saliva vetorial e da pré-exposição à saliva sobre o resultado a longo prazo da

infecção por *Leishmânia major* na derme da orelha do rato. *J Exp Med* 188: 1941-53.

6. Buffet, P. A., A. Sulahian, Y. J. Garin, N. Nassar e F. Derouin. 1995. Microtitração de culturas: um método sensível para quantificar *Leishmânia infantum* em tecidos de camundongos infetados. *Antimicrob Agents Chemother* 39: 2167-8.

7. Campos-Neto, A. 2005. E quanto a Th1/Th2 na descoberta da vacina contra a leishmaniose cutânea? *Braz J Med Biol Res.* 38: 979-84.

8. Coffman, R. L. 1993. Mecanismos de regulação das células T auxiliares da atividade das células B. *Ann N Y Acad Sci* 681: 25-8.

9. Coler, R. N., e S. G. Reed. 2005. Vacinas de segunda geração contra a leishmaniose. *Trends Parasitol* 21: 244-9.

10. Cordeiro-Da-Silva, A., C. C. Borges, E. Guilvard e A. Ouaissi. 2001. Dupla função da *Leishmania major* Proteína ribossomal S3a homólogo na regulação da ativação de células T e B. *Infect Immun* 69: 6588-96.

11. Chenik, M., H. Louzir, H. Ksontini, A. Dilou, I. Abdmouleh e K. Dellagi. 2006. A vacinação com os Parte da proteína histona H2B de *Leishmania* protege os murganhos BALB/c susceptíveis contra um desafio virulento com *Leishmania major*. *Vaccine* 24: 2521-9.

12. Chiaramonte, M. G., M. Hesse, A. W. Cheever e T. A. Wynn. 2000. Os oligonucleótidos CpG podem ser profiláticos Imunizam contra patologia induzida por ovos de

esquistossoma mediada por Th2 por um mecanismo independente de IL-12. *J Immunol* 164: 973-85.

13. Garcia-Alonso, M., A. Blanco, D. Reina, F. Serrano, C. Alonso e C. G. Nieto. 1996. Imunopatologia of A uveíte na leishmaniose canina. *Parasite Immunol* 18: 617-23.

14. Garcia-Alonso, M., C. G. Nieto, A. Blanco, J. M. Requena, C. Alonso, e I. Navarrete. 1996. Presença de Anticorpos no humor aquoso e líquido cefalorraquidiano durante infecções de Leishmânia em cães. Características patológicas no sistema nervoso central. *Parasite Immunol* 18: 539-46.

15. Gradoni, L. 2001. Uma atualização sobre vacinas anti leishmanial candidatos e perspectivas de uma Leishmânia canina vacina. *Vet Parasitol* 100: 87-103.

16. Gramiccia, M., and L. Gradoni. 2005. Situação atual das leishmanioses zoonóticas e das abordagens da doença ao controle. *Int J Parasitol* 35: 1169-80.

17. Handman, E., A. H. Noormohammadi, J. M. Curtis, T. Baldwin e A. Sjolander. 2000. Terapia de murino Leishmaniose cutânea por vacinação com ADN. *Vaccine* 18: 3011-7.

18. Herwaldt, B. L. 1999. Leishmaniose. *Lancet* 354: 1191-9.

19. Iborra, S., M. Soto, J. Carrion, C. Alonso, e J. M. Requena. 2004. Vacinação com um cocktail de DNA de plasmídeo codificando as histonas nucleossômicas de *Leishmania* confere proteção contra a leishmaniose cutânea murina. *Vaccine* 22: 3865-76.

20. Jaafari, M. R., A. Ghafarian, A. Farrokh-Gisour, A. Samiei, M. T. Kheiri, F. Mahboudi, F. Barkhordari, A. Khamesipour e W. R. McMaster. 2006. Ensaio de resposta imunitária e de protecção da superfície principal recombinante Glicoproteína de Leishmania (rgp63) reconstituída com lipossomas em ratinhos BALB / c. *Vaccine* 24: 5708-17.
21. Lopez, R., R. Lucena, M. Novales, P.J. Ginel, E. Martin, e J.M. Molleda. 1996. Imunocomplexos circulantes E função renal na leishmaniose canina. *Zentralbl Veterinarmed B* 43: 469-74.
22. Mancianti, F., A. Poli e A. Bionda. 1989. Análise de depósitos imunes renais na leishmaniose canina. Preliminares resultados. *Parassitologia* 31: 213-30.
23. Martins, D. R., S. M. Jerónimo, J. E. Donelson, e M. E. Wilson. 2006. Antígenos de células T de Leishmania chagasi Identificados através de uma tela de biblioteca dupla. *Infect Immun* 74: 6940-8.
24. McMahon-Pratt, D., e J. Alexander. 2004. O principal paradigma de Leishmania de patogénese e protecção Para as leishmanioses cutâneas do Novo Mundo ou para a doença visceral? *Immunol Rev.* 201: 206-24.
25. Mendez, S., Y. Belkaid, R. A. Seder e D. Sacks. 2002. Otimização da vacinação de DNA contra a Leishmaniose. *Vaccine* 20: 3702-8.
26. Mendez, S., S. Gurunathan, S. Kamhawi, Y. Belkaid, M. A. Moga, Y. A. Skeiky, A. Campos-Neto, S. Reed, R.

A. Seder e D. Sacks. 2001. A potência e durabilidade de vacinas baseadas em DNA e proteínas contra Leishmânia Maior avaliado usando o desafio intradérmico de baixa dose. *J Immunol* 166: 5122-8.

27. Miles, S.A., S.M. Conrad, R.G. Alves, S.M. Jeronimo, e D.M. Mosser. 2005. Um papel para a IgG imune Durante a infecção com o patógeno intracelular *Leishmania*. *J Exp Med* 201: 747-54.

28. Moore, K. W., R. de Waal Malefyt, R. L. Coffman, e A. O'Garra. 2001. Interleucina-10 e interleucina-10 receptor. *Annu Rev Immunol* 19: 683-765.

29. Mougneau, E., F. Altare, E. E. Wakil, S. Zheng, T. Coppola, Z. E. Wang, R. Waldmann, R. M. Locksley e N. Glaichenhaus. 1995. Clonagem de expressão de um antígeno *Leishmânia* protetor. *Science* 268: 563-6.

30. Nieto, C. G., R. Barrera, M. A. Habela, I. Navarrete, C. Molina, A. Jimenez, e J. L. Serrera. 1992. Alterações Nas concentrações plasmáticas de lipídios e frações lipoproteínas em cães infecta dos com *Leishmânia infantum*. *Veterinário Parasitol* 44: 175-82.

31. Nieto, C. G., I. Navarrete, M. A. Habela, F. Serrano, e E. Redondo. 1992. Alterações patológicas nos rins De cães com infecção natural de *Leishmania*. *Vet Parasitol* 45:33-47.

32. Noben-Trauth, N., R. Lira, H. Nagase, W. E. Paul e D. L. Sacks. 2003. A contribuição relativa da IL-4 Receptor e IL-10 para susceptibilidade a *Leishmânia major*. *J Immunol* 170: 5152-8.

33. Pateraki, E., R. Portocala, H. Labrousse e J. L. Guesdon. 1983. Anticorpos anti actina e antitubulina em caninos Leishmaniose visceral. *Infect Immun* 42: 496-500.
34. Peters, N., and D. Sacks. 2006. Privilégio imune em locais de infecção crônica: Leishmânia e células T reguladoras. *Immunol Rev* 213: 159-79.
35. Pollock, K.G., K.S. McNeil, J.C. Mottram, R.L. Lyons, J.M. Brewer, P.Scott, G.H. Coombs, and J. Alexander. 2003. A protéase de cisteína de Leishmânia mexicana, CPB2.8, induz potentes respostas de Th2. *J Immunol* 170: 1746-53.
36. Probst, P., E. Stromberg, H. W. Ghalib, M. Mozel, R. Badaro, S. G. Reed e J. R. Webb. 2001. Identificação E caracterização de antigénios estimuladores de células T de Leishmânia por clonagem de expressão de células T CD4. *J Immunol* 166: 498-505.
37. Rafati, S., A. Nakhaee, T. Taheri, A. Ghashghaii, A. H. Salmanian, M. Jiménez, M. Mohebbali, S. Masina e N. Fasel. 2003. Expressão de proteinase de cisteína de tipo I e II de Leishmânia infantum e seu reconhecimento por soro Durante a leishmaniose visceral canina e humana. *Exp Parasitol* 103: 143-51.
38. Rafati, S., A. H. Salmanian, T. Taheri, M. Vafa e N. Fasel. 2001. Uma vacina de coquetel protetora contra Leishmaniose cutânea com ADN codificando cisteína proteinases de Leishmânia major. *Vaccine* 19: 3369-75.
39. Requena, J. M., C. Alonso e M. Soto. 2000. Proteínas

conservadas evolutivamente como imunogênicos proeminentes durante infecções de Leishmânia. *Parasitol Today* 16: 246-50.

40. Rhee, E. G., S. Mendez, J. A. Shah, C. Y. Wu, J. R. Kirman, T. N. Turon, D.F. Davey, H. Davis, D. M. Klinman, R. N. Coler, D. L. Sacks e R. A. Seder. 2002. A vacinação com antígeno de Leishmânia morto pelo calor ou a proteína leishmânia e os oligodesoxinucleótidos de CpG induzem respostas de células T de memória CD4 + e CD8 + a longo prazo e proteção contra a infecção Leishmânia major. *J Exp Med* 195: 1565-73.

41. Roberts, M. T., C. B. Stober, A. N. McKenzie e J. M. Blackwell. 2005. Interleucina-4 (IL-4) e IL-10 colude na falha da vacina para novos antígenos exacerbatórios na infecção por Leishmânia major murina. *Infect Immun* 73:7620-8.

42. Rodriguez-Gabriel, M. A., M. Remacha, e J. P. Ballesta. 2000. O domínio que interage com o RNA mas não a proteína Interativo é altamente conservado na proteína ribossômica P0. *J Biol Chem* 275: 2130-6.

43. Rosa, R., C. Marques, O. R. Rodrigues, e G. M. Santos-Gomes. 2007. Imunização com Leishmânia infantum Liberada confere proteção parcial contra a infecção parasitária com uma proteína Th1 específica predominantemente imune resposta. *Vaccine* 25: 4525-32.

44. Santos-Gomes, G. M.-, R. Rosa, C. Leandro, S. Cortes, P. Romao e H. Silveira. 2002. Cytokine expression Durante o resultado da infecção experimental canina por Leishmania infantum. *Vet Immunol Immunopathol* 88: 21-30.

45. Santos, W. R., V. M. de Lima, E.P. de Souza, R.R.

Bernardo, M. Palatnik, e C.B. Palatnik de Sousa. 2002. Saponinas, IL12 e adjuvante BCG na formulação de vacina FML contra a leishmaniose visceral murina. *Vacina* 21: 30-43.

46. Saraiva, E. M., A. de Figueiredo Barbosa, F. N. Santos, G. P. Borja-Cabrera, D. Nico, L. O. Souza, C. de Oliveira Mendes-Aguiar, E. P. de Souza, P. Fampa, L. E. Parra, I. Menz, J.G. Dias, Jr., S.M. de Oliveira e C.B. Palatnikde-Sousa. 2006. A vacina FML (Leishmune) contra a leishmaniose visceral canina: um bloqueio de transmissão vacina. *Vacc* 24: 2423-31.

47. Serezani, C. H., A.R. Franco, M. Wajc, J.K. Umada Yokoyama-Yasunaka, G. Wunderlich, M. M. Borges, and S. R. Uliana. 2002. A avaliação da resposta imune murina ao antígeno de Leishmânia meta 1 administrado como Proteína ou DNA. *Vaccine* 20: 3755-63.

48. Skeiky, Y. A., J. A. Guderian, D. R. Benson, O. Bacelar, E. M. Carvalho, M. Kubin, R. Badaro, G. Trinchieri, and S. G. Reed. 1995. Um antigénio de Leishmânia recombinante que estimula as células mononucleares do sangue periférico humano para expressar um perfil de citocina de tipo Th1 e produzem interleucina 12. *J Exp Med* 181: 1527-37.

49. Stager, S., D. F. Smith e P. M. Kaye. 2000. A imunização com uma proteína de superfície regulada em estágio recombinante de Leishmânia donovani induz proteção contra a leishmaniose visceral. *J Immunol* 165: 7064-71.

50. Tonui, W. K., J. S. Mejia, L. Hochberg, M.L. Mbow, J. R. Ryan, A.S. Chan, S.K. Martin, and R.G. Titus. 2004.

A imunização com antígenos exógenos principais de Leishmânia protege ratinhos BALB/c susceptíveis contra a infecção por desafio Com L. major. Infect Immun 72: 5654-61.

51. Webb, J. R., A. Campos-Neto, Y. A. Skeiky e S. G. Reed. 1997. Caracterização molecular do termo-induzível LmSTII1 de Leishmânia major. Mol Biochem Parasitol 89: 179-93.

52. Webb, J. R., D. Kaufmann, A. Campos-Neto e S. G. Reed. 1996. Clonagem molecular de um novo antígeno proteico De Leishmania major que desencadeia uma potente resposta imunitária em leishmaniose murina experimental. J Immunol 157: 5034-41.

53. Zimmermann, S., O. Egeter, S. Hausmann, G. B. Lipford, M. Rocken, H. Wagner e K. Heeg. 1998. CpG Os oligodesoxinucleótidos desencadeiam respostas Th1 protetoras e curativas na leishmaniose murina letal. J Immunol 160: 3627-30.

54. S. Iborra, M. Soto, J. Carrion, A. Nieto, E. Fernandez, C. Alonso, J.M. Requena, The Leishmânia infantum acidic A proteína ribossomal P0 administrada como uma vacina de ADN confere imunidade protetora à infecção por Leishmânia major em Ratinhos BALB/c, Infect Immun 71 (2003) 6562-6572.

55. S. Iborra, N. Parody, D.R. Abanades, P. Bonay, D. Prates, F.O. Novais, M. Barral-Netto, C. Alonso, M. Soto, A vacinação com as proteínas ribossômicas principais de Leishmânia mais os oligodesoxinucleótidos CpG induz proteção contra a leishmaniose cutânea experimental em ratinhos, Microbes Infect 10 (2008) 1133-1141.

56. W.H. Mager, R.J. Planta, J.G. Ballesta, J.C. Lee, K. Mizuta, K. Suzuki, J. R. Warner, J. Woolford, Uma nova nomenclatura para as proteínas ribossômicas citoplasmáticas de *Saccharomyces cerevisiae*, *Nucleic acids research* 25 (1997) 4872-4875.

57. P.Y. Shi, N. Maizels, A.M. Weiner, Recuperação de proteína recombinante ativa solúvel de corpos de inclusão, *BioTechniques* 23 (1997) 1036-1038.

58. N. Santarem, R. Silvestre, J. Tavares, M. Silva, S. Cabral, J. Maciel, A. Cordeiro-da-Silva, Resposta imunitária regulação por antígenos secretados e não secretos de leishmânia, *J Biomed Biotechnol* 2007 (2007) 85154.

59. Boarino, A., A. Scalone, L. Gradoni, E. Ferroglio, F. Vitale, R. Zanatta, M. G. Giuffrida e S. Rosati. 2005. Desenvolvimento de antigénios químicos recombinantes que expressam epítomos B imune dominantes de *Leishmania infantum* para Serodiagnóstico da leishmaniose visceral. *Clin Diagn Lab Immunol* 12: 647-53.

60. Porrozzi, R., M. V. Santos da Costa, A. Teva, A. Falqueto, A. L. Ferreira, D. D. Santos, A. P. Fernandes, R. T. Gazzinelli, A. Campos-Neto e G. Grimaldi, Jr. 2007. A avaliação comparativa de imunes enzimáticos ensaios baseados em antígenos leishmânias brutos e recombinantes para o soro diagnóstico de pacientes sintomáticos e assintomáticos infecções viscerais de *Leishmania infantum* em cães. *Clin Vaccine Immunol* 14: 544-8.

61. Soto, M., J.M. Requena, L. Quijada, e C. Alonso. 1998.

Antígeno quimérico multi componente para soro diagnóstico De leishmaniose visceral canina. J Clin Microbiol 36: 58-63.

62. Melby P.C.G.B., Ogden H.A., Flores W., Zhao C., Geldmacher, N.M., Biediger S.K., Ahuja, J., Uranga e M. Melendez (2000), Identificação de vacinas candidatas para leishmaniose visceral experimental por imunização com Sequenciais de uma biblioteca de cDNA. Infectar. Immun., 68: 5595-5602.

63. Stober C.B.U.G., Lange M.T., Roberts B, R. Gilmartin, R. Francis, Almeida C.S., Peacock S., McCann e J.M. Blackwell, (2006), Do genoma às vacinas para a leishmaniose: seleção de 100 novas vacinas candidatas contra infecção grave por Leishmaniose murina. Vaccine., 24: 2602-2616.

64. Aebischer T., et al, (2000) Infection and Immunity., 68: 1328-1336.

65. Poot J et al., (2009), Vaccine, 27: 4439-4446.

66. Ferreira J.H. Et ai, (2008), Vaccine, 26: 67-685.

67. Buckanovich R.J., et ai, (1994), Proc. Natl. Acad. Sei. USA, 91: 4892.

68. Liu N., et ai (2003), Nature Immunology, 687-693).

69. Bertholet S, Goto Y, Carter L, Bhatia A, Howard RF, Carter D, Coler RN, Vedvick TS, Reed SG. Vacuna. 2009 23 de Novembro; 27 (50): 7036-45.

70. S. Iborra, J. Carrion, C. Anderson, C. Alonso, D. Sacks, M. Soto, Vaccination with the *Leishmania infantum* A proteína P0 ribossomal aciclia mais oligo desoxinucleódos CpG induz proteção contra a leishmaniose cutânea em ratinhos C57BL/6 mas não previne doença progressiva em ratinhos BALB/c, *Infect Immun* 73 (2005) 5842-5852

71. M. Soto, J.M. Requena, L. Quijada, M.J. Perez, C.G. Nieto, F. Guzman, M.E. Patarroyo, C. Alonso, Antigenicity Das histonas de *Leishmânia infantum* H2B e H4 durante a leishmaniose viscerocutaneas canina, *Clin Exp Immunol* 115 (1999) 342-349.

72. T.R. De Moura, F.O. Novais, F. Oliveira, J. Clarêncio, A. Noronha, A. Barral, C. Brodskyn, C.I. De Oliveira, Em direção a um novo modelo experimental de infecção para estudar leishmaniose cutânea americana causada por *Leishmânia Braziliensis*, *Infect Immun* 73 (2005) 5827-5834.

73. S. Iborra, J. Carrion, C. Anderson, C. Alonso, D. Sacks, M. Soto, Vaccination with the *Leishmânia infantum* A proteína P0 ribossomal acílica mais oligodesoxinucleótidos CpG induz proteção contra a leishmaniose cutânea em ratinhos C57BL / 6 mas não previne doença progressiva em ratinhos BALB / c, *Infect Immun* 73 (2005) 5842-5852.

## LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

<110> Laboratorios LETI SL Unipersonal

<120> Use of a L3 and/or a L5 source as a vaccine or as a diagnostic of a parasitic disease

<130> P8028348PCT

<150> EP 09175929.0

<151> 2009-11-13

<150> US 61/281,020

<151> 2009-11-13

<160> 73

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 419

<212> PRT

<213> Leishmania major

<400> 1

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Tyr Asp Leu Thr Ala Lys Thr Ile Thr Pro Met Gly Gly Phe Val Gly  
 305 310 315 320

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

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

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

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

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

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

<210> 2  
<211> 1260  
<212> DNA  
<213> Leishmania major

<400> 2

```
atgtctcact gcaagttoga gcacccccgc cacggccatc toggcttctt gcgcgcgaag    60
cgctcgcgcc agatccggcg ccgtgcgcgc gcgttcccc aaggacagcc gaagcagaag    120
ccccacctga cgsagcttcat ggtgttcaag gcgggtatga cgcacattgt gcgtgatgtc    180
gatcgcctcg gatogaaggt gaacaagaag gaagtggtag agccggtag gatcctggag    240
ggcgcgcgca tggtagattgt cggcattgtg ggcctaccgc aaacgcgggt tggcctgaag    300
acgatcggca ccgtgtgggc gcaccacacg agcgtcagat tccgcgcgcg ctactacaag    360
aactggaagc agtctgcgca actggccttc tccgcgcaga agcagtttg gaacacgaag    420
gaggycaagg tcgcccaggg gcgcaacgtg aacgcgttc cgaagaagg gtcocgcatc    480
cggctgatcg cgcacaagca gctgcgcaag cttcgcaacc accgcgtggg cgtgaagaag    540
gdgcacgtgc aggagatcca ggtcaacggc ggcagcgttg cggcgaagat cgcgctggcc    600
aagtccctgc tggagaagga ggtgcgcgtc gactccgtgt tccagcagtc ccaggcgtgc    660
gaagtgtgct ccgtcacgaa aggcacaggt accgagggcg tggtyaagcg ctggggcgtt    720
gcctgcctgc cagcgaagac gcaccgcggc ctgcgcgaag ttgcgtgcat cggcgcgtgg    780
caccctgccc gcgtcatgta cactgtcggc cgcgcggctc agcacggtta ccaccaacgc    840
accgagctga acaagaagat ctaccagatc ggcgcctccg ttgctgtgga gccgaaccag    900
gdgacgacga cctacgatct gacagccaag acgatcagc ccatgggtgg cttcgtcggc    960
tacggtaccg tcgcgaacga ctacgtgatg ctgaagggct ccgtgtctgg cccgcgcgcg    1020
cgtgtgatga cgtcgcgcg ccgatggcg ccgcagcgt cgcgcagct gaaggagaag    1080
atcgtgctga agttcatcga cagagctcg aagatcggc accgcccgtt ccagaogaag    1140
aaggagaaga accagtggtt cggcccgtc agaaggacc gcacccgcg ccaggagcgc    1200
ctgcgcgaag agcgcgctgc ccgcgcgtg ggcgcgaag caaaggcgc gaagaagtaa    1260
```

<210> 3  
<211> 328  
<212> PRT  
<213> Leishmania major

<400> 3

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

Thr Leu Ala His Thr Leu Glu Met Pro Phe Val Lys Val Val Lys Asn

20

25

30

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

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

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

Lys Asp Ile Ile Ala Gln Ile Val Gln Ala Lys Ile Val Gly Asp Glu  
85 90 95

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ala Ile Arg Glu Arg Leu Gly Lys  
325

<210> 4  
<211> 987  
<212> DNA  
<213> Leishmania major

<400> 4

atgtgcaogc tggcaaatfg ggtacgcgct atcatcaaga aacactcaac actcgcccac 60  
adaactogaga tgcggttcgt caaggtcgtg aagaacaagg cgtacttcaa gogettcag 120  
gtgaagtacc gccgtcgccg cgagggcaag acggactacc acgcgcgccc gcagatggtg 180  
ctgcaggaca agscgaagtt cggctcgccc aagtaecgcc ttgttctgcg catcacgaac 240  
aaggacatca ttgcgcagat cgtgcaggcg aagatcgtcg gcgacgaggt ggtgatggcc 300  
gcgtacgggc acgagctgcc tgcgttcggc attgagcacc gcctgacaaa ctacgctgct 360  
gcgtacggca ctggtctgct gctggcggcg ccacagctgg cgaagctggg catcgcggaac 420  
aagttccagg gcgcgaagga ggccgaaggg tcgtactctg ctgtgcgcac gaagaaggac 480  
gacgagggcg acgacgagga gcgctttccg ttcaaggoga tctggacgt cggccttgcg 540  
cgcaogacga ccggcgcccc cgtggttcggc gtgctgaagg gcgcggtgga cggcggtatg 600  
gctgtgcgcg accgccccaa ccgcttcccc ggctacaaca aggagaagag ctcgctggac 660  
ggcaaggtgc accgcgaccc catctttggc aagcacgtgg cggactacct gaagcaggtg 720  
aaggaggagg cgagctcgaa ccctgacgag aagtgcgtgc agttctcgaa gtadatggcc 780  
ggcaaggttt tgccggagag catcgagggc atgtacaaga aggcgcacgc ggcgatccgc 840  
gggaccogt cgaagtgcct gccgaagaag gcgaagaagg agggcgtcgc gcacaagagc 900  
tacaagacga aqaagctgag cggcggcgag aagagggccc ccgcgaaggc gaaggtcgcg 960  
gccatccgcg agcgcctcgg caagtaa 987

<210> 5  
<211> 10  
<212> DNA  
<213> artificial

<220>  
<223> adjuvant

<400> 5  
lcsaagttga 10

<210> 6  
<211> 14  
<212> DNA  
<213> artificial

<220>  
<223> adjuvant

<400> 6  
gctagcgtta gcgt 14

<210> 7  
<211> 132  
<212> PRT  
<213> Leishmania infantum

<400> 7

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

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

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

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

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

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

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

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

Thr Pro Ser Ala  
130

<210> 8  
<211> 891  
<212> DNA  
<213> Leishmania infantum

<400> 8

```
gootcatccg teatcegtca tttttgtgct acagctttac tetcaactcc ctccaaacta 60
cccatcgtag ccattggtac tctctgcagc gccaaagaag ccgtccgcaa gagcggctcc 120
aagtcgcgga aatgtgtct gatcttcccg gtggggcggc tgggggggat gatgcgcgcg 180
gycacgtacg ctgcgcgcac cgggtgctct ggggcgcgtt acctggcgcg cgtgctggag 240
tacctgacgg cggagctgct ggagctgtcc gtgaaggcgg ccggcgagag cgggaagaag 300
cggtgccgcc tgaaccgcgc cacctgatg ctggccgcgc gccacgaaga agacatcggc 360
acgcttctga agaacgtgac ctgtctctac agcggcgttg tcccgaacat cagcaaggcg 420
atggcaaaag aagaaggcgg caagaagggc aaggcgacac cggcgcgcta agtccctcgg 480
cctgacagcg cacacgcgcc gctgtattgt ggcgctgcgc gcgggtcccg actggggcgc 540
gagatgaggg gcatacacc tccatagaga cccatcttt tgttttatgg ctctctagat 600
gaccacttgg ttcttctgc ctttgtttg tttgtttctc tcttccctc cgcagaggt 660
acgagtcagg gttagctcgg acaaaaaaaaa s 691
```

<210> 9

<211> 111

<212> PRT

<213> Leishmania infantum

<400> 9

```
Met Ala Ser Ser Arg Ser Ala Pro Arg Lys Ala Ser His Ala His Lys
1 5 10 15
Ser His Arg Lys Pro Lys Arg Ser Trp Asn Val Tyr Val Gly Arg Ser
20 25 30
Leu Lys Ala Ile Asn Ala Gln Met Ser Met Ser His Arg Thr Met Ser
35 40 45
Ile Val Asn Ser Tyr Val Asn Asp Val Met Glu Arg Ile Cys Met Glu
50 55 60
Ala Ala Ser Ile Val Arg Ala Asn Lys Lys Arg Thr Leu Gly Ala Arg
65 70 75 80
Glu Val Gln Thr Ala Val Arg Ile Val Leu Pro Ala Gln Leu Ala Lys
85 90 95
His Ala Met Ala Glu Gly Thr Lys Ala Val Ser Ser Ala Ser Ala
100 105 110
```

<210> 10  
<211> 894  
<212> DNA  
<213> Leishmania infantum

<400> 10

```
ccaagccagc caaatccttc gcactttcac gctgtcctc ctttccaacc aaccacatc      60
accatggcct ettotegetc tctcccccgc aaggtttccc acgcgcacaa gtogcacgc      120
aagccgaagc gctcgtgaa cgtgtacgtg gcccgctcgc tgaagggcat caacgccacg      180
atgtcgatgt cgcaccgcac gatgagcctc gtgaactcgt acgtgaacga cgtgatggag      240
cgcactctca tggaggccgc gtcgatcgtt cgcgcgaaca agaagcgcac gttgggtgag      300
cgcgaggtgc agacggcgtt ggcacttctg ctgacggcgy acctcgcga gccagccatg      360
gctgagggca cgaagggcgt gtcgagcgcg tcggcttgag cggctcagtt agagggtttg      420
tccacgcctc gcccgctgtt cggggctgtg gggtaacctc aactccctc tccccgcta      480
cgcgctgggt ttccatagag atttattgtt tcttttoga ttctcttcc ttgaaggtga      540
tgtctcgtcc ttctctggag tgcgtgcagg gttcgcgggc gctagaaagc agcggcggag      600
gaggcagcgy cggcgcgaga cggtgaaagg gaggagaggc gggccgaaag cacagatgag      660
cttctccgtc tttttctccc ttctctgat tcgcccctgc tctctctc tcgatccctc      720
gtacctcgtg gtgcgcgctt ctcccctcg ccgtccgcgc caagctgcac agaggcgtgc      780
acggtttctc ttctatctca gaacgagtga cacacacggt ttcttgttcc cccctcccc      840
cttctcctc gcttctcgtt ttctgttctc gctctcagc ccaaaaaaaaa aaaa      894
```

<210> 11  
<211> 129  
<212> PRT  
<213> Leishmania infantum

<400> 11

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

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

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

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

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

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

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

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

His

<210> 12

<211> 587

<212> DNA

<213> Leishmania infantum

<400> 12

```
gtttcactac agccatccaa cccctgccca ctcccacccc caecgcacca ccatgtcccg 60
caocaaaggag acgcgccgcg cgaagcgcc cctcacgtcg aagaagagca agaaggcgcc 120
gagcggggcg tccggcgtga agaggtcgca tgcgccctgg cgcgccggca cctgcgcgat 180
ccgcgagatc cgcaagttcc agaagagtac gagcctgctg atccagtgcg cgcggttcca 240
gcgcctgggt cgaggtgtcg agcggcagaa ggagggcctg cgcctccaga gcagcgctat 300
catggcgctg caggaggcga cggaggcgta cattgtgtcg ctgatggcgg acacgaacct 360
cgcctgcata caccggaagc ggtgacgat ccagccgaag gacatccagc tggcgctgcg 420
cctgcgcggt gacgcgccact agggcgggccc cgcctcctccc ccctcatag ataccatggt 480
tttgtttctt ttcttttcgc ctccctaaag tctgtcacgc tgcctgccc cggcagccga 540
gagcgtgaga ggtcattga acctctagag cccgccaaaa aaaaaaa 587
```

<210> 13  
 <211> 100  
 <212> PRT  
 <213> Leishmania infantum

<400> 13

```

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

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

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

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

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

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

Tyr Gly Tyr Ala
100
  
```

<210> 14  
 <211> 531  
 <212> DNA  
 <213> Leishmania infantum

<400> 14

```

gtctcccttc ttgcctctc tccccccac gcctcctccc ttcacatata caccatggcc 60
aagggcaagc gttccactga tgccaagggc agccagaggc gccagaaga ggtgctggcc 120
gacaacatcc gggcatcac tggcggtgc gtcgcccga tggcggccg cgttggcgtg 180
aagcgcatct cgaccgaggt gtacgaagag gtgcgcctg tgctgaagc ctacgtggag 240
gacattgtgc gctgcagcac ggcctacacc gagtacggc gcaagaagc cgtgacggcg 300
tgcgstgttg tgaccgctt ggcgaagca ggcacatcc tgtacggcta cgcgtaaatg 360
ctgcagagc cgtgcacac tcatagata accttctttg ttcctgccgt cgtttcgttg 420
gctttcttgg ttttcgact ccttcccc cactatggct tttcttctg ctgctgctgg 480
caaccttccc tactcatgca tgtttgctga aggcagtaca gaacgaagcg g 531
  
```

<210> 15

<211> 106  
<212> PRT  
<213> Leishmania infantum

<400> 15

Met Gln Tyr Leu Ala Ala Tyr Ala Leu Val Ala Leu Ser Gly Lys Thr  
1 5 10 15  
Pro Ser Lys Ala Asp Val Gln Ala Val Leu Lys Ala Ala Gly Val Ala  
20 25 30  
Val Asp Ala Ser Arg Val Asp Ala Val Phe Gln Glu Val Glu Gly Lys  
35 40 45  
Ser Phe Asp Ala Leu Val Ala Glu Gly Arg Thr Lys Leu Val Gly Ser  
50 55 60  
Gly Ser Ala Ala Pro Ala Gly Ala Val Ser Thr Ala Gly Ala Gly Ala  
65 70 75 80  
Gly Ala Val Ala Glu Ala Lys Lys Glu Glu Pro Glu Glu Glu Glu Ala  
85 90 95  
Asp Asp Asp Met Gly Phe Gly Leu Phe Asp  
100 105

<210> 16  
<211> 106  
<212> PRT  
<213> Leishmania infantum

<400> 16

Met Gln Tyr Leu Ala Ala Tyr Ala Leu Val Ala Leu Ser Gly Lys Thr  
1 5 10 15

Pro Ser Lys Ala Asp Val Gln Ala Val Leu Lys Ala Ala Gly Val Ala  
20 25 30

Val Asp Ala Ser Arg Val Asp Ala Val Phe Gln Glu Val Glu Gly Lys  
35 40 45

Ser Phe Asp Ala Leu Val Ala Glu Gly Arg Thr Lys Leu Val Gly Ser  
50 55 60

Gly Ser Ala Ala Pro Ala Gly Ala Val Ser Thr Ala Gly Ala Gly Ala  
65 70 75 80

Gly Ala Val Ala Glu Ala Lys Lys Glu Glu Pro Glu Glu Glu Glu Ala  
85 90 95

Asp Asp Asp Met Gly Phe Gly Leu Phe Asp  
100 105

<210> 17

<211> 2850

<212> DNA

<213> Leishmania infantum

<400> 17

gtgcgcggcg acatggctag agcagtttgt gcagctcccc ctgagcgaca agaaacacga 60  
tetgcgcggt cgcacaggag gtgtttctcc atgcctttgc ccagtgcac c atgagtcgc 120  
ggatctttgt cgcaccacca gcaaaagagg agcagtgccct actcggggcc ttaggaacgg 180  
caatggagcc ttttgcacag taccocgagg agacgatcgc ccaggcaat gcgttttcgc 240  
atcaaggagg gcttcgcgat gtcccgctcg cagctgaggg ggtggagcag caggttatga 300  
atctccagcg gctgcattaa tgcgcgcctg ccagacacgg gggaggtcc ctgtttctgt 360  
ttttgcgtgt tgcgtcttcc tctttatggt tgcctctttg tgtctgtcgg ttaagagctc 420  
ctcccttgc cagaaacag gagtaaccga gtaagccgca gcgcctgcgc cacacgttgt 480  
ccatggascc cctcccctcc tgcctcctcc ctctccact cctccttct gggctctgca 540  
tgtgtgtgtg catgtgtgtg taactttgcc tgggtgtggc tggcagctg cgcctccctc 600  
ccccccccc ccaaaaaaaa aaacagcat cctcagtggy ctgacctgga tacatctcct 660  
cctctccttg tgttcccct cccctcttgc ctcttctct atgcacctcg cccactgccc 720

gcatcaagca cgeatcatcg eggctaogga acaogogacc cccaccccac atagggtttt 780  
 tcaacgagaa atgcagtacc ttgocogga cgcocctcgtg gogctgtctg gcaagagcc 840  
 gtcgaagggg gacgttcagg ctgtcctgaa ggcgcocggc gttgcocgtg atgocctccc 900  
 cgtggatgdc gttctccagg aggtggaggg caagagcttc gatgocctgg tggocgaggg 960  
 ccgcaagaa cgggtgggt ctggtctgc cgtcctcgtt ggocctgtct ccactgctgg 1020  
 tgcocgocgt ggcgggtg ccgagggaa gaaggaggg cccgaggag aggagggoga 1080  
 tgatgacatg gcttcoggtc tctttgactc agcagcccg cactgocctg caggocctc 1140  
 tgcogaagat tctcagcgg cctcctctc atgtttgta tgcacgttt ctttctttgc 1200  
 ttgtgacttc gttcgttt ttgatttoga gtggaagac tctgcaatc gaacaacccg 1260  
 tgcgagatga gctgggagcg taggcgaggt gctgctcgc gaggctgaa cgaaaaaaa 1320  
 aagacagcag cggcgcctc ggcacaaaca cagcagacc tccctccc cgttctgtcc 1380  
 ctctcogaga agagagagc aaagaatctc cacagacgt gtacgagag caccggctc 1440  
 gtcacogaga gaagcaaccg cgtttcgtg ccgtgaccg ctgaccttcg ataaccgaga 1500  
 gagggtgtct tctcttctc aagtgggttc attgcaagt gctgctctac tgtccctct 1560  
 gctcgtctc cccagttct cgttctgtct ctttttgtt cgttccatg actttctctc 1620  
 atactgttt tgcctctgt cgtacaagag gtgtatcaca catgcagtac ctgcocgct 1680  
 acccctcgt ggcctgtct ggcagaagc cgtcgaagc ggaocctcag gctgtctga 1740  
 aggcocccg cgttgcctg gatgcctccc gctggatgc cgtcttcag gaggtgagc 1800  
 gcaagagctt cgtgocctg gtcgocgag gtgcacgaa cctggtggc totggctctg 1860  
 ccctcctgc tggocctgt tccactcgt gtgcocgoc tggocgggtg gccgagcga 1920  
 agaagggaga gcccgaggc gaggagccg atgatgacat ggcctcgt ctctttgact 1980  
 aagcagctc cgtgaggtt ctactgtct tactttttga cttgtttcat ttgacttgtt 2040  
 ttctccctt aagcaaaag cacagtaagc aagcatccct gcaocctcga gogatgctc 2100  
 gaaccggtct cctgctgoc cctatccct cagcagcgc gacctccct cctttccag 2160  
 tctgacctc atctctcca atcttccc ttctctctg tctctctct tgggttccct 2220  
 cttgacgat cctgcatcga cctgaccag gtaattgta tggctctca agagaatagc 2280  
 gactctaca aggtcaaac ttttccctt tccagattt tgggcagtg ttccgactgc 2340  
 cccagctgt gctcagaa gacggccgc gttgtgaaa acagcagtc tgcocccgg 2400  
 ggtgggaa cctattcaa ctccgttgc gaggagcgc ggtctgaga cttggaactc 2460  
 tgcagctgc gatccggtc catgcagcc acctgcccgt cacagagaa ggtccagcag 2520  
 tacgagcgg ctctcgcgc cgccttactc aagccgaaa agagcagcc cccaaacccg 2580  
 tctgtcttc aagacgttc ccgtgccc acgggtcga gttttctcg aagctcctgt 2640  
 tgcocgtgc gcacaaacc agaaggtatc ctcccaacc aaagacctg aacgggagc 2700

acaccgacgc oggtcccacg cgggacggcc gacggaggcg accgaaggtg ctcgagggga 2760  
 ccaagacatg gacaacgata ttccgocgug ctggagcaag ctccgccaag agcgcttcgg 2820  
 ctcaaaggca gagcacgttg ctccgtcgac 2850

<210> 18  
 <211> 111  
 <212> PRT  
 <213> Leishmania infantum

<400> 18

Met Ser Thr Lys Tyr Leu Ala Ala Tyr Ala Leu Ala Ser Leu Ser Lys  
 1 5 10 15  
 Ala Ser Pro Ser Gln Ala Asp Val Glu Ala Ile Cys Lys Ala Val His  
 20 25 30  
 Ile Asp Val Asp Gln Ala Thr Leu Ala Phe Val Met Glu Ser Val Thr  
 35 40 45  
 Gly Arg Asp Val Ala Thr Leu Ile Ala Glu Gly Ala Ala Lys Met Ser  
 50 55 60  
 Ala Met Pro Ala Ala Ser Ser Gly Ala Ala Ala Gly Val Thr Ala Ser  
 65 70 75 80  
 Ala Ala Gly Asp Ala Ala Pro Ala Ala Ala Ala Lys Lys Asp Glu  
 85 90 95  
 Pro Glu Gln Glu Ala Asp Asp Asp Met Gly Phe Gly Leu Phe Asp  
 100 105 110

<210> 18  
 <211> 2936  
 <212> DNA  
 <213> Leishmania infantum

<400> 18

gtogaagcag caacacagtc tctcccccctc ctgcacccgc atgcgtcgtc tctcagatgct 60  
tccggtgggg gggtagcagtg aacgtagtcg atgatccatg ccggtccttc tctctataag 120  
tacgtggcac atgcacctac acccaaccacn accgttaccc atccaccctt ggcaccgcat 180  
gcaccggcca ctgcgggctt ttctctcttt ttgatctcag ccctccacc ttgccagta 240  
ttgttctctt ggcactccc gagtgttctc acccaccctt cctcccaaga tegttaactt 300  
tegaatcttc gcttaaccat gtcaccaag tacctcgcg cgtacgtctt ggcctccctg 360  
agcaaggcgt cccctctca ggggacgty gaggtatct gcaaggcctt ccacatgac 420  
gtcgaccagg ccaccctcgc ctttctgatg gagagcgtta cgggacgca cgtggccacc 480

ctgatcgcgg agggcgccgc gaagatgagc gcgatgccgg cggccagctc tgggtccgct 540  
 gctggcgtca ctgcttcgcg tgcgggtgat gggccccgg ctgccgcgcg ccggaagaag 600  
 gacgagcccg aggagagagg ccacgacgac atgggcttgg gtctgttcca ctaagcccat 660  
 ccagcggctg tttgcgtgtg tgcgtgtatg taaggggtga tgcggggggc ttgctgttic 720  
 ggtaaagttt cttctggcgt gcccccgcgt gcgcccagtc gttcccttga gggcatgaca 780  
 gaagcacaag aaaccggcat gcgcccctcc gfgactgaag agggggggcg ccgtctctct 840  
 ttctggcgt gtgtcactca ttttttttt gcogtcttaa ctcacaggaa aacgcccgcg 900  
 agatgggttt ggggtgtctg atgtaggagg gccaatcagg gatgaggatg gcacggttgg 960  
 tgctcacaac agcggagggc gcccttcagg acgcgtacgc ggtccctctct gtctttctca 1020  
 cgtgcataca ccctcgcgcg caagcaagcg cccagcgaag ggcacacgcg gacgaacaga 1080  
 tgcggggcgg atagcggaat ggaggaagag gaaggggggt gggcgccgcg actgaaagt 1140  
 gcgagatagg ccagcaatga acgcgttgat gggctgatcc ccttccctcg tgcagccctg 1200  
 tcgtccatgc ggggagggag tgggtgcagc agcgcagcgs aaaggtgga agcagggag 1260  
 agagagagag agagacgtgc ataactctgc gggcgggggc ggggaggagt gatgatggtg 1320  
 ctgatggacg ggcggagcac ggtggggag cagtcgggcg atgcctgtct ctcttgagc 1380  
 tgcagcaacc ggtggagagt ctccctctc caccctgcc cgccttccc acattgctgg 1440  
 tccgccatgt gtgcacgcat gtgcctgtat gcctttacac gaacctttcc tactgttcc 1500  
 cacacgccca caactctatc gaacgtctcc tcccccccc cctcgacgca tccgtgctaa 1560  
 ccacacaaag ccscacacag caagcaagca atacacacac acgtatctct gcataatgc 1620  
 atgccaccca ccgctgcctcg ggtgtcgacg tggaaagttaa gctttctgtc tggttttaag 1680  
 ccagtcgac actctccacc atgtccacca agtaacctgc ccggtacgct ctggcctccc 1740  
 tggcaaggcg gtcccctct caggcggagc tggaggctat ctgcaaggcc gtccacatcg 1800  
 acgtcgacca ggcacccctc gcttttgtga tggagagcgt taagggaagc gacgtggcca 1860  
 ccctgatcgc ccagggcgcc gcgaagatga gcgcgatgcc ggcggccagc tctggtgccg 1920  
 ctgctggcgt cactgcttcc gctgcgggtg atgcccggcc ggtgcgcgcg gcgcggaaga 1980  
 aggaagagcc ccaggagggg gccgaagcag acatgggctt ccgtctgttc gactaagccc 2040  
 atcgacgcgt tggcagctgt gacatgtgac accgcccggg tctgtctct ctctgcca 2100  
 ccttcactct ctccgaagcc gagccgctta tcaatctct gtcttctcgc gcgcgggct 2160  
 gccgcctctc tgtgagcatg cgtgcgtgta cgtcgtgtcg tcccatagcg agctgctggc 2220  
 gcgcgcggcg agagagagag agagagcacg aggcgggggg gaagtggagc cgaatgggga 2280  
 atagagtggg ggcctgcgc accggaaaaag ccttctcccg gaaagtgata ccgacacatg 2340  
 cgtatgggag gggggggtgg gagaggatgc gagaagtcgt tgtctgcatc ctctccaacc 2400  
 ccacccccgc gtgtgtgcat gcacttattt ttctgttttc gataatttct tegtactta 2460

ccagcatctg gcatatatga cctacctgca gacacacaaq acagycgcgc agcacacgac 2520  
gacggggcgc ggtgcggtgc cgcacagacat gttcactgtg cctaacctgt gtatgcgtgt 2580  
gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt gtgcctgggt ggggtgaatac gtctctctca eggcggttgt 2640  
gggacacgc agagcgatag ggagaggaga agggggcagg agggggcggc actcctcgtg 2700  
cgcccgcttc ccgctgcgc gacctccact cccttgcctc ctccctctcg ataccagtct 2760  
cgtggcgag aggaggcggg agtcactctg gatatgcgc tgtgagagcg gcccaacag 2820  
ctcacatgag cccacacgct ctccatctca tctcctcag gccatcacac atcgcacgc 2880  
gccctgctt ctcttcaac tctctccac atgattgctt cgacgcact gtcgac 2936

<210> 30

<211> 323

<212> PRT

<213> Leishmania infantum

<400> 30

Met Pro Ser Ile Thr Thr Ala Lys Arg Glu Tyr Glu Glu Arg Leu Val  
 1 5 10 15

Asp Cys Leu Thr Lys Tyr Ser Cys Val Leu Phe Val Gly Met Asp Asn  
 20 25 30

Val Arg Ser Gln Gln Val His Asp Val Gly Arg Ala Leu Arg Ala Lys  
 35 40 45

Ala Glu Phe Met Met Gly Lys Lys Thr Leu Gln Gly Lys Ile Val Glu  
 50 55 60

Lys Arg Ala Gln Ala Lys Asp Ala Ser Pro Glu Ala Lys His Phe Asn  
 65 70 75 80

Asp Gln Cys Glu Glu Tyr Asn Leu Leu Ser Gly Asn Thr Gly Leu Ile  
 85 90 95

Phe Thr Asn Asn Ala Val Gln Glu Ile Thr Ser Val Leu Asp Ala His  
 100 105 110

Arg Val Lys Arg Ala Ala Arg Val Gly Ala Ile Ser Pro Cys Asp Val  
 115 120 125

Ile Val Ala Ala Gly Ser Thr Gly Met Glu Pro Thr Gln Thr Ser Phe  
 130 135 140

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

Ile Val Thr Glu Lys Lys Val Leu Ser Val Gly Asp Lys Val Asp Asn  
165 170 175

Ser Thr Ala Thr Leu Leu Gln Lys Leu Asn Ile Ser Pro Phe Tyr Tyr  
180 185 190

Gln Val Asn Val Leu Ser Val Trp Asp Arg Gly Val Leu Phe Thr Arg  
195 200 205

Glu Asp Leu Met Met Thr Glu Asp Met Val Glu Lys Met Leu Met Glu  
210 215 220

Gly Leu Ser Asn Val Ala Ala Met Ala Leu Gly Ala Gly Ile Pro Thr  
225 230 235 240

Ser Ser Thr Ile Gly Pro Met Leu Val Asp Ala Phe Lys Asn Leu Leu  
245 250 255

Ala Val Ser Val Ala Thr Ser Tyr Glu Phe Glu Glu His Asn Gly Lys  
260 265 270

Glu Leu Arg Glu Ala Ala Ile Asn Gly Leu Leu Ala Gly Ser Cys Ser  
275 280 285

Ala Ala Ala Glu Pro Ala Ala Ala Ala Pro Ala Ala Pro Ser Ala Ala  
290 295 300

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

Gly Leu Phe

<210> 21

<211> 3790

<212> DNA

<213> Leishmania infantum

<400> 21

atgagagagc	gcgagagaga	gagcatgtat	cctgagtg	cttcaatgga	gacttgacac	60
ccctattctc	tgtctctgc	ttctgctcc	gtccctaat	taacttgact	gccttttact	120
tgttcccttt	ctatttcctc	ggtttttggc	aaccttcctt	atgggcccc	cacccccaac	180
ataccacccc	acaaatggt	gcttcaagcc	ctccctcgt	gctttgcagc	tccttttagc	240
aacgatgcgc	tctatcacc	ctgccaagcg	cgagtacgag	gagcgcctcg	tgcactgcct	300
gacaaagtac	agctgagtg	tgttcgtggg	catggacaac	gtccgctcgc	agcaggtgca	360
cgatgtgggc	cgtgcgctgc	gcgagaagcc	cgagttcatg	atgggcaaga	agacgctgca	420
gggcaagctc	gtggagaagc	gagcgaagc	caaggacgcg	agccccgagg	cgaagcactt	480

caacgatcag	tgtgaggagt	anaacctgct	gagcggcaac	accggcctca	tcttcacgaa	540
caacgatgtc	caggagatca	cgtctgtgct	tgacgcgcac	cgcgtgaagc	gocgcggcgc	600
tgtcggagcg	atttccccgt	gtgaogtgat	tgtcgtgct	ggcagcaccc	gcctggagcc	660
gaccacagac	tccttcttcc	aggcgtgaa	cattgcgaag	aagattgcca	agggtatggt	720
ggagatcgtg	acggagaaga	aggtgctgag	cgtcggcgc	aaggtggaca	actcgacggc	780
gacgtcgtg	caaaagctga	acatcagccc	gttctactac	caggtgaatg	tgctgtccgt	840
gtgggacccg	ggtgtgctgt	tcaccccgca	ggacctgatg	atgacggagc	acatggtgga	900
gaagatcgtg	atggaaggcc	tgagcaactg	tgccggcgtg	gocgtgggtg	ctggcatccc	960
gacgtcttcg	acgattggcc	cgatgctggc	ggacgccttc	aagaacctgc	tgctgtcttc	1020
tgtggcgacc	tgtacgagt	tcgaggagca	caacggcaag	gagctgcgcg	aggccgcgat	1080
caacggcctg	ctggccggct	cttgcctggc	tgtcgggag	ccgcgcctg	cgcgcgcggc	1140
cgcacctagc	gcgcctgcca	aggaggagcc	ggaggagagc	gacgaggagc	acttcggcat	1200
ggcgggtctc	ttctaagcga	ctcgccatct	cttagcctcc	ttgtggtgcg	ctttaggtgc	1260
tctcgcctg	cttctcttgc	cagtgttggc	tgactctagc	gggtatgtgt	cgtgcatta	1320
caccacacct	tcccacctct	ttgctctacg	cgtcgcctg	cgcacctcgt	gaatcatcga	1380
gggaagtctc	tctgggtggc	agtgggtaag	cttgtgagga	aagaggtgtg	tgtgtgagcg	1440
ggcaggtacg	tggaccact	taacaaaca	aacacacaca	cacacggaaa	gactcagcta	1500
cagcatccgt	ccggcgcaac	agcaacgtcc	gcgcgcgcaa	gcagagcgcg	tgcctcatt	1560
gtaccgctgt	gaaaggagga	gggggggact	cttgcctttt	ttctttttct	ttttttgtt	1620
tcggtagttt	attcttcatt	ttcgtctca	actcaaaaaa	cagcacaaaa	acgcggaaac	1680
gcagcatgag	tggcccggt	gcaatcggg	acggtggcgc	cgcacccgt	cgtggcaact	1740
gcgcatgggt	tgctatctga	tggatggtg	cactgctgct	cgaacacagc	tggacctccc	1800
ccccccccgc	aacgacgagc	tcgggtcgag	tcgcccggct	gtggccgtga	gcacagggta	1860
gcctttcttt	gcgtgcaca	gcacctatcg	togtctcgg	cactcctcat	cactctccc	1920
tgtgtgcga	cgaaggtgtg	ctgtctgtga	ggacgcttcc	gtgtgagtag	gtgctgcaa	1980
acatgctgcn	atcggcaccg	gatcgggctc	gggtaggttc	cacgctcctg	gagggtcgca	2040
agtgtcttgc	tgctccaggt	gactgatgac	caaggccata	tcctcagcna	acaccttcac	2100
tgtgcgcgcg	ctgcttctct	ccagcacgaa	gcgagcacag	gggcacgggt	gggggcggca	2160
agcagtagc	ctctgaggtt	gtgcgtagcc	gacacgtcgt	gtgccagtgg	gcactgcgca	2220
cttttccagt	gtgtgtgtg	gaaacacagg	tcggcgcaag	ctgtcttcgg	tgatgcttcc	2280
tcattatgag	ccgcttgccg	agcgtgcgcg	cgacccccgg	ccccctcctca	cctcctcgcg	2340
cggagctaac	gcgtgcacgc	tgtgtccctc	gtgtaaagac	agcttcccc	accccttctg	2400

caactccctc	tgggtccgtc	tttctcgggt	tcattctctc	ttcttcgtga	acgaaacacg	2460
accactcgcc	tgcgatattc	cgogtgccca	atateccact	cactccotta	ccatgacatt	2520
gtccgtgcc	caaccggcg	cacacttcgg	cacacgaaaa	acaccttccc	cgaccccaag	2580
acagatagcc	aaggctattg	caagtctcac	aagatgccc	ctatcaccac	tgccaaagcc	2640
gagtacgagg	agggcctcgt	cgactgcctg	accaagtaca	gctgogtget	gttcgtgggc	2700
atggacaacg	tccgctcgca	gcaggtgcac	gatgtcggcc	gtgogctcgg	cgcgaaagcc	2760
gagttcatga	tgggcaagaa	gacgctgcag	ggcaagatcg	tggagaagcg	cgcgcaagcc	2820
aaggacgcga	gccccgaggc	gaagcacttc	aacgatcagt	gtgaggagta	caacctgctg	2880
agoggcaace	ccggcctcat	cttcaogaac	aacgctgtcc	aggagatcac	gtctgtgctt	2940
gacgogcacc	gcgtgaagcg	cgcggcgctg	gtcggagcga	tttccccgig	tgacctgatt	3000
gtcgtcgtg	gcagcaccgg	catggagcgg	accagacagt	ccttcttcca	ggcgtgaac	3060
attgcgacga	agattgccc	gggtatggtg	gagatcgtga	cggagaagaa	ggtgctgagc	3120
gtcggcgaca	aggtggacaa	ctcgacggcg	acgtcgtcgc	aaaagctgaa	catcagcccc	3180
ttctactacc	aggtgaatgt	gctgtccgtg	tgggaccgcg	gtgtgctgtt	caaccgagag	3240
gacctgatga	tgacggagga	catggtggag	aagatgctga	tggaaaggct	gagcaacgtt	3300
gcggcgatgg	cgctgggtgc	tggcctcccg	acgtcttoga	cgattggccc	gatgctggtg	3360
gacgccttca	agsacctgct	ggctgtctct	gtggcgacct	cgtagcagtt	cgaggagcac	3420
aaoggcaagg	agctgcgcga	ggccgcgctc	aacggcctgc	tggccggctc	ttgctcggct	3480
gctgcggagc	ccgcccgtgc	cgcgccggcc	gccctagcgc	ccgctgccc	ggaggagccg	3540
gaggagagcg	acgaggacga	cttcggcatg	ggcggctctc	tctaagcgac	tgcacatctc	3600
ccactgagca	cogtgcagtg	ttcgtgtgtt	cgagggtgg	acagcggcga	gctgtgatg	3660
cccttgatc	ctcaggaagc	aactctctcc	ctttctctct	gtgttcttgc	ttctctctt	3720
cattagtttt	ggatgccgt	gcgctgcgca	tgcctcagtt	ctcatttata	tcaataacaa	3780
caacgaagac						3790

<210> 22

<211> 360

<212> PRT

<213> Leishmania major

<400> 22

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

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

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

	35		40		45														
Glu	His	Glu	Ala	Gly	Arg	Gly	Ala	Ala	Leu	Ala	Arg	Val	Glu	Phe	Arg				
50						55					60								
His	Pro	Tyr	Lys	Phe	Arg	Arg	Val	Lys	Glu	Leu	Met	Val	Ala	Pro	Glu				
65					70					75					80				
Gly	Met	Phe	Thr	Gly	Gln	Ser	Val	Phe	Cys	Gly	Gln	Lys	Ala	Pro	Leu				
				85					90					95					
Ala	Ile	Gly	Asn	Val	Leu	Pro	Leu	Gly	Gln	Ile	Thr	Glu	Gly	Cys	Ile				
			100					105					110						
Val	Cys	Asn	Val	Glu	Ala	Lys	Pro	Gly	Asp	Arg	Gly	Thr	Leu	Ala	Arg				
		115					120					125							
Ala	Ser	Gly	Asp	Tyr	Cys	Ile	Ile	Ile	Ser	His	Asn	His	Glu	Thr	Gly				
130						135					140								
Arg	Thr	Arg	Leu	Lys	Leu	Pro	Ser	Gly	Gln	Lys	Lys	Ser	Val	Pro	Ser				
145					150					155					160				
Thr	Ser	Arg	Ala	Met	Ile	Gly	Ile	Ile	Ser	Gly	Gly	Gly	Arg	Ile	Glu				
				165					170					175					
Lys	Pro	Val	Leu	Lys	Ala	Gly	Asn	Ser	Phe	Tyr	Arg	Phe	Arg	Gly	Lys				
			180					185					190						
Arg	Asn	Cys	Trp	Pro	Lys	Val	Arg	Gly	Val	Ala	Arg	Asn	Pro	Val	Glu				
		195					200					205							
His	Pro	His	Gly	Gly	Gly	Asn	His	Gln	His	Ile	Gly	His	Pro	Ser	Thr				
210						215					220								
Val	Ser	Arg	His	Ser	Pro	Pro	Gly	Gln	Lys	Val	Gly	Leu	Ile	Ala	Ala				
225					230					235					240				
Arg	Arg	Thr	Gly	Arg	Ile	Arg	Gly	Gly	Lys	Ala	Val	Lys	Gly	Ala	Trp				
				245					250					255					
His	Pro	Glu	Glu																
			260																

<210> 23  
 <211> 783  
 <212> DNA

<212> Leishmania major

<400> 23

```
atgggtaaga ctgtgctgag ctgcoytaag ygcaacggct ccgtgtacca ggtgcacggc      60
cacaagcgcc ttggcccccg caagctgcgc attctggact acgccgagcg ccacggctac      120
atgcgcggtg tggatgaagtc gatcgagcac gaggtggcc gcggtgcggc gctggcggc      180
gtggagttcc gccaccctga caagttccgc cgcgtgaagg agctgatggt ggcccgggag      240
ggcatgttca ccggccagtc ggtgtttctg ggccagaagg ccccgctcgc gatcgccaac      300
gtgctgcccc ttggccagat cacggagggc tgcattgtgt gcaacgtgga ggccaagccc      360
ggtgaccgcg gcacgctggc ggcggctcc ggcgactact gcatcatcat ctgcacaaac      420
cacgagacag gccgcacgcg cctgaagctg ccgagcgggc agaagaagtc cgtgccgagc      480
acgagccgcg cgatgatcgg catcatcagc ggccgtggcc gcctcgagaa gcccgctctg      540
aaggccggtg actcgttcta ccgcttccgc ggcaagcgca actgctggcc caaggtcgt      600
ggtgttgccc gcaaccoggt ggagcaccgc ccgggtggtg gtaaccatca gcacattggc      660
caccogtoga cgggtgcgcg ccactgcgcg ccgggccaga aggtgggtct gatcgtgccc      720
cgtcgaccgc gccgtattcg cggtagtaag gctgtcaagg gcgcgtggca cccggaggag      780
taa                                                                                          783
```

<210> 24

<211> 282

<212> PRT

<213> Leishmania major

<400> 24

Met Ala Thr His Ser Val Tyr Gly Asn Ala Ser Asp Met Pro Ala Val  
1 5 10 15  
Pro Ala Pro Glu Ser Ala Ile Lys Arg Ala Ala Phe Lys Gln Gln Gln  
20 25 30  
Thr Glu Ser Phe Lys Lys Ala Val Val Ala Arg Lys Ala Ala Lys Ala  
35 40 45  
Ala Leu Lys Lys Thr Ala Tyr Leu Arg Ala Arg Lys Tyr Ser Arg Glu  
50 55 60  
Tyr Arg Gly Ala Glu Lys Lys Leu Val Thr Leu Arg Arg Gln Ala Ala  
65 70 75 80  
Ser His Gly Asn Tyr Tyr Leu Glu Ala Lys Pro Lys Val Ala Val Val  
85 90 95  
Thr Arg Ile Arg Gly Ile Ala Lys Val Asn Pro Lys Gln Arg Lys Ile  
100 105 110  
Leu Gln Leu Leu Arg Leu Arg Gln Ile Phe Asn Thr Val Phe Val Lys

115

120

125

Met Asn Lys Pro Met Glu Asn Met Leu Arg Ala Val Glu Pro Tyr Ile  
130 135 140

Ala Tyr Gly Tyr Pro Ser Leu Ala Thr Val Arg Ala Met Val Tyr Lys  
145 150 155 160

Arg Gly Tyr Leu Lys Ile Asn Gly Gln Arg Val Lys Ile Thr Asp Asn  
165 170 175

Gln Met Ile Lys Asp Lys Tyr Asn Asn Val Asp Ile Val Cys Ala Glu  
180 185 190

Asp Met Val Asn Gln Ile Tyr Thr Cys Gly Lys His Phe Arg Thr Val  
195 200 205

Thr His Gly Met Trp Pro Phe Lys Leu Ala Pro Pro Ala Gly Gly Met  
210 215 220

Arg Gln Lys Arg Arg His Phe Val Glu Gly Gly Asp Tyr Gly Asn Arg  
225 230 235 240

Asp Thr Leu Ile Asn Arg Phe Leu Ala Arg Met Ile  
245 250

<210> 25

<211> 759

<212> DNA

<213> Leishmania major

<400> 25

atggccacac actcagttta cggcaacgca tccgacatgc cgcctgtccc tgcccctgag	60
tcgcgcatca agcgtgctgc gttcaagcag cagcagacgg agagcttcaa gaaggccgtg	120
gtggccagaa aggtgccaa ggctgccctg aagaagaccg cctacctgag tgcccgcgaa	180
tactcccgcg agtacccggg tgcggagaag aagctggtga cgtgcgcgcg ccaggccgcg	240
tctcacggtc actactacct ggaggcgaag ccgaaggttg ccgtggtgac tgcctaccgc	300
ggtatcgcca aggtgaaccc gaagcagcgc aagattcttc agttgctgag cctgcgccag	360
atcttcaaca cggtgcttct gaagatgaac aagccgatgg aqaacatgct gcgtgcggtg	420
gagccctaca tcgctgtaagg ctaccctcc ctggccaccg tcgcgcgat ggtgtacaag	480
cgcggtacc tgaagatcaa cggccagcgc gtgaagatca ccgacaacca gatgatcaag	540
gataagtaca acacgtgga cattgtgtgt gccgaggata tggatgaacca gatctacacc	600
tgggcaagc acttcgcac ggtgacgac ggcctgtggc ccttcaagct ggcccctccg	660
gcgggtgca tgcgcagaa gcgcgtcac ttctggagg gtgggacta tggtaaccgc	720
gacaccttga tcaaccgctt cctgcgccgc atgatctga	759

<210> 26

<211> 264

<212> PRT

<213> Leishmania major

<400> 26

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

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

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

Arg Phe Met Arg Trp Pro Thr Phe Val Thr Met Gln Arg Lys Lys Arg  
 50 55 60

Val Leu Gln Arg Arg Leu Lys Val Pro Pro Ala Leu Asn Gln Phe Thr  
 65 70 75 80

Lys Val Leu Asp Arg Ala Ser Arg Asn Glu Ala Leu Lys Leu Ile Lys  
 85 90 95

Lys Tyr Ala Pro Glu Thr Arg Lys Ala Arg Arg Glu Arg Leu Gln Lys  
 100 105 110

Val Ala Glu Glu Lys Lys Lys Asp Pro Lys Lys Thr Val Ser Thr Lys  
 115 120 125

Ala Pro Leu Ala Val Val Thr Gly Leu Gln Glu Val Thr Arg Ala Ile  
 130 135 140

Glu Lys Lys Gln Ala Arg Met Val Val Ile Ala Asn Asn Val Asp Pro  
 145 150 155 160

Val Glu Leu Val Leu Trp Met Pro Asn Leu Cys Arg Ala Asn Lys Ile  
 165 170 175

Pro Tyr Ala Ile Val Lys Asp Met Ala Arg Leu Gly Asp Ala Ile Gly  
 180 185 190

Arg Lys Thr Ala Thr Cys Val Ala Leu Thr Asp Val Asn Ala Glu Asp  
 195 200 205

Glu Ala Thr Leu Lys Asn Leu Ile Arg Ser Val Asn Ala Arg Phe Leu  
 210 215 220

Ser Arg Ser Asp Val Ile Arg Arg Gln Trp Gly Gly Leu Gln Leu Ser  
225 230 235 240

Leu Arg Ser Arg Ala Glu Leu Arg Lys Lys His Ala Arg Asn Ala Gly  
245 250 255

Val Asp Ala Ala Ala Ile Ile Gln  
260

<210> 27  
<211> 795  
<212> DNA  
<213> Leishmania major

<400> 27

```
atgcccgcca aggaagtgaa gaaggtgacg cagcccgcca aggcggcgtc tccgtacaag 60
aagcccgccg ttgctgagca ttctcgggcc cgcgccgaga acttcgggat tggccaggat 120
gtgccgtacg cgcgtgaact gtcccgcttc atcgcggtgc cgacgttctg gacgatgcag 180
cgcaagaagc gcgtgctgca gcgccgcctg aaggtgccgc cggcgctgaa ccagttcacg 240
aaggtgctgg accgcccagc cggaaaccag gcgctgaagc tgattaagaa gtaccgcccg 300
gagaccggca aggtctggcc cgagcgcctg cgaaggyttg ccgaggagaa gaagaaggac 360
ccgaagaaga cggtatcgac gaaggctccc ctggctgttg tgaccggtct gcaggaggtg 420
acgcgcgcca tcgagaagaa gcaggctcgc atggttgtga tcgcgaacaa cgtggaccct 480
gtggagctcg tctgttggat gccgaacctg tgcggcgcca acaagatccc gtatgccatc 540
gtgaagyaac tggcgcgact gggcgatgcy atcgggcgga agacggcgac gtgcgttgcg 600
ctcaccgacg tgaacgcgga ggatgaggcg acgctgaaga acctgatccg ctccgtgaac 660
getcgtttct tgtcccgctc gacgtgacg cgcgcgccgt ggggtggtct gcagctgtct 720
ctggatccc gcggggagct ggcgaagaag catgcccgca acgctggtgt ggaagcccgg 780
gccatcatcc agtaa 795
```

<210> 28  
<211> 222  
<212> PRT  
<213> Leishmania major

<400> 28

Met Ala Phe Pro Ser Arg Lys Asp Ala Phe Arg Ala Gln Arg Lys Gly  
1 5 10 15  
Ala Lys Lys His Arg Pro Glu Ile Ile Val Ile Asp Leu Lys Asp His  
20 25 30  
Val Leu Gly Arg Ala Ala Ala Val Val Ala Lys Gln Leu Leu Leu Gly  
35 40 45  
Lys Lys Ile Thr Val Val Arg Cys Glu Gln Leu Asn Ile Ala Gly Thr  
50 55 60  
Glu Ile Arg Asn Lys Ile Lys Tyr Leu Gln Tyr Leu Arg Lys Arg Lys  
65 70 75 80  
Leu Thr Asn Pro Thr Lys Gly Pro Phe His His Arg Ala Pro Ser Asp  
85 90 95  
Val Phe Val Arg Thr Val Arg Ser Met Leu Pro Arg Tyr Thr Lys Arg  
100 105 110  
Gly Met Lys Ala Leu Asn Ser Leu Val Ala Tyr Glu Gly Ile Pro Pro  
115 120 125  
Asn Val Val Arg Thr Gly Gly Arg Val Val Ile Pro Arg Ala Gln Arg  
130 135 140  
His Val Cys Tyr Arg Ser Glu Arg Pro Tyr Thr Val Leu Gly Asn Met  
145 150 155 160  
Cys Lys His Val Gly Trp Lys Tyr Ser Asp Val Val Ala Asn Leu Glu  
165 170 175  
Lys Ala Arg Val Glu Lys Ala Ser Arg His His Glu Lys Gln Ala Lys  
180 185 190  
Leu Arg Asp Ala Trp Lys Ser Ala Arg Lys Glu Ala Leu Ala Lys Met  
195 200 205  
Pro Lys His Asn Val Glu Val Leu Lys Lys Phe Gly Tyr Ala  
210 215 220

<210> 29

<211> 689

<212> DNA

<213> Leishmania major

<400> 29

```

atggccttcc ctagccgcaa ggatgcgttc cgcgcgcagc gcaaggcgc caagaagcac    60
cgccccgaga tcatcgtgat cgaactgaag gatcacgtgc ttggtcgcgc ggccgctgtg    120
gttgccaagc agctgctcct ggtaagaag atcaccgtgg tgcgctgcga gcagctcaac    180
attgcgggta cggagatccg caacaagatc aagtacctgc agtaacctgc caagcgggag    240
ctgacgaacc ccacaaaggg tcccttcac caaccgtgcc cgtccgagct gtttgcctgc    300
actgtgcgca gcatgctgcc ccggtacacg aagcgcggca tgaaggcct taactcgtg    360
gtggcctacg agggattcc gcccaacgtg gtgcgcacgy gggggcgcgt ggtgatcccg    420

egcgcaccagc gccatgtgtg ctaccgctcg gagcgtcatt acacagtget cggcaaccatg    480
tgcaagcaag tgggctggaa gtacagcgac gtcgtcgcca atctcgagaa ggcctcgcgtg    540
gagaaggcgt ccgccaacca cgaaaagcag gogaagcttc ggcacgcgtg gaagtcggcc    600
cgcaaggagc cgcctgcgcaa gatgcaccaag cxcacagctgg aggtgctgaa gaagtttggc    660
tacgcgtag.                                                                    669

```

```

<210> 30
<211> 267
<212> PRT
<213> Leishmania major

```

```

<400> 30

```

Met Thr Pro Leu Ser Leu Ser Ser Ser Arg His Ser Phe Lys Gln Asn  
1 5 10 15

Glu Thr Gln Asn Met Val Ser Leu Lys Leu Gln Ala Arg Leu Ala Ser  
20 25 30

Ser Ile Leu Gly Cys Gly Arg Ala Arg Val Trp Leu Asp Pro Asn Glu  
35 40 45

Ala Val Glu Ile Gln Asn Ala Asn Ser Arg Lys Ser Val Arg Lys Leu  
50 55 60

Ile Lys Asp Gly Phe Ile Ile Arg Lys Pro Val Lys Val His Ser Arg  
65 70 75 80

Ala Arg Trp Arg Lys Met Lys Glu Ala Lys Asp Met Gly Arg His Asn  
85 90 95

Gly Val Gly Arg Arg Glu Gly Ser Arg Glu Ala Arg Met Pro Ser Lys  
100 105 110

Glu Leu Trp Met Arg Arg Leu Arg Ile Leu Arg Arg Leu Leu Arg Lys  
115 120 125

Tyr Arg Ala Asp Lys Lys Ile Asp Arg His Val Tyr Arg Asp Leu Tyr  
130 135 140

Met Arg Ala Lys Gly Asn Val Phe Arg Asn Lys Arg Asn Leu Val Glu  
145 150 155 160

His Ile His Lys Ile Lys Asn Glu Lys Lys Lys Glu Arg Gln Leu Ala  
165 170 175

Glu Gln Leu Ala Ala Lys His Leu Arg Asp Glu Gln Asn Arg Asn Lys  
180 185 190

Ala Arg Lys Gln Glu Leu Lys Lys Arg Glu Lys Glu Arg Glu Arg Ala  
195 200 205

Arg Arg Asp Asp Ala Ala Ala Ala Ala Gln Lys Lys Lys Ala Asp Ala  
210 215 220

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

Lys Ala Ala Ala Pro Ala Thr Lys Ala Ala Ala Ala Ala Pro Ala Thr  
245 250 255

Lys Gly Ala Ala Pro Val Lys Lys Ser Lys Lys  
260 265

<210> 31

<211> 804

<212> DNA

<213> Leishmania major

<400> 31

```
atgacccctc tctcctctc ttctcccg caccgtttta agcagaacga aacgcagaac 60
atggtgtctc tgaagctgca ggctgcctt ggcgcagca tctcggctg cggccgcgc 120
cggctgtggc tggaccocaa cgagcgggtg gagatccaga acgcgaactc gcgcaagagc 180
gtgcgcaagc tgatcaagga tggcttcac atccgcaagc cggtgaaggt gcactcgcgc 240
gcgccgtggc gtaaaatgaa ggagggcaag gacatggggc gccacaacgg cgttggggcg 300
cgcgagggta gccgogaggc ccgcatgcg agcaaggagt tgtggatgcg ccgcctgcgc 360
attctgcgdc gcctgctgug caagtaccgc ggggacaaga agattgaccg ccacgtgtac 420
cgcgcactgt acatgcgcgc gaagggtaac gtgttcgcga acaagcgcaa ccttctggag 480
cacatccaca agatcaagaa tgagaagaag aaggagcgcc agctggcgga gcagctcgcg 540
gcaagcacc tgcgcgagca gcagaaccgc aacaaggctc gcaagcagga gctgaagaag 600
cgcgagaagg agcgcgagcg cgcgagggcg gacgacgctg ctgcgcctgc gcagaagaag 660
aaggcggagc ccgcgaagaa gtccgcgcgc cctgctgcga agtccgcgc gcctgcgcgc 720
aaggctgtg ccccccacc gaaggccgct gctgctgcc ccgccagaa ggtgctgcg 780
cdggtgaaga agtcgaagaa gtaa 804
```

<210> 32

<211> 273

<212> PRT

<213> Leishmania major

<400> 32

Met Ala Lys Lys His Leu Lys Arg Leu Tyr Ala Pro Lys Asp Trp Met



lys

<210> 33  
 <211> 822  
 <212> CNA  
 <213> Leishmania major

<400> 33

```

atggccaaga agcaoctcaa ggccttgtat ggcgccaagg actggatgct gagcaagctg      60
accgypgtgt fcgcgcccgcg tcgcggtccg ggtccgcaca agctgcgcgs gtgcctgccc      120
ctgctggtga teatcogcaa ccggctgaag taocgcctga accgcgcgs cggtagatg      180
atcctgogcc agggctctggt gcacgtggac aaccaccgc gccgcgacgg caagtatccc      240
gccggtttca tggagctggt ccgagatccc aagcggggcg accgattccg cctgatgtac      300
gacgtcaagg gccgcttcgc gttggtgaac ctgtccgagc cggagcgca gatcaagctg      360
atgaagttg tgaacctgta cacggccacc ggcgcgctgc cggtcgctgt gacgcacgac      420
ggccacccca tccgctaccc ggaccgcac acctccattg gtgacaccat cgtgtacaac      480
gtcaaggaga agaagtgcgt ggacctgatc aagaaccgoc agggcaagcc cgtgatcgtg      540
accggtggcg ccaaccgocg ccgcctcggc gagatcgtga aggtggagtg ccaccocggt      600
gcggtcaaca ttgagcacct gaaggaacgcg tcggggcccg agttcgccac ccgcgcocgg      660
aacatcttcg tgatcggcaa ggacctgaac aacctgcagg taacggtgcc gaagcagcag      720
ggcctgcgca tgaacgtgat ccaggagcgc gaggagoccc tgatcgogcc ggaggcocgc      780
aagaacocgc cggctcgtgg tgcccgcagg gcccgcaagt ga      822
  
```

<210> 34  
 <211> 249  
 <212> PRT  
 <213> Leishmania major

<400> 34

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

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

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

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

Val Pro Gly Val Leu Ala Ser Ser Arg Val Ser Leu Leu Val Lys Arg



atgaagctca acatgcgta ccccgcaac gggacggtga agcagttoga gatctggac	60
gaggtgctcc gcgcggtgca gctgcaggac taccgectcg gcaacgaggt ggacggcgcc	120
atctttggta gcgagttcaa gggctacatc ttcgcgctgc gcggtggctc ggacaaggat	180
ggtttccgca tgytccctgy cgtgcttgcc tccagccgtg tgtcgctgct ggtgaagcgc	240
ggtgcgatcg gttcaaacac attccgcggc taccaggtg agcgcgccg caagaacgtt	300
cgcgctgctg tgcctgcgag cgcattgag ctggtgaaag tgaccatctc caaggtcgtt	360
gaccagccga tcgaggggtg gacggacacc accgctccc gccgtctggg tccgaagcgc	420
gcgagcaaga tcgcgaagct attcaacctg tccgcacccg asgacgtgag gaagtacgtt	480
gttcgcccgc gcgtcgtgaa gagcggcaag asggaccggc tgaaggcccc gaagatccag	540
cgtctgatca cgcgcagggc caaggcccgc cgtgcaaga aggccaaagga cgcctcggc	600
aaggtgcgag cgtctgcgcg tgagcgcctg gactacctgc gccttatcgc ctogaaccgc	660
cgtgcgctgc gccagcgtga ccactccaag aagcacaccc ggaaggtgca cgcgcagcgc	720
gctgaggtgg cagcattcca gaagaagtaa	750

<210> 36  
 <211> 1438  
 <212> DNA  
 <213> artificial

<220>  
 <223> protein Q

<400> 36

atgagaggat	ctcaccatca	ccatccccat	acggatccgc	atgagagctc	gaacaacaac	60
aacaataaca	ataacascaa	cttcgggata	gagggaaagg	ctttagctac	tctctgcagc	120
gccaagaagg	cgtccgcgaa	gagcggctcc	aagtcgcgga	aatgtggctc	gatcttcccg	180
gtgggcgcgc	tggcgggat	gatgcgcgc	ggccagtaag	ctgcgcgat	cggtgcctct	240
ggcgcacca	ggatttcaga	attctccgtg	aagggcgcg	cgcagagcgg	gaagsagcgg	300
tgcgcctga	accgcgcgac	cgtgatgctg	gccgcgcgc	acgacgacga	catcggcaag	360
cttctgsaga	acgtgacctt	gtctcacagc	ggcgttgtgc	cgaacctcag	caaggcgatg	420
gcaaagaaga	agggcgcgaa	gaagggcaag	gcgacaccga	gpcgcgccga	attcggatcc	480
tctagaccca	tgtccaccsa	gtacctcgcc	ggctacgctc	tggcctccct	gagcaaggcg	540
tcccgtctc	agggcgacct	ggagcctatc	tccaaggccc	tccacatcga	cgtcgaaccag	600
gccaccctcg	cccttctgat	ggagagcgtt	acgggacgcg	acgtggccac	cctgatccgc	660
gagggcgcgc	cgaagatgag	cgcgatgccg	gcygcagct	ctggtgcgc	tcttggcgtc	720
actgntccg	ctgcgggtga	tgcggctccg	gctgcgcgc	cgcggaagaa	ggaagagccc	780
gagggaggag	cgcacgacga	catgggcccc	tctagagtcg	accccatgca	gtacctcgcc	840
gcgtacgcc	tcttggcct	gtctggcaag	acgcctcga	aggcggacct	tcaggctgtc	900
ctgaaggcgc	ccggcgttgc	cgtggatgcc	tcccgcgtgg	atgccctctt	ccaggagggtg	960
gagggcaaga	gcttcgatgc	gctggtggcc	gagggccgca	cgaagctggt	ggctctggc	1020
tctgcgcctc	ctgctggcgc	tgtctccact	gctggtgccg	ccgctggcgc	ggtggccgag	1080
gccaagaagg	aggagcccg	ggaggaggag	gcgatgatg	acatgggcc	cgtcgaacctg	1140
cagccgcgcg	ctgcgcgcgc	ggcgcgccct	agcgcgcctg	ccaaggagga	gcccaggag	1200
agcgaagagg	acgacctcgg	catgggcggt	ctctctaaag	cgaactgcga	tctcttagcc	1260
tccttctggt	gcgcttgagg	tctctcgcct	ctgctctccc	ttgcagtggt	ggctgacctc	1320
ggcgggtatg	tgcctcagca	ttacaccacc	ctctccacc	cccttgcct	acgcgctcgc	1380
atgcgcaatc	cgtgaatcat	cgaaggaagt	ctctctgggt	ggcagtggt	aagctt	1436

<210> 37  
 <211> 412  
 <212> PRT  
 <213> artificial  
  
 <220>  
 <223> protein G  
  
 <400> 37

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

Ala Val His Ile Asp Val Asp Gln Ala Thr Leu Ala Phe Val Met Glu  
195 200 205

Ser Val Thr Gly Arg Asp Val Ala Thr Leu Ile Ala Glu Gly Ala Ala  
210 215 220

Lys Met Ser Ala Met Pro Ala Ala Ser Ser Gly Ala Ala Ala Gly Val  
225 230 235 240

Thr Ala Ser Ala Ala Gly Asp Ala Ala Pro Ala Ala Ala Ala Ala Lys  
245 250 255

Lys Asp Glu Pro Glu Glu Glu Ala Asp Asp Asp Met Gly Pro Ser Arg  
260 265 270

Val Asp Pro Met Gln Tyr Leu Ala Ala Tyr Ala Leu Val Ala Leu Ser  
275 280 285

Gly Lys Thr Pro Ser Lys Ala Asp Val Gln Ala Val Leu Lys Ala Ala  
290 295 300

Gly Val Ala Val Asp Ala Ser Arg Val Asp Ala Val Phe Gln Glu Val  
305 310 315 320

Glu Gly Lys Ser Phe Asp Ala Leu Val Ala Glu Gly Arg Thr Lys Leu  
325 330 335

Val Gly Ser Gly Ser Ala Ala Pro Ala Gly Ala Val Ser Thr Ala Gly  
340 345 350

Ala Ala Ala Gly Ala Val Ala Glu Ala Lys Lys Glu Glu Pro Glu Glu  
355 360 365

Glu Glu Ala Asp Asp Asp Met Gly Pro Val Asp Leu Gln Pro Ala Ala  
370 375 380

Ala Ala Pro Ala Ala Pro Ser Ala Ala Ala Lys Glu Glu Pro Glu Glu  
385 390 395 400

Ser Asp Glu Asp Asp Phe Gly Met Gly Gly Leu Phe  
405 410

<210> 38  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>

<223> primer  
 <400> 38  
 aacacgaagg agggcaaggi c 21  
 <210> 38  
 <211> 22  
 <212> DNA  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> primer  
 <400> 39  
 ctctctcgag gcccttgcc t 22  
 <210> 40  
 <211> 22  
 <212> DNA  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> primer  
 <400> 40  
 tgcacgtctg caatttggg ac 22  
 <210> 41  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> primer  
 <400> 41  
 ctctctctg ccacacagc 20  
 <210> 42  
 <211> 22  
 <212> DNA  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> primer  
 <400> 42  
 ctctctcgag gcccttgcc t 22  
 <210> 43  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> primer  
 <400> 43

cttctctgtg cgcacagcag 20

<210> 44  
 <211> 29  
 <212> DNA  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> primer

<400> 44  
 cgggatccat gctccacgic aagttogag 29

<210> 45  
 <211> 28  
 <212> DNA  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> primer

<400> 45  
 aactgcagtt acttctctgc gccctttg 28

<210> 46  
 <211> 28  
 <212> DNA  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> primer

<400> 46  
 egggatccat gtcacagcig gcaaattg 28

<210> 47  
 <211> 29  
 <212> DNA  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> primer

<400> 47  
 cccaagcttt tacttgcgga ggcgctgc 29

<210> 48  
 <211> 419  
 <212> PRT  
 <213> Leishmania infantum

<400> 48

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Tyr Asp Leu Thr Ala Lys Thr Ile Thr Pro Met Gly Gly Phe Val Gly  
305 310 315 320

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

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

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

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

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

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

Ala Lys Lys

<210> 49

<211> 1260

<212> DNA

<213> *Leishmania infantum*

<400> 49

atgtotcaact	gcaagttoga	gcacccccgc	caagccatc	toggttccct	gccggcgaag	60
cgctcgccgc	agatccggcg	ccgcgcgcgc	gcgttcccc	aggacgacgc	gacgcagaag	120
ccccacctga	cgagtttcat	ggtgttcaag	gccggcatga	cgcacattgt	gcgtgatgic	180
gatcgccctg	gatcgaaggt	gaacaagaag	gagtggtgg	agccggtgac	gattctggag	240
gcgcgcgcga	tggtgattgt	cggcattgtg	ggctacccgc	aaacgcgggt	cggtctgaag	300
acgatcggca	ccgtgtgggc	gcaccacacg	agcgtcgagt	tccgcgcgcg	ctaactacaag	360
aaactggaagc	agtctgcgca	actggccttc	tcccgccaga	agcagtttgc	gaacacgaag	420
gagggcaagg	tgcgcgaggc	gcgcacgcctg	aacgcgttcg	cgaagaaggc	gtccgtcatc	480
cgctgatcgc	cgcacacgca	gctgcgcaag	cttcgcaacc	accgcgtggg	cgtgaagaag	540
gcgcacgtgc	aggagatcca	ggtcaacggc	ggcagcgttg	cggcgaagat	cgctctggcc	600
aagtccctgc	tggagaagga	ggtgcgcctg	gactccgtgt	tccagcagtc	ggaggcctgc	660
gacgtgtgct	ccgtgacgaa	aggccacggt	acggagggcg	tggtgaagcg	ctggggcggt	720
gctgcctgc	cacgcaagac	gcaccgcggt	ctgcgcaagg	ttgcgtgcat	cggcgctggg	780
caacctgcc	gcgtcatgta	cactgtcgcg	cggccgggtc	agcacggtta	ccaccacccg	840
acgcagctga	acaagaagat	ctaccagatc	ggccgctccg	ttgctgtgga	accgaaccag	900
gcgacgacga	cctacgatct	gacggccaag	acgatcacac	ccatgggtgg	cttcgtcggc	960
tacggcacgg	tggcaacga	ctacgtgatg	ctgaagggct	ccgtgtctgg	tccgcgcgcg	1020
cgtgtgatga	cgctccgcgg	ccgatggca	ccgcagacgt	cgccccscct	gaaggagaag	1080
atcgtgctga	agttcatoga	cactagctcg	aagattggcc	acggccgctt	ccagacgaag	1140
aaggagaaga	accagtgggt	ggcccccgtc	aagaaggacc	gcctccgcgg	cgaggagcgc	1200
ctgcgcaagg	agcgcgctgc	ccgcgcgctg	gagcgcgaag	caaaggtcgc	gaagaagtaa	1260

<210> 50

<211> 419

<212> PRT

<213> Leishmania mexicana

<400> 50

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Tyr Asp Leu Thr Ala Lys Thr Ile Thr Pro Met Gly Gly Phe Val Gly  
 305 310 315 320

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

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

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

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

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

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

Ala Lys Lys

<210> 51  
 <211> 1280  
 <212> DNA  
 <213> Leishmania mexicana

<400> 51

```

atgtctcact gcaagttcga gcaccccccg caccggccatc toggcttctt gcgogcgaag    60
ogctcggggc agatccgggg ccgcccggcg gcgttcccca aggacgagcg gacgcagaag    120
ccccacctaa cgagcttcat ggtgttcaag gctggcatga cgcacattgt gctgtatgtc    180
gacggccctg gatcgaaggt gaacaagaag gagggtgggg agccggtgac gatcctggag    240
gcgcccggca tgggtattgt cggcattgtg ggttaccggc aaacgcgggt tggcctgaag    300
acgatcggca ccgtgtgggc gcaaccacag agcgtggagt tcggccggcg ctactacaag    360
aactggaagc agtctgogca gctggccttc tcccggcaga agcagttcgc gaacacgaag    420
gagggcagga togetgaggg gcgcacgctg aacggcttcg cgsagaaggg gtccgtcctc    480
cgctgtatcg cgcacacgca gctggcgaag ctccgcaacc accggctggg cgtgaagaag    540
gcgcacgtgc agggatcca gatcaacggc ggcaacgttg cggogaagat cgcgctggcc    600
aagtccctgc tggagaagga ggtgcgctc gactccgtgt tccagcagtc ggagggctgc    660
gacgtgtgct ccgtgacgaa aggtcacggg acggagggcg tggggaagcg ctggggcgtt    720
gcctgcctgc cgcgcaagac acaccggggc ctggcgaagg tggcgtgcat cggcggctgg    780
caccctgccc gcgtcatgta cactgtccgg cggcccggtc agcaccggta ccaccaccgc    840
accgagctga acaagaagat ctaccagatc ggccgctccg ttgctgtgga gccgaaccag    900
gcgacganga cctacgatct gacggccaag acgatcacgc ccatggggcg ettcgtccgc    960
tacggtacgg tgcgcaacga ctacgtgatg ctgaagggct ccgtgtctgg cccggccggc   1020
cgtgtgatga ccctgcgagc cccgatggcg ccgcagacgt cggcccagct gaaggagaag   1080
atcgtgctga agttcctcga caccagctcg aagatccggc accggccgtt ccagacgaag   1140
aaggagaaga gccagtggtt cggcccggct aagaaggacc gcctccggcg cgaggagcgc   1200
ctggcgaagy agcggcgtgc cccggccgtg gaggcgaagy caaaggccgc gaagaagtaa   1260
  
```

<210> 52  
 <211> 305  
 <212> PRT  
 <213> Leishmania infantum

<400> 52

Met Fro Phe Val Lys Val Val Lys Asn Lys Ala Tyr Phe Lys Arg Phe  
 1 5 10 15

Gln Val Lys Tyr Arg Arg Arg Arg Glu Gly Lys Thr Asp Tyr His Ala  
 20 25 30

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

Tyr Arg Leu Val Val Arg Ile Thr Asn Lys Asp Ile Ile Ala Gln Ile  
 50 55 60

Val Gln Ala Lys Ile Val Gly Asp Glu Val Val Met Ala Ala Tyr Ala  
 65 70 75 80

His Glu Leu Pro Ala Phe Gly Ile Glu His Gly Leu Thr Asn Tyr Ala  
 85 90 95

Ala Ala Tyr Ala Thr Gly Leu Leu Leu Ala Arg Arg Thr Leu Ala Lys  
 100 105 110

Leu Gly Ile Ala Asp Lys Phe Gln Gly Ala Lys Glu Ala Asp Gly Ser  
 115 120 125

Tyr Ser Ala Val Arg Thr Lys Lys Asp Asp Glu Gly Asp Asp Glu Glu  
 130 135 140

Arg Phe Pro Phe Lys Ala Ile Leu Asp Val Gly Leu Ala Arg Thr Thr  
 145 150 155 160

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

Met Ala Val Pro His Arg Pro Asn Arg Phe Pro Gly Tyr Asn Lys Glu  
 180 185 190

Lys Ser Ser Leu Asp Ala Lys Val His Arg Asp Arg Ile Phe Gly Lys  
 195 200 205

His Val Ala Glu Tyr Leu Lys Gln Val Lys Glu Glu Ala Ser Ser Asn  
 210 215 220

Pro Asp Glu Lys Cys Val Gln Phe Ser Arg Tyr Met Ala Ala Lys Val  
 225 230 235 240

Leu Pro Glu Ser Ile Gln Gly Met Tyr Lys Lys Ala His Ala Ala Ile  
 245 250 255

Arg Ala Asp Pro Ser Lys Ser Leu Pro Lys Lys Ala Lys Lys Glu Gly  
 260 265 270

Val Ala His Lys Ser Tyr Lys Thr Lys Lys Leu Ser Gly Ala Glu Lys  
 275 280 285

Arg Ala Ala Ala Lys Ala Lys Val Ala Ala Ile Arg Glu Arg Leu Gly

290

295

300

Lys  
305

<210> 53  
<211> 918  
<212> DNA  
<213> *Leishmania infantum*  
  
<400> 53

```

atgccgttcc tcsaggtcgt gaagaacaag gcgtacttca agcgccttcca ggtgaagtac   60
cgccgtcgcc gcgagggcaa gacggactac caccgcgcgc gccagatggt gctgcaggac   120
aagacgaagt tcggctcgcc caegtaccgc cttgttgtgc gcatacogaa caaggacatc   180
attgcgcaga tcgtgcagac gaagatcgtc gccgacgagg tggtagatggc ccggtaccgc   240
cacgagctgc ctgcggttcgg cattgagcac gccctgacaa actacgctgc tcggtaccgc   300
actggtctgc tcctggcgcg ccgcacgctg gcgaagctgg gcatacggga caagttccag   360
ggcgcgaagg agggggacgg ctcgtactct gctgtgcgca cgaagaagga ccgacgagggc   420
gacgacgagg agcgccttccc gttcaaggcg atcctggaag tcgggcttgc gcgcacgacg   480
accggcgccc gcgtgttcgg cgtgctgaag gccgcggtgg accgcggtat ggctgtgccc   540
caccgcccc aaccgcttccc cggctacac aaggagaaga gctcgcctgga ccgcaaggtg   600
caccgcgacc gcatactttg caagcacgtg gccgagtacc tgaagcaggt gaaggagag   660
gcgagctcga accccgacga gaagtgcgtg cagttctcga ggtacatggc ccgcaaggtt   720
ttgcgggaga gcatacaggg catgtacaag aaggcgcacg ccgcatccg ccgcgacccc   780
tcgaagctgc tcgcgaagaa gccgaagaag gagggcgtcg ccacacagag ctacaagacg   840
aagaagctga gcggcgcgga gaagagggcc gccgcgaggg cgaaggtcgc ggccatccgc   900
gagcgcctcg gcaagtaa                                     918

```

<210> 54  
<211> 305  
<212> PRF  
<213> *Leishmania mexicana*  
  
<400> 54

Met Pro Phe Val Lys Val Val Lys Asn Lys Ala Tyr Phe Lys Arg Phe  
1 5 10 15

Gln Val Lys Tyr Arg Arg Arg Arg Glu Gly Lys Thr Asp Tyr His Ala  
20 25 30

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

Tyr Arg Leu Val Val Arg Ile Thr Asn Lys Asp Ile Ile Ala Gln Ile  
 50 55 60

Val Gln Ala Lys Ile Val Gly Asp Glu Val Val Met Ala Ala Tyr Ala  
 65 70 75 80

His Glu Leu Pro Ala Phe Gly Ile Glu His Gly Leu Thr Asn Tyr Ala  
 85 90 95

Ala Ala Tyr Ala Thr Gly Leu Leu Leu Ala Arg Arg Thr Leu Ala Lys  
 100 105 110

Leu Gly Ile Ala Asp Lys Phe Gln Gly Ala Lys Glu Ala Asp Gly Ser  
 115 120 125

Tyr Ser Ala Val Arg Thr Lys Lys Asp Asp Glu Gly Asp Asp Glu Glu  
 130 135 140

Arg Phe Pro Phe Lys Ala Ile Leu Asp Val Gly Leu Ala Arg Thr Thr  
 145 150 155 160

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

Met Ala Val Pro His Arg Pro Asn Arg Phe Pro Gly Tyr Asn Lys Glu  
 180 185 190

Lys Ser Ser Leu Asp Ala Lys Val His Arg Asp Arg Ile Phe Gly Lys  
 195 200 205

His Val Ala Glu Tyr Leu Lys Gln Val Lys Glu Glu Ala Ser Ser Asn  
 210 215 220

Pro Asp Glu Lys Cys Val Gln Phe Ser Lys Tyr Met Ala Ala Lys Val  
 225 230 235 240

Leu Pro Glu Ser Ile Glu Gly Met Tyr Lys Lys Ala His Ala Ala Ile  
 245 250 255

Arg Ala Asp Pro Ser Lys Ser Leu Pro Lys Lys Ala Lys Lys Glu Ser  
 260 265 270

Val Ala His Lys Ser Tyr Lys Thr Lys Lys Leu Ser Gly Ala Glu Lys  
 275 280 285

Arg Ala Ala Ala Lys Ala Lys Val Ala Ala Ile Arg Glu Arg Leu Gly  
 290 295 300

Lys

<210> 55  
 <211> 918  
 <212> DNA  
 <213> *Leishmania mexicana*

<400> 55

```

atgccgttcg tcaaggtcgt gaagaacaag gcgtacttca agcgctttca ggtgaagtac   60
cgccgtcgcc gcgagggcaa gacggactac cacgcgcgcc gccagatggt gctgcaggac   120
aagacgaagt ttggctcgcc caagtaccgc cttgttgtgc gcctcacgaa caaggacatc   180
attgcgcaga tcgtgcagge gaagatcgtc ggcgacgagg tggatgagcc cgcgtaccgc   240
cacgagctgc ctgcgttcgg gattgagcac ggcctgacaa actacgcgcc tgcgtaccgc   300
actgggctgc tgcctggcgg ccgcacgctg gcgaagctgg gcctcgcgga caagttccag   360
ggcgcgaaag aggcggacgg ctcgtactct gctgtgcgca cgaagaagga cgcagagggc   420
gacgacgagc agcgcttccc gttcaaggcg atcctggacg tcggcctcgc gcgcaagcgc   480
accggtgccc gcgtgttcgg cgtgctgaag ggcgcggtgg accgcggtat ggctgtgccc   540
caccgcccc accgcttccc cggctacaac aaggagaaga gctcactgga cgcgaagggtg   600
caccgogacc gcctctttgg caagcacggt gcggagtacc tgaagcaggt gaaggaggag   660
gcgagctcga accccgacga gaagtgcgtg cagttctcga agtacatggc cgcgaagggtt   720
ttgccggaga gcctcgaggg catgtacaag aagggcgcag cggcgatccg cgcggacccc   780
togaagtcgc tgcgcaagaa ggcgaagaag gagagcgtcg cgcacaagag ctacaagacg   840
aagaagctga gcggcgcgga gaagagggcc gccgcgaagg cgaaggtcgc ggcctaccgc   900
gagcgctcgc gcaagtaa                                     918

```

<210> 56  
 <211> 305  
 <212> PRT  
 <213> *Leishmania braziliensis*

<400> 56

Met Pro Phe Val Lys Val Val Lys Asn Lys Ala Tyr Phe Lys Arg Phe  
1 5 10 15

Gln Val Lys Tyr Arg Arg Arg Arg Glu Gly Lys Thr Asp Tyr His Ala  
20 25 30

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

Tyr Arg Leu Val Val Arg Thr Thr Asn Lys Asp Ile Ile Ala Gln Ile  
50 55 60

Val Gln Ala Lys Ile Ala Gly Asp Glu Val Leu Met Ala Ala Tyr Ala  
65 70 75 80

His Glu Leu Pro Ala Phe Gly Ile Glu His Gly Leu Thr Asn Tyr Ala  
85 90 95

Ala Ala Tyr Ala Thr Gly Leu Leu Leu Ala Arg Arg Thr Leu Ala Lys  
100 105 110

Leu Gly Ile Ala Asp Lys Phe Gln Gly Ala Lys Glu Ala Asp Gly Ser  
115 120 125

Tyr Ser Ala Val Arg Thr Lys Lys Asp Asp Gln Gly Asp Asp Glu Ala  
130 135 140

Arg Phe Pro Phe Lys Ala Ile Leu Asp Val Gly Leu Ala Arg Thr Thr  
145 150 155 160

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

Ile Ser Val Pro His Arg Pro Asn Arg Phe Pro Gly Tyr Ser Lys Glu  
180 185 190

Lys Ser Ala Leu Asp Ala Lys Val His Arg Asp Arg Ile Phe Gly Lys  
195 200 205

His Val Ala Glu Tyr Leu Lys Gln Val Lys Glu Glu Ala Ser Ser Asn  
210 215 220

Pro Asp Glu Lys Cys Val Gln Phe Ser Lys Tyr Met Glu Ala Lys Val  
225 230 235 240

Ala Pro Glu Ser Ile Glu Cys Met Tyr Lys Lys Ala His Ala Ala Ile  
245 250 255

Arg Ala Asp Pro Ser Lys Ser Leu Pro Lys Lys Ala Lys Lys Glu Gly  
260 265 270

Ala Lys His Lys Ser Tyr Lys Thr Lys Lys Met Ser Gly Ala Glu Lys  
275 280 285

Arg Ala Ala Ala Lys Ala Lys Val Ala Ala Ile Arg Glu Arg Leu Gly  
290 295 300

Lys  
305

<210> 57  
<211> 29  
<212> DNA  
<213> artificial  
  
<220>  
<223> primer  
  
<400> 57  
cgggctccat gctccactgc aagttcggg 29

<210> 58  
<211> 30  
<212> DNA  
<213> artificial  
  
<220>  
<223> primer  
  
<400> 58  
gggatatctc cctctctcgc ggcclttgc 30

<210> 59  
<211> 32  
<212> DNA  
<213> artificial  
  
<220>  
<223> primer  
  
<400> 59  
gggatctcgg gctggccaag aagcaccica ag 32

<210> 60  
<211> 28  
<212> DNA  
<213> artificial  
  
<220>  
<223> primer  
  
<400> 60  
cggaaattctc cctgcgggc cctgcggg 28

<210> 61  
<211> 32  
<212> DNA  
<213> artificial  
  
<220>  
<223> primer  
  
<400> 61  
cggaaattcgg gatgaagctc aacatccgt ac 32

<210> 62  
<211> 32  
<212> DNA

<213> artificial

<220>

<223> primer

<400> 62

ggatatacgc cactctctcg gaatgtgccc ac 32

<210> 63

<211> 31

<212> DNA

<213> artificial

<220>

<223> primer

<400> 63

ggatatacgg gatgtgcaacg ctggcaaat g 31

<210> 64

<211> 34

<212> DNA

<213> artificial

<220>

<223> primer

<400> 64

gggtaccgg atccctactt gccgggggc tcgc 34

<210> 65

<211> 918

<212> DNA

<213> *Leishmania braziliensis*

<300> 65

atgccgttcg tcaaggtcgt gaagaacaag gcgtaactca agcgccttcca ggtgaagtac	60
cgcgcgtogcc ggcgagggcaa gacggactac caccgcacgcc gccagatggt gctgcaggac	120
aagacgaagt ttggctcacc caagtaccgc cttgttgtgc gcacgcagaa caaggacatc	180
attgcccaga tctgtccaggc gaagatccgc ggagacgagg tgctgatggc tgcgtaccgc	240
cacgagctgc ctgcgttcgg gattgagcac ggccctgacga actacgctgc ggcgtaccgc	300
acgggcctgc tgcctggcgc ccgcaacgtg gcgaagttgg gcctcggga caagttccag	360
ggcgcgaagg aggcggacgg ctccgtactct gctgtgcgca cgaagaagga cgaccagggc	420
gacgacgagg cgcgccttccc gttcaaggcg atcctggacg ttggtcttgc gcgcacgacg	480
acgggtgccc gcgtgttcgg cgtgctgaag ggccctgtgg acggcggcat ctccgtgccc	540
caaccgcccc aacgccttccc cggctacagc aaggagaaga gcgcacctga ccggaaggtg	600
caaccgtgacc gcatcttcgy caagcacgtt ggggagtacc tgaagcaggt gaaggaggag	660
gcgagctcga accctgacga gaagtgcgtg cagttctcga agtacatgga ggogaaggtt	720
gcgcacagaga gcctcagagt gatgtacaag aaggcacacg cggcgatccg cgcggacccg	780
tccaagtctc tgcggaagaa ggcgaagaag gagggcgcca agcacaagag ctacaagacg	840
aagaagatga gcggcgcgga gaagagggcc gcgcgcgagg cgaaggtcgc cgcattcgc	900
 gagcgccttg gcaagtga	 918

<210> 86

<211> 3848

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Chimeric DNA encoding L3-S4-S6-L5

<400> 86

atgtctcact gcaagttcga gcacccccgc caeaggccatc tcggcttccct gccgcgcaag 80  
cgctcgcgcc agatccgcgc cegtgcgcgc gcgttcccga aggacgaacc gacgcagaag 120  
ccccacctga cgagcttcac ggtgttcaag gccggatga cgcacattgt gogtgatgc 180  
gatcgccctg gatcgaaggt gaacaagaag gaagtggtag agccggtagc gatcctggag 240  
gogccgcoga tgggtgattgt cggcattgtg ggctacogcc aaacgcggtt tggcctgaag 300  
acgatgggca cegtgtgggc gcaccacaag agcgtcgagt tccgcccgcg ctactacaag 360  
aactggaagc agtctgcgca actggccttc tcccgcacga agcagtttgc gaacacgaag 420  
gagggcaagc tcgccgaggc ggcacgcctg aacgcgttcg cgaagaagc gtccgtcacc 480  
cgggtgatcg cgcacacgca gctgcgcaag cttcgcaccc accgcgtggg cgtgaagaag 540  
gogcaegtgc aggagatcca ggtcaacgyc ggcagcgttg cggcgaagat cgcctggccc 600  
aagtccctgc tggagaagga ggtgocgctc gactccgtgt tccagcagtc cgaggcgtgc 660  
gacgtgtgct cegtcaagaa aggcacaggt accgagggcg tggtagaagc ctggggcgtt 720  
gcctgcctgc caagcaagac gcaccgcggt ctgcgcaagg ttgcgtgcat cggcgcgtgg 780  
caccctgccc gegtcatgta cactgtcgcg cgcgcggctc agcaagttta ccaccaccgc 840  
accagcctga acaagaagat ctaccagatc ggcgcctccg ttgctgtgga gccgaaccag 900  
ggcagcgcga cctacgatct gacagccaag acgatcagc ccattgggtg cttcgtcggc 960  
tacggtacgg tgcgcaagca ctacgtgatg ctgaagggtc cegtgtctgg cccgcgcgc 1020  
cgtgtgatga cgctgcgcgc cccgatggcg ccgcagacgt cgcgccagct gaaggagaag 1080  
atcgtgctga agttcatcga caagagctcg aagatcgcc accggccgtt ccagacgaag 1140  
aaggagaaga accagtggtt cggcccgcctc aagaaggacc gcaccgcgcg cgaggagcgc 1200  
ctgcgcaagg agcgcgctgc ccgcgcctg gagcgaagg caaaggccgc gaagaagggc 1260  
gatateggga tggccaagaa gcacctcaag cgtttgatg cgcaccaagc ctggatgctg 1320  
agcaagctga cggcgtgtt cgcgcgcgt ccgcgtccgg gtccgcacaa gctgcgcgag 1380  
tgctgcgcgc tgcgtgtgat catccgcaac cggctgaagt accgcctgaa cgcgcgcgag 1440  
ggtgagatga tccgtgcgca gggctcgtg cacgtgaca accaccgcgc ccgcgacggc 1500  
aagtatccc cgggtttcat ggaagtgtc gagatcccga agacgggcga ccgcttccgc 1560

ctgatgtacg acgtcaaggc ccgcttcgag ttggtgaacc tgtccgaggg ggaggcgcag 1620  
atcaagctga tgaaggttgt gaacctgtac accgccaccg gcgcgctgac ggtcgcctgtg 1680  
acgcacgacg gccaccgcat ccgctaaccg gaccgcacac cctccattgg tganaccatc 1740  
gtgtacaacg tcaaggagaa gaagtgcgtg gacctgatca agaaccgcca gggcaaggcc 1800  
gtgatcgtga ccggtggcgc caaccgggc ccgcatcgcc agatcgtgaa ggtggagtgc 1860  
caccocggtg cgttcaacat tgcgcacctg aaggacgctt ccggcgccga gttcgcaccc 1920  
cgcgcgcga acatcttctg gatcggcaag gacctgaaca acctgcaggt aacggtgccc 1980  
aagcagcagg gcctgcgcat gaacgtgatc caggagcgcg aggagcgctt gatcgcggcg 2040  
gaggcccgca agaaccgccc ggctcgttgt gccgcaggg ccgcgaagg agaattcggg 2100  
atgaagctca acatcgcgta ccccccgaac gggacggtga agcagttcga gatctcggac 2160  
gaggtgctcc gcgcgctgca gctgcaggac taccgcctcg gcaaccaggt ggaccggccc 2220  
atctttggtg gcgagttcaa gggctacatc ttcgcctgc ccggtggctc gacacaaggat 2280  
ggttcccgga tggctcctgg cgtgcttgc tccagccgtg tgtcgtctct ggtgaagccc 2340  
ggtcgcatcg gcttcaaac cttccgggc taccagggtg agcgcgcgc caagaacggt 2400  
cgcgctgag tctcgcgag cgcacattgg ctggtgacg tgaccatctc caaggtcggg 2460  
gaccagccga tccaggggtg gacggacacc ccgctcccc gcgctctggg tcogaagccc 2520  
gcgagcaaga tccgcaagct cttcaacctg tccgcaccg aagacgtgc gaagtaagtt 2580  
gttcgcgcgc gcgtcgtgaa gaggcgcaag aaggaccggc tgaaggcccc gaagatccag 2640  
cgtctgatca cgcagaggt caaggccgc cgtgcaca gaagcaagga cgcctatgcc 2700  
aagtgccgc cgtctgcgc tgagcgcctt ggtacactgc gccttatcgc ctogaacccc 2760  
cgtgcgctgc gccagcgtga ccactccaag aagcacccc ggaaggtgca cgcaccgcgc 2820  
gctgaggtgg cagcattcca gaagaagga gatatcggga tgtgcacgct ggcaaatgg 2880  
gtacgcgcta tcatcaagaa acaactcaaca ctgcgccaca cactcgagat gccgttctc 2940  
aaggtcgtga agaacaaggc gtacttcaag cgttccagg tgaagtacc cgtcgcgcgc 3000  
gaggcaaga ccgactaca ccgcgcgcgc cagatcgtgc tgcaggacaa gacgaagttc 3060  
ggctcgcaca agtacgcct tgttgtgccc atcacgaca aggacatcat tgcgcagatc 3120  
gtgcaggcga agatcgtcgc ccagcaggtg gtgatggccg cgtacgcga cgagctgct 3180  
gcgttcggca ttgagcagc cctgacaaac tccgtctctg cgtacgcga tggctctctg 3240  
ctggcgcgc gccgcctgca gaagctgggc atcgcgaca agttccagg ccgcaaggag 3300  
gcggaagcct cgtactctgc tgtgcgcac aagaaggac ccgagggcga cgcagaggag 3360  
cgtttcctt tcaaggcgat cctggacgtc ggccttgcgc gcaacgcga ccgcccgcgc 3420  
gtgttcggcg tctgaaggc ccggtggac ggcgtctctg ctgtgcgca ccgcccacac 3480  
cgttccccg gctacaacaa ggagaagagc tgcgtggac cgaaggtgca ccgcaaccgc 3540

atctttggca agcacgtggc ggactacctg aagcaggtga aggaggaggc gagctcgaac	3600
cctgacgaga agtgcgtgca gttctcgaag tacatggccg cgaaggtttt gccggagagc	3660
atcgagggca tgtacaagaa ggcgcacgcg gcgatccqcg cggacccgta gaagtcgctg	3720
ccgaagaagg cgaagaagga gggcgtcgcg cacaagagct acaagacgaa gaagctgagc	3780
ggcgcggaga agagggccgc cgcgaagcgc aaggtcgcgg ccataccgca gcgcctcggc	3840
aagtaa	3846

<210> 67

<211> 1281

<212> PRT

<213> Artificial

<230>

<233> Chimeric protein L3-S4-S6-L5

<400> 67

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Arg Val Ile Ala His Thr Gln Leu Arg Lys Leu Arg Asn His Arg Val

				165					170					175				
Gly	Val	Lys	Lys	Ala	His	Val	Gln	Glu	Ile	Gln	Val	Asn	Gly	Gly	Ser			
			180					185					190					
Val	Ala	Ala	Lys	Ile	Ala	Leu	Ala	Lys	Ser	Leu	Leu	Glu	Lys	Glu	Val			
		195					200					205						
Arg	Val	Asp	Ser	Val	Phe	Gln	Gln	Ser	Glu	Ala	Cys	Asp	Val	Cys	Ser			
		210				215					220							
Val	Thr	Lys	Gly	His	Gly	Thr	Glu	Gly	Val	Val	Lys	Arg	Trp	Gly	Val			
		225			230					235								240
Ala	Cys	Leu	Pro	Arg	Lys	Thr	His	Arg	Gly	Leu	Arg	Lys	Val	Ala	Cys			
				245					250					255				
Ile	Gly	Ala	Trp	His	Pro	Ala	Arg	Val	Met	Tyr	Thr	Val	Ala	Arg	Ala			
			260					265					270					
Gly	Gln	His	Gly	Tyr	His	His	Arg	Thr	Gln	Leu	Asn	Lys	Lys	Ile	Tyr			
		275					280					285						
Gln	Ile	Gly	Arg	Ser	Val	Ala	Val	Glu	Pro	Asn	Gln	Ala	Thr	Thr	Thr			
		290				295					300							
Tyr	Asp	Leu	Thr	Ala	Lys	Thr	Ile	Thr	Pro	Met	Gly	Gly	Phe	Val	Gly			
		305			310					315					320			
Tyr	Gly	Thr	Val	Arg	Asn	Asp	Tyr	Val	Met	Leu	Lys	Gly	Ser	Val	Ser			
				325					330					335				
Gly	Pro	Arg	Arg	Arg	Val	Met	Thr	Leu	Arg	Arg	Pro	Met	Ala	Pro	Gln			
			340					345					350					
Thr	Ser	Arg	Gln	Leu	Lys	Glu	Lys	Ile	Val	Leu	Lys	Phe	Ile	Asp	Thr			
		355					360					365						
Ser	Ser	Lys	Ile	Gly	His	Gly	Arg	Phe	Gln	Thr	Lys	Lys	Glu	Lys	Asn			
		370				375					380							
Gln	Trp	Phe	Gly	Pro	Leu	Lys	Lys	Asp	Arg	Ile	Arg	Arg	Glu	Glu	Arg			
					390					395					400			
Leu	Arg	Lys	Glu	Arg	Ala	Ala	Arg	Ala	Val	Glu	Arg	Lys	Ala	Lys	Ala			
				405					410						415			
Ala	Lys	Lys	Gly	Asp	Ile	Gly	Met	Ala	Lys	Lys	His	Leu	Lys	Arg	Leu			
			420					425					430					

Tyr Ala Pro Lys Asp Trp Met Leu Ser Lys Leu Thr Gly Val Phe Ala  
 435 440 445

Pro Arg Pro Arg Pro Gly Pro His Lys Leu Arg Glu Cys Leu Pro Leu  
 450 455 460

Leu Val Ile Ile Arg Asn Arg Leu Lys Tyr Ala Leu Asn Ala Arg Glu  
 465 470 475 480

Gly Glu Met Ile Leu Arg Gln Gly Leu Val His Val Asp Asn His Pro  
 485 490 495

Arg Arg Asp Gly Lys Tyr Pro Ala Gly Phe Met Asp Val Val Glu Ile  
 500 505 510

Pro Lys Thr Gly Asp Arg Phe Arg Leu Met Tyr Asp Val Lys Gly Arg  
 515 520 525

Phe Ala Leu Val Asn Leu Ser Glu Ala Glu Ala Gln Ile Lys Leu Met  
 530 535 540

Lys Val Val Asn Leu Tyr Thr Ala Thr Gly Arg Val Pro Val Ala Val  
 545 550 555 560

Thr His Asp Gly His Arg Ile Arg Tyr Pro Asp Pro His Thr Ser Ile  
 565 570 575

Gly Asp Thr Ile Val Tyr Asn Val Lys Glu Lys Lys Cys Val Asp Leu  
 580 585 590

Ile Lys Asn Arg Gln Gly Lys Ala Val Ile Val Thr Gly Gly Ala Asn  
 595 600 605

Arg Gly Arg Ile Gly Glu Ile Val Lys Val Glu Cys His Pro Gly Ala  
 610 615 620

Phe Asn Ile Ala His Leu Lys Asp Ala Ser Gly Ala Glu Phe Ala Thr  
 625 630 635 640

Arg Ala Ala Asn Ile Phe Val Ile Gly Lys Asp Leu Asn Asn Leu Gln  
 645 650 655

Val Thr Val Pro Lys Gln Gln Gly Leu Arg Met Asn Val Ile Gln Glu  
 660 665 670

Arg Glu Glu Arg Leu Ile Ala Ala Glu Ala Arg Lys Asn Ala Pro Ala  
 675 680 685

Arg Gly Ala Arg Arg Ala Arg Lys Gly Glu Phe Gly Met Lys Leu Asn  
 690 695 700

Ile Ala Tyr Pro Arg Asn Gly Thr Val Lys Gln Phe Glu Ile Ser Asp  
 705 710 715 720

Glu Val Leu Arg Arg Val Gln Leu Gln Asp Tyr Arg Leu Gly Asn Glu  
 725 730 735

Val Asp Gly Ala Ile Phe Gly Ser Glu Phe Lys Gly Tyr Ile Phe Arg  
 740 745 750

Leu Arg Gly Gly Ser Asp Lys Asp Gly Phe Pro Met Val Pro Gly Val  
 755 760 765

Leu Ala Ser Ser Arg Val Ser Leu Leu Val Lys Arg Gly Ala Ile Gly  
 770 775 780

Phe Asn Thr Phe Arg Gly Tyr Gln Gly Glu Arg Arg Arg Lys Asn Val  
 785 790 795 800

Arg Gly Cys Val Leu Ala Ser Asp Ile Ala Leu Val Asn Val Thr Ile  
 805 810 815

Ser Lys Val Gly Asp Gln Pro Ile Glu Gly Val Thr Asp Thr Thr Ala  
 820 825 830

Pro Arg Arg Leu Gly Pro Lys Arg Ala Ser Lys Ile Arg Lys Leu Phe  
 835 840 845

Asn Leu Ser Arg Thr Glu Asp Val Arg Lys Tyr Val Val Arg Arg Arg  
 850 855 860

Val Val Lys Ser Gly Lys Lys Asp Arg Leu Lys Ala Pro Lys Ile Gln  
 865 870 875 880

Arg Leu Ile Thr Pro Arg Val Lys Ala Arg Arg Ala Lys Lys Ala Lys  
 885 890 895

Asp Ala Ile Ala Lys Val Arg Ala Ser Ala Ala Glu Arg Arg Glu Tyr  
 900 905 910

Leu Arg Leu Ile Ala Ser Asn Arg Arg Ala Leu Arg Gln Arg Asp His  
 915 920 925

Ser Lys Lys His Thr Arg Lys Val His Ala Gln Arg Ala Glu Val Ala  
 930 935 940

Ala Phe Gln Lys Lys Gly Asp Ile Gly Met Cys Thr Leu Ala Asn Trp  
945 950 955 960

Val Arg Ala Ile Ile Lys Lys His Ser Thr Leu Ala His Thr Leu Glu  
965 970 975

Met Pro Phe Val Lys Val Val Lys Asn Lys Ala Tyr Phe Lys Arg Phe  
980 985 990

Gln Val Lys Tyr Arg Arg Arg Arg Glu Gly Lys Thr Asp Tyr His Ala  
995 1000 1005

Arg Arg Gln Met Val Leu Gln Asp Lys Thr Lys Phe Gly Ser Pro  
1010 1015 1020

Lys Tyr Arg Leu Val Val Arg Ile Thr Asn Lys Asp Ile Ile Ala  
1025 1030 1035

Gln Ile Val Gln Ala Lys Ile Val Gly Asp Glu Val Val Met Ala  
1040 1045 1050

Ala Tyr Ala His Glu Leu Pro Ala Phe Gly Ile Glu His Gly Leu  
1055 1060 1065

Thr Asn Tyr Ala Ala Ala Tyr Ala Thr Gly Leu Leu Leu Ala Arg  
1070 1075 1080

Arg Thr Leu Ala Lys Leu Gly Ile Ala Asp Lys Phe Gln Gly Ala  
1085 1090 1095

Lys Glu Ala Asp Gly Ser Tyr Ser Ala Val Arg Thr Lys Lys Asp  
1100 1105 1110

Asp Glu Gly Asp Asp Glu Glu Arg Phe Pro Phe Lys Ala Ile Leu  
1115 1120 1125

Asp Val Gly Leu Ala Arg Thr Thr Thr Gly Ala Arg Val Phe Gly  
1130 1135 1140

Val Leu Lys Gly Ala Val Asp Gly Gly Met Ala Val Pro His Arg  
1145 1150 1155

Pro Asn Arg Phe Pro Gly Tyr Asn Lys Glu Lys Ser Ser Leu Asp  
1160 1165 1170

Ala Lys Val His Arg Asp Arg Ile Phe Gly Lys His Val Ala Asp  
1175 1180 1185

Tyr Leu Lys Gln Val Lys Glu Glu Ala Ser Ser Asn Pro Asp Glu

1190						1195						1200			
Lys	Cys	Val	Gln	Phe	Ser	Lys	Tyr	Met	Ala	Ala	Lys	Val	Leu	Pro	
1205						1210					1215				
Glu	Ser	Ile	Glu	Gly	Met	Tyr	Lys	Lys	Ala	His	Ala	Ala	Ile	Arg	
1220						1225					1230				
Ala	Asp	Pro	Ser	Lys	Ser	Leu	Pro	Lys	Lys	Ala	Lys	Lys	Glu	Gly	
1235						1240					1245				
Val	Ala	His	Lys	Ser	Tyr	Lys	Thr	Lys	Lys	Leu	Ser	Gly	Ala	Glu	
1250						1255					1260				
Lys	Arg	Ala	Ala	Ala	Lys	Ala	Lys	Val	Ala	Ala	Ile	Arg	Glu	Arg	
1265						1270					1275				
Leu	Gly	Lys													
1280															

<210> 68  
 <211> 308  
 <212> DNA  
 <213> Leishmania infantum

<400> 88

```

atggtactc ctgcagcgc caagaagcc gtccgcaaga gggctccaa gtccggaaa    60
tgtggtctga ttttccngt gggcgcgto ggcgggatga tgcgcgggg ccagtaagct    120
cgccgcacatg gtgcctctgg cgcctgtac ctggcgcgg tgcgggagta cctgacggcg    180
gagctgctgg agctgtccgt gaaggcggcc ggcgcgagcg ggaagaagcg gtgcccctg    240
aaccgcggca ccgtgatgct ggcgcgcgc cagcagcag acatcggcac gottctgaag    300
aacgtgacct tgtatcacg cggcgttgb cgaacatca gcaaggcagat gcaaaagsag    360
aaggggggca agaagggcaa ggcgacccg agcgcgtaa    399

```

<210> 88  
 <211> 338  
 <212> DNA  
 <213> Leishmania infantum

<400> 89

```

atggcctctt atcctctctg tccccgcaag gcttcccacg cgcacaagtc gcaccgcaag    60
ccgaagcgtc cgtggaacgt gtaactgggc cgtctcctga aggcgatcaa cgtcccagatg    120
tcgatgtcgc accgcacgat gagcctcgtg aactcgtacg tgaacgacgt gatggagcgc    180
atctgcatgg aggcgcgctc gatcgttctg gcaacaaga agcgcacggt gggctgcgcgc    240
gaggctcaga cggcggctgc cattgtcctg ccggcggagc tcgcgaagca cgtccatggt    300
gagggcacga aggcctgtc gagcgcctg gcttga                                     336

```

<210> 70  
<211> 330  
<212> DNA  
<213> Leishmania infantum

<400> 70

```

atgtcccga ccaaggagc cgtcccgcg aagggcacca tcactcga gaagagcaag    60
aagggccga gggggcgtc cggcgtgaa aggtcctatc gccgctggcg ccggggcacc    120
tgcgcgatcc gcgagatcc caagttccag aagagtaaga gacctctgat ccagtgcgcg    180
cgttccagc gctcgtgctg aggtgtcgc cggcagaagg agggcctgag ctccagagc    240
agcgtatca tggcgtgca ggaggcagc gaggcgtaca ttgtgtcct gatggcggac    300
accgaactcg cctgcattca cgcgaagcgc gtgacgatcc agccgaagga catccagctg    360
gcgctgcgcc tgcgcggtg gcgccactag                                     390

```

<210> 71  
<211> 303  
<212> DNA  
<213> Leishmania infantum

<400> 71

```

atggccaagg gcaagcgtc cactgatgcc aagggcagcc agaggcgcga gaagaaggtg    60
ctgcgcgaca acatccgcgg cactactctg ggtcgcctc gccgcctggc ggcgcgcggt    120
ggcgtgaaag ccatctcagc cagaggtgac gaagaggtgc gccgtgtgct gaaggcctac    180
gtggaggaca ttgtgcgctg cagcacggcc taacccagat accgcgcgaa gaagaccgtg    240
accgcgtgct atgttctgac cgcctcgcgc aagcaaggcc acatcctgta cggctacgcg    300
taa                                                                                   303

```

<210> 72  
<211> 336  
<212> DNA  
<213> Leishmania infantum

<400> 72

```

atgtccacca agtacctcgc cgggtacgct ctggcctccc tgagcaaggc gtccccgtct 60
caggcggagc tggaggttat ctgcaaggcc gtccacatcg acgtcgacca ggccaccctc 120
gcctttgtga tggagagcgt tacgggacgc gacgtggcca cctgatcgc ggagggcgcc 180
gogaagatga ggcgatgcc ggccgccagc tctggtgccg ctgctggcgt cactgcttec 240
gctgcccgtg atgcggccc ggctgcgcc gcccggaaga aggacgagcc cgagagggag 300
gcccagcagc acatgggctt cggctctgtc gactaa 336

```

<210> 73  
<211> 972  
<212> DNA  
<213> Leishmania infantum

<400> 73

```

atgcggtcta tcaccactgc caagcggag tacgaggagc gcctcgtcga ctgacctgac 60
aagtacagct gcgtgctgtt cgtggccatg gacaacgtcc gctcgcagca ggtgcacgat 120
gtggcccgct cgcctgcgcg gaagccggag ttcattgatg gcaagaagac gctgcagggc 180
aagatcgttg agaagcggc gcaagccaag gacgcgagcc ccgagggcga gcaactdaac 240
gatcagtggt aggagctaca cctgctgagc ggcaaacacc gcctcactct caccgaacaa 300
gctgtccagg agatcacgtc tgtgcttgac ggcacccgcg tgaagcggc ggccgctgtc 360
ggagcgattt ccccgtgtga cgtgattgtc gctgctggca gcaccggcat ggagccgacc 420
cagacgtcct tcttcaggc gctgaacatt gogacgaaga ttgccaaagg tatggtggag 480
atcgtgacgy agaagaaggt gctgagcgtc ggcgacaagg tggacaactc gacggcgacg 540
ctgctgcaaa agctgaacat cagcccgttc tactaccagg tgaatgtgct gtcctgtgtg 600
gacccgggtg tgctgttca ccccgaggac ctgatgatga ccgagagcat ggtggagsag 660
atgotgatgg aaggcctgag caacgttgcg gogatggcgc tgggtgctgy catcccagc 720
tcttcagcga ttggcccgat gctggtggac gccttcaga acctgctggc tgtctctgtg 780
ggacactcgt acgagttoga ggagcaaac ggcaaggagc tgcgcgaggc ccgatcaac 840
ggcctgctgy ccggctcttg ctggctgct gggagaccgc ccgctgcgc gccggccgcc 900
cctagcgcgc ctgccaaaga ggagccggag gagagcgac aggacgactt ccgcatgggc 960
ggtctcttct aa 972

```

## Reivindicações

1. Uma fonte de proteína L5 ribossomal que exhibe propriedades imunogénicas para utilização num método para tratar ou prevenir ou retardar uma doença parasítica num indivíduo, em que a referida fonte de L5 é um polipeptídico compreendendo uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 60% de identidade de sequência ou similaridade com a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 3 e/ou que é codificado por uma sequência nucleotídica que tem pelo menos 60% de identidade com SEQ ID NO: 4 ou em que a referida fonte L5 é um nucleico compreendendo uma sequência de ácido nucleico que tem pelo menos 60% de identidade de sequência com a sequência de nucleótidos SEQ ID NO: 4 e/ou que codifica uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 60% de identidade ou similaridade com SEQ ID NO: 3, em que a similaridade entre duas sequências de aminoácidos é determinada comparando a sequência de aminoácidos e seus substitutos de aminoácidos conservados de um polipéptido para a sequência de um segundo polipéptido utilizando o computador programa BLAST X com a matriz de comparação BLOSUM62, sendo o referido segundo polipéptido definido pela SEQ ID NÃO com que a similaridade deve ser determinada.

2. Fonte de proteína L5 ribossomal para utilização de acordo com a reivindicação 1, em que uma fonte S4 e/ou S6 e/ou L3 é combinada com a referida fonte L5, em que:

a referida fonte de S4 é um polipéptido compreendendo uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 60% de identidade de sequência ou similaridade com a sequência de

aminoácidos SEQ ID NO: 32 e/ou que é codificada por uma sequência de nucleótidos que tem pelo menos 60% de identidade com SEQ ID NO: 33 ou a referida fonte S4 é um ácido nucleico compreendendo uma sequência de ácido nucleico que tem pelo menos 60% de identidade de sequência com a sequência nucleótido SEQ ID NO: 33 e/ou que codifica uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 60%

identidade ou similaridade com SEQ ID NO: 32;

a referida fonte S6 é um polipéptido compreendendo uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 60% de identidade de sequência ou similaridade com a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 34 e/ou que é codificada por uma sequência de nucleótidos que tem pelo menos 60% de identidade com SEQ ID NO: 35 ou a referida fonte S6 é um ácido nucleico compreendendo uma sequência de ácido nucleico que tem pelo menos 60% de identidade de sequência com a sequência nucleotídica SEQ ID NO: 35 e/ou que codifica uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 60% da identidade ou similaridade com SEQ ID NO: 34;

a referida fonte de L3 é um polipéptido compreendendo uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 60% de identidade de sequência ou similaridade com a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 1 e/ou que é codificada por uma sequência de nucleótidos que tem pelo menos 60% de identidade com SEQ ID NO: 2 ou a referida fonte de L3 é um ácido nucleico compreendendo uma sequência de ácido nucleico que tem pelo menos 60% de identidade de sequência com a sequência nucleotídica SEQ ID NO: 2 e/ou que codifica uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 60%

identidade ou similaridade com a SEQ ID NO: 1.

3. Uma fonte de proteína L5 ribossomal para utilização de acordo com a reivindicação 1 ou 2, em que está presente um adjuvante.

4. Uma fonte de proteína L5 ribossomal para utilização de acordo com a reivindicação 3, em que o referido adjuvante é um adjuvante promotor de Th1.

5. Fonte de proteína L5 ribossômica para utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, em que as proteínas L3 e/ou L5 e/ou S4 e/ou S6 como definido na reivindicação 1 ou 2 é uma vacina.

6. Uma fonte de proteína L5 ribossomal para utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, em que o L3 e/ou L5 e/ou S4 e/ou S6 como definido na reivindicação 1 ou 2 é uma proteína, um fragmento de proteína, um péptido, um ácido nucleico.

7. Composição farmacêutica compreendendo uma fonte de proteica L5 ribossomal exibindo propriedades imunogênicas, em que a referida fonte L5 é um polipéptido compreendendo uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 60% de identidade de sequência ou similaridade com a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 3 e/ou que é codificada por uma sequência de nucleótidos que tem pelo menos 60% de identidade com SEQ ID NO: 4 ou; em que a referida fonte L5 é um ácido nucleico compreendendo um ácido nucleico

que tem pelo menos 60% de identidade de sequência com a sequência de nucleótidos SEQ ID NO: 4 e/ou que codifica uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 60% de identidade ou similaridade com SEQ ID NO: 3; onde a similaridade é avaliada como indicado na reivindicação 1.

8. Processo de acordo com a reivindicação 7, caracterizado por uma fonte S4 e/ou S6 e/ou L3 estar compreendida na referida composição, em que: A referida fonte de S4 é um polipéptido compreendendo uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 60% de identidade de sequência ou similaridade com a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 32 e/ou que é codificada por uma sequência de nucleótidos que tem pelo menos 60% de identidade com SEQ ID NO: 33 ou

a referida fonte S4 é um ácido nucleico compreendendo uma sequência de ácido nucleico que tem pelo menos 60% de identidade de sequência com a sequência nucleotídica SEQ ID NO: 33 e/ou que codifica uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 60% de identidade ou similaridade com SEQ ID NO: 32; a referida fonte S6 é um polipéptido compreendendo uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 60% de identidade de sequência ou similaridade com a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 34 e/ou que é codificada por uma sequência de nucleótidos que tem pelo menos 60% de identidade com SEQ ID NO: 35 ou a referida fonte S6 é um ácido nucleico compreendendo uma sequência de ácido nucleico que tem pelo menos 60% de identidade de sequência com a sequência nucleotídica SEQ ID NO: 35 e/ou que codifica uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 60% de identidade ou similaridade com SEQ ID NO: 34;

a referida fonte de L3 é um polipéptido compreendendo uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 60% de identidade de sequência ou similaridade com a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 1 e/ou que é codificada por uma sequência de nucleótidos que tem pelo menos 60% de identidade com SEQ ID NO: 2 ou 3, a referida fonte L3 é um ácido nucleico compreendendo uma sequência de ácido nucleico que possui pelo menos 60% de identidade de sequência com a sequência de nucleótidos SEQ ID NO: 2 e/ou que codifica um amino que tem pelo menos 60% de identidade ou similaridade com SEQ ID NO: 1.

9. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 7 ou 8, compreendendo ainda um adjuvante.

10. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 9, em que o referido adjuvante é um adjuvante promotor de Th1.

11. Processo de acordo com uma qualquer das reivindicações 7 a 10, caracterizado pelo facto de compreender um composto farmacêuticamente aceitável adjuvante e/ou transportador.

12. Composição farmacêutica de acordo com qualquer uma das reivindicações 7 a 11, para utilização como medicamento.

13. Composição farmacêutica para utilização de acordo com a reivindicação 12, em que o referido medicamento é uma vacina.

14. Utilização de uma fonte de proteína L5 ribossomal que exibe propriedades imunogénicas, em que a referida fonte L5 é um polipéptido compreendendo uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 60% de identidade de sequência

ou similaridade com a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 3 e/ou que é codificada por uma sequência de nucleótidos que tem pelo menos 60% de identidade com SEQ ID NO: 4 ou;

em que a referida fonte de L5 é um ácido nucleico compreendendo uma sequência de ácido nucleico que tem pelo menos 60% de identidade de sequência com a sequência nucleotídica SEQ ID NO: 4 e/ou que codifica uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 60% de identidade

ou similaridade com a SEQ ID NO: 3; para o diagnóstico in vitro de uma doença parasitária num indivíduo, em que a similaridade é avaliada como indicado na reivindicação 1.

15. Utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6 ou 14, em que a fonte L3 e/ou L5 e/ou S4 e/ou S6 tal como definida na reivindicação 1 ou 2 é obtida a partir de uma espécie de leishmânia.

16. Uma fonte de proteína L5 ribossomal que exibe propriedades imunogénicas para utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6 ou utilização de acordo com a reivindicação 14 ou 15, em que a doença parasitária é leishmaniose ou malária e/ou em que o parasita é causada por uma leishmânia ou por uma espécie de plasmodium e/ou em que a doença parasitária é causada por uma espécie diferente da espécie da qual a fonte L5 é derivada.

17. Método para diagnosticar uma doença parasítica num indivíduo utilizando uma fonte de proteína ribossômica de L5, exibindo propriedades imunogênicas propriedades em que a referida fonte L5 é um polipéptido compreendendo uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 60% de identidade de sequência ou similaridade com a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 3 e/ou que é codificada por uma sequência de nucleótidos que tem pelo menos 60% de identidade com SEQ ID NO: 4 ou; em que a referida fonte de L5 é um ácido nucleico compreendendo uma sequência de ácido nucleico que tem pelo menos 60% de identidade de sequência com a sequência nucleótido SEQ ID NO: 4 e/ou que codifica uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 60% de identidade ou similaridade com a SEQ ID NO: 3; o método compreendendo determinar se um anticorpo que reconhece a referida fonte está presente numa amostra obtida do sujeito, em que a similaridade é avaliada como indicado na reivindicação 1.

18. Dispositivo de ensaio para o diagnóstico de uma doença parasitária num indivíduo, em que o dispositivo compreende uma proteína ribossômica L5 apresentando propriedades imunogênicas, em que a referida fonte L5 é um polipéptido compreendendo uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 60% de identidade de sequência ou similaridade com a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 3 e/ou que é codificada por uma sequência de nucleótidos que tem pelo menos 60% de identidade com SEQ ID NO: 4 ou; em que a referida fonte de L5 é um ácido nucleico compreendendo uma sequência de ácido nucleico que tem pelo menos 60% de identidade de sequência com a sequência nucleotídica SEQ ID NO: 4 e/ou que codifica

uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 60% de identidade ou similaridade com a SEQ ID NO: 3

em que a similaridade é avaliada como indicado na reivindicação 18. Ensaio de acordo com a reivindicação 18, em que o referido ensaio é uma ELISA.

Lisboa, 12 de Janeiro de 2017

Fig 1

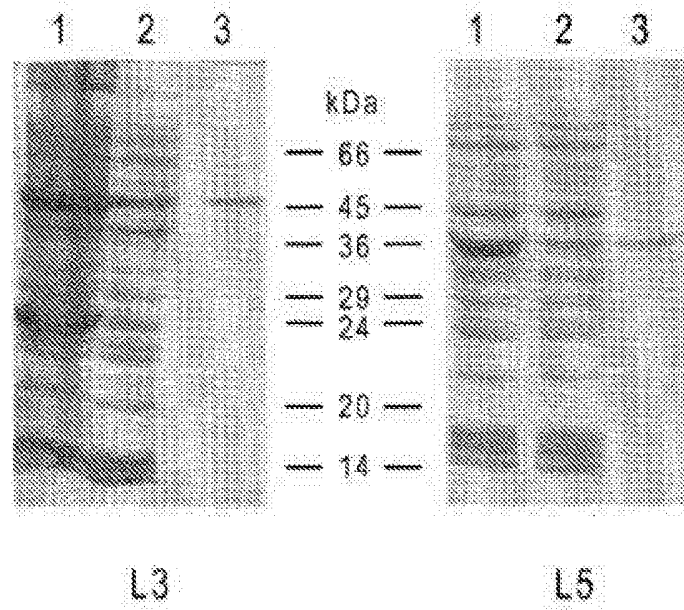


Fig 2a

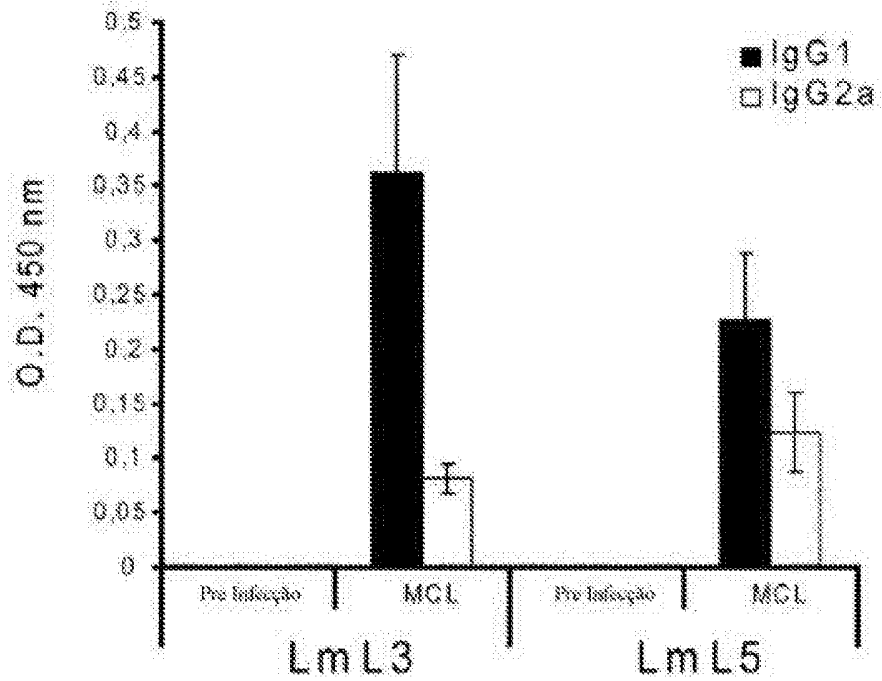


Fig 2b

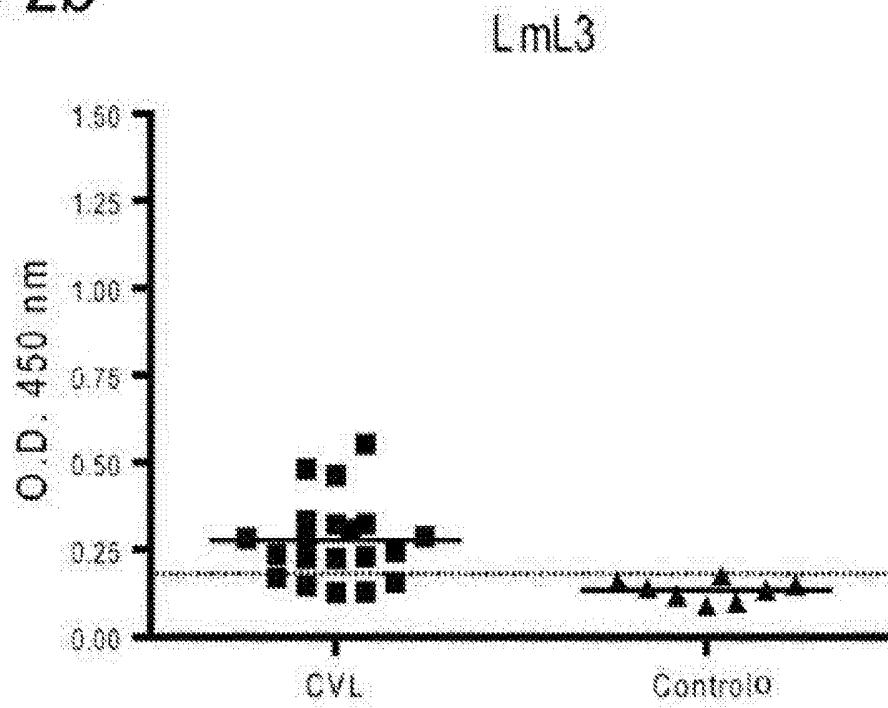


Fig 2c

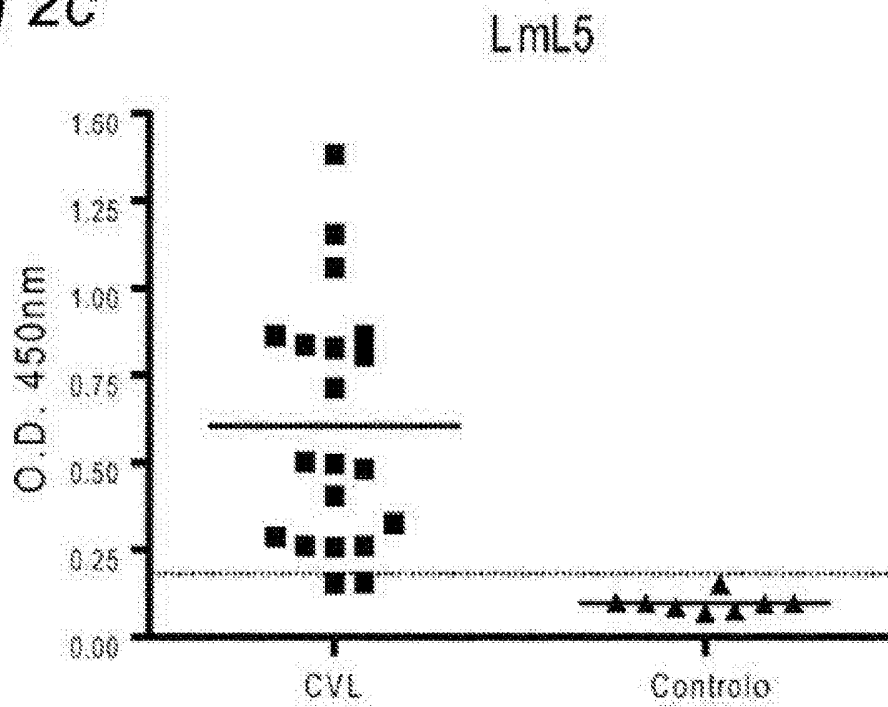


Fig 3a

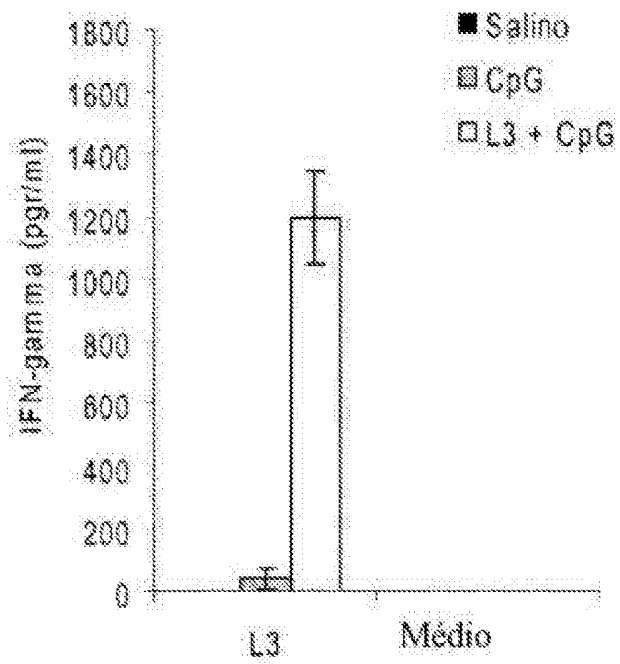


Fig 3b

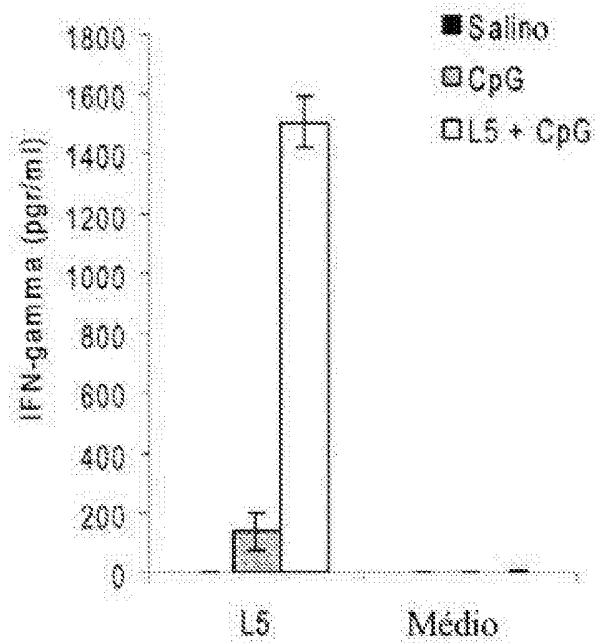


Fig 3c

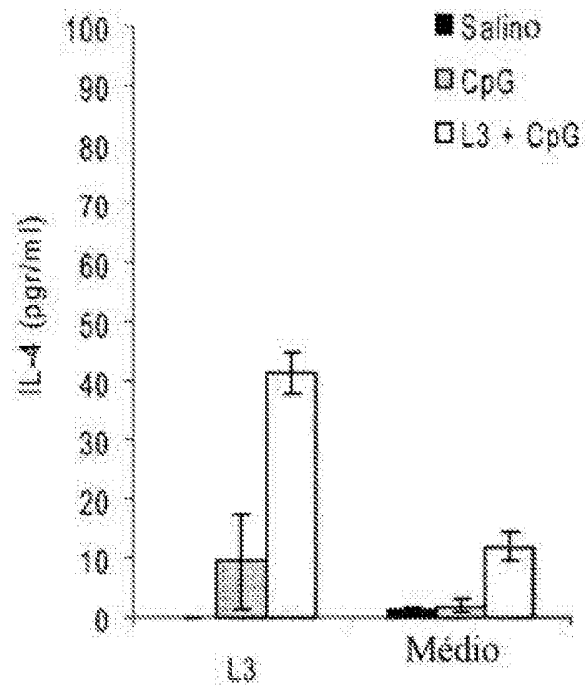
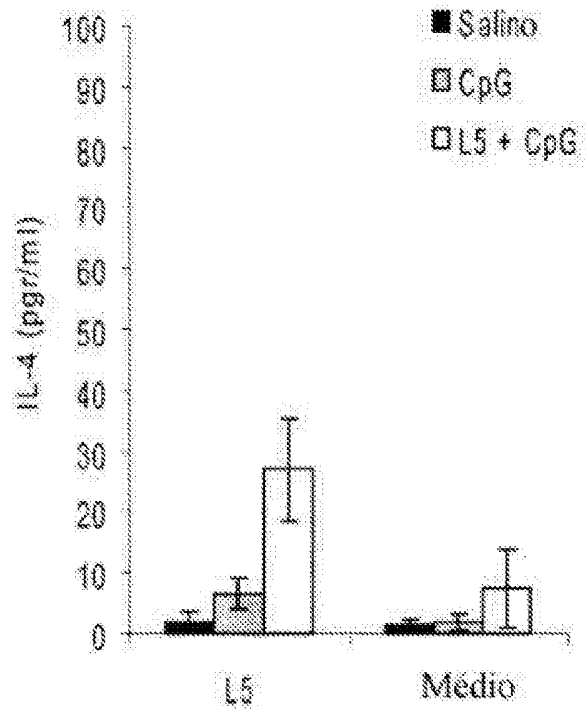
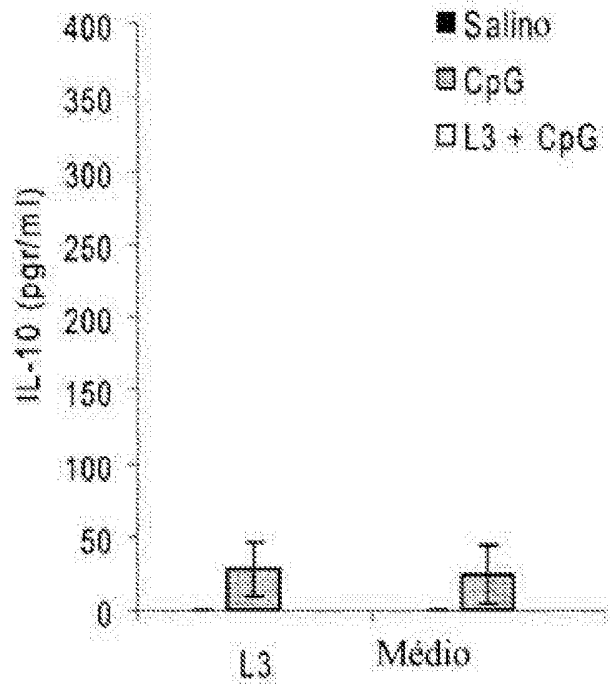


Fig 3d



*Fig 3e*



*Fig 3f*

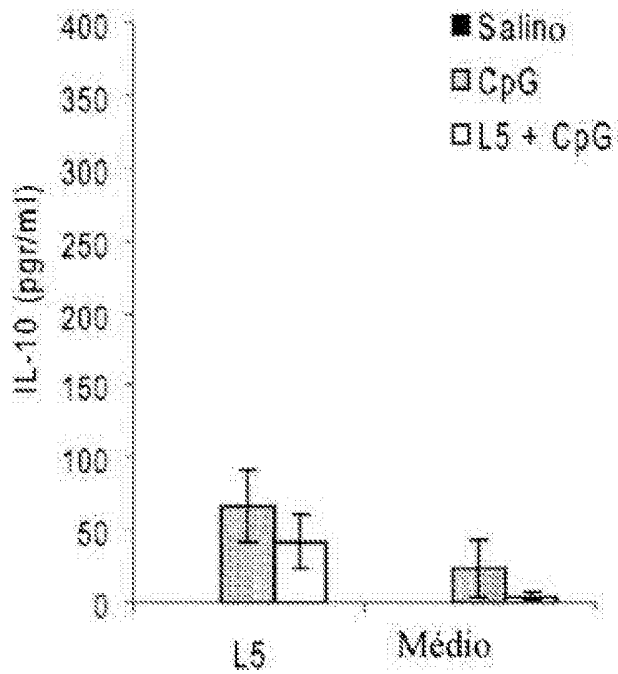


Fig 4a

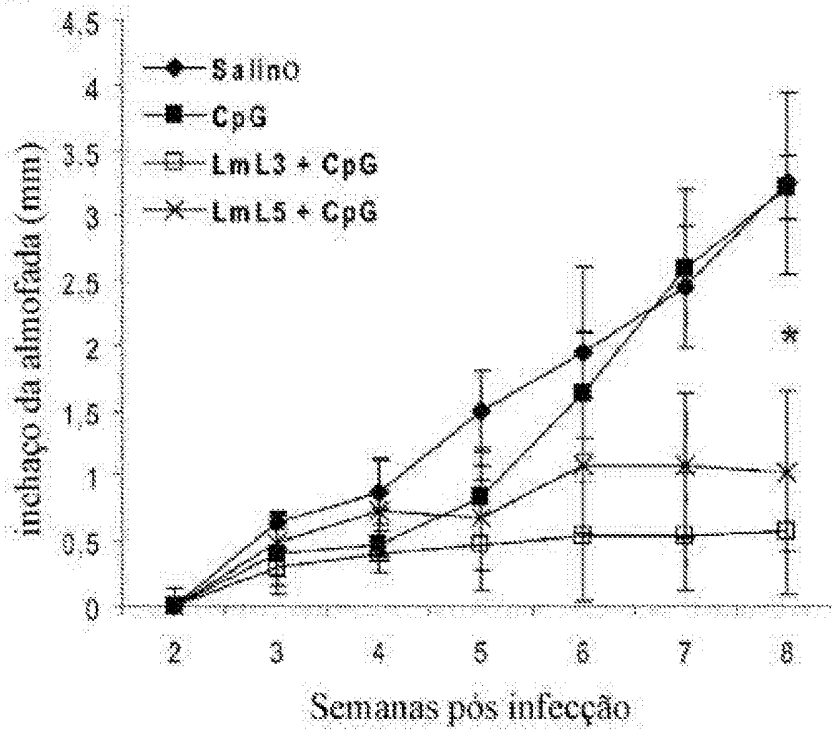
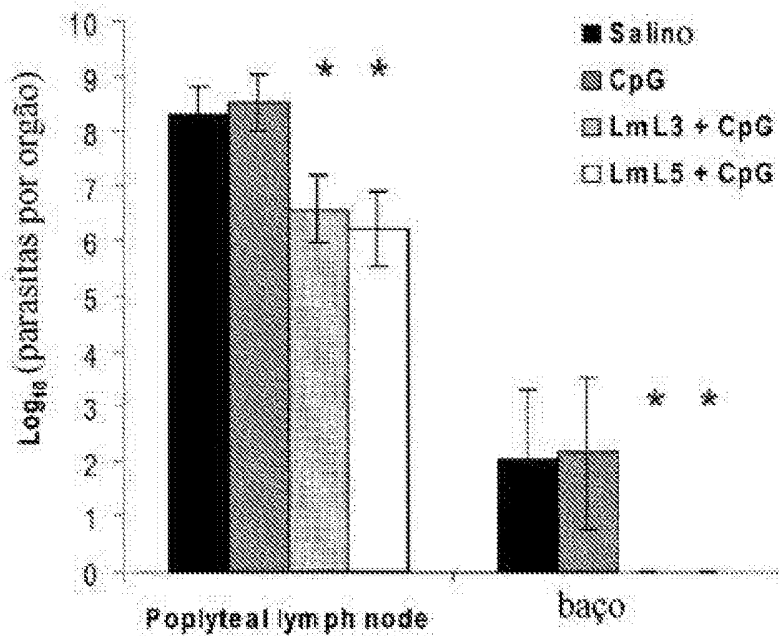
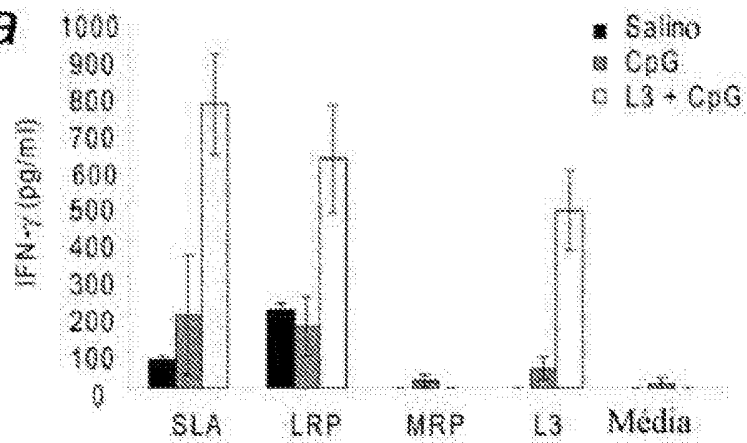


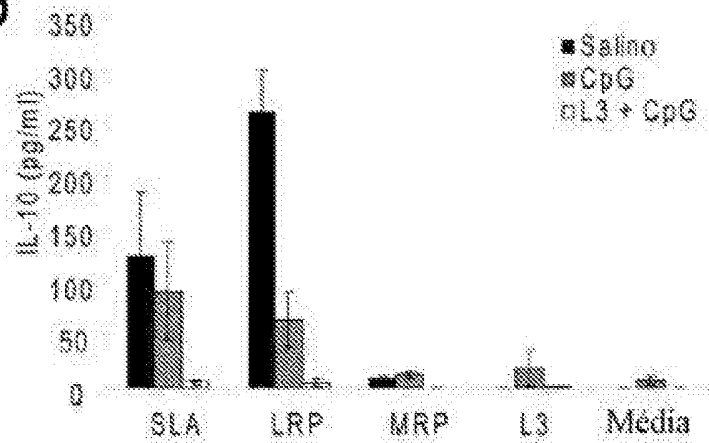
Fig 4b



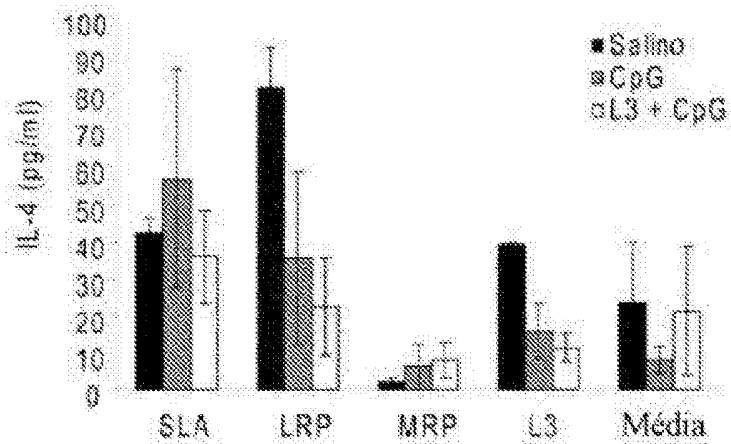
**Fig 5a**



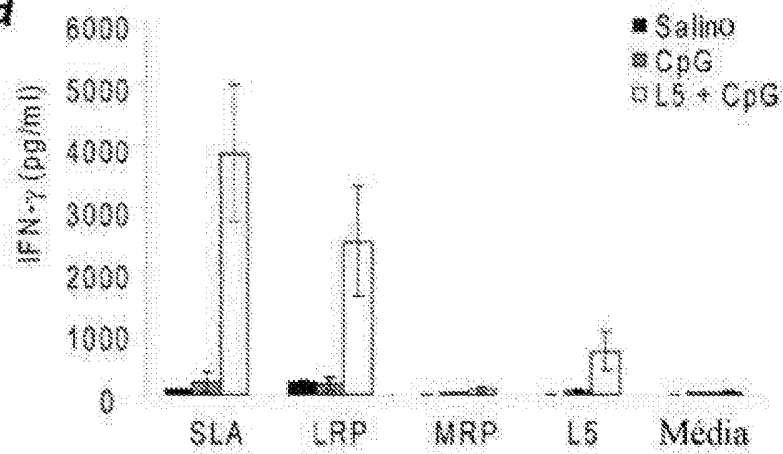
**Fig 5b**



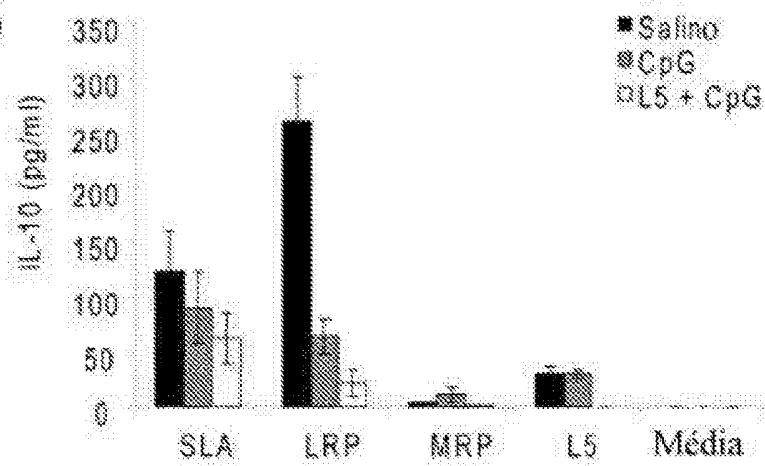
**Fig 5c**



**Fig 6a**



**Fig 6b**



**Fig 6c**

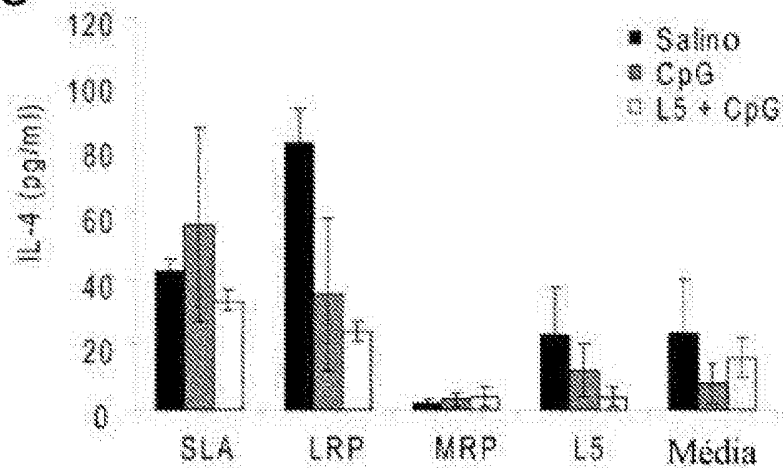


Fig 7a

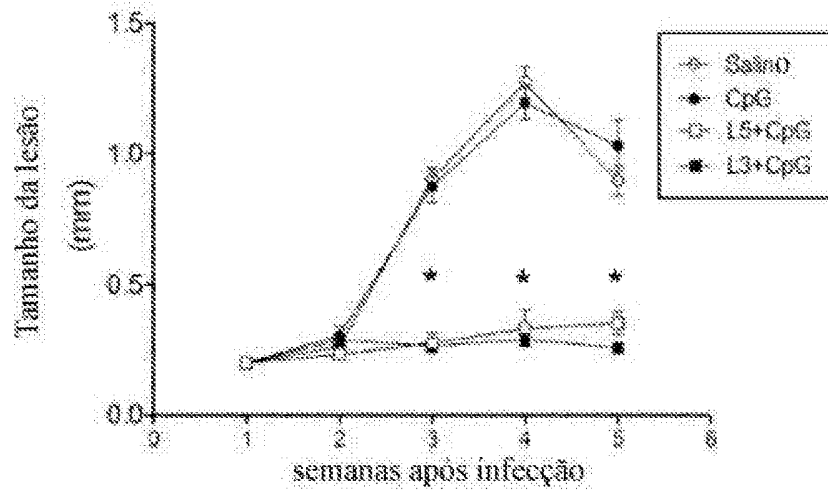


Fig 7b

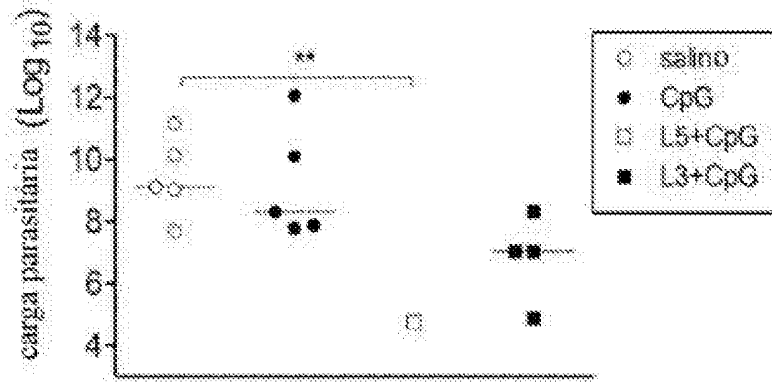


Fig 8a

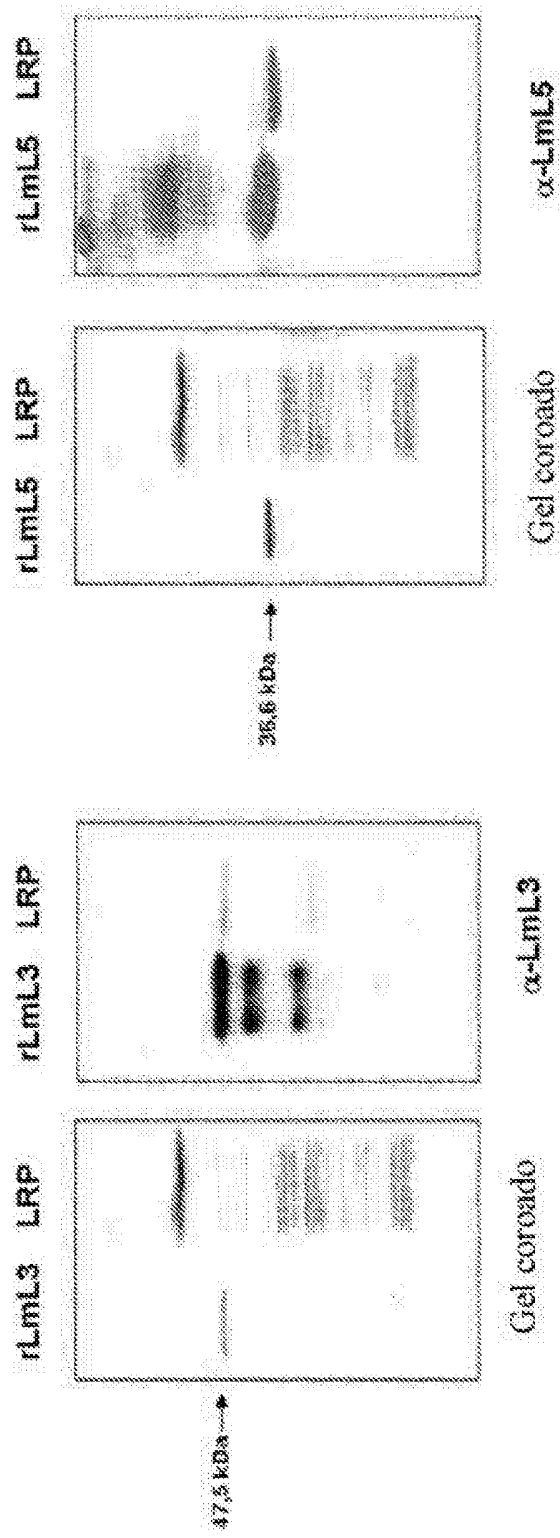


Fig 8b

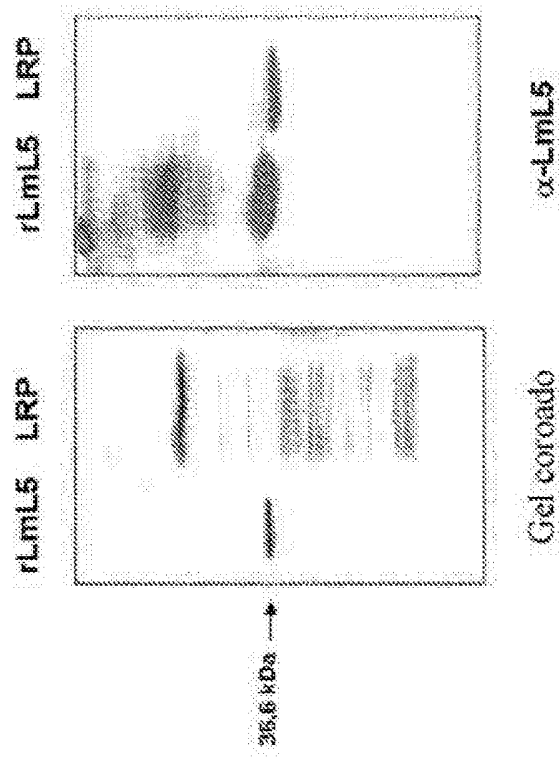


Fig 9a

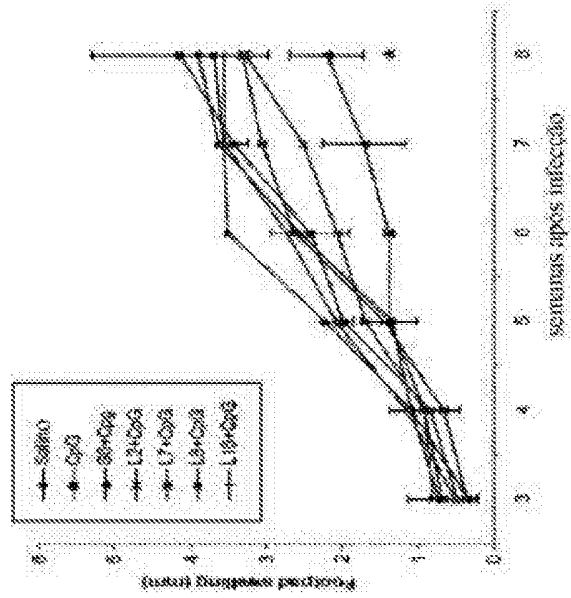


Fig 9b

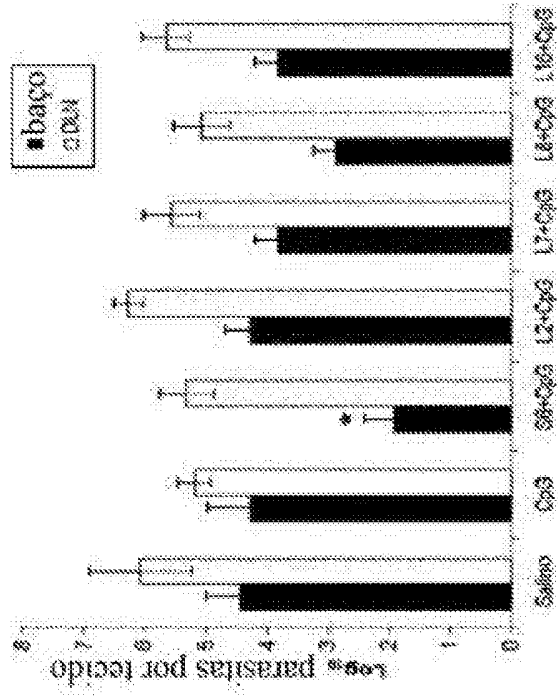


Fig 10a

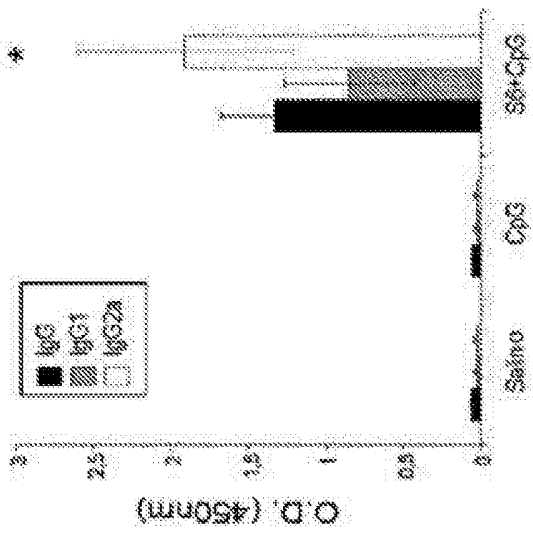


Fig 10b

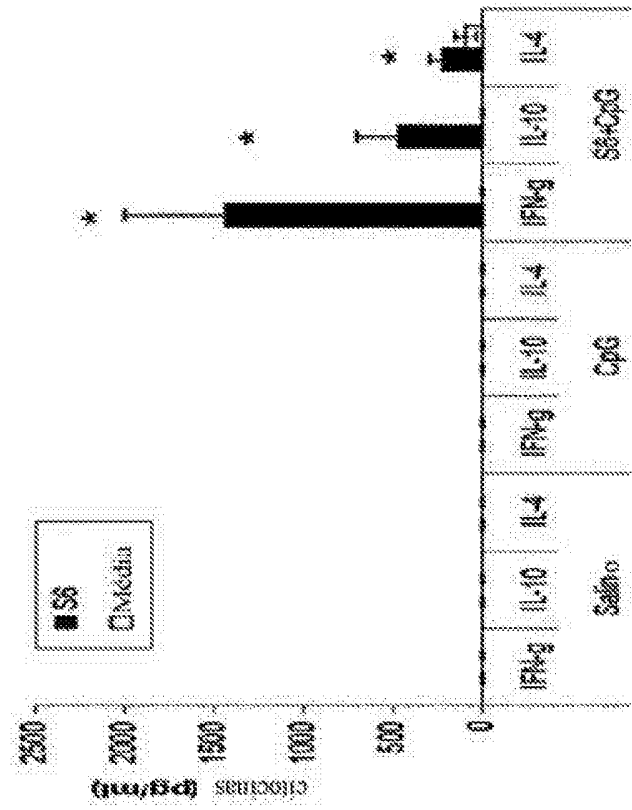


Fig 11a

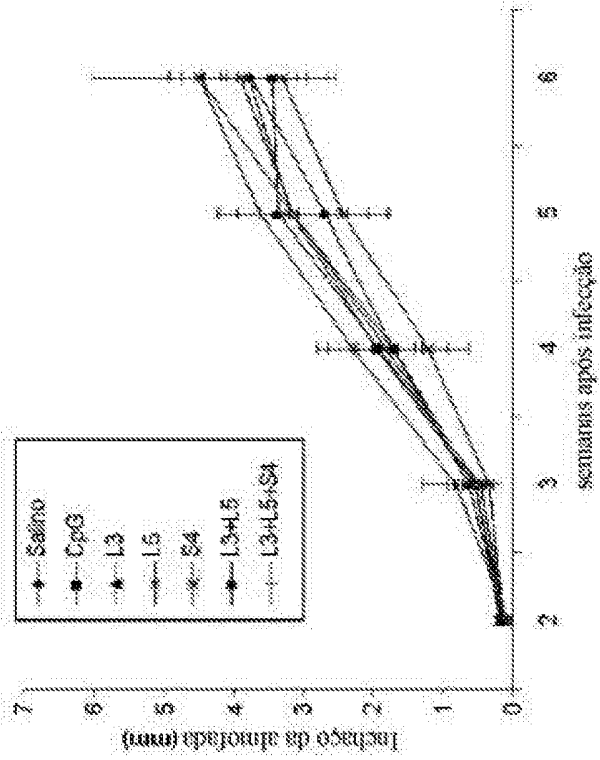


Fig 11b

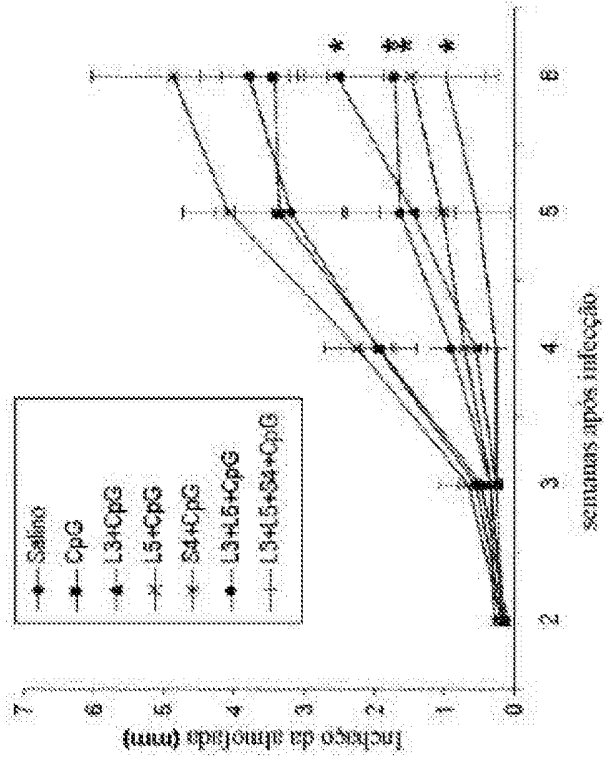


Fig 11a

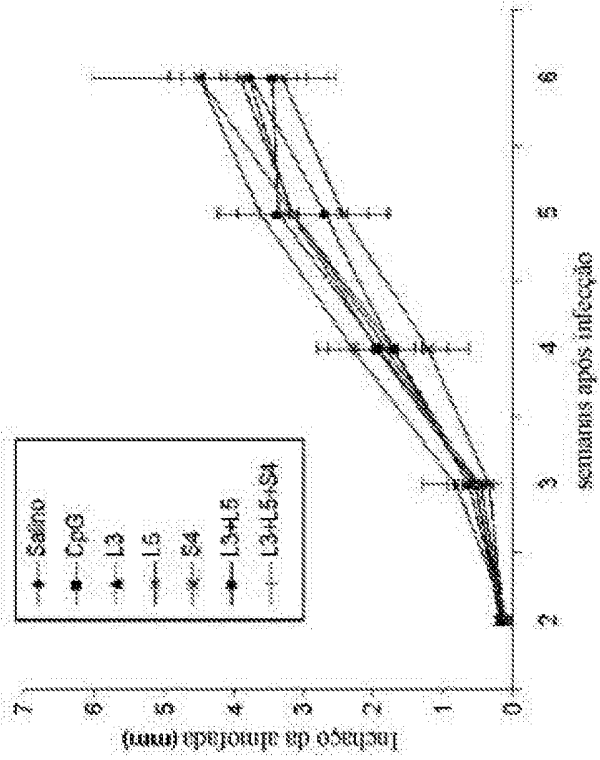


Fig 11b

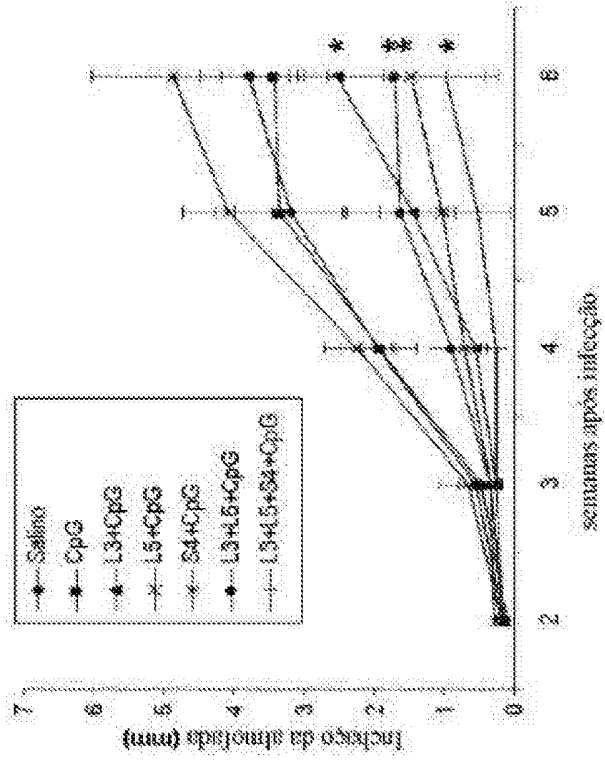


Fig 12a

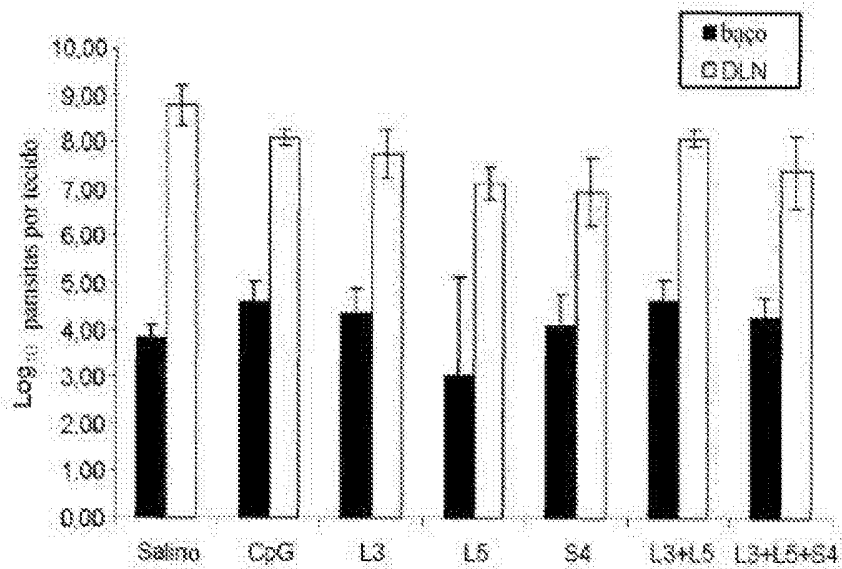
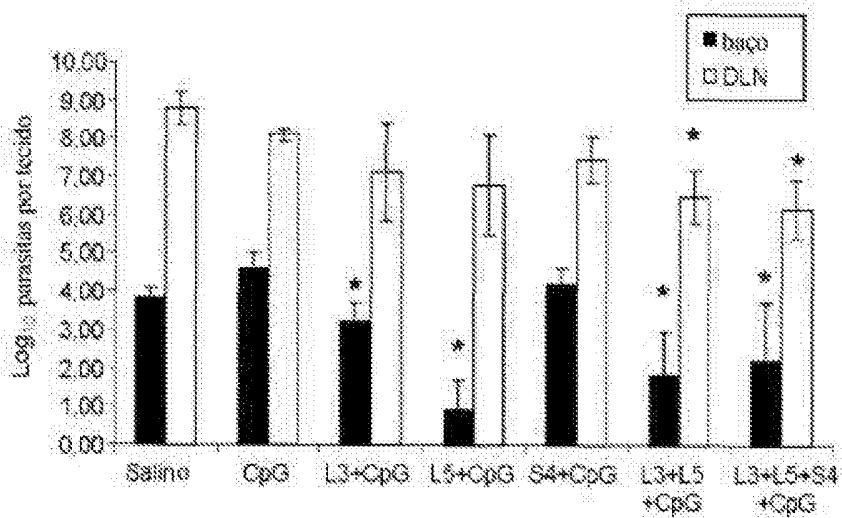


Fig 12b



**Fig 13**

	Primarios	Enzimas de restrição
Lml3	<p>57 Forward 5'-CGGATCCAGATGCTCTACTCCCAAGTTTCAG-3'</p> <p>58 Reverse 5'-GCGATATCTCCCTTCTTCGCGGCGCTTTCGC-3'</p>	BamHI/EcoRV
Lml4	<p>59 Forward 5'-GGATATCTGGATGGCGAGAGACACACCTCCAG-3'</p> <p>60 Reverse 5'-CGGATCTCCCTTCGGGGCCCTCCGCGG-3'</p>	EcoRV/EcoRI
Lml5	<p>61 Forward 5'-CGGATTCGGGATGATGACCTCACATCTCCTAC-3'</p> <p>62 Reverse 5'-GCGATATCTCCCTTCTTCGGAATGCTTCGAC-3'</p>	EcoRV/EcoRV
Lml5	<p>63 Forward 5'-GCGATTCGGGATGATGACCTCACATCTCCTAC-3'</p> <p>64 Reverse 5'-GCGGATCCGATCTTACTTTCGGGAGCCACTCCG-3'</p>	EcoRV (BamHI)EcoRI