

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200780021420.6

[51] Int. Cl.

G12N 15/00 (2006.01)

C07K 4/12 (2006.01)

C07K 2/00 (2006.01)

C07K 19/00 (2006.01)

A61K 39/008 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

[43] 公开日 2009年6月24日

[11] 公开号 CN 101466831A

[22] 申请日 2007.4.10

[21] 申请号 200780021420.6

[30] 优先权

[32] 2006.4.10 [33] US [31] 60/791,226

[32] 2006.4.13 [33] US [31] 60/744,798

[32] 2007.4.10 [33] US [31] 11/733,440

[86] 国际申请 PCT/US2007/066338 2007.4.10

[87] 国际公布 WO2007/121184 英 2007.10.25

[85] 进入国家阶段日期 2008.12.9

[71] 申请人 传染病研究所有限公司

地址 美国华盛顿州

[72] 发明人 S·G·里德 后藤康之

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 刘冬 刘玥

权利要求书7页 说明书44页 序列表66页
附图5页

[54] 发明名称

用于诊断和治疗利什曼病的化合物和方法

[57] 摘要

公开了提供用于诊断、预防、治疗和检测利什曼病感染并刺激患者免疫应答的化合物和方法。所公开的化合物包括多肽和融合蛋白或它们的变体，其含有一种或多种利什曼原虫抗原的至少一个免疫原性部分。另外，公开了从筛选文库中筛选出具有免疫原性的串联重复蛋白质的方法。描述了可以用于预防和治疗利什曼病以及检测利什曼病感染的包含多核苷酸、多肽、融合蛋白及其变体的疫苗和药物组合物。

1. 用于检测对象中利什曼原虫感染的方法，所述方法包括：

(a)在足以使样本中的抗体发生结合的条件和持续时间下，使疑有利什曼原虫感染的对象的生物样品与一种或多种多肽接触，其中每种多肽包含至少一个串联重复单位，其中所述串联重复单位包含以下氨基酸序列：具有选自 SEQ ID NO: 1-59 的氨基酸序列的至少 8 个邻接的氨基酸并与这些氨基酸序列有至少 70%的同源性；和

(b)检测所述生物样品中的与所述多肽特异性结合的一种或多种抗体的存在情况，从而检测出在所述生物样品中的利什曼原虫感染。

2. 权利要求 1 的用于检测在生物样品中利什曼原虫感染的方法，其中所述一种或多种多肽各包含至少两个串联重复单位，其中各个串联重复单位包含以下氨基酸序列：具有选自 SEQ ID NO: 1-59 的氨基酸序列的至少 8 个邻接的氨基酸并与这些氨基酸序列有至少 70%的同源性。

3. 权利要求 1 的方法，其中所述一种或多种多肽中的至少一种为包含至少第一和第二串联重复单位的融合蛋白，其中所述第一串联重复单位包含以下氨基酸序列：具有选自 SEQ ID NO: 1-59 的氨基酸序列的至少 8 个邻接的氨基酸并与这些氨基酸序列有至少 70%的同源性；而所述第二串联重复单位包含以下氨基酸序列：具有选自 SEQ ID NO: 1-59 的氨基酸序列的至少 8 个邻接的氨基酸并与这些氨基酸序列有至少 70%的同源性。

4. 权利要求 3 的方法，其中所述第一串联重复单位和第二串联重复单位是同一的。

5. 权利要求 3 的方法，其中所述第一串联重复单位具有所述第二串联重复单位的至少 8 个邻接的氨基酸并与第二串联重复单位有至少 70%的同源性。

6. 权利要求 1、权利要求 2 或权利要求 3 的方法，其中串联重复单位包含以下氨基酸序列：具有选自 SEQ ID NO: 14、17、26、27、

33、43、44 的氨基酸序列的至少 8 个邻接的氨基酸并与这些氨基酸序列有至少 70%的同源性。

7. 权利要求 1、权利要求 2 或权利要求 3 的方法，其中检测临床的或亚临床的内脏利什曼病感染，其中至少一个串联重复单位包含以下氨基酸序列：具有选自 SEQ ID NO: 14、26、33、44 的氨基酸序列的至少 8 个邻接的氨基酸并与这些氨基酸序列有至少 70%的同源性。

8. 权利要求 1、权利要求 2 或权利要求 3 的方法，其中检测临床的或亚临床的内脏利什曼病，其中至少一个串联重复单位包含以下氨基酸序列：具有选自 SEQ ID NO: 17、27、43 的氨基酸序列的至少 8 个邻接的氨基酸并与有至少 70%的同源性。

9. 权利要求 1、权利要求 2 或权利要求 3 的方法，其中所述一种或多种多肽与固相支持体结合。

10. 权利要求 9 的方法，其中所述一种或多种多肽与固相支持体非共价结合。

11. 权利要求 9 的方法，其中所述固相支持体包含硝基纤维素、胶乳或塑料。

12. 权利要求 9 的方法，其中检测一种或多种抗体的步骤包括：

(a)从所述固相支持体去除非结合的样品；

(b)使检测试剂暴露至所述固相支持体；和

(c)测定相对于预定截断值的、与所述固相支持体结合的抗体水平，从而检测所述生物样品中的利什曼原虫感染。

13. 用于检测生物样品中利什曼原虫感染的诊断试剂盒，所述诊断试剂盒包含：

(a)一种或多种多肽，其中各种所述多肽包含至少一个串联重复单位，其中所述串联重复单位包含以下氨基酸序列：具有选自 SEQ ID NO: 1-59 的氨基酸序列的至少 8 个邻接的氨基酸并与这些氨基酸序列有至少 70%的同源性；和

(b)检测试剂。

14. 权利要求 13 的诊断试剂盒，所述诊断试剂盒还包含多肽，所

述多肽包含在 SEQ ID NO: 119 阐述的氨基酸序列的并与该氨基酸序列有至少 70%的同源性的至少 8 个邻接氨基酸。

15. 权利要求 13 的诊断试剂盒, 所述诊断试剂盒还包含多肽, 所述多肽包含选自 SEQ ID NO: 119-121 的氨基酸序列的并与这些氨基酸序列有至少 70%同源性的至少 8 个邻接氨基酸。

16. 包含至少第一和第二串联重复单位的融合蛋白, 其中所述第一串联重复单位包含以下氨基酸序列: 具有选自 SEQ ID NO: 1-59 的氨基酸序列的至少 8 个邻接的氨基酸并与这些序列有至少 70%的同源性; 而所述第二串联重复单位包含以下氨基酸序列: 具有选自 SEQ ID NO: 1-59 的氨基酸序列的至少 8 个邻接的氨基酸并与这些序列有至少 70%的同源性。

17. 编码多肽的分离的多核苷酸, 所述多肽选自: (i)包含至少一个串联重复单位的多肽, 其中所述串联重复单位包含以下氨基酸序列: 具有选自 SEQ ID NO: 1-59 的氨基酸序列的至少 8 个邻接的氨基酸并与这些氨基酸有至少 70%的同源性, (ii)包含至少两个串联重复单位的多肽, 其中每个串联重复单位包含以下氨基酸序列: 具有选自 SEQ ID NO: 1-59 的氨基酸序列的至少 8 个邻接的氨基酸并与这些氨基酸有至少 70%的同源性, 和(iii)包含融合蛋白的多肽, 所述融合蛋白包含至少第一和第二串联重复单位, 其中所述第一串联重复单位包含以下氨基酸序列: 具有选自 SEQ ID NO: 1-59 的氨基酸序列的至少 8 个邻接的氨基酸并与这些氨基酸有至少 70%的同源性, 和其中所述第二串联重复单位包含以下氨基酸序列: 具有选自 SEQ ID NO: 1-59 的氨基酸序列的至少 8 个邻接的氨基酸并与这些氨基酸有至少 70%的同源性。

18. 权利要求 17 的多核苷酸, 所述多核苷酸包含以下核苷酸序列: 具有选自 SEQ ID NO: 60-118 的序列的至少 24 个邻接的核苷酸并与这些序列有至少 70%的同源性。

19. 包含权利要求 18 的多核苷酸的重组表达载体。

20. 用权利要求 19 的表达载体转化的宿主细胞。

21. 包含生理学上可接受的载体和一种或多种多肽的药物组合物，其中每种多肽包含至少一个串联重复，其中串联重复单位包含以下氨基酸序列：具有选自 SEQ ID NO: 1-59 的氨基酸序列的至少 8 个邻接的氨基酸并与这些氨基酸有至少 70% 的同源性。

22. 包含至少一种权利要求 16 的融合蛋白和生理学上可接受的载体的药物组合物。

23. 包含免疫刺激剂和一种或多种多肽的免疫原性组合物，其中每种多肽包含至少一个串联重复单位，其中所述串联重复单位包含以下氨基酸序列：具有选自 SEQ ID NO: 1-59 的氨基酸序列的至少 8 个邻接的氨基酸并与这些氨基酸有至少 70% 的同源性。

24. 包含免疫刺激剂和一种或多种权利要求 16 的融合蛋白的免疫原性组合物。

25. 权利要求 20 或权利要求 21 的免疫原性组合物，所述免疫原性组合物还包含递药载体。

26. 在患者中诱导保护性免疫对抗利什曼病的方法，所述方法包括给予权利要求 21 和 22 中任一项的药物组合物。

27. 在患者中诱导保护性免疫对抗利什曼病的方法，所述方法包括给予权利要求 23 和 24 中任一项的免疫原性组合物。

28. 诊断、治疗或免疫接种患者或血液供给的免疫原性多肽的筛选方法，所述方法包括：

(a) 构建多核苷酸筛选文库；

(b) 表达(a)的表达产物；

(c) 通过使所述表达产物与生物样品接触，筛选所述筛选文库的表达产物；和

(d) 分析通过筛选所述筛选文库的表达产物而鉴定的序列，以选出为串联重复基因的基因，从而选出含串联重复的免疫原性多肽。

29. 权利要求 28 的方法，所述方法还包括步骤：当分析通过筛选所述筛选文库而鉴定的基因以选出为串联重复基因的基因时，排除具有邻接的 8 个或更少氨基酸的串联重复模体的多核苷酸。

30. 权利要求 28 或 29 的方法，其中所述筛选文库通过婴儿利什曼原虫(*L. infantium*)构建。

31. 诊断、治疗或免疫接种患者或血液供给的免疫原性多肽的筛选方法，所述方法包括：

(a)选择一种或多种多肽序列或多核苷酸序列；

(b)分析所选择的一种或多种多肽序列或多核苷酸序列，并选出含串联重复的序列；

(c)表达所选择的(b)的序列；和

(d)通过使(c)的表达产物暴露于从感染利什曼病的一个或多个患者获得的一个或多个生物样品，来筛选(c)的表达产物，从而选出免疫原性多肽。

32. 权利要求 31 的方法，其中所述免疫原性多肽用于诊断或治疗利什曼病，或免疫接种对抗利什曼病。

33. 权利要求 28、权利要求 29、权利要求 30、权利要求 31 或权利要求 32 的方法，所述方法还包括步骤：通过比较所选择的免疫原性多肽的序列与潜在感染利什曼病的机体的多肽序列的同源性，来筛选所选择的免疫原性多肽，从而选出与潜在感染利什曼病的机体的多肽同源性最小的一种或多种多肽。

34. 权利要求 28、权利要求 29、权利要求 30、权利要求 31 或权利要求 32 的方法，所述方法还包括步骤：通过比较所选择的免疫原性多肽的序列与潜在感染被利什曼病潜在感染的生物体的生物体的多肽序列的同源性，来筛选所选择的免疫原性多肽，从而选出与潜在感染被利什曼病潜在感染的生物体的生物体的多肽同源性最小的一种或多种多肽。

35. 鉴定用于诊断、治疗或免疫接种患者的免疫原性多肽的方法，所述方法包括：

(a)在一种或多种宿主细胞中表达多核苷酸表达文库的表达产物，所述多核苷酸表达文库包含一种或多种编码候选免疫原性多肽的多核苷酸，所述多核苷酸中的至少一种能够表达含串联重复的候选免疫

原性多肽，以获得含表达产物的宿主细胞群；

(b)在足以使生物材料中的至少一种抗体与至少一种表达产物特异性结合的条件和持续时间下，使(i)含(a)的表达产物的宿主细胞群与(ii)从已经被利什曼原虫生物体感染的对象或生物源中获得的生物材料接触，其中所述生物材料包含至少一种抗体并选自血液、血清和尿；

(c)检测含至少一种表达产物的至少一种宿主细胞，所述表达产物与所述至少一种抗体特异性结合；

(d)从在(c)中所检测的宿主细胞分离编码所述表达产物的多核苷酸，以获得分离的多核苷酸，所述表达产物与所述至少一种抗体特异性结合；和

(e)分析(d)的所述分离的多核苷酸的核苷酸序列是否存在串联重复，其中串联重复的存在表明所述分离的多核苷酸编码免疫原性多肽，并由此鉴定所述免疫原性多肽。

36. 权利要求 35 的方法，其中所述多核苷酸表达文库从得自生物体的核苷酸序列构建，所述生物体选自传染性生物体和非传染性生物体。

37. 权利要求 35 的方法，其中所述多核苷酸表达文库从引起利什曼病的生物体构建。

38. 权利要求 37 的方法，其中所述引起利什曼病的生物体选自婴儿利什曼原虫(*Leishmania infantum*)、杜氏利什曼原虫(*Leishmania donovani*)、硕大利什曼原虫(*Leishmania major*)、亚马逊利什曼原虫(*Leishmania amazonensis*)、克氏锥虫(*Trypanosoma cruzi*)、和引起利什曼病的天然的或非天然的细菌株。

39. 权利要求 35 的方法，其中所述多核苷酸表达文库构建自选自细菌、病毒、原生动物、真菌、酵母、双滴虫目(diplomonadid)和动基体目(kinetoplastid)原生动物的致病性或非致病性微生物体。

40. 鉴定用于诊断、治疗或免疫接种患者的免疫原性多肽的方法，所述方法包括：

(a)在一种或多种宿主细胞中表达多核苷酸表达文库的表达产物，

所述多核苷酸表达文库包含一种或多种编码候选免疫原性多肽的多核苷酸，所述多核苷酸中的至少一种能够表达含串联重复的候选免疫原性多肽，以获得含表达产物的宿主细胞群；

(b)在足以使下述生物材料中的至少一种抗体与至少一种表达产物特异性结合的条件和持续时间下，使(i)含(a)的表达产物的宿主细胞群与(ii)从已经感染了传染性生物体的对象或生物源中获得的生物材料接触，其中所述生物材料包含至少一种抗体并选自血液、血清和尿；

(c)检测含至少一种表达产物的至少一种宿主细胞，所述表达产物与所述至少一种抗体特异性结合；

(d)从在(c)中所检测的宿主细胞分离编码所述表达产物的多核苷酸，以获得分离的多核苷酸，所述表达产物与所述至少一种抗体特异性结合；和

(e)分析(d)的所述分离的多核苷酸的核苷酸序列是否存在串联重复，其中串联重复的存在表明所述分离的多核苷酸编码免疫原性多肽，并从此鉴定所述免疫原性多肽。

41. 权利要求 40 的方法，其中所述多核苷酸表达文库从得自生物体的核苷酸序列构建，所述生物体选自传染性生物体和非传染性生物体。

42. 权利要求 40 的方法，其中所述多核苷酸表达文库由引起利什曼病的生物体构建。

43. 权利要求 42 的方法，其中引起利什曼病的生物体选自婴儿利什曼原虫 (*Leishmania infantum*)、杜氏利什曼原虫 (*Leishmania donovani*)、硕大利什曼原虫 (*Leishmania major*)、亚马逊利什曼原虫 (*Leishmania amazonensis*)、克氏锥虫 (*Trypanosoma cruzi*)、和引起利什曼病的天然或非天然的细菌株。

44. 权利要求 40 的方法，其中所述多核苷酸表达文库构建自选自细菌、病毒、原生动物、真菌、酵母、双滴虫目 (diplomonadid) 和动基体目 (kinetoplastid) 原生动物的致病性或非致病性微生物体。

用于诊断和治疗利什曼病的化合物和方法

优先权要求

[0001]本申请要求2007年4月10日提交的美国非临时申请11/733,440的优先权。前述申请以其整体通过引用结合至本文中。

[0002]本申请要求2006年4月13日提交的美国临时申请60/744,798的优先权。前述申请以其整体通过引用结合至本文中。

[0003]本申请要求2006年4月10日提交的美国临时申请60/791,226的优先权。前述申请以其整体通过引用结合至本文中。

发明领域

[0004]本发明总的来说涉及利什曼原虫感染的血清诊断。更详细地讲本发明涉及一种或多种利什曼原虫多肽在方法和诊断试剂盒中的用途，以从生物体和血液供给中筛选利什曼原虫，并以鉴定有可以发展成急性内脏利什曼病的那些个体。本发明也涉及用于治疗 and 免疫接种生物体对抗利什曼病的疫苗和药物组合物。

发明背景

[0005]利什曼原虫生物体是巨噬细胞的胞内原生动动物寄生虫，在人体和家禽，主要是狗中引起范围广的临床疾病。在一些感染中，寄生虫可以在体内潜伏许多年。在其它情况下，宿主可以发展成多种利什曼病形式中的一种。例如，疾病可以无症状或可以征候为亚临床的内脏利什曼病，它表征为不适、腹泻和间断性肝肿大的轻微症状。亚临床或无症状疾病的患者通常抗体滴度低，致使疾病难以用标准技术检测。或者，利什曼病可以征候为皮肤疾病，所述皮肤疾病是严重的医学问题但一般自身限制，或征候为高破坏性粘膜病，该粘膜病不自

身限制。最终和最严重地，疾病可以征候为涉及脾脏、肝脏和淋巴结的急性内脏感染，该感染不治疗的话一般会成为不治之症。急性内脏利什曼病的症状包括肝脾大、发热、白细胞减少、贫血和血内丙种球蛋白过多。

[0006]利什曼病在全世界的许多地区，包括巴西、中国、东非、印度和中东地区，是严重的问题。该疾病也是地中海地区，包括法国南部、意大利、希腊、西班牙、葡萄牙和北非，的地方病。在最近的20年中利什曼病的病例数量已经急剧增加，并且现在全世界存在该疾病的数百万病例。现在每年诊断约2百万新病例，其中的25%为内脏利什曼病。然而，目前没有疫苗或有效的治疗可利用。

[0007]内脏利什曼病可以不总是仅基于临床症状来诊断，因为内脏利什曼病与通常发生于同一病区的其它疾病例如疟疾、伤寒和肺结核具有相同的临床特征。因此，内脏利什曼病的诊断多半依赖于寄生虫学或血清学方法。前者是显微镜检测脾脏和骨髓的抽吸物中的无鞭毛体或通过培养抽吸物检测前鞭毛体。不幸的是，该方法要求骨髓、肝脏、脾脏、或可能需要淋巴结的活组织检查，这可以引起患者的继发性感染或甚至毁容。另外，连同是侵入性诊断一起，它花费长时间诊断，并且结果通常是非结论性的。因此，该方法是侵入的、费时的、和不够灵敏的，因此使它无效。

[0008]的确存在侵入性和耗时较小的实验室方法，然而，这些方法具有缺乏灵敏度或执行麻烦的缺点。例如液体直接凝集试验(LQ DAT: Ahfad University, Khartoum and IPB, Addis Abbeba)和冷冻干燥DAT (FD DAT: Meredith 等. 1995)具有良好的灵敏度，但需要多个吸液和温育步骤，这使所述试验难以在发展中国家施行。相似地，尿中胶乳抗原凝集试验(Latex Antigen Agglutination Test in Urine) (KATEX®: Kalon Biological Ltd-UK)具有良好的灵敏度和特异性，但需要麻烦的尿液煮沸步骤并还具有低重现性的缺点。最终，rK39和rK26浸渍检查法(dipstick test) (Inbios®, Seattle, WA)可以在约几分钟

内快速给出结果，但这些试验在某些地理区域例如苏丹、埃塞俄比亚和肯尼亚缺乏灵敏度。因为浸渍检查法可以容易地、快速地、和提供得起地实现，但仍然具有缺乏抗原灵敏度的缺点，所以新抗原的发现对于利什曼病的更准确诊断是必需的。

[0009]在先前报道的确定的利什曼原虫抗原中，在灵敏度和特异性方面rK39似乎是内脏利什曼病血清诊断的最佳抗原。rK39甚至在试验纸形式(strip format)上是灵敏的和可靠的，该试验纸形式可在野外使用，并且rK39试验纸检验在印度、尼泊尔和巴西具有高灵敏度。然而，在苏丹、埃塞俄比亚和肯尼亚，试验纸检验的灵敏度下降到67%，并且试验纸检验的阴性反应通过ELISA似乎与较低反应性有关。因此，需要新诊断性抗原来弥补rK39的不足，以促进利什曼病的更准确诊断的发展。本发明满足了这些需要和许多其它相关的需要。

发明概述

[0010]简要地陈述，本发明涉及用于检测与治疗个体和血液供给中的利什曼病的化合物和方法。

[0011]更具体地讲，公开了提供诊断、预防、治疗和检测利什曼病感染和刺激患者的免疫应答的化合物和方法。所公开的化合物包括多肽和融合蛋白或它们变体，其含有一种或多种利什曼原虫抗原的至少一个免疫原性部分。另外，公开了从筛选文库中筛选具有免疫原性的串联重复蛋白质的方法。描述了含多核苷酸、多肽、融合蛋白及其变体的可用于预防和治疗利什曼病、以及用于检测利什曼病感染的疫苗和药物组合物。

[0012]在一个实施方案中，公开了检测利什曼原虫感染的方法，该方法包括以下步骤：首先，使生物样品与包含至少一个串联重复单位的多肽接触，其中该串联重复单位包含与选自SEQ ID NO: 1-59的氨基酸序列具有同源性的氨基酸序列；第二，检测生物样品中抗体的存在情况以检测利什曼病感染。相关的实施方案包括使用包含SEQ ID

NO: 1-59中的一种或多种氨基酸序列的串联重复蛋白质和融合蛋白的类似方法。在又一实施方案中，公开了用于检测利什曼原虫感染的、包含上述多肽的诊断试剂盒。

[0013]在本发明的又一实施方案中，公开了编码上述多肽的DNA序列以及所述DNA的表达载体和宿主细胞。

[0014]公开了另外的实施方案，其中所公开的多肽用于药理学组合物中，并公开了使用这些药理学组合物来治疗、检测和免疫接种对抗利什曼原虫感染的相关方法。

[0015]在其他实施方案中，公开了用于筛选免疫原性多肽的方法，该方法包括以下步骤：构建筛选文库、用生物样品筛选该文库并分析经鉴定的序列以选出串联重复基因。对于本发明的实施方案而言还公开了又一方法，其中选择一种或多种多肽或多核苷酸序列，然后筛选出串联重复域，从而筛选免疫原性多核苷酸或免疫原性多肽。

附图简述

[0016]参考以下附图下面详细描述本发明的优选的和替换的实施方案：

[0017]图1显示串联重复基因的代表性PCR分析。使用婴儿利什曼原虫(*L. infantium*) (Li)、杜氏利什曼原虫(*L. donovani*) (Ld)、硕大利什曼原虫(*L. major*) (Lm)、亚马逊利什曼原虫(*L. amazonensis*) (La)和克氏锥虫(*T. cruzi*) (Tc)的总DNA为模板，用对LinJ16.1750、LinJ22.1590和LinJ33.2870的串联重复区域或对克氏锥虫(*T. cruzi*)基因特异的引物组进行PCR反应。以碱基对显示大小。

[0018]图2举例说明婴儿利什曼原虫(*L. infantium*)重组蛋白的例示性的表达和纯化。所显示的是未诱导的大肠杆菌(*E. coli*)裂解物(泳道1)、诱导的裂解物(泳道2)和纯化的蛋白质(泳道3)的考马斯蓝染色的SDS/4-20%聚丙烯酰胺梯度凝胶。以kDa显示大小。

[0019]图3呈现对婴儿利什曼原虫(*L. infantium*)重组蛋白的患者血

清反应性的指示性酶联免疫吸附测定评估。使用内脏利什曼病患者(VL, n=10)、皮肤利什曼病患者(CL, n=10)、肺结核患者(TB, n=10)、疟疾患者(n=6)的患者血清、或美国健康对照者的血清(n=10)。显示了每组中OD值的平均数和SEM。

[0020]图4显示人内脏利什曼病患者血清对串联重复蛋白质的典型的反应性。通过ELISA测试内脏利什曼病患者(n=35)和健康对照(n=20)的(A)血清对rLinJ16.1750r2或rK39的反应性。每组的平均值显示为实线。虚线代表计算为健康对照的OD值的平均值+3SD的截断值。

[0021]图5例示性地阐明通过8个内脏利什曼病患者血清识别重组蛋白, 这些血清显示对rK39的反应性低(OD < 1.0, 在A中的圆圈)。

[0022]图6显示内脏利什曼病患者血清对串联重复蛋白质的指示性抗体应答。通过ELISA测试内脏利什曼病患者(封闭的圆圈: n=16)和健康对照(开放的圆圈: n=8)的血清对串联重复蛋白质的反应性, 显示了每个个体的OD值。条代表各组的平均值。

详述

[0023]如上所述, 本发明涉及用于检测和防御对抗生物样品或生物体中利什曼原虫感染的组合物和方法, 另外还涉及用于筛选和鉴定对检测和防御对抗生物样品或生物体中利什曼原虫感染有效的化合物的方法。

[0024]在一个实施方案中, 本发明提供用于检测在生物样品或生物体中利什曼原虫感染的方法和化合物, 包括: (a)在足以使样品中的抗体与下述多肽发生结合的条件和持续时间下, 使生物样品与一种以上多肽或其仅在保守的取代和修饰方面不同的变体接触, 所述多肽中至少一种包含一个以上串联重复单位, 其串联重复单位在某些实施方案中包含具有至少8个保守氨基酸并且与选自SEQ ID NO: 1-59的氨基酸序列有至少70%序列同源性的氨基酸序列; 和(b)检测在生物样品中与所述多肽特异性结合的一种或多种抗体的存在情况, 从而检测生物

样品中的利什曼原虫感染。

[0025]在另一实施方案中，本发明提供用于检测在生物样品或生物体中利什曼原虫感染的方法和组合物，包括：(a)在足以使样品中的抗体与下述多肽发生结合的条件和持续时间下，使生物样品与包含多肽或其仅在保守的取代或修饰方面不同的变体的组合物接触，所述多肽具有串联重复单位；和(b)检测在生物样品中与多肽结合的抗体的存在情况，从而检测在生物样品中的利什曼原虫感染。在这些和其它相关的实施方案中，所述组合物可以包括如本文提供的单个串联重复，或可以包括可相同或不同的两个或多个串联重复单位。因此该组合物可以包含一个或多个物种的串联重复单位，和/或也可以包含含一个或多个物种的串联重复单位的融合蛋白。

[0026]在又一实施方案中，本发明提供用于筛选和选择对检测生物样品或生物体中的利什曼原虫感染有效的串联重复蛋白质的方法，包括：(a)构建利什曼原虫筛选文库；(b)筛选利什曼原虫筛选文库；和(c)分析从筛选利什曼原虫筛选文库中鉴定的基因，以选出为串联重复基因的基因。

[0027]在另一实施方案中，本发明提供用于治疗 and 检测具有临床或亚临床利什曼病感染的患者的利什曼病的系统和方法。

[0028]本发明的某些实施方案考虑的多肽包括但不限于：包含利什曼原虫抗原的免疫原性部分的多肽，所述多肽包含在SEQ ID NO: 1-59中列举序列。本文所用术语“多肽”包括任何长度的氨基酸链，其包括全长蛋白(即抗原)，其中氨基酸残基通过肽键共价连接成线性聚合物。因此，包含以上抗原中的一种的免疫原性部分的多肽可以完全由免疫原性部分组成，或可以包含添加序列。所述添加序列可以是天然存在的序列(例如得自天然利什曼原虫抗原的序列)或可以是异源的(例如得自包括外源性的天然存在序列和/或人工序列的其它来源)，并且这样的序列可以(但不必须)是免疫原性的。“具有”详细列举序列的抗原是包含所列举序列的抗原，例如，在其全长序列中包含所列举的

序列。天然抗原可以，或可以不，包含一个或多个添加的氨基酸序列。“分离的”材料、分子、制品指已经将它从其天然存在的环境或来源中移出。例如，在对象或生物源(例如完好的活动物)中染色体上的基因的一部分中存在的多核苷酸序列不是分离的，而从已经得自这样的对象或生物源的生物样品中提取的DNA将被认为是分离的。在类似的模式中，“分离”可以指在用于从所述材料存在的自然环境中将其移出的过程或方法中所采取的步骤。

[0029]本文所用术语“串联重复”指多核苷酸序列(例如DNA、RNA、重组工程的或合成的寡核苷酸的序列，其包括非天然存在的核苷酸或核苷酸类似物等(包括核苷酸模拟物)的线性聚合物)的区域、或分别包含约6 - 1200个核苷酸序列或2 - 400个氨基酸序列的多肽或蛋白质的区域，所述区域重复串联致使序列存在至少两次。本文所用术语“串联重复单位”指以串联方式重复的序列的单个单位。此外，术语“串联重复”也包括DNA的区域，其中多于单个2 - 至400 - 氨基酸或6 - 至1200 - 核苷酸的串联重复单位以串联或带有插入碱基或氨基酸的方式重复，前提是所述序列中至少一种以串联方式重复至少两次。此外，术语“串联重复”也包括DNA或蛋白质的区域，其中所述串联重复单位是不同一的。当两种或多种序列互相之间具有至少70%的同源性，或者是互相之间的合理变体时，这些序列出于包含或构成串联重复的意图将被认为是串联重复单位。

[0030]同样地，当序列为至少6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22或更多个氨基酸的串联重复单位时，该序列出于包含或构成串联重复的意图将被认为是串联重复单位。

[0031] 同样地，当序列为至少约18、21、24、27、30、33、36、39、42、45、48、51个或任何插入整数的核苷酸时，该序列出于包含或构成串联重复的意图将被认为是串联重复单位。

[0032]此外，术语“串联重复”也包含串联重复：其中串联重复的一个或多个串联重复单位是其它串联重复单位的反向序列。反向串联

重复单位和非反向串联重复可以以任何方式和具有或不具有插入核苷酸碱基或氨基酸来装配。反向和非反向序列的构型包括但不限于以下的那些构型：非反向序列后接反向序列；反向序列后接非反向序列；和反向序列后接反向序列。在具有串联重复的双链多核苷酸的情况下，两个或多个这样的重复可以存在于同一链上或可以发生在相反链上。

[0033]在某些优选的实施方案中，串联重复可以包含利什曼原虫抗原的免疫原性部分。利什曼原虫抗原的免疫原性部分是能够在目前或以前感染利什曼原虫的患者(例如人或狗)中和/或在从目前或以前感染利什曼原虫的个体中分离的淋巴结细胞或外周血单核细胞(PBMC)的培养物中引发免疫应答(即细胞和/或体液免疫应答)的部分。本领域的技术人员将熟悉用于确定是否已经引发免疫应答的广泛多样的方法学和标准中的任何一种。(参见例如，Current Protocols Immunology, John Wiley & Sons Publishers, NY)。在其中引发应答的细胞可以包含混合的细胞类型或可以包含分离的成分细胞(包括但不限于：T细胞、NK细胞、巨噬细胞、单核细胞和/或B细胞)。详细地讲，免疫原性部分能够诱导T细胞增殖和/或占优势的Th1型细胞因子应答(例如，由T细胞和/或NK细胞产生的IL-2、IFN- γ 、和/或TNF- α ；和/或由单核细胞、巨噬细胞和/或B细胞产生的IL-12)。本文所述抗原的免疫原性部分一般可以使用本领域的普通技术人员已知的技术、包括本文所提供的代表性方法来鉴定。

[0034]本发明的组合物和方法也包含以上多肽的变体。当用于本文时，与另一蛋白质“同源”的多肽“变体”或多肽是在一个或多个替换、缺失、添加和/或插入方面不同于天然(例如天然存在)蛋白质的多肽，致使多肽的免疫原性基本上没有降低。例如，相对于天然蛋白质而言，变体与抗原特异性抗体、抗血清或T细胞反应的能力可以被提高或没有变化，或相对于天然蛋白质而言，可以被降低少于50%，和优选少于20%。这样的变体一般可以通过修饰本文描述的多肽序列之一并评

估修饰的多肽与如本文描述的抗原特异性抗体或抗血清的反应性来鉴定。优选的变体包括已经在其中去除一个或多个部分(例如N-末端前导序列或跨膜区)的那些变体。其它优选的变体包括已经在其中从成熟蛋白质的N-和/或C-末端去除了小部分(例如1-30个氨基酸, 优选5-15个氨基酸)的变体。

[0035]本发明所包括的多肽变体包括显示与本文公开的多肽有至少约70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多同一性(如下所述确定的)的那些多肽变体。

[0036]优选地, 变体包含保守取代。“保守取代”是其中的氨基酸被具有相似特性的另一氨基酸取代, 致使肽化学领域中的技术人员期望多肽的二级结构和亲水性基本上没有改变。氨基酸的取代一般可以在残基的极性、电荷、可溶性、疏水性、亲水性和/或两亲性相似的基础上进行。例如, 带负电的氨基酸包括门冬氨酸和谷氨酸; 带正电的氨基酸包括赖氨酸和精氨酸; 而具有相似亲水值的不带电极性头基的氨基酸包括亮氨酸、异亮氨酸和缬氨酸; 甘氨酸和丙氨酸; 天冬酰胺和谷氨酰胺; 和丝氨酸、苏氨酸、苯丙氨酸和酪氨酸。可以代表保守变化的其它组别的氨基酸包括: (1)ala、pro、gly、glu、asp、gln、asn、ser、thr; (2)cys、ser、tyr、thr; (3)val、ile、leu、met、ala、phe; (4)lys、arg、his; 和(5)phe、tyr、trp、his。或可供选择的是, 变体也可以非保守的变化。在优选的实施方案中, 变体多肽与天然序列有取代、缺失或添加五个或更少氨基酸的不同。变体也可以(或备选)通过, 例如, 对多肽的免疫原性、二级结构和亲水性具有最小影响的氨基酸的缺失或添加来修饰。

[0037]可以用本领域已知的任何合适的方法来制备本发明的多肽。这样的多肽包括天然存在的多肽、重组产生的多肽、合成产生的多肽、或由这些方法的组合产生的多肽。本文公开的某些相似的实施方案考虑由天然存在的多核苷酸组成的多核苷酸, 其具有以5'-至-3'

键合的糖(例如核糖或脱氧核糖)磷酸盐骨架,但本发明不限于此,也考虑由任何许多天然的和/或人造的多核苷酸类似物和/或模拟物组成的多核苷酸,例如设计用于对抗降解或具有其它所需理化性质的那些核苷酸,例如具有硫代磷酸骨架的合成多核苷酸等等。

[0038]多核苷酸可以包含天然序列(即编码蛋白质或其部分的内源性序列)或可以包含变体、或这样的序列的生物学或抗原功能等价物。如以下进一步描述的,多核苷酸变体可以包含一种或多种取代、添加、缺失和/或插入,优选致使相对于天然肿瘤蛋白而言所编码的多肽的免疫原性不降低。一般可以如本文所述的那样评估对所编码的多肽免疫原性的影响。术语“变体”也包括异种来源的同源基因。

[0039]在比较多核苷酸或多肽序列时,如果在两个序列中核苷酸或氨基酸的序列当进行如下所述的最大限度对应比对时是相同的,则认为这两个序列是“同一的”。通常通过比较窗口上比较序列以鉴定和比较序列的局部区域的相似性,来进行两个序列之间的比较。本文所用的“比较窗口”指至少约20、通常30-约75、40-约50个邻接位点的区段,其中序列可以与相同数量邻接位点(position)的参考序列在两个序列最优化比对之后进行比较。

[0040]可以使用生物信息学软件的Lasergene程序组中的Megalign程序(DNASTAR, Inc., Madison, Wis.),使用默认参数,来进行用于比较的序列的最优化比对。该程序包含在以下参考文献中描述的几种比对方案:在Dayhoff, M. O. (编辑) *Atlas of Protein Sequence and Structure*, 美国生物医学研究基金会, 华盛顿市, 第5卷, 增刊3, 第345-358页中的Dayhoff, M. O. (1978)蛋白质进化的模型 - 用于检测远缘关系的矩阵(A model of evolutionary change in proteins—Matrices for detecting distant relationships); Hein J. (1990)比对的统一方法和种系基因(Unified Approach to Alignment and Phylogenesis), 第626-645页, *Methods in Enzymology* 第183卷, Academic Press, Inc., San Diego, Calif; Higgins, D. G.和Sharp, P. M. (1989) *CABIOS* 5:151-153; Myers, E. W.和Muller

W. (1988) *CABIOS* 4:11-17; Robinson, E. D. (1971) *Comb. Theor* 11: 105; Santou, N. Nes, M. (1987) *Mol. Biol. Evol.* 4:406-425; Sneath, P. H. A. 和 Sokal, R.R. (1973) *Numerical Taxonomy—the Principles and Practice of Numerical Taxonomy*, Freeman Press, San Francisco, Calif; Wilbur, W. J.和 Lipman, D. J. (1983) *Proc. Natl. Acad., Sci. USA* 80:726-730.

[0041]或者,可以通过以下来进行用于比较的序列的最优化比对: Smith和Waterman (1981) *Add. APL. Math* 2:482的局部同一性算法、Needlem和Wunsch (1970) *J. Mol. Biol.* 48:443的同一性比对算法、Pearson和Lipman (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 2444的搜索相似性方法、计算机执行这些算法(在Wisconsin Genetics Software Package中的GAP、BESTFIT、BLAST、FASTA、和TFASTA, Genetics Computer Group (GCG), 575 Science Dr., Madison, Wis.)、或检验 (inspection)。

[0042]适用于确定序列同一性和序列相似性百分比的算法的一个优选的实例是BLAST和BLAST 2.0算法, 分别在Altschul 等. (1977) *Nucl. Acids Res.* 25:3389-3402和Altschul 等. (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-410中描述了这两种算法。BLAST和BLAST 2.0可以例如与本文所述的参数一起用于确定本发明的多核苷酸和多肽的序列同一性百分比。执行BLAST分析的软件通过美国生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information)是公开可用的。在一个例证性实施例中, 对于核苷酸序列而言, 可以使用参数M(对匹配的残基加分; 总是>0)和参数N(对不匹配的残基扣分; 总是<0)计算累积分数。对于氨基酸序列而言, 可以使用记分矩阵计算累积分数。当累计比对分数由其最大实现值(achieved value)下降X个量; 当由于一个或多个负分的残基比对的积累导致累积分数变为0或更低; 或者当到达任一序列的末端的时候, 停止代码击中(word hit)向各个方向的延伸。BLAST算法参数W、T和X确定比对的灵敏度和速度。BLASTN程序(对于核苷酸

而言)使用作为默认值的字长(W)11、和期望值(E)10、和BLOSUM62记分矩阵(参见Henikoff和Henikoff (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915)比对、(B)50、期望值(E)10、M=5、N=-4和两链的比较。

[0043]优选地,“序列同一性的百分比”通过在至少20个位点的比较窗口上比较两个最优化比对的序列来确定,其中当为了两个序列的最佳比对与参考序列(不包含添加或缺失)进行比较时,比较窗口中的多核苷酸或多肽序列部分可以包含20%或更少、通常5-15%、或10-12%的添加或缺失(即缺口)。通过以下来计算百分比:确定在两个序列中存在的位于同一核苷酸碱基或氨基酸残基的位点数目,以得到配对位点的数目;配对位点的数目除以在参考序列中的总位点数(即窗口大小)并将该结果乘以100从而得到序列同一性的百分比。

[0044]因此,本发明包括与本文公开的序列相比基本上具有同一性的多核苷酸和多肽序列,例如使用本文描述的方法(例如,如下文描述的使用标准参数的BLAST分析)与本发明的多核苷酸或多肽序列比较,包含至少50%序列同一性,优选至少55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%或更高的那些多核苷酸和多肽序列。本领域的技术人员将认识到:可以通过考虑密码子简并性、氨基酸相似性、读码框定位等,对这些值适当地进行调整以确定由两个核苷酸序列编码的蛋白质的相应的同一性。

[0045]在此外的实施方案中,本发明提供分离的多核苷酸和多肽,其包含与本文公开的一个或多个序列同一或互补的不同长度的邻接序列段。例如,本发明提供包含以下的多核苷酸:本文公开的一个或多个序列中的至少约15、20、30、40、50、75、100、150、200、300、400、500或1000或更多个以及在此之间的所有中间长度的邻接核苷酸。容易理解的是,在该上下文中,“中间长度”意指所引用的值之间的任何长度,例如16、17、18、19等;21、22、23等;30、31、32等;50、51、52、53等;100、101、102、103等;150、151、152、153等;包括200-500;500-1,000的所有整数,等等。

[0046]本发明的多核苷酸或其片段，不管编码序列自身的长度，可以与其它的DNA序列组合，例如启动子、多腺苷酸化信号、添加的限制性内切酶位点、多克隆位点、其它的编码区段等，致使它们的总长度可以大幅度地改变。因此所考虑的是，可以使用几乎任何长度的核苷酸片段，优选总长度受到制备的简易性和在预期重组DNA方案中的使用的限制。例如，总长度为约10,000、约5000、约3000、约2,000、约1,000、约500、约200、约100、约50碱基对长度的例示性DNA区段被考虑为在本发明的许多实践中有用。

[0047]在其它的实施方案中，本发明涉及能在适度严格的条件下与本文提供的多核苷酸序列杂交的多核苷酸或其片段、或其互补序列。杂交技术在分子生物学领域是众所周知的。为了例证，用于测试本发明的多核苷酸与其它多核苷酸的杂交的合适的适度严格条件包括：在5倍SSC、0.5% SDS、1.0 mM EDTA (pH 8.0)溶液中预洗；在50°C - 65°C、5×SSC杂交，过夜；接着分别用含0.1% SDS的2×SSC、0.5×SSC和0.2×SSC在65°C下洗涤20分钟两次。

[0048]此外，本领域的普通技术人员将认识的是，由于遗传密码的简并性，有许多编码如本文所述的多肽的核苷酸序列。这些多核苷酸中的一些与任何天然基因核苷酸序列相比具有最小同源性。但是，由于密码子选择的差异而改变的多核苷酸为本发明所明确考虑。此外，包含本文提供的多核苷酸序列的基因的等位基因在本发明的范围内。等位基因是由于一个或多个突变而改变的内源性基因，例如核苷酸的缺失、添加和/或置换。产生的mRNA和蛋白质可以但非必须具有改变的结构或功能。等位基因可以使用标准技术(例如杂交、扩增和/或数据库序列比较)来鉴定。

[0049]本文描述的“多肽”也包括组合多肽，也称为融合蛋白。“组合多肽”或“融合蛋白”是包含至少一个上述的免疫原性部分和一个或多个添加的免疫原性利什曼原虫序列的多肽，经由肽键连接到单个氨基酸链中。序列可以直接连接(即没有插入氨基酸)或可以经由不显著

降低成分多肽的免疫原性的接头序列(例如Gly-Cys-Gly)连接。

[0050]融合蛋白一般可以使用标准技术包括化学缀合来制备。优选融合蛋白在表达系统中作为重组蛋白表达,致使有相对于非融合蛋白而言提高水平的生产。简而言之,编码多肽组分的DNA序列可以单独装配,并连接入合适的表达载体中。用或不用肽接头,将编码一种多肽组分的DNA序列的3'末端连接到编码第二多肽组分的DNA序列的5'末端,致使序列的读码框在框内。这允许翻译成保留两种成分多肽的生物活性的单个融合蛋白。

[0051]可以利用肽接头序列,通过足以确保每个多肽折叠入其二级和三级结构的距离,来使第一与第二多肽组分分开。使用本领域熟知的标准技术将这样的肽接头序列掺入融合蛋白中。可以基于以下因素选择合适的肽接头序列:(1)它们采用(adopt)弹性伸展构象的能力;(2)它们不能采用与第一和第二多肽上的功能性表位相互作用的二级结构;和(3)缺乏可与多肽功能性表位反应的疏水的或带电的残基。优选的肽接头序列包含Gly、Asn和Ser残基。其它近中性氨基酸,例如Thr和Ala也可以用于接头序列中。可以有效地用作接头的氨基酸序列包括在以下中公开的那些氨基酸序列: Maratea 等, *Gene* 40:39-46, 1985; Murphy 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:8258-8262, 1986; 美国专利第4,935,233号和美国专利第4,751,180号。接头序列的长度一般可以为1-约50个氨基酸。当第一和第二多肽具有可以用于分开功能域和防止空间干扰的非必需N末端氨基酸区时,不需要接头序列。

[0052]连接的DNA序列可操作地与合适的转录或翻译调节元件连接。负责DNA表达的调节元件仅位于编码第一多肽的DNA序列的5'端。类似地,结束翻译和转录终止信号所需的终止密码子仅出现在编码第二多肽的DNA序列的3'端。

[0053]在本发明的实施方案中,融合蛋白包含一个或多个串联重复单位。在又一实施方案中,一个或多个串联重复单位选自SEQ ID NO.1-59。在再一实施方案中,融合蛋白还包含蛋白质的抗原部分,

例如但不限于：在SEQ ID NO. 119-121中明确公开的rK26、rK39和rLiA2。

免疫原性多肽的筛选方法

[0054]在一个实施方案中，本发明提供用于筛选和选择可用于诊断、治疗和/或免疫接种对象或生物源例如人类患者，例如用于检测生物样品或生物体中的利什曼原虫感染的串联重复蛋白质的方法，该方法包括：(a)构建利什曼原虫筛选文库；(b)筛选利什曼原虫筛选文库；和(c)分析从筛选利什曼原虫筛选文库中鉴定的基因，以选出为串联重复基因的基因。在又一的实施方案中，可以从例如以下的任何生物体的基因组DNA中构建筛选文库，例如为了举例说明而并非限制，传染性的或非传染性的生物体、或可以是致病性的或非致病性的传染性生物体，例如细菌、病毒、原生动物、真菌、酵母、双滴虫目(diplomonadid)和动基体目(kinetoplastid)原生动物。在某些实施方案中，可以从遗传物质(即核苷酸)或以下的生物体构建筛选文库：引起或能引起利什曼病的生物体，例如婴儿利什曼原虫(*Leishmania infantum*)、杜氏利什曼原虫(*Leishmania donovani*)、硕大利什曼原虫(*Leishmania major*)、亚马逊利什曼原虫(*Leishmania amazonensis*)、克氏锥虫(*Trypanosoma cruzi*)、或引起利什曼病的天然的或非天然的细菌株。在又一实施方案中，可以用核苷酸类包括但不限于DNA和cDNA来构建文库。

[0055]例如，一个这样的实施方案考虑用于诊断、治疗或免疫接种患者的免疫原性多肽的鉴定方法，该方法包括：(a)在一种或多种宿主细胞中，表达多核苷酸表达文库的表达产物，该多核苷酸表达文库包含一种或多种编码候选免疫原性多肽的多核苷酸，该多核苷酸中的至少一种能够表达包含串联重复的候选免疫原性多肽，以获得包含表达产物的宿主细胞群；(b)在足以使下述生物材料中的至少一种抗体与至少一种表达产物特异性结合的条件和持续时间下，使(i)与(ii)接触，其中(i)为包含(a)的表达产物的宿主细胞群，(ii)为从已经感染以下生物体的对象或生物源获得的生物材料：传染性的或非传染性的生物体、

或致病性的或非致病性的传染性生物体,例如细菌、病毒、原生动物、真菌、酵母、双滴虫目(diplomonadid)和动基体目(kinetoplastid)原生动物,或利什曼原虫生物体或能够引起利什曼病的其它生物体,其中所述生物材料包含至少一种抗体,并选自血液、血清和尿液;(c)检测包含至少一种表达产物的至少一种宿主细胞,该表达产物与至少一种抗体特异性结合;(d)从在(c)中检测的宿主细胞分离编码所述表达产物的多核苷酸以获得分离的多核苷酸,该表达产物与至少一种抗体特异性结合;和(e)分析(d)所分离的多核苷酸的核苷酸序列是否存在串联重复,其中存在串联重复表明分离的多核苷酸编码免疫原性多肽,并从此鉴别免疫原性多肽。

[0056]通过用本领域熟知的方法例如超声处理或限制性酶切割或剪切DNA,可以完成构建多核苷酸筛选文库例如本文所述的多核苷酸表达文库。产生的核苷酸片段可以是任何大小的,然而,优选平均为1、2或3 kb。然后通过本领域熟知的方法例如连接入重组多核苷酸载体中,包括扩增和/或表达载体和用表达载体例如 λ 噬菌体载体或ZAP Express[©]载体(Stratagene, La Jolla, CA)表达,来扩增产生的核苷酸片段,以产生多核苷酸筛选文库例如多核苷酸表达文库。然后将生物材料暴露(expose)至包含所表达的表达式文库产物的宿主细胞来筛选筛选文库,其中所述生物材料可以是血清、血液、尿液、唾液或已得自己被或正被以下感染的对象或生物源的任何生物材料: 婴儿利什曼原虫(*Leishmania infantum*)、杜氏利什曼原虫(*Leishmania donovani*)、硕大利什曼原虫(*Leishmania major*)、亚马逊利什曼原虫(*Leishmania amazonensis*)、克氏锥虫(*Trypanosoma cruzi*)、或引起利什曼病的其它天然的或非天然的细菌株。宿主细胞可以是高等真核细胞,例如哺乳动物细胞(包括肿瘤细胞),或低等真核细胞,例如酵母细胞,或者宿主细胞可以是原核细胞,例如细菌细胞。本发明的合适的宿主细胞的代表性实例包括但不必限于: 细菌细胞例如E. coli、链霉菌(*Streptomyces*)、鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*); 真菌细胞,

例如酵母；昆虫细胞，例如果蝇S2和贪夜蛾(*Spodoptera*) Sf9；动物细胞，例如CHO、COS或293细胞；腺病毒；植物细胞、或已经适应于体外增殖或由此重新确立的任何合适的细胞。根据本文的教导，选择合适的宿主被认为在本领域的技术人员的范围内。也可以利用各种哺乳动物细胞培养系统来表达重组蛋白。哺乳动物表达系统的实例包括Gluzman, Cell 23:175 (1981)描述的猴肾成纤维细胞的COS-7系、和能够表达相容性载体的其它细胞系，例如，C127、3T3、CHO、HeLa、和BHK细胞系。哺乳动物表达载体将包含复制起始区、合适的启动子和增强子，也包含任何必须的核糖体结合位点、多腺苷酸化位点、间接供体和受体位点、转录的终止序列、和5'侧翼非转录序列。得自SV40剪接、和多腺苷酸化位点的DNA序列可以用于提供必需的不转录的遗传成分。将构建体导入宿主细胞可以通过本领域的技术人员所熟悉的多种方法实现，所述方法包括但不限于：例如磷酸钙转染、DEAE-葡聚糖介导的转染、电穿孔法(例如Davis等，1986 Basic Methods in Molecular Biology)或本领域已知的其它技术。

[0057]表达包含免疫原性多肽(例如通过特异性结合相互作用与存在于测试生物材料的抗体反应的多肽)的表达产物的宿主细胞可以按照许多已知方法学中的任何一种来鉴定。容易观察到宿主细胞表达表达文库产物(例如在表达文库内产生噬斑)，然后可以进行检测，并将可以编码原始抗原表位的多核苷酸片段从表达载体切除并回收。在备选的实施方法中，所述筛选文库得自已经暴露于被以下生物体(例如有传染性的生物体)感染的生物材料的对象或生物源：例如致病性或非致病性细菌、原生动物、真菌、酵母、病毒、双滴虫目(diplomonadid)、动基体目(kinetoplastid)原生动物或其它的传染性生物体。然后可以使用本领域熟知的方法测序被切除的核苷酸片段。在此外的实施方法中，将这些序列与可以在以下数据库中找到的已知基因比较：例如婴儿利什曼原虫(*Leishmania infantum*)数据基因数据库(GeneDB: The Wellcome Trust Sanger Institute, www.genedb.org)、或GenBank基因数据

库 (National Center for Biotechnology Information (NCBI) www.ncbi.nih.gov).

[0058]然后分析从核苷酸片段测序所获得的核苷酸序列,以确定这些序列是否包含串联重复。可以例如使用Tandem Repeats Finder (<http://tandem.bu.edu/trf/trf.htm>)或鉴定串联重复的其它类似的程序或方法,来鉴定串联重复。通常这些程序或方法鉴定串联重复的周期大小和经过与共有模式(consensus pattern)比对的拷贝数。在本发明的一个实施方案中,筛选可以排除具有约24、21、18、15、12或10个碱基对或更少碱基对的周期大小(例如周期性)的小串联重复模体。

[0059]在另一个实施方案中,可以筛选任何生物体的序列文库或基因组的串联重复,以找到可以用于以下疾病的血清诊断或治疗的表位:包括但不限于,利什曼病、肺结核、HIV和癌症。当已知任何生物体的DNA、cDNA、RNA或氨基酸的一种或多种序列时,可以筛选这些序列的串联重复。如上所述,这样的Tandem Repeats Finder程序可以用于分析和鉴定包含串联重复的序列,该序列可能包含可用于疾病的血清诊断或治疗的表位。在一个实施方案中,筛选婴儿利什曼原虫(*L. infantium*)基因组的串联重复。

[0060]在又一个实施方案中,从序列文库鉴定出的串联重复序列随后通过暴露于来自受感染个体或血液供给的生物样品来筛选,以鉴定在疾病的血清诊断或治疗中具有最大效能的串联重复序列。

[0061]在再一个实施方案中,将来自经鉴定的序列的一个或多个串联重复单位分离,并用于构建具有一种或多种串联重复单位序列的一个或多个串联重复单位的新蛋白质。例如,在其它的可能性之中,构建的蛋白质可以包含单个串联重复单位、多个串联重复单位、或者是以下的融合蛋白:具有一个或多个串联重复单位、具有不同的或同源的序列的串联重复单位。

[0062]在SEQ ID NO 1-59中公开了通过这些和其它方法发现的串联重复单位的实例。

[0063]在本发明的再一个实施方案中，随后筛选由上述方法鉴定的串联重复单位或串联重复序列与其它已知的或未知的蛋白质的同源性。本文所用术语“最少的同源性”是指一个或多个序列的亚群，其与群内的至少一个序列相比，与一个或多个参考序列的同源性更低。参考序列可以是，例如潜在感染潜在感染利什曼病的生物体的生物体或者潜在感染利什曼病的生物体的多肽序列。同源性筛选可以通过上述的同源性筛选的方法、或通过本领域熟知的许多方法来完成。例如，可以筛选串联重复序列或串联重复单位与已知的寄生虫例如克氏锥虫(*Trypanosoma Cruzi*)的同源性，该寄生虫潜在地存在于将被检验利什曼病的患者内。通过筛选与所述寄生虫内的蛋白质没有同源性的蛋白质，蛋白质可出于药学和诊断意图经过选择，这将使其对待治疗的或待检验的疾病更具特异性(在该实例中是利什曼病)。通过筛选对利什曼病具有高特异性的蛋白质，可以避免假阳性和误诊。

[0064]在又一个实施方案中，随后筛选由上述方法鉴定的串联重复单位或串联重复序列与以下哺乳动物中的其它已知的或未知的蛋白质的同源性：例如鼠、狗或人，其对于利什曼病而言是潜在宿主或试验宿主。再次筛选与这些哺乳动物中的蛋白质的低同源性，将致使药理学上的和诊断的应用对利什曼病更具特异性，从而减少或消除假阳性或误诊。

[0065]在再一个实施方案中，上述的筛选方法可以应用于任何疾病。

用于检测利什曼原虫感染的化合物和方法

[0066]如上所述，本发明公开筛选和选择对检测生物样品或生物体中的利什曼原虫感染有效的串联重复蛋白质的方法，该方法包括步骤：(a)构建利什曼原虫筛选文库；(b)筛选利什曼原虫筛选文库；和(c)分析从筛选利什曼原虫筛选文库中鉴定的基因，以选择是串联重复基因的基因。由本发明的这个方法和其它方法筛选和选择的多肽可用于

不同的应用，包括但不限于在生物体或血液供给品中检测、治疗、预防、监控和免疫对抗利什曼病感染的系统和方法。

[0067]因此，在本发明的另一个实施方案中，公开了用于在个体和血液供给品中检测和监测利什曼原虫感染的方法。一般而言，可在包含抗体的任何生物样品中检测利什曼原虫感染。优选样品是血液、血清、血浆、唾液、脑脊液或尿液。更优选样品是得自患者或血液供给品的血液或血清样品。简而言之，可以使用以上讨论的一种或多种串联重复多肽、融合蛋白或其它多肽、或它们的变体，来检测利什曼原虫感染。然后将所述一种或多种串联重复多肽、融合蛋白或其它多肽用于确定能与所述多肽或样品中的多肽特异性结合的抗体的存在与否。

[0068]在本发明的范围内的多肽包括但不限于：包含在SEQ ID NO:1-59列举的序列的包含利什曼原虫抗原的免疫原性部分。本文所用术语“串联重复”指包含至少两次串联重复的4-40个400的核苷酸或氨基酸的序列的DNA区域或蛋白质区域。本文所用术语“串联重复单位”指串联重复的序列的单个单位。

[0069]如本文中所使用的，对两种分子间(例如抗体和它的相应抗原之间)的“结合”相互作用的引用，可以包括可根据非限制性理论的以下作用中的一种或多种的结果的结合：静电相互作用、疏水性相互作用、空间相互作用、范德华力、氢键等、或影响所述结合事件(例如抗体与多肽结合、检测试剂与抗体/多肽复合体结合)的其它类型的相互作用；或者可以包括分子的任何其它结合相互作用，包括在优选的实施方案中的特异性结合相互作用，其中“特异性”结合的亲和常数 K_a 通常可以小于约 10^{-9} M、小于约 10^{-8} M、小于约 10^{-7} M、小于约 10^{-6} M、小于约 10^{-5} M 或小于约 10^{-4} M。

[0070]有使用多肽来检测样品中抗体的本领域的普通技术人员已知的多种测定形式。参见，例如 *Current Protocols in Immunology* (Coligan 等，编辑，John Wiley & Sons 出版公司)，和 Harlow 和 Lane,

Antibodies. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988, 这些文献通过引用结合至本文中。在优选的实施方案中,所述测定包括使用固定在固相支持体上的多肽(例如如本文描述的包含一个或多个串联重复单位的多肽抗原),与样品中的所述抗体结合并将其除去。然后可以使用与抗体/多肽复合体特异性结合的、且包含易检测部分例如可检测的报道基团的检测试剂,来检测所述被结合的抗体。合适的检测试剂包括与抗体/多肽复合体结合且用报道基团标记的游离多肽(例如在半竞争性测定中)的抗体。可供选择的是,可以用竞争性测定,其中与所述多肽结合的抗体用报道基团来标记,并允许在多肽与样品温育之后与固定化的多肽结合。样品的成分抑制标记的抗体结合至多肽的程度,是样品与固定化多肽的反应性的指示。

[0071]固相支持体可以是本领域普通技术人员已知的多肽可以附着的任何材料。例如,所述支持体可以是在微孔滴定板上的测试孔或硝基纤维素薄膜或其它合适的薄膜。可供选择的是,载体可以是珠或盘,例如玻璃、玻璃纤维、胶乳或塑料例如聚苯乙烯或聚氯乙烯。支持体也可以是磁性颗粒或纤维光学传感器,例如在美国专利第5,359,681号中公开的那些。

[0072]可以使用在专利和科学文献中详细描述的本领域技术人员已知的各种技术使多肽与固相支持体结合。在本发明的上下文中,术语“结合”指非共价缔合,例如吸附,和共价附着(可以是在支持体上抗原和官能团之间的直接连接,或可以通过交联剂方式的连接)。优选通过吸附到微孔滴定板中的孔或吸附到膜的结合。在这些情况下,吸附可以通过使多肽与固相支持体在合适的缓冲液中接触持续合适的时间来实现。接触时间随温度而改变,但通常是约1小时-1天。一般而言,使塑料微孔滴定板(例如聚苯乙烯或聚氯乙烯)的孔与约10 ng - 约1 μ g (.mu.g), 优选约100 ng的多肽接触,足以结合足够量的抗原。每 cm^3 硝基纤维素将结合约100 mg的蛋白质。

[0073]多肽共价附着到固相支持体一般可以通过首先使所述支持

体与双功能试剂反应来实现,该双功能试剂将与所述支持体和多肽上的官能团(例如羟基或氨基)两者反应。例如,可以使用苯醌或通过使支持体上的醛基与多肽上的活性氢和胺缩合,将多肽结合至具有合适聚合物涂层的支持体(参见例如,Pierce Immunotechnology Catalog and Handbook (1991)在A12-A13)。

[0074]在某些实施方案中,所述测定法是酶联免疫吸附测定法(ELISA)。可以通过首先使已经固定在固相支持体(通常是微孔滴定板的孔)上的多肽抗原与样品接触,致使允许样品中的针对多肽的抗体与固定化的多肽结合来完成该测定。然后从固定化的多肽中去除没有结合的样品,并加入能够与固定化的抗体-多肽复合体结合的检测试剂。然后使用适用于特异性检测试剂的方法,测定保持与固相支持体结合的检测试剂的量。

[0075]所述多肽被固定在支持体上后,通常马上阻断支持体上剩余的蛋白质结合位点。可以使用本领域的普通技术人员已知的任何合适的阻断剂,例如牛血清白蛋白(BSA)或吐温20 TM (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.)。然后将固定化的多肽与样品温育,并允许抗体(如果在样品中存在的话)与抗原结合。可以在温育之前用合适的稀释剂(例如磷酸盐缓冲盐水(PBS))稀释样品。一般而言,合适的接触时间(即温育时间)是足以允许检测抗体在感染利什曼原虫的样品中存在情况的时间。优选所述接触时间为足以实现在结合抗体和非结合抗体之间平衡时实现至少95%结合的水平。本领域的普通技术人员将认识到:达到平衡的所需时间可以通过测定在一段时间内发生的结合水平而容易地确定。

[0076]然后可以通过用合适的缓冲液(例如含有0.1%吐温20 TM的PBS)洗涤固相支持体,除去非结合的样品。然后将检测试剂添加至固相支持体。合适的检测试剂是与固定化的抗体-多肽复合体结合并可以通过本领域已知的多种方法中的任何一种检测的任何化合物。优选所述检测试剂含有与报道基团缀合的结合剂(例如蛋白A、蛋白G、

免疫球蛋白、凝集素或游离抗原)。优选的报道基团包括酶(例如辣根过氧化物酶)、底物、辅助因子、抑制剂、染料、放射性核素、发光基团、荧光基团和生物素。可以使用本领域的普通技术人员已知的标准方法,来完成结合剂与报道基团的缀合。也可以从许多来源(例如, Zymed Laboratories, San Francisco, Calif, 和Pierce, Rockford, Ill.)购买与多种报道基团缀合的普通结合剂。

[0077]然后将检测试剂与固定化抗体多肽复合体温育持续足以检测被结合的抗体的时间。一般可以从制造者的说明书或通过测定在一段时间内发生的结合的水平来确定合适的时间。然后去除未结合的检测试剂,并使用报道基团检测被结合的检测试剂。所采用的用于检测报道基团的方法取决于报道基团的性质。对于放射性基团而言,闪烁计数或放射自显影的方法一般是合适的。分光镜方法可以用于检测染料、发光基团和荧光基团。生物素可以使用与不同的报道基团(通常为放射性基团或荧光基团或酶)偶联的抗生物素蛋白来检测,。酶报道基团一般可以通过加入底物(一般需要特定的时间),随后通过反应产物的分光镜分析或其它分析来检测。

[0078]为了测定抗-利什曼原虫抗体在样品中的存在与否,一般将从保持与固相支持体特异性结合的报道基团所检测到的信号,与对应于合适的对照信号(按照在技术上可接受的方法例如预定的截断值)进行比较。在一个优选的实施方案中,截断值可以是当固定化的多肽与来自非感染患者的样品温育时获得的信号平均值。一般而言,产生超过预定的截断值三个标准差的信号的样品被认为是阳性(即与多肽反应)。在备选的优选实施方案中,按照 Sackett 等, *Clinical Epidemiology: A Basic Science for Clinical Medicine*, 第106-7页(Little Brown and Co., 1985)的方法,使用Receiver Operator Curve确定截断值。简而言之,在该实施方案中,可以从对应关于诊断试验结果的各个可能的截断值的真阳性率(即灵敏度)和假阳性率(100%-特异性)的成对曲线来确定截断值。在曲线上最接近左上角(upper lefthand comer)(即

包围最大面积的值)的截断值是最准确的截断值,而所产生的信号高于由该方法测定的截断值的样品可以被认为是阳性的。可供选择的是,所述截断值可以沿着曲线左移,以最小化假阳性率,或右移,以最小化假阴性率。

[0079]在相关的实施方案中,以流过检验或试验纸检验形式执行测定,其中将抗原(例如,一种或多种多肽,各包含至少一个串联重复单位)固定在固相支持体(例如,膜例如硝基纤维素)上。在流过检验中,使液体样品与固相支持体在足以允许当样品通过薄膜时抗体(如果样品中存在抗体)与固定化的多肽特异性结合的条件和持续时间下接触。检测试剂(例如蛋白质A-胶体金)可存在于固相支持体中,或者备选地被施用,然后随含检测试剂的溶液流过所述薄膜而与抗体-多肽复合物结合。然后可以如上所述执行对结合检测试剂的测定。在试验纸检验形式的某些相关实施方案中,将结合多肽抗原的固相支持体薄膜的一端浸入含样品的溶液中。样品沿着薄膜移行,穿过含检测试剂的区域,并到达固定化多肽抗原的区域。检测试剂在固定化多肽抗原区域的聚集表明在样品中存在利什曼原虫抗体。通常检测试剂聚集在那个位置产生容易目测的图形,例如一条线或一连串的两条或多条线。没出现这样的图形指示阴性结果。一般而言,如上所述,当生物样品包含足以在ELISA中产生阳性信号的水平抗体时,选择固定在薄膜上的多肽的量,以产生可目测辨别的图形。优选固定在薄膜上的多肽的量为约25 ng-约1 μ g,更优选约50 ng-约500 ng。通常可以用很少量(例如一滴)的患者血清或血液执行此类试验。

[0080]当然,存在适用于本发明的多肽的众多其它测定方案,它们将被熟悉本领域的人所熟知用于检测能够特异性地结合特定多肽抗原的抗体的存在。以上说明旨在仅作为范例。

治疗、预防、和免疫对抗利什曼病的系统和方法

[0081]如上所述,本发明公开了在生物样品或生物体中筛选和选

择有效检测利什曼原虫感染的串联重复蛋白质的方法，该方法包括步骤：(a)构建利什曼原虫筛选文库；(b)筛选利什曼原虫筛选文库；和(c)分析从筛选利什曼原虫筛选文库中鉴定的基因，以选出为串联重复基因的基因。如本文所述，由本发明的这个方法和其它方法筛选和选择的多肽可以用于不同的应用，包括但不限于在生物体或血液供给品中检测、治疗、预防、监控和免疫对抗利什曼病感染的系统和方法。

[0082]因此，在下面详述的本发明的某些方面，本发明的多肽、抗原表位、串联重复单位、免疫原性序列、融合蛋白和/或可溶性利什曼原虫抗原可以被掺入药物组合物或疫苗中。为了清楚，当描述发明的治疗性组合物和诊断方法的特定实施方案时，将使用术语“多肽”；然而，本领域的技术人员将清楚：本发明的抗原表位、多肽、串联重复单位和融合蛋白也可以用于这样的组合物和方法中。

[0083]药物组合物包含一种或多种多肽，每种多肽可以含有一种或多种上述序列(或其变体)和生理学上可接受的载体。疫苗(也称为免疫原性组合物)包含一种或多种上述的多肽和免疫刺激剂，例如佐剂(例如LbeIF4A、白介素-12或其它细胞因子)或脂质体(将多肽掺入其中)。许多佐剂含有设计用于保护抗原不被快速分解代谢的物质，例如氢氧化铝或液状石蜡、和免疫应答刺激剂，例如脂质A、百日咳杆菌(*Bordetella pertussis*)或肺结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*)衍生的蛋白质。某些佐剂可以市购自，例如，弗氏不完全佐剂和完全佐剂(Difco Laboratories, Detroit, Mich.); Merck佐剂65 (Merck and Company, Inc., Rahway, N.J.); AS-2 (SmithKline Beecham, Philadelphia, Pa.); 铝盐例如氢氧化铝凝胶(明矾)或磷酸铝；钙、铁或锌的盐；酰化酪氨酸的不溶性混悬液；酰化糖；阳离子或阴离子衍生化多糖；聚磷嗪；生物可降解的微球；单磷酰脂质A和quil A。细胞因子例如GM-CSF、白介素-2、白介素-7、白介素-12、和其它类似的生长因子也可以用作佐剂。

[0084]在本发明的某些实施方案中，所述佐剂组合物优选为主要

诱导Th 1型免疫应答的组合物。由于其能够诱导特异的Th 1免疫应答，所以特别优选LbeIF4A及其变体作为佐剂用于本发明的疫苗中。激发主要的Th 1型应答的某些其它优选的佐剂包括，例如，咪喹莫特、Res-咪喹莫特、单磷酸脂质A，优选3-脱-O-酰化单磷酸脂质A与铝盐的组合物。可从Corixa Corporation获得MPL.RTM.佐剂(Seattle, Wash; 参见，例如，美国专利第4,436,727; 4,877,611; 4,866,034和4,912,094号)。含CpG的寡核苷酸(其中CpG二核苷酸是非甲基化的)也诱导主要的Th1应答。这样的寡核苷酸众所周知，例如在WO 96/02555、WO 99/33488和美国专利第6,008,200号和5,856,462号中描述。例如，Sato等，*Science* 273:352, 1996也描述了免疫刺激的DNA序列。另一优选的佐剂包含皂甙，例如Quil A或其衍生物，包括QS21和QS7(Aquila Biopharmaceuticals Inc., Framingham, Mass.); 七叶皂苷; 洋地黄皂甙; 或丝石竹或昆诺阿藜皂甙。其它优选的制剂包括本发明的佐剂组合物中的多于一种的皂甙，例如下述组别中的至少两种的组合物，包括QS21、QS7、Quil A、 β -七叶皂苷或洋地黄皂甙。

[0085]备选地，皂甙制剂可以与由以下组成的疫苗载体组合：壳聚糖或其它聚阳离子聚合物、聚丙交酯和丙交酯-乙交酯的共聚物颗粒、基于聚-N-乙酰葡萄糖胺聚合物的基质、由多糖或化学修饰的多糖组成的颗粒、脂质体和基于脂质的颗粒、由甘油单酯组成的颗粒等。也可以在胆固醇的存在下配制皂甙，以形成微粒结构例如脂质体或ISCOM。此外，可以以非微粒溶液或混悬液，或以微粒结构例如paucilamellar脂质体或ISCOM，与聚氧乙烯醚或酯一起配制皂甙。也可以用赋形剂例如卡波普(Carbopol^R)配制皂甙，以提高粘度，或可以用粉末赋形剂例如乳糖，以干粉形式配制。

[0086]在一个优选的实施方案中，佐剂系统包括单磷酸脂质A与皂甙衍生物的组合物，例如QS21和3D-MPL RTM佐剂的组合物，如在WO 94/00153中所述，或反应原性更小的组合物，其中QS21用胆固醇淬灭，如在WO 96/33739中所述。其它优选的制剂包含水包油型乳剂

和维生素E。在WO 95/17210中描述了在水包油型乳剂中使用QS21、3D-MPL RTM佐剂和维生素E的另一特别优选的佐剂制剂。

[0087]另一增强的佐剂系统包括含CpG的寡核苷酸与皂甙衍生物的组合，尤其是在WO 00/09159中公开的CpG与QS21的组合。优选所述制剂另外还包含水包油型乳剂和维生素E。

[0088]用于本发明的组合物的此外的例示性佐剂包括Montanide ISA 720 (Seppic, France)、SAF (Chiron, Calif, United States)、ISCOMS (CSL)、MF-59 (Chiron)、SBAS系列的佐剂(例如SBAS-2或SBAS-4, 可从SmithKline Beecham, Rixensart, Belgium获得)、Enhanzyn.TM. (Corixa, Hamilton, MT)、RC-529 (Corixa, Hamilton, Mont.)和其它的氨基烷基氨基葡萄糖苷4-磷酸酯(AGP), 例如在美国专利第6,113,918号和未决的美国专利申请序列号09/074,720中所述的那些佐剂, 这些文献的公开内容通过整体引用结合至本文中, 和聚氧乙烯醚佐剂例如在WO 99/52549A1中所述的那些佐剂。

[0089]其它优选的佐剂包括以下通式(I)的佐剂分子： $\text{HO}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n - \text{A} - \text{R}$, 其中n是1-50, A是键或 $-\text{C}(\text{O})-$, R是 C_{1-50} 烷基或苯基 C_{1-50} 烷基。本发明的一个实施方案包括包含通式(I)的聚氧乙烯醚的疫苗制剂, 其中n为1-50, 优选4-24, 最优选9; R组分是 C_{1-50} , 优选 $\text{C}_4 - \text{C}_{20}$ 烷基和最优选 C_{12} 烷基, A是键。聚氧乙烯醚的浓度应该为0.1-20%, 优选0.1-10%, 和最优选0.1-1%。优选的聚氧乙烯醚选自: 聚氧乙烯-9-十二烷基醚、聚氧乙烯-9-十八烷基醚、聚氧乙烯-8-十八烷基醚、聚氧乙烯-4-十二烷基醚、聚氧乙烯-35-十二烷基醚、和聚氧乙烯-23-十二烷基醚。在默克指南(第12版: 条目7717)中描述了聚氧乙烯醚, 例如聚氧乙烯十二烷基醚。在WO 99/52549中描述了这些佐剂分子。若有需要, 以上通式(I)的聚氧乙烯醚可以与另一佐剂组合。例如, 优选的佐剂组合是优选与CpG组合, 如在未决的UK专利申请GB 9820956.2中所述。

[0090]疫苗还可以此外含有释放载体, 例如生物可降解的微球(例

如,在美国专利第4,897,268和5,075,109号中公开的)。在本发明的范围内的药物组合物和疫苗也可以含有掺入多肽组合中的或存在于一种或多种单独的多肽中的其它利什曼原虫抗原。

[0091]备选地,药物组合物或免疫原性组合物可以含有免疫刺激剂,例如佐剂(例如, LbeIF4A、白介素-12或其它细胞因子、或编码此类增强剂的DNA)、和编码上述一种或多种多肽或融合蛋白的致使原位产生所述多肽的多核苷酸(例如DNA)。在这样的组合物中, DNA可以存在于本领域的普通技术人员已知的多种递药系统中的任何一种之内,该递药系统包括核苷酸表达系统、细菌表达系统和病毒表达系统。合适的核苷酸表达系统含有在患者中表达所必需的DNA序列(例如合适的启动子和终结信号)。细菌递药系统涉及给予在其细胞表面上表达所述多肽的免疫原性部分的细菌(例如结核菌(Bacillus-Calmette-Guerrin))。在优选的实施方案中,可以使用病毒表达系统(例如,痘苗病毒或其它的痘病毒、逆转录病毒或腺病毒)引入DNA,该病毒表达系统可以涉及使用不致病的(缺陷型的)、有复制能力的病毒。本领域的普通技术人员熟知将DNA掺入这样的表达系统的技术。DNA也可以是“裸露的”,如例如在Ulmer等, *Science* 259:1745-1749 (1993)中所描述的和由Cohen, *Science* 259:1691-1692 (1993)所综述的。可以通过将裸露的DNA包被在有效地输送入细胞内的可生物降解的珠上,来提高裸露的DNA的摄取。

[0092]当本领域的普通技术人员已知的任何合适的载体可以被用于本发明的药物组合物中时,载体的类型将依赖于给药的模式而改变。对于胃肠外给药,例如皮下注射,载体优选包含水、盐、乙醇、脂肪、蜡或缓冲液。对于口服给药,可以使用以上载体或固相载体中的任何一种,例如甘露醇、乳糖、淀粉、硬脂酸镁、糖精钠、滑石粉、纤维素、葡萄糖、蔗糖、和碳酸镁。生物可降解的微球(例如polylactic galactide)也可以用作本发明的药物组合物的载体。例如在美国专利第4,897,268号和5,075,109号中公开了合适的生物可降解的微球。

[0093]在一个优选的实施方案中，本发明的组合物包括为了提供增强的保护对抗多种利什曼原虫而选择的多种多肽。可以根据天然抗原的起源的物种或根据在不同种的利什曼原虫之间高度保守的氨基酸序列，来选择这样的多肽。个体多肽的组合可以特别有效地用作预防性的和/或治疗性的疫苗，因为：(1)个体多肽(individual polypeptide)的组合对增殖和/或细胞因子生产的刺激可以相加，(2)个体多肽的组合对增殖和/或细胞因子生产的刺激可以协同，(3)个体多肽的组合可以以互补的方式刺激细胞因子谱(cytokine profile)，和/或(4)当在单个感染性利什曼原虫的种或株上更大量地表达个体多肽中的某些时，所述个体多肽可以互相补充。优选的组合含有包含M15、Ldp23、Lbhsp83、Lt-I和LbeIF4A的免疫原性部分的多肽。作为备选或此外，所述组合可包括含本文公开的其它利什曼原虫抗原的免疫原性部分、和/或可溶性的利什曼原虫抗原的一种或多种多肽。

[0094]在另一个优选的实施方案中，本发明的组合物包括为了提供增强的对抗多种利什曼原虫的保护作用而选择的单种多肽。因为上述的那些原因，用于个体多肽组合的单种个体多肽可以特别有效地用作预防性的和/或治疗性的疫苗。

[0095]在另一个实施方案中，本发明的组合物包括个体多肽和上述使用的多肽与多种佐剂例如IL-12(蛋白质或DNA)的组合物，以赋予保护性应答对抗多种利什曼原虫。

[0096]在又一个实施方案中，本发明的组合物包括单用或与多种佐剂例如IL-12(蛋白质或DNA)联用的DNA构建体，以赋予保护性应答对抗多种利什曼原虫的各种利什曼原虫。

[0097]以上药物组合物和疫苗可以用于，例如在患者例如人和狗中诱发保护性免疫对抗利什曼原虫，以预防利什曼病。下面详细地描述了用于该目的的合适的给药剂量和方法。

[0098]本文描述的药物组合物和免疫原性组合物也可以用于刺激免疫应答，该免疫应答在患者中可以是细胞的和/或体液的。对于感染

利什曼原虫的患者，可以产生的免疫应答包括优先的Th1免疫应答(即特征在于产生细胞因子白介素-1、白介素-2、白介素-12和/或 γ -干扰素、以及 α -肿瘤坏死因子的应答)。对于非感染性患者而言，所述免疫应答可以产生白介素-12和/或白介素-2，或刺激 $\gamma\delta$ T-细胞。在任一类的患者中，刺激的应答可以包括IL-12的产生。也可以在得自感染或未感染利什曼原虫的个体的PBMC或其成分的生物样品中激发这样的应答。如上所述，一般可以使用本领域的普通技术人员已知的方法，例如酶联免疫吸附测定法(ELISA)，来执行对于以上细胞因子中的任何一种的分析。

[0099]用于本发明的这方面的合适的药物组合物和疫苗是含有至少一种多肽的那些药物组合物和疫苗，所述多肽包含本文公开的利什曼原虫抗原(或其变体)的免疫原性部分。优选，如上所述，用于药物组合物中的多肽和疫苗是互补的。也可以使用具有或不具有另外的多肽的可溶性利什曼原虫抗原。

[00100]本文描述的药物组合物和疫苗还可以用于治疗遭受对IL-12刺激敏感的疾病折磨的患者。所述患者可以是任何温血动物，例如人或狗。这样的疾病包括感染(可以是例如细菌、病毒或原生动物感染)或诸如癌症的疾病。在一个实施方案中，所述疾病是利什曼病，患者可以显示临床症状或可以无症状。一般而言，可以通过评估用本发明的药物组合物或疫苗治疗在临床相关的免疫方面的效果，来确定特定疾病对IL-12刺激的应答性。例如，如果治疗导致增强的Th1应答或Th2转变成Th1的模式(profile)，伴随在治疗的患者中的临床改善，那么所述疾病为对IL-12刺激敏感。多肽的给药可以按照下面所述，或可以根据指征延长更长的时间。优选，如上所述，用于药物组合物中的多肽和疫苗是互补的。特别优选的组合物包含含LmSTII、Ldp23、Lbhsp83、Lt-1和LbeIF4A、Lmspla、Lmsp9a和TSA的免疫原性部分的多肽。也可以使用具有或不具有另外多肽的可溶性利什曼原虫抗原。

[00101]用于本发明以上方面的给药途径和频率、以及剂量将随个

体而改变,并可比得上当前用于免疫对抗其它感染(包括原生动、病毒和细菌感染)的那些给药途径和频率、以及剂量。一般而言,所述药物组合物和疫苗可以通过注射(例如皮内、肌内、静脉内或皮下注射)、鼻内(例如通过吸入)或口服给药。在一年时间内可以给予1-12个剂量。对于治疗性疫苗(即治疗受感的染个体)而言,优选按1个月间隔,给予12个剂量。对于预防性用途而言,优选按3个月间隔,给予3个剂量。在任一情况下,此后可以周期性地给予增强的疫苗接种。备选方案可适用于各别的患者。合适的剂量是:当如上所述给药时,能够在经免疫接种的患者中引起足以保护患者至少1-2年不患利什曼病的免疫应答的一定量的多肽或DNA。一般而言,存在于剂量中的(或由剂量中的DNA在原位产生的)多肽的量为约100 ng - 约1 mg/kg宿主,通常为约10 µg - 约100 µg。合适的剂量容量随患者的体型而改变,但通常为约0.1 mL - 约5 mL。

[00102]在另一方面,本发明提供在采用皮肤试验的患者中使用一种或多种上述多肽诊断利什曼原虫感染的方法。当用于本文时,“皮肤试验”是在患者身上直接进行的任何测定,在皮内注射如上所述的一种或多种多肽之后,在该患者中测量迟发型超敏(DTH)反应(例如硬结和伴随的发红)。可以使用足以使一种或多种多肽与患者真皮细胞接触的任何合适的装置(例如结核菌素注射器或1mL注射器)来完成这样的注射。优选在注射之后至少48小时,更优选在注射之后72小时对反应进行测量。

[00103]DTH反应是细胞介导的免疫应答,在先前已经暴露于试验抗原(即所使用的多肽的免疫原性部分或其变体)的患者中该反应更强烈。应答可以使用尺进行目测测量。一般而言,直径大于约0.5 cm,优选直径大于约1.0 cm的硬结是阳性反应,表明是利什曼原虫感染,可以或不可以证明为活动性疾病。

[00104]为了用于皮肤试验,优选将本发明的多肽如上所述配制成含至少一种多肽和生理学上可接受的载体的药物组合物。这样的组合

物通常包含以下量的一种或多种上述多肽：在0.1 mL的体积中约1 μ g - 100 μ g，优选约10 μ g - 50 μ g。优选地，用于这样的药物组合物的载体是具有合适的防腐剂(例如苯酚和/或吐温₈₀T)的盐水溶液。

[00105]在使用诸如上述皮肤试验的利什曼病的诊断中，本发明的多肽也可以与一种或多种已知的利什曼原虫抗原联用。优选以这种方式选择个体多肽，以至于相互补充。可以与本发明的多肽有效联用的已知利什曼原虫抗原的实例包括K39(Bums 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1993 90:775-779)。

[00106]提供以下实施例，作为例证而非旨在限制。

实施例

实施例1：寄生虫和感染仓鼠

[00107]婴儿利什曼原虫(*Leishmania infantum*)、杜氏利什曼原虫(*Leishmania donovani*)、硕大利什曼原虫(*Leishmania major*)、亚马逊利什曼原虫(*Leishmania amazonensis*)和克氏锥虫(*Trypanosoma cruzi*)用于感染仓鼠，由此产生感染的血清。用稳定期的 1×10^7 婴儿利什曼原虫(*Leishmania infantum*)、杜氏利什曼原虫(*Leishmania donovani*)、硕大利什曼原虫(*Leishmania major*)、亚马逊利什曼原虫(*Leishmania amazonensis*)或克氏锥虫(*Trypanosoma cruzi*)前鞭毛体使仓鼠心内感染。在8 - 12周之后，处死受感染的仓鼠并收集血清。

实施例2：患者血清

[00108]从临床诊断和在寄生虫学上证明有活动性疾病的患者收集苏丹人内脏利什曼病患者血清。从具有表征充分的患者(包括寄生虫学诊断(表皮利什曼病、疟疾)或培养阳性诊断(结核病)的患者)收集表皮利什曼病(巴西)、结核病(美国)和疟疾(巴西)的患者血清。从美国的健康个体获得正常血清。

实施例3：婴儿利什曼原虫(*L. infantum*)表达文库的血清学筛选

[00109]进行文库的构建和筛选。简而言之，来自婴儿利什曼原虫 (*L. infantium*) 的总DNA通过超声处理随机剪切成平均大小为~2 kb，用 T₄ DNA聚合酶使末端平整，并随后加入EcoRI衔接头。插入物随后接入用EcoRI(Stratagene, La Jolla, CA)预消化的ZAP Express[®]载体中并使用Gigapack III[®] Gold Packaging Extract (Stratagene)包装。扩增噬菌体文库，然后用上述的混合的婴儿利什曼原虫(*L. infantium*)感染的仓鼠血清或混合的苏丹人内脏利什曼病患者血清，根据生产商的指示进行筛选。使用1:100稀释的血清来筛选大约 5×10^5 的噬斑，用碱性磷酸酶缀合的山羊抗-仓鼠IgG或山羊抗-人IgG (KPL, Gaithersburg, MD)和底物BCIP/NBT (KPL)来检测免疫反应性噬斑。根据生产商的方案从免疫反应性噬菌体克隆切除PBK-CMV噬菌粒载体。测序插入物并使用婴儿利什曼原虫(*Leishmania infantum*)基因数据库(GeneDB: The Wellcome Trust Sanger Institute, www.genedb.org)来分析。

实施例4: 串联重复基因分析

[00110]分析通过筛选鉴定的基因，以确定它们是否是串联重复基因。Tandem Repeats Finder (在DNA序列中定位并显示串联重复的程序)用于该分析(<http://tandem.bu.edu/trf/trf.html>) (5)。作为筛选的基因的对照，也分析从婴儿利什曼原虫(*L. infantium*)基因数据库中随机挑选的108种基因的串联重复模体存在。程序依照串联重复基因的属性例如重复的周期大小、按共有模式比对的拷贝数和全部相邻拷贝之间配对的百分比，来计算得分。在该研究中，假如从Tandem Repeats Finder分析的得分高于500，那么所述基因被认为是串联重复基因，从而排除含小的串联重复模体的基因例如LinJ01.0470和LinJ13.0810 (表 I)。

表I. 经血清学筛选鉴定的婴儿利什曼原虫(*L. infantium*)蛋白质
基因DB TR分析

ID	基因	大小	PS	CN	分数
LinJ01.0470	假拟的蛋白质(hypothetical protein)	151	3	11	66
LINJ03.0120	假拟的蛋白质	237	117	31.8	7033
LinJ05.0380	微管缔合蛋白	165	114	28.5	6336
LinJ05.0590	假拟的蛋白质	86			
LinJ08.0860	线粒体DNA聚合酶 β -PAK	154			
LinJ08.1010	应激诱导性蛋白stil	62			
LinJ08.1130	假拟的蛋白质	50			
LinJ10.1460	假拟的蛋白质	56			
LinJ13.0810	假拟的蛋白质	76	15	3.7	74
LinJ14.1160	驱动蛋白K39 (rK39)	241	117	27.9	5237
LinJ14.1190	驱动蛋白K39	95	105	6.2	1198
LinJ14.1540	假拟的蛋白质	112	72	6.1	806
LinJ15.0490	tb-292 membrane associated protein-like	164	105	31.6	6027
LinJ16.1540	驱动蛋白	230	42	138.5	10588
LinJ16.1560	驱动蛋白	88	42	2.5	172
LinJ16.1750	假拟的蛋白质	346	219	8.7	3691
LinJ17.0100	延伸因子1- α	49			
LinJ17.0610	假拟的蛋白质	86			
LinJ18.0610	假拟的蛋白质	68			
LinJ18.1150	假拟的蛋白质	107			
LinJ21.0440	la RNA结合蛋白	37			
LinJ22.0680	假拟的蛋白质	45	30	34.2	1137
LinJ22.1590	假拟的蛋白质	234	84	29.2	3993
LinJ24.1570	基体组分	164			
LinJ26.0980	动力蛋白重链	458			
LinJ26.1200	Hsp70.4热休克蛋白70	70			
LinJ27.0290	核孔蛋白	159	27	2.4	74
LinJ27.0410	钙激活蛋白酶样半胱氨酸肽酶	702	12	2.6	53
LinJ27.1480	假拟的蛋白质	247			
LinJ28.2310	糖蛋白96-92	61	315	2.2	1398
LinJ28.3170	假拟的蛋白质	75	60	23.4	2546
LinJ31.0530	无鞭毛蛋白	21			
LinJ31.1430	假拟的蛋白质	95			
ID	基因	大小	PS	CN	分数
LinJ32.2730	假拟的蛋白质	173	150	10.3	2916
LinJ32.2780	膜缔合性蛋白	131	30	60.9	3125
LinJ33.2870	假拟的蛋白质	413	444	7	6041
LinJ34.0710	假拟的蛋白质	306	168	16.3	4487
LinJ34.2140	假拟的蛋白质	296	249	7.4	3604
LinJ35.0590	蛋白磷酸聚糖(proteophosphoglycan) ppg4	536	45	246.1	10667

LinJ35.0600	蛋白磷酸聚糖ppg3	-	135	37.8	8773
LinJ35.4250	多聚(A)结合蛋白	65	36	3.6	111
LinJ36.4560	线粒体的陪伴蛋白Hsp60	59			
LinJ36.4930	甾醇24-c-甲基转移酶	40			

[00111]在GeneDB中ID号是临时性的并可以改变。以kDa显示大小。在TR分析中PS、CN和得分的数据来自使用Tandem Repeats Finder的程序分析。以粗体字母显示串联重复基因。PS、CN和得分栏中的空白表示在该基因中没有发现重复。PS: 重复的周期大小(bp), CN: 与共有模式比对的拷贝数。

实施例5: 串联重复基因的PCR分析和克隆

[00112]使用与串联重复的单拷贝两端对应的引物(引物序列显示于表II中), 通过PCR扩增LinJ16.1750、LinJ22.1590或LinJ33.2870的串联重复序列。通过PCR扩增LinJ28.2310的全基因序列, 用于该反应的引物也显示于表II中。为了分析那些基因在利什曼原虫(*Leishmania*)种间是否保守, 以婴儿利什曼原虫(*L. infantium*)、杜氏利什曼原虫(*L. donovani*)、硕大利什曼原虫(*L. major*)、亚马逊利什曼原虫(*L. amazonensis*)和克氏锥虫(*Trypanosoma cruzi*)的总DNA用作模板。作为对照, 使用婴儿利什曼原虫(*L. infantium*)和克氏锥虫(*Trypanosoma cruzi*)DNA作为模板(表II中的引物序列), 通过PCR扩增克氏锥虫(*T. cruzi*)基因(GenBank: XM_810936)。为了克隆产生重组蛋白的基因, 将婴儿利什曼原虫(*L. infantium*)总DNA用作PCR反应的模板。

[00113]表II: 用于该研究的引物

基因	引物序列
LinJ16.1750	CAA TTA CAT ATG TAC CCG TTC CTA CGG CTG CAA TTA GGA TCC CTA GCG CGA CGC CAG CTC GTC
LinJ22.1590	CAA TTA CAT ATG GCT GAC CTG AGG GAG CAG CAA TTA GGA TCC CTA CAC CTC GGC GTC CCT GTC
LinJ28.2310	CAA TTA CAT ATG AGC GCT GCA CCG TCC CAA TTA GAA TTC CTA CGC AAG TCC GAG GGC
LinJ33.2870	CAA TTA CAT ATG CAG CGG CTG GTG CTC CAA TTA GGA TCC CTA CGA CGT CCG CGG CAG CGC
克氏锥虫(<i>T. cruzi</i>) XM_810936	CAA TTA CAT ATG TGC ATT GCT CTT GGC ATCGTC CAA TTA AAG CTT CTG GGG CGT GAA GCG TAT GTA CTC

实施例6: 重组蛋白的表达

[00114]将: 与 LinJ16.1750 重复的两个拷贝 (LinJ16.1750r2)、LinJ22.1590 重复的三个拷贝 (LinJ22.1590r3)、LinJ33.2870 重复的一个拷贝 (LinJ33.2870r1) 或 LinJ28.2310 的全基因对应的 PCR 产物插入 pET28 载体的 NdeI/BamHI 或 NdeI/EcoRI 位点。然后分析插入物的序列。为了表达重组蛋白将这些 pET28 载体转化入大肠杆菌 Rosetta 中。通过用 1M 异丙基-β-D-硫代半乳糖苷培养, 来诱导重组蛋白的表达。然后使用 Ni-NTA 琼脂糖 (Qiagen Inc., Valencia, CA) 将重组蛋白纯化为 6x His-标记的蛋白。在 SDS-PAGE 之后通过考马斯蓝染色评价蛋白质的纯化。通过 BCA 蛋白测定法 (Pierce Biotechnology Inc., Rockford, IL) 测量这些蛋白质的浓度。

实施例7: 酶联免疫吸附测定 (ELISA)

[00115]在 ELISA 包被缓冲液中稀释 rLinJ16.1750r2、rLinJ22.1590r3、rLinJ28.2310、rLinJ33.2870、rK39 或 婴儿利什曼原虫 (*L. infantum*) 前鞭毛体可溶性裂解物抗原 (LiSLA), 并用 rLinJ16.1750r2、rLinJ22.1590r3、rLinJ28.2310、rLinJ33.2870 (200 ng)、rK39 (50 ng) 或 LiSLA (1 μg) 涂覆 96 孔板, 随后用含 0.05% 吐温 20 和 1% 牛血清白蛋白的

磷酸盐缓冲盐水封阻。然后，将该板与患者血清(稀释1:100)以及健康对照孵育，然后与辣根过氧化物酶缀合的蛋白G (Zymed laboratories, South San Francisco, CA)孵育。用TMB过氧化物酶底物(KPL)使该板显色并通过微量培养板阅读器在450 nm波长处读数。

实施例8: 在血清学筛选基因中串联重复基因的检测

[00116]来自感染婴儿利什曼原虫(*L. infantium*)的仓鼠或苏丹人内脏利什曼病患者的混合血清用于筛选婴儿利什曼原虫(*L. infantium*)表达文库。筛选出覆盖约8倍(~x8)婴儿利什曼原虫(*L. infantium*)基因组等价物的50万噬斑。从阳性克隆切除PBK-CMV噬菌粒；对插入物测序并使用GeneDB分析。总共43种基因鉴定为编码B细胞抗原的基因(表I)。一些基因编码先前鉴定的抗原例如HSP70和K39 (9, 20)，但它们中的大多数编码先前未鉴定的抗原。

[00117]然后通过Tandem Repeats Finder分析通过筛选鉴定的基因。在该研究中，假如从分析的得分为500或更高，则此基因被认为是串联重复基因，从而排除含小串联重复域的基因。在经血清学筛选而鉴定的43种基因中，有19种基因被鉴定为串联重复基因(表I)。例如，LinJ16.1750含有8.7个拷贝的219 bp序列，而LinJ28.3170含有23.4个拷贝的60 bp序列。除LinJ14.1160 (称为rK39)之外，这些基因新鉴定为编码B细胞抗原的基因。也用Tandem Repeats Finder分析从数据库(来自各染色体的3种基因)随机挑选的108种基因，以比较它们中的与在经筛选而鉴定的基因中的串联重复基因的普遍性(prevalence)。与经筛选的基因相比，在随机挑选的108种基因中没有发现串联重复基因。

实施例9: 串联重复基因的PCR分析

[00118]用来自利什曼原虫(*Leishmania*)种和克氏锥虫(*T. cruzi*)的总DNA来进行PCR扩增，以分析串联重复基因在这些寄生虫之中是否保守。使用LinJ16.1750和LinJ22.1590的串联重复域的特异性引物组，PCR产物显示与一个或多个拷贝的重复对应的梯度条带(图1)。这些基因在利什曼原虫(*Leishmania*)种间是保守的，因为通过所有4个种的利

什曼原虫(*Leishmania*)的试验均观察到相似的带型。当使用LinJ33.2870的串联重复域的引物时, PCR产物也显示了一些条带, 其大小与在利什曼原虫(*Leishmania*)种中但非亚马逊利什曼原虫(*L.amazonensis*)中的一个或两个拷贝的重复相对应(图1)。当使用LinJ33.2870的全基因的引物时, 在婴儿利什曼原虫(*L. infantium*)和杜氏利什曼原虫(*L.donovani*)中发现了1.5 kb的带, 而在硕大利什曼原虫(*L.major*)和亚马逊利什曼原虫(*L.amazonensis*)中分别发现了2.1 kb和1.8 kb的带。在所有的情况下, 在使用克氏锥虫(*T.cruzi*)DNA的PCR反应中均没有发现带。相反, 当克氏锥虫(*T.cruzi*)基因的引物用于PCR时, 在克氏锥虫(*T.cruzi*)中但非婴儿利什曼原虫(*L. infantium*)中发现了预期大小的单个条带。因此, 所述串联重复基因在利什曼原虫(*Leishmania*)和克氏锥虫(*T.cruzi*)之间不保守, 而它们在利什曼原虫各个种(*Leishmania spp.*)之间充分保守。

实施例10: 经内脏利什曼病患者血清识别重组串联重复蛋白质

[00119]为了正式检验作为潜在的诊断候选物的经鉴定串联重复蛋白质, 将LinJ16.1750r2、LinJ22.1590r3、LinJ28.2310和LinJ33.2870r1表达成为重组蛋白(图2)。

[00120]通过ELISA在10份苏丹人内脏利什曼病患者血清的初步筛选中针对重组蛋白抗体的情况(prevalence)。内脏利什曼病患者血清显示比非内脏利什曼病组(即结核病、疟疾和表皮利什曼病患者或健康个体)的血清显著更强的对所有重组蛋白的反应性, 尽管发现: 表皮利什曼病患者显示对LiSLA的抗体应答(图3)。在试验的蛋白质之中, rLinJ16.1750r2是被内脏利什曼病患者血清强烈地识别的最佳抗原, 具有高度特异性。然后, 用另外的苏丹人内脏利什曼病患者血清试验rLinJ16.1750r2。在试验的35份血清中, 34份显示对rLinJ16.1750r2的抗体应答(截断值是健康对照的均值+3SD: 图4A)。使用rLinJ16.1750r2的灵敏度是97%, 相得上rK39 (35/35, 100%: 图4A)的灵敏度。rLinJ16.1750r2和rK39的O.D.均值分别为1.159和1.771。

[00121]虽然这35份血清使用rK39呈100%阳性, 但8份血清显示对

rK39的低反应性(OD值<1.0: 图4A)。测试这8个样品对rLinJ16.1750r2、rLinJ22.1590r3、rLinJ28.2310或rLinJ33.2870r1的反应性,以检验那些抗原是否可以补充rK39的更灵敏抗体检测。8份血清中的5份显示对新抗原的反应比对rK39更好(在图4B中的No.3-7)。5名患者(No.3-7)显示对rLinJ22.1590r3,4名患者(No.4-7)对rLinJ28.2310,和3名患者(No.3、5和6)对rLinJ33.2870r1有更好的反应。通过所有8份血清与rK39比较,rLinJ22.1590r3被微弱地识别。

实施例11: 查找串联重复基因的生物信息学计算机分析

[00122]从婴儿利什曼原虫(*L. infantium*)GeneDB

(<http://www.genedb.org/genedb/linfantum/index.jsp>)获得了8,191种婴儿利什曼原虫(*L. infantium*)基因的DNA序列。Tandem Repeats Finder(用于在DNA序列中定位和显示串联重复的程序)用于该分析

(<http://tandem.bu.edu/trf/trf.html>)。该程序根据串联重复基因的属性例如重复的周期大小、与共有模式比对的拷贝数和全部相邻拷贝之间配对的百分比,来计算得分。因此,在基因分析中高分的输出指:基因具有大的串联重复序列和重复在拷贝之间高度保守。低分意味着相反;例如,具有36 bp重复的3.6拷贝的基因的得分是111。在该研究中,假如来自Tandem Repeats Finder分析的得分高于500,那么将基因作为串联重复基因,因此排除含小串联重复模体的基因。使用这些筛选参数,从婴儿利什曼原虫(*L. infantium*)GeneDB鉴定以下基因。(表3)

表III. 经Tandem Repeats Finder鉴定的婴儿利什曼原虫(*L. infantium*) TR基因

基因ID1	C/I2	产物	大小 (kDa)	PS3 (bp)	CN3	分数3	参考4
LinJ03.0120	C	假拟的蛋白质	237	117	31.8	7033	1
LinJ05.0340	C	亲内脏的利什曼病抗原	95	99	13.8	2545	2
LinJ05.0380	C	微管缔合蛋白	165	114	28.5	6336	1
LinJ09.0950	C	多聚遍在蛋白	74	228	8	3621	
LinJ11.0070	C	假拟的蛋白质	147	138	12.9	2435	
LinJ13.0780	C	假拟的蛋白质	107	63	14.2	1637	
LinJ14.0370	C	假拟的蛋白质	302	84	10.9	1475	
LinJ14.1160	C	驱动蛋白K39	242	117	27.9	5237	1,3
LinJ14.1180	I	驱动蛋白K39	278	168	8.2	2671	
LinJ14.1190	I	驱动蛋白K39	95	315	6.1	2828	1
LinJ14.1200	C	驱动蛋白K39	79	468	3.4	1971	3
LinJ14.1210	I	驱动蛋白K39	337	483	10.9	3676	
LinJ14.1540	C	假拟的蛋白质	112	72	6.1	806	1
LinJ15.0490	I	膜相关的tb-292		105	31.6	6027	1
LinJ15.1570	I		112	105	29.9	5588	
LinJ16.1540	C	驱动蛋白	230	42	138.5	10588	1
LinJ16.1750	C	假拟的蛋白质	346	219	8.7	3691	1
LinJ18.1030	C	假拟的重复蛋白质	46	21	30.4	1036	
LinJ19.0940	C		24	6	95	1076	
LinJ19.1560	I		166	81	21.1	3094	
LinJ20.1220	C	钙激活蛋白酶样半胱氨酸肽酶	112	39	11.3	826	
LinJ21.2010	C	假拟的蛋白质	306	192	5.3	2003	
LinJ22.0410	C	假拟的蛋白质	130	183	15.9	5779	
LinJ22.0680	C	假拟的蛋白质	45	216	5.9	1240	1,4
LinJ22.1510	C	假拟的蛋白质	179	81	13.5	1984	
LinJ22.1520	C		72	39	42.9	3197	
LinJ22.1550	C		126	81	10.4	1504	
LinJ22.1560	I		172	267	16.9	8614	
LinJ22.1570	C		210	81	23.5	3230	
LinJ22.1580	C		175	267	17.1	8591	
LinJ22.1590	C	假拟的蛋白质	234	84	29.2	3993	1
LinJ23.1180	C	亲水表面蛋白(HASPB)	26	42	11.2	832	5
LinJ25.1100	C	假拟的蛋白质	91	66	9.5	1142	
LinJ25.1910	C	假拟的蛋白质	91	369	2	1443	
LinJ26.2140	C	假拟的蛋白质	215	48	63.4	5289	
LinJ27.0140	I	kinetoplast-associated protein-like	33	30	19.9	1086	
LinJ27.0170	C	kinetoplast-associated protein-like	95	30	62.1	3283	
LinJ27.0400	C	钙激活蛋白酶样半胱氨酸肽酶	687	204	43.8	17362	
LinJ28.2310	C	糖蛋白96-92	61	315	2.2	1398	1
LinJ28.3170	C	假拟的蛋白质	75	60	23.4	2546	1
LinJ29.0110	C	假拟的蛋白质	278	24	28.6	967	
LinJ30.0400	C	假拟的蛋白质	56	117	7.4	1716	
LinJ31.1820	C	假拟的蛋白质	49	75	4.1	581	
LinJ31.1840	C	假拟的蛋白质	52	24	18.1	814	
LinJ31.2660	C	假拟的蛋白质	247	456	2.2	1973	

LinJ31.3360	C	假拟的蛋白质	71	30	11.1	556	
LinJ32.2730	C	假拟的蛋白质	173	150	10.3	2916	1
LinJ32.2780	C	membrane associated protein-like	132	30	60.9	3125	1
LinJ32.3710	C	假拟的蛋白质	292	99	3.9	730	
LinJ33.2870	C	假拟的蛋白质	413	444	7	6041	1
LinJ34.0710	I	假拟的蛋白质		336	9.5	4517	1
LinJ34.2140	C	假拟的蛋白质	296	249	7.4	3604	1
LinJ34.4250	C	假拟的蛋白质	168	168	6.1	1960	
LinJ35.0590	C	蛋白磷酸聚糖ppg4	536	45	246.1	10667	1
LinJ35.0600	I	蛋白磷酸聚糖ppg3		135	37.8	8773	1
LinJ35.0610	C	蛋白磷酸聚糖ppg4	291	45	183.2	13275	
LinJ35.0620	I	蛋白磷酸聚糖5	495	90	152.5	15050	
LinJ35.0630	I	蛋白磷酸聚糖ppg4	281	45	176.6	10813	
LinJ35.0640	I	假拟的蛋白质	95	45	58.4	4766	
LinJ35.1530	C	假拟的蛋白质	328	141	2.4	661	
LinJ35.1620	I	假拟的蛋白质		126	8.7	1855	
LinJ35.4500	C	假拟的蛋白质	60	165	4.5	1438	
LinJ36.0320	C	组氨酸分泌性酸性磷酸酶	71	72	6.5	861	
LinJ36.5810	C	假拟的蛋白质	365	276	4.3	2341	

[00123]以下注解对应于在表III中上标的注解: (1)在GeneDB中ID号是临时性的并可以改变; (2)C或I分别指基因是完整的或不完整的基因; (3)在TR分析中PS、CN和得分的数据来自使用Tandem Repeats Finder的程序分析。TR基因以粗体字母显示。PS、CN和得分栏中的空白表示在基因中没有发现重复。PS: 重复的周期大小(bp), CN: 与共有模式比对的拷贝数; 和(4)已经在参考文献中报导了蛋白质的抗原性。

实施例12: 串联重复蛋白质的氨基酸成分的分析

[00124]使用软件EditSeq (DNASTAR Inc., Madison, WI)分析串联重复蛋白质(由经生物信息学分析而鉴定的串联重复基因编码)的同组异序点(isometric point)和氨基酸组成。将赖氨酸和精氨酸分类为强碱性氨基酸, 天冬氨酸和谷氨酸分类为强酸性氨基酸, 天冬酰胺、半胱氨酸、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸和酪氨酸分类为其它的极性氨基酸, 而丙氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、苯丙氨酸、色氨酸和缬氨酸分类为疏水性氨基酸。以同样的方式分析串联重复蛋白质的串联重复域。作为对照, 也分析108种基因(随机选自婴儿利什曼原虫(*L. infantium*)基因数

据库)演绎的氨基酸序列的同组异序点和氨基酸组成。

实施例13: 重组蛋白的表达

[00125]通过PCR扩增编码LinJ20.1220、LinJ25.1100、LinJ32.3710的全部或部分串联重复域的序列。将所扩增的PCR产物插入pET28a的多克隆位点,插入物根据它们的序列与数据库上的匹配而得以证实了。将具有插入物的载体转入表达宿主大肠杆菌(*E. coli*)中,使用Ni-NTA琼脂糖(Qiagen Inc., Valencia, CA)将重组蛋白纯化成6x组氨酸标记的蛋白质。通过BCA蛋白测定法(Pierce Biotechnology Inc., Rockford, IL)测定这些蛋白质的浓度。

实施例14: 从利什曼病患者血清识别串联重复蛋白质

[00126]为了评估串联重复蛋白质的抗原性,在96孔板中使用200 ng抗原/孔执行ELISA。内脏利什曼病患者(苏丹)、表皮利什曼病患者(巴西)和健康个体(美国)的血清按1:100稀释度用于ELISA。

[00127]内脏利什曼病患者血清显示比非内脏利什曼病组(即结核病、疟疾和表皮利什曼病患者或健康个体)的血清显著更强的对所有重组蛋白的反应性,尽管发现了表皮利什曼病患者显示对LiSLA的抗体应答(图6)。在被试验的蛋白质之中,rLinJ16.1750r2是最佳抗原,被内脏利什曼病患者血清强烈地识别,具有高度特异性。然后,用另外的苏丹人内脏利什曼病患者血清试验rLinJ16.1750r2。在试验的35份血清中,34份显示对rLinJ16.1750r2的抗体应答(截断值是健康对照的均值+3SD:图6)。使用rLinJ16.1750r2的灵敏度是97%,比得上rK39(35/35,100%:图6)的灵敏度。rLinJ16.1750r2和rK39的O.D.均值分别为1.159和1.771。

[00128]虽然这35份血清使用rK39呈100%阳性,但8份血清显示对rK39的低反应性(OD值<1.0:图6)。测试这8个样品对rLinJ16.1750r2、rLinJ22.1590r3、rLinJ28.2310或rLinJ33.2870r1的反应性,以检验那些抗原是否可以补充rK39的更灵敏抗体检测。8份血清中的5份显示对新抗原的反应比对rK39更好(在图6中的No.3-7)。5名患者(No.3-7)显示对

rLinJ22.1590r3, 4名患者(No.4-7)对rLinJ28.2310, 和3名患者(No. 3、5和6)对rLinJ33.2870r1有更好的反应。最终, 与rK39比较, rLinJ22.1590r3被所有8份血清微弱地识别。

实施例15: 经血清学筛选和生物信息学鉴定的串联重复蛋白质的 ELISA分析

[00129]在ELISA包被缓冲液中稀释重组串联重复蛋白或婴儿利什曼原虫(*L. infantium*)前鞭毛体可溶性裂解物抗原(LiSLA), 并用rK39 (50 ng)、其它重组蛋白(200 ng)或LiSLA (1 μ g)涂覆96孔板, 随后用含0.05%吐温20和1%牛血清白蛋白的磷酸盐缓冲盐水封阻。然后, 使该板与按1:100稀释的患者血清(n=16)以及健康对照(n=8)孵育, 然后与辣根过氧化物酶缀合的抗-人IgG (Rockland Immunochemicals, Inc., Gilbertsville, PA)孵育。用TMB过氧化物酶底物(KPL)使该板显色并通过微量培养板阅读器在450 nm波长处(570 nm作为参照)读数。

[00130]不仅从血清学筛选中而且单独从生物信息学分析中, 都可在VL患者中检测到与健康对照相比更高水平的抗体串联重复蛋白质(表IV)(图6)。这证明: 不仅从血清学筛选中而且单独经生物信息学分析鉴定, 串联重复蛋白质都是抗原性的。

表IV. 婴儿利什曼原虫(*L. infantium*)串联重复蛋白质在ELISA中的反应性

重组体	PSa (aa)	CNa	大小 (kDa)	OD:		P值
				VL	HC	
经血清学鉴定						
rLinJ05.0380r6	38	6	28	0.786	0.142	**
rLinJ16.1750r2	73	2	18	0.847	0.058	***
rLinJ22.1590r3	28	3	12	0.474	0.042	***
rLinJ28.2310TR	105	2.2	35	1.326	0.123	***
rLinJ33.2870r1	148	1	18	0.476	0.137	**
rLinJ34.2140r2	83	2	20	0.327	0.126	**
单独从生物信息学鉴定						
rLinJ11.0070r2	46	2	12	0.359	0.065	***
rLinJ21.2010TR	64	5.3	38	0.274	0.048	***
rLinJ25.1100TR	22	9.6	27	0.520	0.032	***
rLinJ27.0400r2	68	2	18	0.748	0.117	***
rLinJ29.0110TR	8	28.8	31	0.724	0.185	**
rLinJ32.3710TR	33	3.8	17	0.192	0.124	*
天然的(CRUDE)						
LiSLA				0.885	0.082	***

[00131]注解: aPS: 在氨基酸的单位中一个拷贝的重复的长度, CN: 拷贝数。b显示了VL患者(VL: n=16)和健康对照(HC: n=8)的OD平均值。P值是来自使用Mann-Whitney试验的统计分析。*P<0.05、**P<0.01、***P<0.001。

[00132]从上述将可认识到的是, 虽然本文为了阐述目的而已经描述了本发明特定的实施方案, 但在不违背本发明的精神和范围下可以进行各种修改。因此, 除了附加的权利要求之外本发明不被限制。

<110> 传染病研究所有限公司

Reed, Steven G.

Goto, Yasuyuki

<120> 用于诊断和治疗利什曼病的化合物和方法

<130> IDRI-2008009; CPCH0863717P

<160> 121

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 39

<212> PRT

<213> 婴儿利什曼原虫(*Leishmania infantum*)

<400> 1

序列名称: LinJ03.0120

Gln Gln Arg Leu Val Thr Ala Ala Gln Gln Arg Ala Glu Leu Glu Ala

1

5

10

15

Gln Val Ala Arg Leu Ala Ala Asp Arg Asp Glu Ala Arg Glu Gln Leu

20

25

30

Ala Ala Asn Ala Glu Glu Leu

35

<210> 2

<211> 38

<212> PRT

<213> 婴儿利什曼原虫(*Leishmania infantum*)

<400> 2

序列名称: LinJ05.0380

Asp Pro Ala Met Tyr Asn Thr Thr Thr Lys Asp Ala Tyr Lys Lys Tyr

1 5 10 15

Asp Pro Asp Ala Tyr Arg Arg Glu Leu Pro Ala Asp Asp Gly Glu Gly

 20 25 30

Tyr Glu Lys Ala Pro Val

 35

<210> 3

<211> 76

<212> PRT

<213> 婴儿利什曼原虫(*Leishmania infantum*)

<400> 3

序列名称: LinJ09.0950

Met Gln Ile Phe Val Lys Thr Leu Thr Gly Lys Thr Ile Ala Leu Glu

1 5 10 15

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

Lys Glu Gly Ile Pro Pro Asp Gln Gln Arg Leu Ile Phe Ala Gly Lys
 35 40 45

Gln Leu Glu Glu Gly Arg Thr Leu Ser Asp Tyr Asn Ile Gln Lys Glu
 50 55 60

Ser Thr Leu His Leu Val Leu Arg Leu Arg Gly Gly
 65 70 75

<210> 4

<211> 46

<212> PRT

<213> 婴儿利什曼原虫(*Leishmania infantum*)

<400> 4

序列名称: LinJ11.0070

Leu Arg His Gln Leu Ala Ala Gly Ala Asp Glu Gln Ala Gln Ala His
 1 5 10 15

Glu Ala Leu Arg Ala Glu Leu Ala Ala Ala Gln Ser Glu Arg Asp Asn
 20 25 30

Ala Ala Gln Gln Ala Gln Arg His Ala Glu Glu Leu Glu Gln
 35 40 45

<210> 5

<211> 21

<212> PRT

<213> 婴儿利什曼原虫(*Leishmania infantum*)

<400> 5

序列名称: LinJ13.0780

Ala Ala Pro Ala Gly Glu Ala Gln Ala Ala Glu Glu Gln Glu Pro Ala
 1 5 10 15

Gly Ala Asp Thr Tyr
 20

<210> 6

<211> 28

<212> PRT

<213> 婴儿利什曼原虫(*Leishmania infantum*)

<400> 6

LinJ14.0370

Thr Pro Leu Arg Leu Glu Thr Ala Ser Gly Ala Asp Val Pro Thr Pro
 1 5 10 15

Ser Arg Leu Glu Ala Ala Ser Gly Ala Asp Val Ala

20

25

<210> 7

<211> 56

<212> PRT

<213> 婴儿利什曼原虫(*Leishmania infantum*)

<400> 7

序列名称: LinJ14.1180

Gln Leu Glu Lys Ala His Ala Lys Leu Glu Lys Ser Ser Ala Ala Leu

1

5

10

15

Glu Gln Gln Val Ala Glu Trp Lys Thr Arg Ala Thr Ser Leu Asp Ala

20

25

30

Glu Arg Gly Asp Val Ser Glu Arg Leu Val Arg Leu Glu Gly Glu His

35

40

45

Ala Glu Leu Ala Arg Thr His Glu

50

55

<210> 8

<211> 105

<212> PRT

<213> 婴儿利什曼原虫(*Leishmania infantum*)

<400> 8

序列名称: LinJ14.1190

Ala Leu Arg Gly Gln Leu Glu Glu Ala Asn Ala Glu Lys Glu Arg Leu
1 5 10 15

Gln Ser Glu Leu Glu Glu Lys Gly Ser Glu Ala Glu Ala Ala Lys Glu
 20 25 30

Asp Ser Glu Ala Leu Arg Gly Gln Leu Glu Glu Ala Asn Ala Glu Lys
 35 40 45

Glu Arg Leu Gln Ser Glu Leu Glu Glu Lys Gly Ser Glu Ala Glu Ala
50 55 60

Ala Lys Glu Asp Asn Glu Ala Leu Arg Gly Gln Leu Glu Glu Ala Asn
65 70 75 80

Ala Glu Lys Glu Arg Leu Gln Ser Glu Leu Glu Glu Lys Gly Ser Glu
 85 90 95

Ala Glu Ala Ala Lys Glu Asp Ser Glu
 100 105

<210> 9

<211> 161

<212> PRT

<213> 婴儿利什曼原虫(*Leishmania infantum*)

<400> 9

序列名称: LinJ14.1210

Ala Asn Ala Glu Lys Glu Arg Leu Gln Ser Glu Leu Glu Glu Lys Gly
1 5 10 15

Ser Glu Ala Glu Ala Ala Lys Glu Asp Ser Glu Ala Leu Arg Gly Gln
 20 25 30

Leu Glu Glu Thr Thr Gln Gln Leu Glu Glu Ala Asn Ala Glu Lys Glu
 35 40 45

Arg Leu Gln Ser Glu Leu Glu Glu Lys Gly Ser Glu Ala Glu Ala Ala
 50 55 60

Lys Glu Asp Ser Glu Ala Leu Arg Gly Gln Leu Glu Glu Thr Thr Gln
65 70 75 80

Gln Leu Glu Glu Ala Asn Ala Glu Arg Glu Arg Leu Gln Ser Glu Leu
 85 90 95

Glu Glu Lys Gly Ser Glu Ala Glu Ala Ala Lys Glu Asp Asn Glu Ala
 100 105 110

Leu Arg Gly Gln Leu Glu Glu Thr Thr Gln Gln Leu Glu Glu Ala Asn
 115 120 125

Ala Glu Arg Glu Arg Leu Gln Ser Glu Leu Glu Glu Lys Gly Ser Glu
 130 135 140

Ala Glu Ala Ala Lys Glu Asp Asn Glu Ala Leu Arg Gly Gln Leu Glu
 145 150 155 160

Glu

<210> 10

<211> 24

<212> PRT

<213> 婴儿利什曼原虫 (*Leishmania infantum*)

<400> 10

序列名称: LinJ14.1540

Ala Ser Glu Ala Ala Ser Glu Ser Glu Ala Gly Glu Glu Gly Leu Arg
 1 5 10 15

Arg Pro Ala Ala Ala Ser Glu Glu
 20

<210> 11

<211> 35

<212> PRT

<213> 婴儿利什曼原虫(*Leishmania infantum*)

<400> 11

序列名称: LinJ15.0490

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

Gln Gln Ala Gly Asp Ala Lys Glu Pro Ala Asp Arg Asp Ala Val Leu
 20 25 30

Glu Arg Ser
 35

<210> 12

<211> 35

<212> PRT

<213> 婴儿利什曼原虫(*Leishmania infantum*)

<400> 12

序列名称: LinJ15.1570

Gln Arg Ala Leu Glu Ser Ala Leu Gln Gln Ala Gly Asp Ala Lys Glu
1 5 10 15

Pro Ala Ser Arg Asp Ala Val Leu Glu Arg Ser Met Gly Thr Pro Val
 20 25 30

Asp Glu Thr

35

<210> 13

<211> 14

<212> PRT

<213> 婴儿利什曼原虫(*Leishmania infantum*)

<400> 13

序列名称: LinJ16.1540

Thr Glu Glu Thr Leu Gln Glu Thr Ser Ala Lys Leu Ala Asp

1 5 10

<210> 14

<211> 73

<212> PRT

<213> 婴儿利什曼原虫(*Leishmania infantum*)

<400> 14

序列名称: LinJ16.1750

Tyr Pro Phe Leu Arg Leu His Glu Glu Glu Gly Trp Ala Glu Ala Leu

1 5 10 15

Gly Ala Asp Glu Ala Phe Gln Gly Leu Ala Ala Glu Tyr Ala Asp Leu

20 25 30

Val Cys Asp Ala Arg Lys Asn Ala Ala Ala Leu Arg Ala Val Glu Asp

35

40

45

Ala Met Asn Glu Arg Gly Asp Ala Val Ala Ala Ala Leu Arg Arg Ala

50

55

60

Ala Ala Met Asp Glu Leu Ala Ser Arg

65

70

<210> 15

<211> 7

<212> PRT

<213> 婴儿利什曼原虫(*Leishmania infantum*)

<400> 15

序列名称: LinJ18.1030

His His His His His Arg His

1

5

<210> 16

<211> 27

<212> PRT

<213> 婴儿利什曼原虫(*Leishmania infantum*)

<400> 16

序列名称: LinJ19.1560

Ala Pro Gln Pro Ser Glu Ala Ala Pro Ala Ser Ala Val Glu Ala Leu
 1 5 10 15

Pro Pro Thr Pro Ala Glu Cys Ala Ser Glu Ala
 20 25

<210> 17

<211> 13

<212> PRT

<213> 婴儿利什曼原虫(*Leishmania infantum*)

<400> 17

序列名称: LinJ20.1220

Gln Ala Glu Asp Cys Asn Glu Ala Ala Pro Ala Glu Glu
 1 5 10

<210> 18

<211> 64

<212> PRT

<213> 婴儿利什曼原虫(*Leishmania infantum*)

<400> 18

序列名称: LinJ21.2010

Glu Ala Glu Leu Asp Ala Ala Asn Ala Glu Leu Gln Ala Thr Arg Glu
 1 5 10 15

Ser Ala Ala Ala Ala Arg Pro Thr Arg Gly Asp Gly Asn Pro Phe Ala

20

25

30

Asp Ala Glu Asp Pro Phe Gly Gly Ser Ser Arg Val Ala Ala Pro Cys

35

40

45

Ala Asp Asp Gly Ala Leu Asp Ala Ala Arg Gln Arg Ile Ala Glu Leu

50

55

60

<210> 19

<211> 61

<212> PRT

<213> 婴儿利什曼原虫(*Leishmania infantum*)

<400> 19

序列名称: LinJ22.0410

Gly Val Ala Ala Glu Ala Ala Gly Ala Leu Ala Gln Leu Ala Glu Asp

1

5

10

15

Arg Ala Ala Asp Met Ala Gln Ala Val Ser Ser Ala Glu Gly Gly Ser

20

25

30

Arg Ala Ala Leu Glu Ala Thr Glu Ala Ala Glu Arg Ala Glu Gln Glu

35

40

45

Arg Ala Cys Val Ala Ser Glu Glu Cys Ala Ala Arg Ala

50

55

60

<210> 20
 <211> 27
 <212> PRT
 <213> 婴儿利什曼原虫(*Leishmania infantum*)

<400> 20
 序列名称: LinJ22.1510

Ala Pro Gln Pro Ser Glu Ala Ala Pro Val Ser Ala Val Glu Ala Leu
 1 5 10 15

Pro Pro Thr Pro Ala Glu Cys Ala Ser Glu Ala
 20 25

<210> 21
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> 婴儿利什曼原虫(*Leishmania infantum*)

<400> 21
 序列名称: LinJ22.1520

Asp Val Asn Val His Asn Thr Gln Thr Lys Met Tyr Ile
 1 5 10

<210> 22
 <211> 27
 <212> PRT

<213> 婴儿利什曼原虫 (*Leishmania infantum*)

<400> 22

序列名称: LinJ22.1550

Gln Pro Ser Glu Ala Ala Pro Ala Ser Ala Val Glu Ala Leu Pro Pro
1 5 10 15

Thr Pro Ala Glu Cys Ala Ser Asp Ala Val Pro
 20 25

<210> 23

<211> 89

<212> PRT

<213> 婴儿利什曼原虫 (*Leishmania infantum*)

<400> 23

序列名称: LinJ22.1560

Val Cys Leu His Ala Phe Arg Gly Cys Cys Arg Tyr Cys Val Gly Trp
1 5 10 15

Leu Gln Thr Pro Leu Phe Val Asp Tyr Ile Phe Leu Ser Phe Ala Leu
 20 25 30

Val Phe Tyr Ile Tyr Ser His Ser Phe Ser His Leu Pro Ile Tyr Leu
 35 40 45

Phe Phe Pro Pro Ala Ala Leu Pro Leu Pro His Ser Leu Gly Ala Cys
 50 55 60

Gly Gly Gly Ser Pro Leu Leu Ser Ile Pro Val Val Val Ala Ser Phe
 65 70 75 80

Gln Ile Val Phe Ser Lys Ile Lys Arg
 85

<210> 24

<211> 27

<212> PRT

<213> 婴儿利什曼原虫(*Leishmania infantum*)

<400> 24

序列名称: LinJ22.1570

Ala Pro Gln Pro Ser Glu Ala Ala Pro Val Ser Ala Val Glu Ala Leu
 1 5 10 15

Pro Pro Thr Pro Ala Glu Cys Ala Ser Glu Ala
 20 25

<210> 25

<211> 89

<212> PRT

<213> 婴儿利什曼原虫(*Leishmania infantum*)

<400> 25

序列名称: LinJ22.1580

Cys Arg Leu Val Ser Asn Cys Phe Phe Glu Ser Gln Ala Cys Val Phe

1 5 10 15

Ala Arg Leu Pro Trp Leu Leu Ser Leu Leu Arg Arg Leu Val Ala Asp

 20 25 30

Thr Ser Phe Arg Arg Leu Tyr Leu Ser Phe Leu Arg Pro Arg Leu Leu

 35 40 45

His Leu Leu Pro Phe Val Leu Ser Ser Pro Tyr Ile Phe Val Phe Pro

50 55 60

Thr Arg Gly Ser Ser Ser Thr Ser Leu Pro Arg Cys Val Trp Trp Trp

65 70 75 80

Phe Ala Ser Leu Val Asp Ser Cys Ser

85

<210> 26

<211> 28

<212> PRT

<213> 婴儿利什曼原虫(*Leishmania infantum*)

<400> 26

序列名称: LinJ22.1590

Ala Asp Leu Arg Glu Gln Leu Arg Glu Ala Glu Glu Arg Ala Arg Asp

1 5 10 15

Val Glu Ala Gln Gln Cys Asp Arg Asp Ala Glu Val

20 25

<210> 27

<211> 22

<212> PRT

<213> 婴儿利什曼原虫(*Leishmania infantum*)

<400> 27

序列名称: LinJ25.1100

Ala Glu Ser Val Ala Thr Ile Ser Ile Arg Glu Glu Pro Ser Glu Gly

1 5 10 15

His Arg Asp Asp Lys Val

20

<210> 28

<211> 123

<212> PRT

<213> 婴儿利什曼原虫(*Leishmania infantum*)

<400> 28

序列名称: LinJ25.1910

Ala Asp Val Pro Leu Ala Glu Glu His Glu Asp Gln Pro Glu Ala Tyr
 1 5 10 15

Pro Glu Asp Ala Gln Trp Ala Gly Glu Ala Leu Met Thr Thr Glu Asp
 20 25 30

Ala Lys Pro Ala Glu Asp Glu Asp Lys Tyr Ser Glu Asp Gly Phe Phe
 35 40 45

Lys Asp Ser Ala Ala Asp Ser Ala Val Ala Ala Glu Pro Gln Leu Tyr
 50 55 60

Asn Arg Leu Asp Ala Ala Ala His Asp Asp Asp Ala Val Lys Ala Lys
 65 70 75 80

Ser Asp Val Ala Asp Asp Ala Tyr Asp Glu Asp Asn Phe Glu Asp Glu
 85 90 95

Leu Pro Ser Lys Lys Ser Ser Val Ala Ser Ser Ala Pro Arg Ser Pro
 100 105 110

Ala Ala Gly Ser Arg Lys Ser Asp Ala Ser Gly
 115 120

<210> 29

<211> 16

<212> PRT

<213> 婴儿利什曼原虫(*Leishmania infantum*)

<400> 29

序列名称: LinJ26.2140

Ala Pro Gln Glu Ala Tyr Glu Gly Val Glu Glu Ala Asp Arg Ala Ala

1 5 10 15

<210> 30

<211> 10

<212> PRT

<213> 婴儿利什曼原虫(*Leishmania infantum*)

<400> 30

序列名称: LinJ27.0140

Gln Gln Ala Glu Ala Glu Glu Ala Ala Arg

1 5 10

<210> 31

<211> 10

<212> PRT

<213> 婴儿利什曼原虫(*Leishmania infantum*)

<400> 31

序列名称: LinJ27.0170

Ala Ala Arg Gln Gln Ala Glu Ala Glu Glu

1 5 10

<210> 32

<211> 68

<212> PRT

<213> 婴儿利什曼原虫(*Leishmania infantum*)

<400> 32

序列名称: LinJ27.0400

Arg Ala His Asp Leu Ala Cys Asp Lys Lys Trp Ala Asp Arg Asp Arg

1 5 10 15

Val Leu Asp Pro Lys Pro Glu Gly Val Pro Leu Arg Cys Val Pro Leu

20 25 30

Asp Glu Asp Ala Glu Phe Val Ala Leu Glu Asp Glu Trp Arg Gly Leu

35 40 45

Leu Gln Asp Pro Gln Arg Asn Ser Met Pro Leu Lys Asp Leu Glu Arg

50 55 60

Arg Met Asn Asp

65

<210> 33

<211> 105

<210> 34

<211> 20

<212> PRT

<213> 婴儿利什曼原虫(*Leishmania infantum*)

<400> 34

序列名称: LinJ28.3170

Ala Ala Pro Phe Lys Ser Ala Phe Gly Ala Val Ser Ala Pro Asp Ala

1 5 10 15

Ala Lys Pro Ala

20

<210> 35

<211> 8

<212> PRT

<213> 婴儿利什曼原虫(*Leishmania infantum*)

<400> 35

序列名称: LinJ29.0110

Ala Glu Glu Gln Ala Arg Arg Val

1 5

<210> 36

<211> 39

<212> PRT

<213> 婴儿利什曼原虫(*Leishmania infantum*)

<400> 36

序列名称: LinJ30.0400

Leu Glu Ala Ala Lys Ala Val Ala Asp Ala Arg Val Gln Glu Leu Glu
1 5 10 15

Ala Ala Ala Ala Ser Ser Ala Glu Val Ala Ser Arg Leu Ala Ala Glu
 20 25 30

His Ala Glu His Val Ala Gly
 35

<210> 37

<211> 25

<212> PRT

<213> 婴儿利什曼原虫(*Leishmania infantum*)

<400> 37

序列名称: LinJ31.1820

Ser Ser Ser Gly Ser Ala Gly Glu Val Ser Gly Ser Ser Ser Ser Ser
1 5 10 15

Thr Ala Thr Thr Ala Glu Pro Thr Pro
 20 25

<210> 38

Thr Thr Thr Thr Thr Thr Glu Ala Pro Thr
 1 5 10

<210> 41

<211> 50

<212> PRT

<213> 婴儿利什曼原虫(*Leishmania infantum*)

<400> 41

序列名称: LinJ32.2730

Thr Ala Glu Arg Glu Gln His Glu Ser Arg Val Ala Glu Leu Gln Gln
 1 5 10 15

Gln Leu Glu Thr Glu Arg Asp Arg Ala Ala Ala Ser Gln Ser Thr Val
 20 25 30

Glu Glu Arg Glu Ser Val Leu Gln Gln Arg Leu Ala Glu Leu Arg Thr
 35 40 45

Ser Met
 50

<210> 42

<211> 10

<212> PRT

<213> 婴儿利什曼原虫(*Leishmania infantum*)

<400> 42

序列名称: LinJ32.2780

Glu Glu Gln Ala Arg Leu Ala Arg Glu Ala
 1 5 10

<210> 43

<211> 33

<212> PRT

<213> 婴儿利什曼原虫(*Leishmania infantum*)

<400> 43

序列名称: LinJ32.3710

Ala Ala Pro Lys Arg Pro Leu Thr Ala Glu Gln Ile Ala Ala Glu Arg
 1 5 10 15

Ala Glu Leu Asp Arg Leu Glu Arg Glu Glu Leu Leu Ala Ser Glu Ala
 20 25 30

Thr

<210> 44

<211> 148

<212> PRT

<213> 婴儿利什曼原虫(*Leishmania infantum*)

<400> 44

序列名称: LinJ33.2870

Glu Glu His Ala Pro Ala Leu Gln Arg Val Gly Thr Pro Val Glu Pro

1 5 10 15

Gln Pro Arg Leu Ala Val Thr Thr His Arg Val Arg Leu Asp Gly Asp

 20 25 30

Leu Trp Ala Arg Val Val Asp Glu Trp Pro Asp Leu Leu Lys Gln Glu

 35 40 45

Phe Thr Ser Asp Val Cys Asp Ala Thr Ala Leu Pro Arg Thr Ser Met

50 55 60

Gln Arg Leu Val Leu Thr Ala Gly Ser Leu Val Ala Asp Phe Gln Leu

65 70 75 80

Ser His Gly Gly Leu Ala Lys Arg Glu Leu Asn Lys Gln Leu Ala Ser

 85 90 95

Ser Pro Phe Thr Arg Thr Trp Ala Leu Tyr Glu Arg Val Ala Glu Thr

 100 105 110

Lys Glu Thr Pro Pro Thr Arg Ala Thr Pro Pro Ala Ala Leu Arg Ala

115 120 125

Ser Glu Ser Phe Ala Ser Leu Asp Pro Val Glu Glu Ala Ala Val Leu
 130 135 140

Arg Ala Gln Gln
 145

<210> 45

<211> 111

<212> PRT

<213> 婴儿利什曼原虫 (*Leishmania infantum*)

<400> 45

序列名称: LinJ34.0710

Gly Ala Gly Gly Gly Arg Asp Thr Gly Arg Arg Ala Ala Glu Gly Ala
 1 5 10 15

Gly Gly Arg Gly Glu Ala Glu Gly Arg Gln Pro Pro Ala Gly Gln Arg
 20 25 30

Gln Arg Ala Ala Gly His Arg Ala Gly Glu Gly Ala Gly Gly Gly Arg
 35 40 45

Glu Ala Gly Arg Arg Ser Arg Lys Gly Ala Gly Gly Gly Arg Asp Thr
 50 55 60

Glu Pro Gln Gln Ile Ala Asp Glu Pro Leu Tyr Ala Val Thr Leu Glu
 50 55 60

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

Glu Glu Gln

<210> 47

<211> 56

<212> PRT

<213> 婴儿利什曼原虫(*Leishmania infantum*)

<400> 47

序列名称: LinJ34.4250

Gln Glu Glu Ala Glu Arg Leu Ala Gly Asp Leu Glu Lys Ala Glu Glu
 1 5 10 15

Glu Ala Glu Thr Leu Ala Gly Glu Leu Gln Lys Ala Gln Glu Asp Gly
 20 25 30

Glu Arg Gln Lys Ala Asp Asn Arg Gln Leu Ala Ser Asp Asn Glu Arg
 35 40 45

Leu Ala Thr Glu Leu Glu Arg Ala

50

55

<210> 48

<211> 15

<212> PRT

<213> 婴儿利什曼原虫(*Leishmania infantum*)

<400> 48

序列名称: LinJ35.0590

Pro Ser Ala Ser Ser Ser Ser Ala Pro Ser Ser Ser Ser Ser Ala

1 5 10 15

<210> 49

<211> 45

<212> PRT

<213> 婴儿利什曼原虫(*Leishmania infantum*)

<400> 49

序列名称: LinJ35.0600

Pro Ala Ala Ala Pro Arg Arg Arg Arg Pro Arg Arg Leu Arg Arg Pro

1 5 10 15

Ala Ala Ala Pro Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Leu Arg Arg Pro Ala

20 25 30

Ala Ala Pro Arg Arg Arg Arg Pro Arg Arg Leu Arg Arg

35 40 45

<210> 50
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 婴儿利什曼原虫(*Leishmania infantum*)

<400> 50
 序列名称: LinJ35.0610

Gln Gln Gln Leu Arg Ala Val Gly Val Leu Val Val Cys Ala Val
 1 5 10 15

<210> 51
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> 婴儿利什曼原虫(*Leishmania infantum*)

<400> 51
 序列名称: LinJ35.0620

Gln Gln Leu Arg Ala Val Gly Val Leu Val Val Cys Ala Val Gln Gln
 1 5 10 15

Gln Leu Arg Ala Val Gly Val Leu Val Val Cys Thr Val Gln
 20 25 30

<210> 52
 <211> 15
 <212> PRT

<213> 婴儿利什曼原虫(*Leishmania infantum*)

<400> 52

序列名称: LinJ35.0630

Val Leu Val Val Cys Ala Val Gln Gln Gln Leu Arg Ala Val Gly

1 5 10 15

<210> 53

<211> 15

<212> PRT

<213> 婴儿利什曼原虫(*Leishmania infantum*)

<400> 53

序列名称: LinJ35.0640

Gln Leu Arg Ala Val Gly Val Leu Val Val Cys Ala Val Gln Gln

1 5 10 15

<210> 54

<211> 47

<212> PRT

<213> 婴儿利什曼原虫(*Leishmania infantum*)

<400> 54

序列名称: LinJ35.1530

Leu Arg Ala Ile Ala Gln Ala Leu Gly Val Pro Pro Asp Ala Tyr Ala

1 5 10 15

Gly Glu Arg Asp Gly Glu Cys Val Pro Thr Thr Gly Gln Leu Ala Glu
 20 25 30

Arg Ala Gly Ala Val Val Ser Ala Arg Ala Glu Glu Thr Ala Gly
 35 40 45

<210> 55

<211> 42

<212> PRT

<213> 婴儿利什曼原虫(*Leishmania infantum*)

<400> 55

序列名称: LinJ35.1620

Ala Glu Gln Glu Ala Glu Met Val Ala Leu Arg Gln Leu Leu Ala Glu
 1 5 10 15

Ala Gln Arg Glu Ala Gln Ala Ala Gly Ala Arg Gln Arg Asp Ser Gly
 20 25 30

Ala Ala Val Gln Ala Leu Arg Asp Gln Met
 35 40

<210> 56

<211> 55

<212> PRT

<213> 婴儿利什曼原虫(*Leishmania infantum*)

<400> 56

序列名称: LinJ35.4500

Lys Pro Ser Pro Lys Gln Ala Pro Lys Lys Ala Pro Ile Ala Asp Ser
 1 5 10 15

Asp Ser Asp Asp Asp Glu Pro Val Arg Lys Pro Val Leu Ala Lys Lys
 20 25 30

Pro Val Ala Asp Ser Ser Ser Asp Glu Glu Glu Ala Pro Lys Lys Pro
 35 40 45

Ala Ala Lys Arg Pro Ser Pro
 50 55

<210> 57

<211> 24

<212> PRT

<213> 婴儿利什曼原虫(*Leishmania infantum*)

<400> 57

序列名称: LinJ36.0320

Ser Ser Ser Asp Val Thr Thr Ala Ser Ser Ser Glu Gly Thr Thr Ala
 1 5 10 15

Ser Ser Ser Glu Gly Thr Thr Ala

20

<210> 58

<211> 92

<212> PRT

<213> 婴儿利什曼原虫(*Leishmania infantum*)

<400> 58

序列名称: LinJ36.5810

Glu Glu Arg Leu Glu Ala Ala Ser Ala Glu Gln Gln Gln Leu Gln Ala
 1 5 10 15

Asp Arg Asp Ala Lys Leu Arg Ala Ala Asp Glu Arg Leu Ala Gln Thr
 20 25 30

Ala Ala Ala Arg Gln Glu Leu Cys Asp Ser Val Ala Asp Ala Leu Ala
 35 40 45

Ala Leu Gly Ala Asp Ala Pro Ala Ser Pro Ser Val Ala Glu Ala Ile
 50 55 60

Ala Arg Ala Ala Ala Asp Ala Ala Glu Arg Glu Arg Ala Leu Arg Ala
 65 70 75 80

Glu Val Ala Ala Ala Glu Glu Arg Leu Gln Ala Met
 85 90

<210> 59
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 婴儿利什曼原虫(*Leishmania infantum*)

<400> 59
 序列名称: LinJ19.0940

Val Cys Val Cys Val Cys Val Cys Val Cys
 1 5 10

<210> 60
 <211> 117
 <212> DNA
 <213> 婴儿利什曼原虫(*Leishmania infantum*)

<400> 60
 序列名称: LinJ03.0120 DNA

cagcagcgcc tggtcacggc cgcgcagcag cgcgccgagc tggaggcaca ggtggcacgg 60

ctggccgcgg accgcgacga ggcgcgcgag cagctggccg cgaacgccga ggagctg 117

<210> 61
 <211> 114
 <212> DNA
 <213> 婴儿利什曼原虫(*Leishmania infantum*)

<400> 61

序列名称: LinJ05.0380 DNA

gaccccgcca tgtacaacac gaccaccaag gacgcctaca agaagtacga ccccgacgcg 60

tacaggcgcg agctgccggc ggacgacggc gagggctacg agaaggcgcc cgtg 114

<210> 62

<211> 228

<212> DNA

<213> 婴儿利什曼原虫(*Leishmania infantum*)

<400> 62

序列名称: LinJ09.0950 DNA

atgcagatct tcgtgaagac gctgaccggc aagacgatcg cgctggaggt ggagccgagc 60

gacacgatcg agaacgtgaa ggogaagatc caggacaagg agggcatccc gccggaccag 120

cagcgctga tcttcgccgg caagcagctg gaggagggcc gcacgctctc ggactacaac 180

atccagaagg agtccacgct gcacctggtg ctgcgcctgc gcggcggc 228

<210> 63

<211> 138

<212> DNA

<213> 婴儿利什曼原虫(*Leishmania infantum*)

<400> 63

序列名称: LinJ11.0070 DNA

ctccgccacc agctggccgc cggcgcggac gagcaggcac aggccacga ggccctccgc 60

gctgagctgg cggcggcgca gagcgagcgc gacaacgccg cgcagcaggc gcagcggcac 120

gcagaggagc tggagcag 138

<210> 64

<211> 63

<212> DNA

<213> 婴儿利什曼原虫(*Leishmania infantum*)

<400> 64

序列名称: LinJ13.0780 DNA

gccgcgccag ctggggaggc gcaggccgcg gaagagcagg agcctgctgg cgccgatacc 60

tac 63

<210> 65

<211> 84

<212> DNA

<213> 婴儿利什曼原虫(*Leishmania infantum*)

<400> 65

序列名称: LinJ14.0370 DNA

acaccgctgc gtctcgagac agcctccggc gccgacgtgc cgactccctc gcgtctcgag 60

gcagcctccg gcgcagatgt cgcg 84

<210> 66

- <211> 168
 <212> DNA
 <213> 婴儿利什曼原虫(*Leishmania infantum*)

<400> 66

序列名称: LinJ14.1180 DNA

```
cagctggaga aggcgcatgc gaagctggag aagtcgagtg ccgctctgga gcagcaggtg    60
gcggagtgga agaccgcgc cagagcctg gacgctgagc gcggcgacgt gtcggagcgc    120
cttgtgcggc tggagggcga gcacgcggag ctggccagga cgcacgag                    168
```

- <210> 67
 <211> 315
 <212> DNA
 <213> 婴儿利什曼原虫(*Leishmania infantum*)

<400> 67

序列名称: LinJ14.1190 DNA

```
gcgctgcgcg gccagctgga ggaggcgaac gcggagaagg agcgcctgca gagcgagctg    60
gaggagaagg gctcggaggc cgaggccgcc aaggaggaca gcgaggcgct gcgcggccag    120
ctggaggagg cgaacgcgga gaaggagcgt ctgcagagcg agctggagga gaagggctcg    180
gaggcggagg ccgccaagga ggacaacgag gcgctgcgcg gccagctgga ggaggcgaac    240
gcggagaagg agcgtctgca gagcgagctg gaggagaagg gctcggaggc cgaggccgcc    300
aaggaggaca gcgag                                          315
```

- <210> 68
 <211> 483
 <212> DNA
 <213> 婴儿利什曼原虫(*Leishmania infantum*)

<400> 68

序列名称: LinJ14.1210 DNA

```

gcgaacgcgg agaaggagcg tctgcagagc gagctggagg agaagggctc ggaggccgag      60

gccgccaagg aggacagcga ggcgctgcgc ggccagctgg aggagacgac ccagcagctg      120

gaggaggcga acgcggagaa ggagcgcctg cagagcgagc tggaggagaa gggctcggag      180

gcggaggccg ccaaggagga cagcggaggc ctgcgcggcc agctggagga gacgaccag      240

cagctggagg aggcgaacgc ggagagggag cgtctgcaga gcgagctgga ggagaagggc      300

tcggaggccg aggccgcaa ggaggacaac gaggcgctgc gcggccagct ggaggagacg      360

accagcagc tggaggaggc gaacgcggag agggagcgtc tgcagagcga gctggaggag      420

aagggtcgg aggccgaggc cgccaaggag gacaacgagg cgctgcgcgg ccagctggag      480

gag                                                                                   483

```

- <210> 69
 <211> 72
 <212> DNA
 <213> 婴儿利什曼原虫(*Leishmania infantum*)

<400> 69

序列名称: LinJ14.1540 DNA

gcgtcggaaag ccgcttcgga atccgaggcg ggggaagagg gtctgcgccg gcctgcggcg 60

gcgtcggaaag ag 72

<210> 70

<211> 105

<212> DNA

<213> 婴儿利什曼原虫(*Leishmania infantum*)

<400> 70

序列名称: LinJ15.0490 DNA

atgggcacgc ccgtcgacga ggcggagcgg gcgctggaga gcgctctgca gcaagccggc 60

gatgcgaagg agcccgccga ccgcgacgcc gtgctggagc ggtcg 105

<210> 71

<211> 105

<212> DNA

<213> 婴儿利什曼原虫(*Leishmania infantum*)

<400> 71

序列名称: LinJ15.1570 DNA

cagcgggcgc tggagagcgc tctgcagcaa gccggcgatg cgaaggagcc cgccagccgc 60

gacgccgtgc tggagcggtc gatgggcacg cccgtcgacg agacg 105

<210> 72
 <211> 42
 <212> DNA
 <213> 婴儿利什曼原虫(*Leishmania infantum*)

<400> 72

序列名称: LinJ16.1540 DNA

accgaggaga cgctgcagga gacgtccgcc aagctcgccg ac 42

<210> 73
 <211> 219
 <212> DNA
 <213> 婴儿利什曼原虫(*Leishmania infantum*)

<400> 73

序列名称: LinJ16.1750 DNA

taccggttcc tacggctgca cgaggaggag gggtagggcg aagcgcttg ggaggacgag 60

gcgttccagg gtcttgctgc ggagtacgag gacctggtgt gcgatgcgag gaagaacgcc 120

gccgcgctgc gcgctgtgga ggacgcgatg aacgagcgcg gcgacgccgt tgcggcccgcg 180

ctgcggcgcg ctgctcgat ggacgagctg gcgtcgcg 219

<210> 74
 <211> 21
 <212> DNA

<213> 婴儿利什曼原虫(*Leishmania infantum*)

<400> 74

序列名称: LinJ18.1030 DNA

caccaccacc accaccgaca c

21

<210> 75

<211> 30

<212> DNA

<213> 婴儿利什曼原虫(*Leishmania infantum*)

<400> 75

序列名称: LinJ19.0940 DNA

gtgtgcgtgt gcgtgtgcgt gtgcgtgtgc

30

<210> 76

<211> 81

<212> DNA

<213> 婴儿利什曼原虫(*Leishmania infantum*)

<400> 76

序列名称: LinJ19.1560 DNA

gcgccccagc cgagcgaggc ggcgccggcg tctgcagtgg aggctctgcc tccgacgct

60

gccgagtgcg catctgaggc g

81

<210> 77

<211> 39

<212> DNA

<213> 婴儿利什曼原虫(*Leishmania infantum*)

<400> 77

序列名称: LinJ20.1220 DNA

caggctgagg attgcaacga ggccgcaccg gcagaggag 39

<210> 78

<211> 192

<212> DNA

<213> 婴儿利什曼原虫(*Leishmania infantum*)

<400> 78

序列名称: LinJ21.2010 DNA

gaggcggagc tggatgcggc caatgctgag ctgcaggcta cccgcgagag tgccgctgct 60

gcgcggccca cacgcggtga cgggaacccg ttcgccgacg ccgaggaccg gttcggcggc 120

tcgtcgcgcg tcgctgcacc gtgtgcggac gacggggcgc tggatgctgc ccgccagagg 180

atcgcggagc tg 192

<210> 79

<211> 183

<212> DNA

<213> 婴儿利什曼原虫(*Leishmania infantum*)

<400> 79

序列名称: LinJ22.0410 DNA

ggcgttgctg ccgaggcggc gggcgcgctg ggcagctgg cggaggaccg cgccgaggac 60

atggcgcagg ccgtgtcgag cgccgaggga ggcagccgcg ccgcccttga ggcaaccgag 120

gccgccgagc ggcgccgagca ggagcgcgct tgcgttgctg cggaggagtg cgctgcgcgc 180

gcc 183

<210> 80

<211> 81

<212> DNA

<213> 婴儿利什曼原虫(*Leishmania infantum*)

<400> 80

序列名称: LinJ22.1510 DNA

gccccccagc cgagcgaggc ggcgccggtg tctgcagtgg aggctctgcc tccgacgct 60

gccgagtgcg catctgaggc g 81

<210> 81

<211> 39

<212> DNA

<213> 婴儿利什曼原虫(*Leishmania infantum*)

<400> 81

序列名称: LinJ22.1520 DNA

gacgttaatg tacacaacac acaaacaaag atgtatata 39

<210> 82
 <211> 81
 <212> DNA
 <213> 婴儿利什曼原虫(*Leishmania infantum*)

<400> 82
 序列名称: LinJ22.1550 DNA

cagccgagcg aggcggcgcc ggcgtctgca gtggaggctc tgcctccgac gcctgccgag 60

tgcgcatccg acgccgtgcc a 81

<210> 83
 <211> 267
 <212> DNA
 <213> 婴儿利什曼原虫(*Leishmania infantum*)

<400> 83
 序列名称: LinJ22.1560 DNA

gtgtgtttgc acgccttccg tggttgctgt cgttactgcg tcggttggtt gcagacacct 60

cttttcgtcg actatatcctt tctttctttc gccctcgtct tttacatcta ctcccattcg 120

ttctctcatc tcctatata tttgtttttc ccaccgcgg ctcttctct acctcactcc 180

ctcggtgcg gtggtgggtg ttcgcctctc ttgtcgattc ctgtagttgt cgctcgttt 240

caaattgttt tttcggaaat caagcgt 267

<210> 84

<211> 81

<212> DNA

<213> 婴儿利什曼原虫(*Leishmania infantum*)

<400> 84

序列名称: LinJ22.1570 DNA

gcgccccagc cgagcgaggc ggcgccggtg tctgcagtgg aggctctgcc tccgacgcct 60

gccgagtgcg catctgaggc g 81

<210> 85

<211> 267

<212> DNA

<213> 婴儿利什曼原虫(*Leishmania infantum*)

<400> 85

序列名称: LinJ22.1580 DNA

tgtcgccctcg ttcaaatg ttttttcgaa agtcaagcgt gtgtgtttgc acgccttccg 60

tggttgctgt cgttactgcg tcggttggtt gcagacacct cttttcgtcg actatatctt 120

tctttccttc gcctcgtct tttacatcta ctcccattcg ttctctcatc tcctatata 180

tttgtttttc ccaccgcgg ctcttctct acctcactcc ctcggtgcgt gtggtggtgg 240

ttegcctctc ttgtcgattc ctgtagt 267

<210> 86

<211> 84

<212> DNA

<213> 婴儿利什曼原虫 (*Leishmania infantum*)

<400> 86

序列名称: LinJ22.1590 DNA

gctgacctga gggagcagct gcgtgaggcg gaggagcgcg cgagggacgt ggaggcgag 60

cagtgcgaca gggacgccga ggtg 84

<210> 87

<211> 66

<212> DNA

<213> 婴儿利什曼原虫 (*Leishmania infantum*)

<400> 87

序列名称: LinJ25.1100 DNA

gccgagagtg tcgccacat ctccatacgg gaggagccca gcgaaggcca ccgggacgac 60

aaggta 66

<210> 88

<211> 369

<212> DNA

<213> 婴儿利什曼原虫 (*Leishmania infantum*)

<400> 88

序列名称: LinJ25.1910 DNA

gccgatgtcc cgctggctga agagcacgag gaccagccgg aagcctatcc agaggatgcg 60

cagtgggctg gagaggcttt gatgaccacc gaggatgcga agccagcgga ggacgaggac 120

aagtacagcg aggacggctt cttcaaggat agcgccgagg acagtgccgt cgcggcggaa 180

ccgcagctat acaatcggtt ggatgccgcc gccacgacg acgacgctgt gaaggccaag 240

agcgacgtag ccgacgacgc gtacgacgag gacaacttcg aggatgaact gccctccaag 300

aagtcgtcgg tggcctcgtc cgcgccgga tcgccggccg cggggtcgag gaagagcgac 360

gcctcgggc 369

<210> 89

<211> 48

<212> DNA

<213> 婴儿利什曼原虫(*Leishmania infantum*)

<400> 89

序列名称: LinJ26.2140 DNA

gctccgcagg aggcgtacga gggcgtggag gaggctgacc gcgctgcc 48

<210> 90

<211> 30

<212> DNA

<213> 婴儿利什曼原虫(*Leishmania infantum*)

<400> 90

序列名称: LinJ27.0140 DNA

cagcaggccg aggcggagga ggctgcccgc 30

<210> 91

<211> 30

<212> DNA

<213> 婴儿利什曼原虫(*Leishmania infantum*)

<400> 91

序列名称: LinJ27.0170 DNA

gctgcccgcc agcaggccga ggcggaggag 30

<210> 92

<211> 204

<212> DNA

<213> 婴儿利什曼原虫(*Leishmania infantum*)

<400> 92

序列名称: LinJ27.0400 DNA

cgcgcgcacg accttgcggtg cgacaagaag tggcgggacc gcgacagggt gctggacccg 60

aagccggagg gcgtgccgct gcgctgcgtc ccgctggacg aggacgcgga gttcgtggcg 120

ctggaggacg agtggcgcggt cctgctgcag gaccacagc gcaacagcat gccgtgaag 180

gacctggaga ggaggatgaa cgac 204

<210> 93
 <211> 315
 <212> DNA
 <213> 婴儿利什曼原虫(*Leishmania infantum*)

<400> 93
 序列名称: LinJ28.2310 DNA

gaggagctgc agcgccagcg cgaggaggag gagaagcagc gcatcgagat ggtgcgcaag 60
 cagcgtgagg aggcccaaaa gaagcgggag gagatccaga agcagcgcga ggatgagatc 120
 aagcgccgca aggctgagat cgaagcagag aggcagaagc tgaaggagct gcaggaggag 180
 cacgagaggg agcaggagga ggtccgccag cgtcgcgtcg cggaggagaa ggaggcacag 240
 aagagggccg agaagaaggc cgaggaggtc gagggcgagt tcgctgcgac gcgccggcag 300
 aggaaggggg agttg 315

<210> 94
 <211> 60
 <212> DNA
 <213> 婴儿利什曼原虫(*Leishmania infantum*)

<400> 94
 序列名称: LinJ28.3170 DNA

gctgcgccgt tcaagagcgc ctttgggtgcc gtgtctgcac cggatgcggc caagcctgct 60

<210> 95

<211> 24

<212> DNA

<213> 婴儿利什曼原虫(*Leishmania infantum*)

<400> 95

序列名称: LinJ29.0110 DNA

gctgaggagc aggcgcgtcg cgtg 24

<210> 96

<211> 117

<212> DNA

<213> 婴儿利什曼原虫(*Leishmania infantum*)

<400> 96

序列名称: LinJ30.0400 DNA

ctggaggccg cgaaggctgt ggctgacgcg agsgtgcagg agctggagc ggctgccgcg 60

tcgagcggcg aggtggcgag caggctggcc gccgagcacg ctgagcacgt cgccggg 117

<210> 97

<211> 75

<212> DNA

<213> 婴儿利什曼原虫(*Leishmania infantum*)

<400> 97

序列名称: LinJ31.1820 DNA

agcagctccg gctcggccgg cgaggtgtcc gggtcgtcga gctcagcac cgccacgacc 60

gcagagccga ctccg	75
<210> 98	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> 婴儿利什曼原虫(<i>Leishmania infantum</i>)	
<400> 98	
序列名称: LinJ31.1840 DNA	
ccgacgacca cgacgaccga ggca	24
<210> 99	
<211> 456	
<212> DNA	
<213> 婴儿利什曼原虫(<i>Leishmania infantum</i>)	
<400> 99	
序列名称: LinJ31.2660 DNA	
cgcggcgggt acggcagcat gatggaggcc gacagcgctg tggccccaga cgcgagcgct	60
gcgtcgcggt cgaatggcgg gtacagcggt ggcgggcgca gcgagacgag cgtgcaatcg	120
cgcggcgggt acggcagcat gatggaggcc gacagcgctg tggccccaga cgcgggcgct	180
gcgtcgcggt cgaatggcgg gtacagcctt ggcgggcgcg gcgggtacgg cagcatgatg	240
gaggccgaca gcgtgtggc cccagacgcg ggcgctgcgt cgcgttcgaa tggcgggtac	300
agcgttggcg ggcgacgca gacgagcgctg cggtcgcgcg gcgggtacgg cagcatgatg	360

gaggccgaca gcgctgtggc cccagacgcg ggcgctgcgt cgcgttcgaa tggcgggtac 420

agccttggcg ggcgcagcga gacgagcgtg caatcg 456

<210> 100

<211> 30

<212> DNA

<213> 婴儿利什曼原虫(*Leishmania infantum*)

<400> 100

序列名称: LinJ31.3360 DNA

acaacgacca cgacgacaga ggcaccaacg 30

<210> 101

<211> 150

<212> DNA

<213> 婴儿利什曼原虫(*Leishmania infantum*)

<400> 101

序列名称: LinJ32.2730 DNA

acagcggagc gcgagcagca cgagagccgg gtggcggagc tgcagcagca gctagagacg 60

gagcgcgacc ggcgggctgc cagccagtct actgtggagg agcgcgagtc tgtgttgcag 120

cagcgcctcg ccgagctgcg caccagtatg 150

<210> 102

<211> 30

<212> DNA

<213> 婴儿利什曼原虫(*Leishmania infantum*)

<400> 102

序列名称: LinJ32.2780 DNA

gaggagcagg cacggctcgc ccgtgaggcg 30

<210> 103

<211> 99

<212> DNA

<213> 婴儿利什曼原虫(*Leishmania infantum*)

<400> 103

序列名称: LinJ32.3710 DNA

gcgccccga agcggcgct cacggcggag cagattgcgg ctgagcgcgc tgagctggac 60

cggtggagc gcgaggagct gctggcctct gaggccacg 99

<210> 104

<211> 444

<212> DNA

<213> 婴儿利什曼原虫(*Leishmania infantum*)

<400> 104

序列名称: LinJ33.2870 DNA

gaggagcatg cgccagcgct gcagcgcgtc ggcacgccgg tggagccgca gccgcgcctc 60

gcggtcacga cacaccgggt tcgcctggac ggcgatttgt gggcgcgtgt cgtcgacgag 120

tggccggacc tgctcaagca ggagttcaca agcgacgtgt gcgatgccac ggcgctgccg 180

cggacgtcga tgcagcggct ggtgctcaca gccggcagcc tcgtcgccga cttccagctc 240

tcgcacggag gcctcgcgaa gagggagctg aacaagcagc ttgccagctc gcccttcacc 300

cgcacctggg cactgtacga gcgctcgcc gagacgaaag agacgccgcc cacccgcgcc 360

acgccccgg ctgcccttcg cgcctcggag agcttcgcgt cgctggacc ggtggaggag 420

gccgcagtgc tgcgtgcgca gcag 444

<210> 105

<211> 335

<212> DNA

<213> 婴儿利什曼原虫(*Leishmania infantum*)

<400> 105

序列名称: LinJ34.0710 DNA

ggcgcaggag gaggccgaga cactggccgg cgagctgcag aaggcgcagg aggacgggga 60

gaggcagagg gccgacaacc gccagctggc cagcgacaac gagcggctgg ccaccgagct 120

ggagagggcg caggaggagg ccgagaggct ggccggcgat ctcgaaaagg cgcaggagga 180

ggccgagaca ctggcggcga gctgcagaag gcgcaggagg acggggagag gcagaaggcc 240

gacaaccgcc agctggccag cgacaacgag cggctggcca ccgagctgga gagggcgcag 300

gaggaggccg agaggctggc cggcgatctc gaaaa 335

<210> 106

<211> 249

<212> DNA

<213> 婴儿利什曼原虫(*Leishmania infantum*)

<400> 106

序列名称: LinJ34.2140 DNA

agggcggagg cggagaggct tgcgaaggag gtggccgct tccgcgcgag gcgcaacgcg 60

gcgctggagg cccgcgacgc ggacggcacg ctgcccgtgc cggcaaggcc tgtgcccgcg 120

ggcgaggcgg cggagcgcgc gctggagccg cagcagatcg ccgacgagcc gctgtacgct 180

gtgacgctgg aggagtacct gggcaaggac gcggccgtgg agcagctggc ggcgagctg 240

gaggagcag 249

<210> 107

<211> 168

<212> DNA

<213> 婴儿利什曼原虫(*Leishmania infantum*)

<400> 107

序列名称: LinJ34.4250 DNA

caggaggagg ccgagaggct ggccggcgat ctcgaaaagg cagaggagga ggccgagaca 60

ctggcgggcg agctgcagaa ggcgaggag gacggggaga ggcagaaggc cgacaaccgc 120

cagctggcca gcgacaacga gcggtggcc accgagctgg agaggcgg 168

<210> 108

<211> 45

<212> DNA

<213> 婴儿利什曼原虫(*Leishmania infantum*)

<400> 108

序列名称: LinJ35.0590 DNA

ccgtcgcggt cgtcgtcgtc tgcgccgtcc agcagcagct ccgcg 45

<210> 109

<211> 135

<212> DNA

<213> 婴儿利什曼原虫(*Leishmania infantum*)

<400> 109

序列名称: LinJ35.0600 DNA

ccagcagcag ctccgcgccg tcggcgtcct cgtcgtctgc gccgtccagc agcagctccg 60

cgccgtcggc gtcgtcgtcg tctgcgccgt ccagcagcag ctccgcgccg tcggcgtcct 120

cgtcgtctgc gccgt 135

<210> 110

<211> 45

<212> DNA

<213> 婴儿利什曼原虫(*Leishmania infantum*)

<400> 110

序列名称: LinJ35.0610 DNA

cagcagcagc tccgcgccgt cggcgtcctc gtcgtctgcg ccgtc 45

<210> 111

<211> 90

<212> DNA

<213> 婴儿利什曼原虫(*Leishmania infantum*)

<400> 111

序列名称: LinJ35.0620 DNA

cagcagctcc gcgccgtcgg cgtcctcgtc gtctgcgccg tccagcagca gctccgcgcc 60

gtcggcgtcc tcgtcgtctg caccgtccag 90

<210> 112

<211> 45

<212> DNA

<213> 婴儿利什曼原虫(*Leishmania infantum*)

<400> 112

序列名称: LinJ35.0630 DNA

gtcctcgtcg tctgcgccgt ccagcagcag ctccgcgccg tcggc 45

<210> 113

<211> 45

<212> DNA

<213> 婴儿利什曼原虫(*Leishmania infantum*)

<400> 113

序列名称: LinJ35.0640 DNA

cagctccgcg ccgtcggcgt cctcgtcgtc tgcgccgtcc agcag 45

<210> 114

<211> 141

<212> DNA

<213> 婴儿利什曼原虫(*Leishmania infantum*)

<400> 114

序列名称: LinJ35.1530 DNA

ctgcgcgcca tcgcccaggc cctcggcgtg ccgcccggacg cgtacgctgg cgagcgggac 60

ggcgagtgcg tgccaacaac cggacagcta gcggagcgcg ctggcgctgt ggtgagcgcc 120

cgcgctgagg agacggcggg g 141

<210> 115

<211> 126

<212> DNA

<213> 婴儿利什曼原虫(*Leishmania infantum*)

<400> 115

序列名称: LinJ35.1620 DNA

gcggagcagg aggcggagat ggttgcgctc cgccagctgc tggctgaggc acagcgcgag 60

gcacaggccg ccggcgcaag acagcgcgac agtggcgccg ctgtgcaggc gctgcgcgac 120

cagatg 126

<210> 116

<211> 165

<212> DNA

<213> 婴儿利什曼原虫(*Leishmania infantum*)

<400> 116

序列名称: LinJ35.4500 DNA

aagccttcgc caaagcaggc cccaagaag gccccatcg ccgacagcga cagcgcgac 60

gacgagcctg ttcgaagcc ggtgctagcc aaaaagcctg tggcggactc gagctctgac 120

gaggaggagg ctccgaaaaa gccggcggcg aagcgccctt ctccg 165

<210> 117

<211> 72

<212> DNA

<213> 婴儿利什曼原虫(*Leishmania infantum*)

<400> 117

序列名称: LinJ36.0320 DNA

agcagcagcg acgttaccac cgccagcagc agcgagggca ccaccgccag cagcagcag 60

ggcaccaccg cc 72

- <210> 118
 <211> 276
 <212> DNA
 <213> 婴儿利什曼原虫(*Leishmania infantum*)

<400> 118

序列名称: LinJ36.5810 DNA

```

gaggagcggc tggaggcggc gagcgccgag cagcagcagc tgcaggcggg ccgcgacgcg      60
aagctgcgtg ccgcggacga gcggctggcg cagacggcgg ctgcgcgcca ggagctgtgc      120
gacagcgttg ccgacgcgct tgctgcgttg ggtgcggacg cgccggcgtc gccgtctgtc      180
gcggaggcga ttgcgcgcgc gcccgccgat gccgcggagc gcgagcgtgc actgcgcgcc      240
gaggtcgccg cggcggagga ggcctgcag gcgatg                                     276

```

- <210> 119
 <211> 39
 <212> PRT
 <213> 婴儿利什曼原虫(*Leishmania infantum*)

<400> 119

序列名称: rK36

```

Leu Glu Gln Gln Leu Arg Asp Ser Glu Glu Arg Ala Ala Glu Leu Ala
1           5           10           15

```

Ser Gln Leu Glu Ala Thr Ala Ala Ala Lys Met Ser Ala Glu Gln Asp
 20 25 30

Arg Glu Asn Thr Arg Ala Ala
 35

<210> 120

<211> 14

<212> PRT

<213> 婴儿利什曼原虫(*Leishmania infantum*)

<400> 120

序列名称: rK26

Lys Glu Asp Gly Arg Thr Gln Lys Asn Asp Gly Asp Gly Pro
 1 5 10

<210> 121

<211> 10

<212> PRT

<213> 婴儿利什曼原虫(*Leishmania infantum*)

<400> 121

序列名称: rLiA2

Val Gly Pro Gln Ser Val Gly Pro Leu Ser
 1 5 10

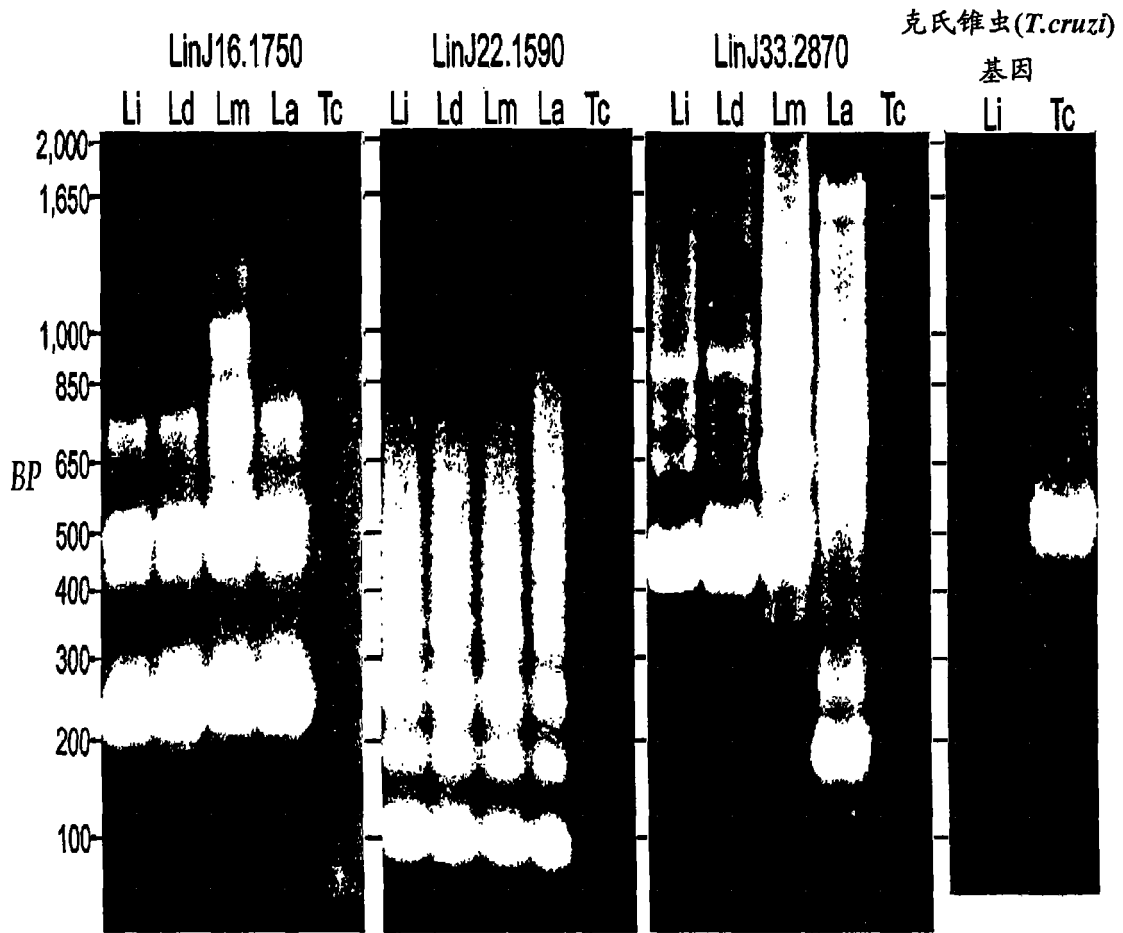


图 1

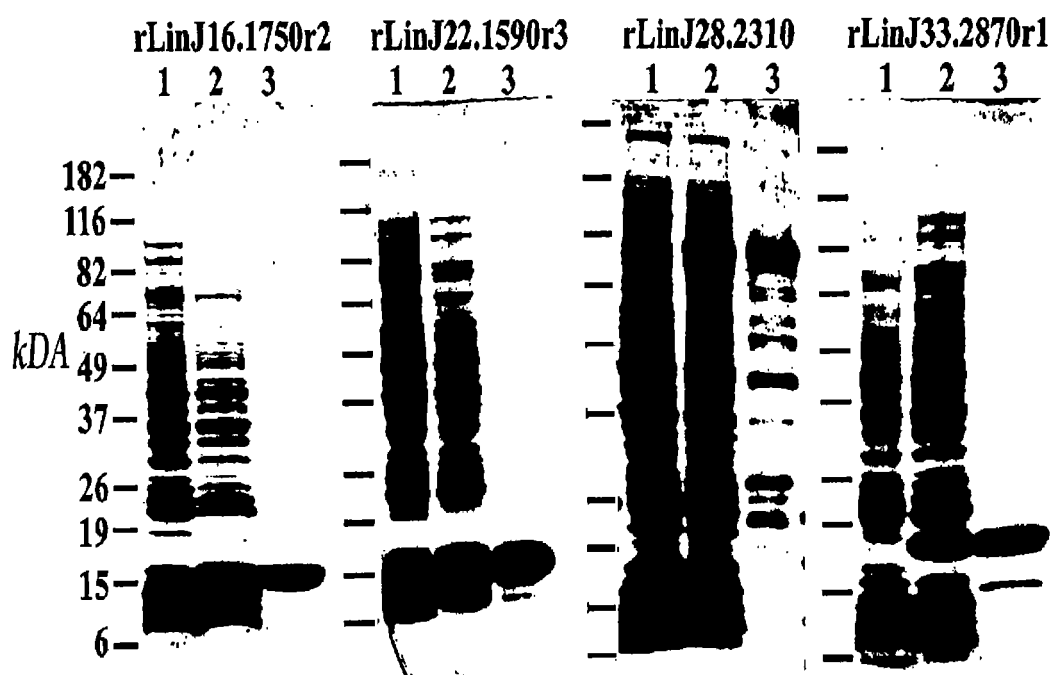


图 2

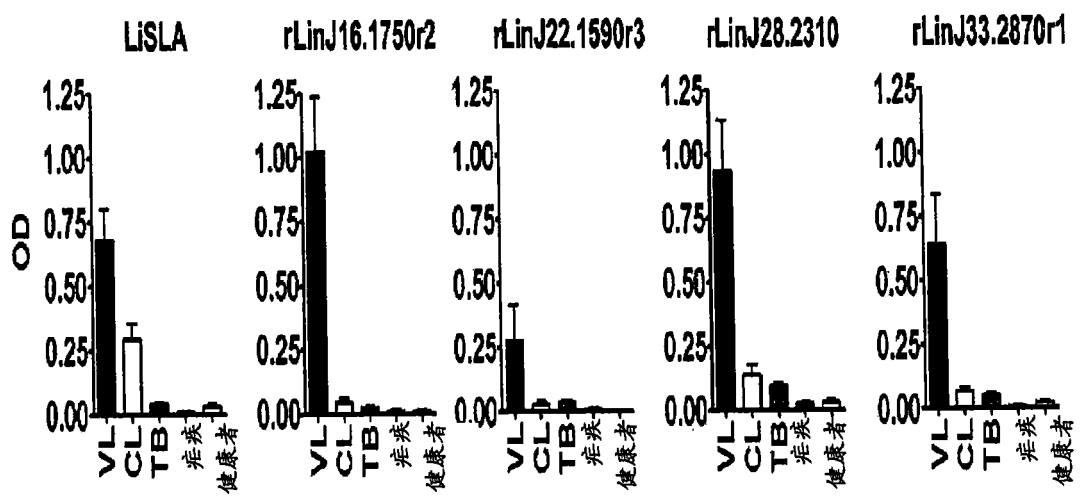


图 3

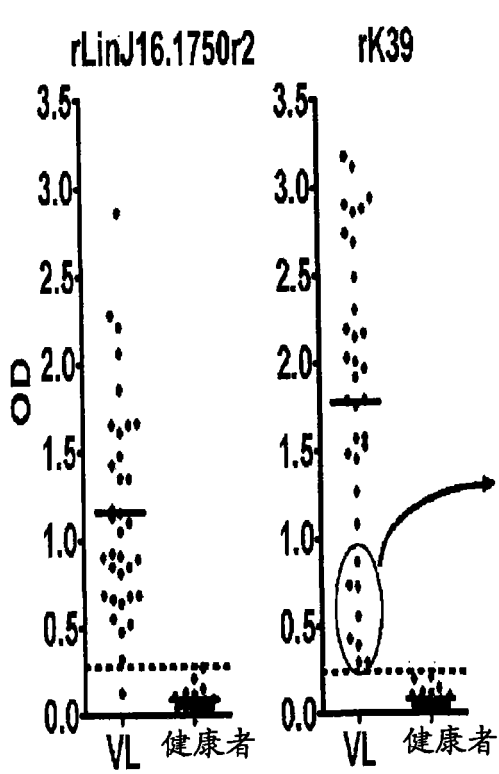


图 4

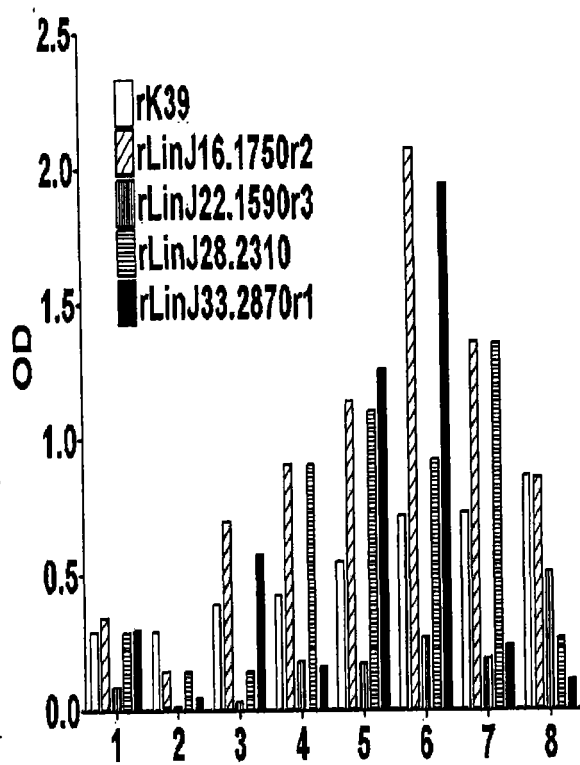


图 5

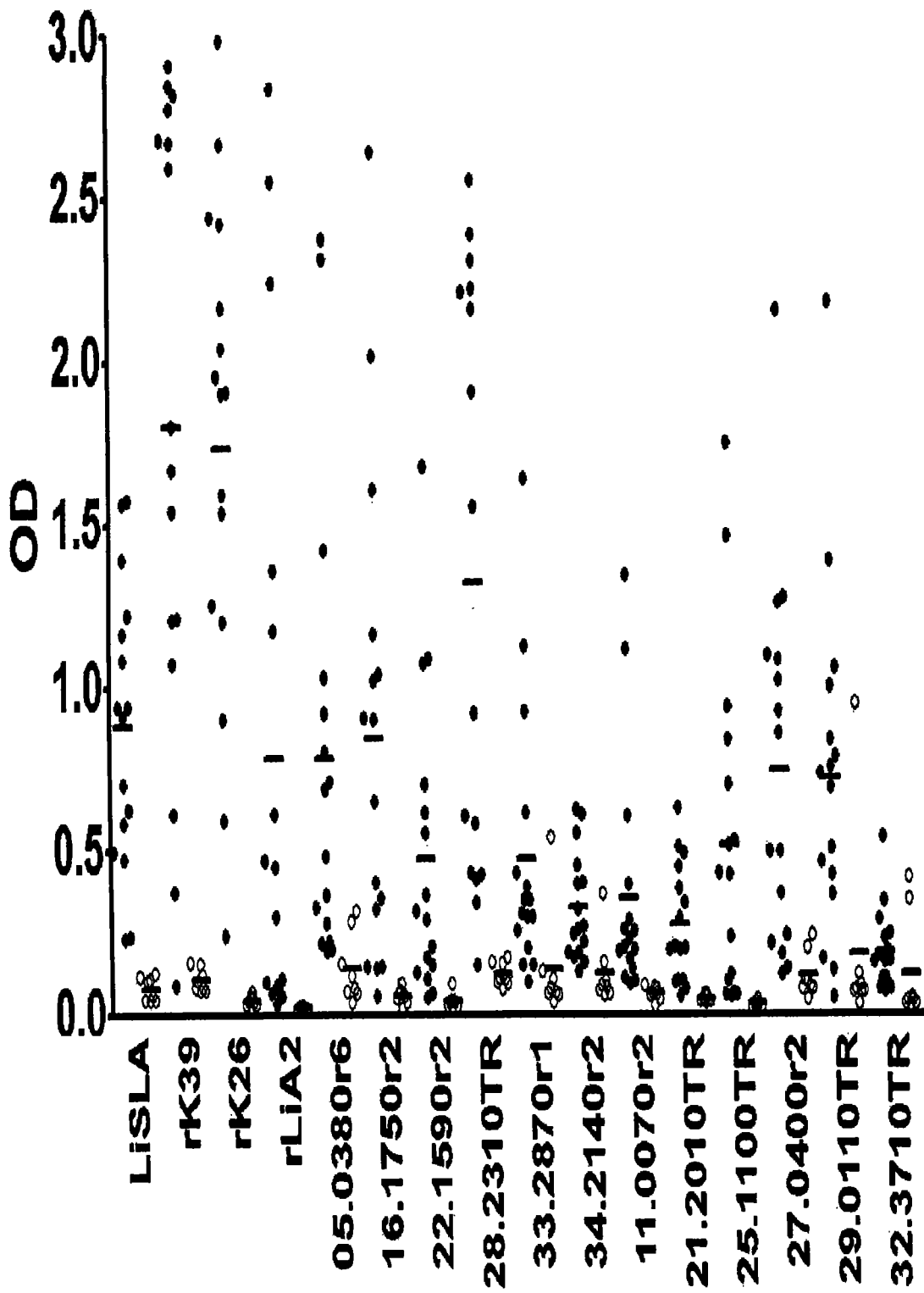


图 6

专利名称(译)	用于诊断和治疗利什曼病的化合物和方法		
公开(公告)号	CN101466831A	公开(公告)日	2009-06-24
申请号	CN200780021420.6	申请日	2007-04-10
[标]申请(专利权)人(译)	传染病研究所		
[标]发明人	SG里德 后藤康之		
发明人	S·G·里德 后藤康之		
IPC分类号	C12N15/00 C07K4/12 C07K2/00 C07K19/00 A61K39/008 G01N33/53		
CPC分类号	Y02A50/414		
代理人(译)	刘冬 刘玥		
优先权	60/791226 2006-04-10 US 60/744798 2006-04-13 US 11/733440 2007-04-10 US		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

公开了提供用于诊断、预防、治疗和检测利什曼病感染并刺激患者免疫应答的化合物和方法。所公开的化合物包括多肽和融合蛋白或它们的变体，其含有一种或多种利什曼原虫抗原的至少一个免疫原性部分。另外，公开了从筛选文库中筛选出具有免疫原性的串联重复蛋白质的方法。描述了可以用于预防和治疗利什曼病以及检测利什曼病感染的包含多核苷酸、多肽、融合蛋白及其变体的疫苗和药物组合物。

图 1 显示本申请提供的免疫原性肽及其衍生物(即, 衍生物)的序列

序列 ID	名称	长度	PI	PII	PIII	PIV
1	1.100000000	101	3	11	66	66
2	1.100000100	101	117	117	117	117
3	1.100000200	101	114	114	114	114
4	1.100000300	101	114	114	114	114
5	1.100000400	101	114	114	114	114
6	1.100000500	101	114	114	114	114
7	1.100000600	101	114	114	114	114
8	1.100000700	101	114	114	114	114
9	1.100000800	101	114	114	114	114
10	1.100000900	101	114	114	114	114
11	1.100001000	101	114	114	114	114
12	1.100001100	101	114	114	114	114
13	1.100001200	101	114	114	114	114
14	1.100001300	101	114	114	114	114
15	1.100001400	101	114	114	114	114
16	1.100001500	101	114	114	114	114
17	1.100001600	101	114	114	114	114
18	1.100001700	101	114	114	114	114
19	1.100001800	101	114	114	114	114
20	1.100001900	101	114	114	114	114
21	1.100002000	101	114	114	114	114
22	1.100002100	101	114	114	114	114
23	1.100002200	101	114	114	114	114
24	1.100002300	101	114	114	114	114
25	1.100002400	101	114	114	114	114
26	1.100002500	101	114	114	114	114
27	1.100002600	101	114	114	114	114
28	1.100002700	101	114	114	114	114
29	1.100002800	101	114	114	114	114
30	1.100002900	101	114	114	114	114
31	1.100003000	101	114	114	114	114
32	1.100003100	101	114	114	114	114
33	1.100003200	101	114	114	114	114
34	1.100003300	101	114	114	114	114
35	1.100003400	101	114	114	114	114
36	1.100003500	101	114	114	114	114
37	1.100003600	101	114	114	114	114
38	1.100003700	101	114	114	114	114
39	1.100003800	101	114	114	114	114
40	1.100003900	101	114	114	114	114
41	1.100004000	101	114	114	114	114
42	1.100004100	101	114	114	114	114
43	1.100004200	101	114	114	114	114
44	1.100004300	101	114	114	114	114
45	1.100004400	101	114	114	114	114
46	1.100004500	101	114	114	114	114
47	1.100004600	101	114	114	114	114
48	1.100004700	101	114	114	114	114
49	1.100004800	101	114	114	114	114
50	1.100004900	101	114	114	114	114
51	1.100005000	101	114	114	114	114
52	1.100005100	101	114	114	114	114
53	1.100005200	101	114	114	114	114
54	1.100005300	101	114	114	114	114
55	1.100005400	101	114	114	114	114
56	1.100005500	101	114	114	114	114
57	1.100005600	101	114	114	114	114
58	1.100005700	101	114	114	114	114
59	1.100005800	101	114	114	114	114
60	1.100005900	101	114	114	114	114
61	1.100006000	101	114	114	114	114
62	1.100006100	101	114	114	114	114
63	1.100006200	101	114	114	114	114
64	1.100006300	101	114	114	114	114
65	1.100006400	101	114	114	114	114
66	1.100006500	101	114	114	114	114
67	1.100006600	101	114	114	114	114
68	1.100006700	101	114	114	114	114
69	1.100006800	101	114	114	114	114
70	1.100006900	101	114	114	114	114
71	1.100007000	101	114	114	114	114
72	1.100007100	101	114	114	114	114
73	1.100007200	101	114	114	114	114
74	1.100007300	101	114	114	114	114
75	1.100007400	101	114	114	114	114
76	1.100007500	101	114	114	114	114
77	1.100007600	101	114	114	114	114
78	1.100007700	101	114	114	114	114
79	1.100007800	101	114	114	114	114
80	1.100007900	101	114	114	114	114
81	1.100008000	101	114	114	114	114
82	1.100008100	101	114	114	114	114
83	1.100008200	101	114	114	114	114
84	1.100008300	101	114	114	114	114
85	1.100008400	101	114	114	114	114
86	1.100008500	101	114	114	114	114
87	1.100008600	101	114	114	114	114
88	1.100008700	101	114	114	114	114
89	1.100008800	101	114	114	114	114
90	1.100008900	101	114	114	114	114
91	1.100009000	101	114	114	114	114
92	1.100009100	101	114	114	114	114
93	1.100009200	101	114	114	114	114
94	1.100009300	101	114	114	114	114
95	1.100009400	101	114	114	114	114
96	1.100009500	101	114	114	114	114
97	1.100009600	101	114	114	114	114
98	1.100009700	101	114	114	114	114
99	1.100009800	101	114	114	114	114
100	1.100009900	101	114	114	114	114
101	1.100010000	101	114	114	114	114
102	1.100010100	101	114	114	114	114
103	1.100010200	101	114	114	114	114
104	1.100010300	101	114	114	114	114
105	1.100010400	101	114	114	114	114
106	1.100010500	101	114	114	114	114
107	1.100010600	101	114	114	114	114
108	1.100010700	101	114	114	114	114
109	1.100010800	101	114	114	114	114
110	1.100010900	101	114	114	114	114
111	1.100011000	101	114	114	114	114
112	1.100011100	101	114	114	114	114
113	1.100011200	101	114	114	114	114
114	1.100011300	101	114	114	114	114
115	1.100011400	101	114	114	114	114
116	1.100011500	101	114	114	114	114
117	1.100011600	101	114	114	114	114
118	1.100011700	101	114	114	114	114
119	1.100011800	101	114	114	114	114
120	1.100011900	101	114	114	114	114
121	1.100012000	101	114	114	114	114
122	1.100012100	101	114	114	114	114
123	1.100012200	101	114	114	114	114
124	1.100012300	101	114	114	114	114
125	1.100012400	101	114	114	114	114
126	1.100012500	101	114	114	114	114
127	1.100012600	101	114	114	114	114
128	1.100012700	101	114	114	114	114
129	1.100012800	101	114	114	114	114
130	1.100012900	101	114	114	114	114
131	1.100013000	101	114	114	114	114
132	1.100013100	101	114	114	114	114
133	1.100013200	101	114	114	114	114
134	1.100013300	101	114	114	114	114
135	1.100013400	101	114	114	114	114
136	1.100013500	101	114	114	114	114
137	1.100013600	101	114	114	114	114
138	1.100013700	101	114	114	114	114
139	1.100013800	101	114	114	114	114
140	1.100013900	101	114	114	114	114
141	1.100014000	101	114	114	114	114
142	1.100014100	101	114	114	114	114
143	1.100014200	101	114	114	114	114
144	1.100014300	101	114	114	114	114
145	1.100014400	101	114	114	114	114
146	1.100014500	101	114	114	114	114
147	1.100014600	101	114	114	114	114
148	1.100014700	101	114	114		