



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 346 281**

⑫ Número de solicitud: 200900387

⑮ Int. Cl.:
A61K 35/68 (2006.01)
C07K 14/44 (2006.01)
A61P 33/02 (2006.01)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

⑫ Fecha de presentación: **11.02.2009**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **13.10.2010**

⑭ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
13.10.2010

⑰ Solicitante/s: **Universidad Autónoma de Madrid
Ciudad Universitaria de Cantoblanco
c/ Einstein, nº 3
28049 Madrid, ES**

⑱ Inventor/es: **Carrión Herrero, Javier;
Folgueira Fernández, Cristina;
Fresno Escudero, Manuel y
Requena, José María**

⑲ Agente: **Pons Ariño, Ángel**

⑳ Título: **Uso de cepas de *Leishmania* Δ hsp70-II como vacuna.**

㉑ Resumen:

Uso de cepas de *Leishmania* Δ HSP70-II como vacuna.
La presente invención se refiere al uso de organismos del género *Leishmania* que tienen delecionado el gen HSP70-II, para la elaboración de un medicamento para el tratamiento o prevención de la leishmaniasis en un mamífero, más preferiblemente en un perro, y más preferiblemente en un humano. También se refiere a las composiciones farmacéuticas que contienen dichos organismos, y a su uso en la elaboración de vacunas frente a la leishmaniasis.

ES 2 346 281 A1

DESCRIPCIÓN

Uso de cepas de *Leishmania* Δhsp70-II como vacuna.

5 La presente invención se encuentra dentro del campo de la biología molecular y la medicina, y se refiere a una línea de *Leishmania* defectiva para los dos alelos del gen HSP70-II (línea Δhsp70-II), a una composición que comprende organismos de dicha línea, y al uso de dicha composición como vacuna.

Estado de la técnica anterior

10 Los organismos protistas del género *Leishmania* son los agentes causales de un amplio grupo de enfermedades conocidas como leishmaniosis o más correctamente según la SNOAPAD (*Standard Nomenclature of Animal Parasites and Diseases*), leishmaniasis. Esta enfermedad presenta cuadros clínicos y epidemiológicos diversos, afecta a unos 12-14 millones de personas en todo el mundo, y cada año aparecen entre 1,5 y 2 millones de nuevos casos (Murray
15 *et al.*, 2005. *Lancet* 366:1561-1577). Según la OMS, actualmente amenaza a 350 millones de personas en 88 países diferentes, principalmente en zonas tropicales y subtropicales, pero los enfermos se encuentran, principalmente, en los países en vías de desarrollo (Sudán, India, Bangladesh, Nepal y Brasil). Estos organismos tienen un ciclo de vida dige-
nético, alternante entre una fase de vida libre, promastigotes flagelados en mosquitos de los géneros *Phlebotomus* (en el viejo mundo) y *Lutzomyia* (en América), y amastigotes no flagelados intracelulares que se multiplican en el interior
20 de macrófagos de mamíferos hospedantes. La transmisión desde los insectos vectores ectodérmicos (poiquilotérmicos) a los hospedadores mamíferos, implica un “shock” térmico, que parece actuar como una señal de diferenciación celular (Zilberstein & Shapira, 1994. *Annu Rev Microbiol* 48:449-470). En este contexto, el estudio de la respuesta al shock térmico, y los mecanismos de regulación controlados por las proteínas HSP, pueden dilucidar los mecanismos de diferenciación de estos protozoos.

25 Los organismos vivos responden al estrés por calor, y otros tipos de estrés, sintetizando un set de proteínas altamente conservadas, las *heat-shock proteins* (HSPs) (Lindquist & Craig, 1988. *Annu Rev Genet* 22:631-677). Sin embargo, las HSPs también juegan un papel importante en la células no sometidas a estrés, al estar involucradas en el plegamiento, ensamblaje, localización intracelular, secreción, activación, y degradación de muchas proteínas (Feder & Hofmann, 1999. *Annu Rev Physiol* 61:243-282). Tanto HSP70 como HSP90 interaccionan con muchos otros com-
30 ponentes de vías de señalización que regulan el crecimiento y desarrollo. En este sentido, la relación molecular entre HSPs y las proteínas señalizadoras es crítica para el correcto funcionamiento de estas vías: por ejemplo, los niveles relativos de estas proteínas han demostrado ser importantes, puesto que una deficiencia o un exceso de HSPs han dado lugar a un crecimiento aberrante, desarrollo de malformaciones y muerte celular (Mayer & Bukau, 2005. *Cell Mol Life*
35 *Sci* 62:670-684).

Hasta la fecha HSP70 es la proteína más conservada presente en todos los organismos. Entre sus numerosas funciones, HSP70 protege a las células de los efectos deletéreos de los plegamientos incorrectos y de la agregación de proteínas. Los autores de la presente invención han demostrado que los loci del gen HSP70-II se encuentran conser-
40 vados en varias especies de *Leishmania* (*L. infantum*, *L. major*, *L. tropica*, *L. mexicana*, *L. amazonensis*) (Folgueira, *et al.*, 2007. *Parasitology* 134, 369-377).

Actualmente se ha producido un incremento de casos de leishmaniasis humanas en individuos inmunosuprimidos, en fase avanzada de infección por VIH, cuyas defensas inmunológicas están muy debilitadas. En España, y otros países
45 de la cuenca mediterránea, la especie predominante es *L. infantum*, cuya infección produce principalmente afecciones viscerales. El perro doméstico está considerado como el principal reservorio de *L. infantum* en la región mediterránea, desempeñando un papel clave en la transmisión del parásito a seres humanos a través del flebótomo. En países como España, donde la enfermedad es endémica en los perros, casi todo el mundo padece una infección latente, de manera que cuando una persona padece una bajada de defensas, como en el caso del sida y otras inmunodeficiencias, la
50 *Leishmania* hasta entonces latente empieza a prosperar en el organismo. En Europa, el 25% de los infectados con el virus del sida padece a la vez una infección de leishmania. Además, la leishmaniasis canina constituye un problema en sí mismo, ya que cerca del 50% de los perros infectados desarrolla una sintomatología clínica que en la mayoría de los casos conduce a la muerte del animal, debido a la ineficacia de los métodos de tratamiento y a la toxicidad de sus efectos secundarios.

55 Atendiendo a los síntomas clínicos de la enfermedad, las leishmaniasis han sido clasificadas en 5 tipos: leishmaniasis visceral o *kala-azar*, cutánea o Botón de Oriente, cutáneo-difusa, muco-cutánea o espundia, y leishmaniasis dérmica post *kala-azar*. Estas formas han sido clasificadas en base a criterios clínicos y son causadas por al menos 15 especies diferentes.

60 Actualmente no existe ningún método profiláctico eficaz y los tratamientos quimioterapéuticos no poseen la eficacia deseable. Desde mediados del siglo pasado se usan drogas que requieren administración parenteral y prolongados tratamientos, presentando además, una serie de reacciones adversas que dificultan su utilización (cardiotoxicidad con electrocardiogramas anormales, pancreatitis, etc.). Entre los fármacos utilizados como primera línea de tratamiento se
65 encuentran los antimoniales pentavalentes (SSG (*Sodium stibogluconate*) y Meglumina antimoniato). Como segunda línea (cuando el paciente no responde a los primeros) existe la Amfotericina B y la Aminosidina. Un problema adicional, puesto que los enfermos se encuentran principalmente en países en desarrollo, es el elevado precio de los tratamientos, que en ocasiones lleva a su incumplimiento y a la aparición de resistencias.

Aunque existen principios activos de origen vegetal y sintéticos con actividad leishmanicida prometedora y baja toxicidad (péptidos, moléculas orgánicas de síntesis etc), pero hasta ahora por si solos, no son capaces de eliminar totalmente al parásito. Y pese a que diversas vacunas se encuentran en diferentes etapas de desarrollo, actualmente no hay ninguna vacuna aprobada contra la enfermedad. Existe, por tanto, la necesidad de desarrollar una vacuna capaz de generar una respuesta que integre activación celular y producción de anticuerpos con un cierto balance hacia una respuesta de tipo 1.

Descripción de la invención

Los autores de la presente invención han desarrollado una línea de *L. infantum* deficiente para el gen HSP70-II (línea Δ *hsp70-II*), caracterizada porque su virulencia está atenuada, no presentando variaciones en la misma, y por que es capaz de generar inmunidad en un mamífero, tanto frente a la leishmaniasis provocada por *L. infantum* como por *L. major*.

Como se ha dicho previamente, los loci del gen *HSP70-II* se encuentran conservados en otras especies de *Leishmania* (*L. infantum*, *L. chagasi*, *L. major*, *L. tropica*, *L. mexicana*, *L. braziliensis* y *L. amazonensis*), y, por tanto, mutantes de estas especies que presenten delecionado el gen *HSP70-II* podrían ser empleados como vacunas frente a las distintas leishmaniasis.

Los organismos de *Leishmania* que tienen delecionado el gen *HSP70-II*, pueden usarse para generar inmunidad en un mamífero frente a leishmaniasis. Así pues, un primer aspecto de la invención se refiere al uso de organismos de *Leishmania* que tienen delecionado el gen *HSP70-II*, de ahora en adelante organismos de *Leishmania* de la invención, para la elaboración de un medicamento para el tratamiento o prevención de la leishmaniasis.

Los organismos del género *Leishmania* pertenecen al Superreino *Eukaryota*, Orden *Kinetoplastida*, Familia *Trypanosomatidae*.

Los métodos para delecionar un determinado gen en el genoma de un organismo son conocidos en el estado de la técnica. Generalmente, los métodos de delección implican varios pasos de clonación, y comprenden la construcción de un *cassette* de delección que contiene un *cassette* de expresión para un gen marcador flanqueado con secuencias de pares de bases correspondientes al promotor y terminador del gen a delecionar. Posteriormente, los casetes de delección se amplifican por PCR y se utilizan para transformar las cepas de *Leishmania* seleccionadas. A continuación, los transformantes se seleccionan en función de dicho gen marcador. Un “*cassette*” o “casete” es una región codificante de un gen procedente de un organismo procariota o eucariota flanqueada por los elementos reguladores necesarios para su expresión *in vivo* o *in vitro*. Aunque los casetes de expresión pueden tener configuraciones muy variadas, deben contener por lo menos un promotor (*promoter*), una región codificante (ADNc eucariota o gen procariota) y un terminador de la transcripción (*terminator*) o un sitio de poliadenilación, según se trate de un gen derivado de un organismo procariota o de un ADNc procedente de un organismo eucariota. A esta configuración básica se le añade, si fuera necesario, una secuencia con función reguladora para la expresión natural del gen en el sistema elegido.

En el contexto de la presente invención, *HSP70-II* se define por una secuencia de nucleótidos o polinucleótido, que constituye la secuencia codificante de la proteína HSP70 (SEQ ID NO: 1), u otras secuencias homólogas, y que presenta una región 3'UTR característica, que se recoge en la SEQ ID NO: 2, según ya ha sido descrito (Quijada *et al.*, 1997. *J Biol Chem* 272: 4493-4499). El término “homología”, tal y como se utiliza en esta memoria, hace referencia a la semejanza entre dos estructuras debida a una ascendencia evolutiva común, y más concretamente, a la semejanza entre dos o más secuencias de nucleótidos o aminoácidos. Puesto que dos secuencias se consideran homólogas si tienen el mismo origen evolutivo, en general, se asume que valores superiores de similitud o identidad del 50% indicarían homología. Podemos considerar, por tanto, que porcentajes de identidad de, al menos, un 50%, podrían mantener la función de la secuencia aminoacídica ortóloga recogida en la SEQ ID NO: 1, y la secuencia de nucleótidos que codifica dicha secuencia y que presenta un región 3'UTR característica como se ha descrito (3'UTR-II) podría denominarse como gen *HSP70-II*.

En esta memoria se entiende como “leishmaniasis” una enfermedad zoonótica causada por diferentes especies de protozoos del género *Leishmania*. Las manifestaciones clínicas de la enfermedad, van desde úlceras cutáneas que cicatrizan espontáneamente hasta formas fatales en las cuales se presenta inflamación severa del hígado y del bazo. La enfermedad por su naturaleza zoonótica, afecta tanto a perros como humanos. Sin embargo, animales silvestres como zarigüeyas, coatíes y osos hormigueros entre otros, son portadores asintomáticos del parásito, por lo que son considerados como animales reservorios.

En el genoma de *L. infantum* existen 6 copias del gen HSP70 que se disponen en un tándem directo (Quijada *et al.*, 1997. *J Biol Chem* 272: 4493-4499). La principal diferencia que existe entre las distintas copias reside en sus regiones 3'UTR: la región 3'UTR del gen HSP70 situado en el extremo 3' del locus (3'UTR-II) es altamente divergente en secuencia respecto a la región 3'UTR de los 5 genes restantes (3'UTR-I). Teniendo en cuenta esta divergencia de secuencia de las regiones 3'UTR, a los cinco primeros genes HSP70, aquellos que portan la región 3'UTR-I, se las ha denominado genes HSP70-I, mientras que al sexto gen, portador de la región 3'UTR-II, se le ha denominado HSP70-II. Además de la divergencia de secuencia de sus regiones 3'UTR, los genes HSP70-I y HSP70-II presentan claras diferencias en cuanto a su expresión durante el choque térmico. En otras especies de *Leishmania* (*L. major*, *L. tropica*, *L. mexicana* y *L. amazonensis*) la disposición de estos loci, y la región característica 3'UTR-II,

se encuentra conservada (seis copias en tándem para *L. infantum* y *L. major*, y 7 copias en tándem para *L. tropica*, *L. mexicana* y *L. amazonensis*), tal y como se describe en Folgueira *et al.*, 2007 (*Parasitology* 134:369-377).

Por tanto, en una realización preferida de este aspecto de la invención, los organismos en los que se delecciona el gen *HSP70-II* pertenecen a una especie de *Leishmania* que se selecciona de la lista que comprende: *Leishmania infantum*, *L. chagasi*, *L. major*, *L. tropica*, *L. mexicana*, *L. braziliensis* y/o *L. amazonensis*. En otra realización aún más preferida, los organismos de la cepa pertenecen a la especie *L. infantum*.

La *Leishmaniasis* tiene especial importancia no solo en países en desarrollo, sino también en países desarrollados, por tratarse de una zoonosis en la cual se considera al perro el principal reservorio del parásito *L. infantum*. De esta manera, los casos registrados en muchos países, entre ellos España, se deben al contacto con perros. Se ha observado que los gatos y las ratas también pueden actuar como reservorios. Por tanto, en una realización preferida de este aspecto de la invención, el mamífero es un perro. En otra realización preferida de este aspecto de la invención, el mamífero es humano. En una realización aún más preferida, la leishmaniasis es causada por el parásito *L. infantum*.

Los perros pertenecen a la especie *Canis lupus* subsp. *familiaris*. Los organismos de la especie *Canis lupus* subsp. *familiaris* pertenecen al Superreino *Eukaryota*, (grupo *Metazoa/Fungi*), Reino *Metazoa*, Phylum *Chordata*, Subphylum *Craniata*, Clase *Mammalia*, Orden *Carnivora*, Familia *Canidae* y Género *Canis*. El hombre es un mamífero humano que pertenece a la especie *Homo sapiens*. Los organismos de la especie *Homo sapiens* pertenecen al Superreino *Eukaryota*, (grupo *Metazoa/Fungi*), Reino *Metazoa*, Phylum *Chordata*, Subphylum *Craniata*, Clase *Mammalia*, Orden *Primates*, Familia *Hominidae* y Género *Homo*.

El empleo de organismos de *Leishmania* de la invención, en los que se delecciona el gen *HSP70-II*, como inmunógenos, hace que puedan ser empleados en composiciones como vacunas en mamíferos, incluyendo humanos, o producir una respuesta en la producción de anticuerpos en animales. Para la formulación de tales composiciones, una cantidad efectiva inmunológicamente de al menos uno de los organismos de *Leishmania* de la invención, es mezclado con un transportador adecuado aceptable fisiológicamente para la administración a mamíferos incluyendo humanos. Los inmunógenos pueden estar incorporados en liposomas u otras vesículas similares, y/o mezclados con un adyuvante o absorbente como es conocido en el campo de las vacunas. Por ejemplo, pueden ser mezclados con otros complejos inmunoestimuladores. Alternativamente, los inmunógenos no están acoplados y meramente mezclados con un transportador aceptable fisiológicamente tal como un compuesto tampón o salino normal adecuado para la administración a mamíferos incluyendo humanos.

Así pues, otro aspecto de la invención se refiere a una composición farmacéutica, de ahora en adelante composición de la invención, que comprende organismos de *Leishmania* de la invención, esto es, que tienen deleccionado el gen *HSP70-II*. En una realización preferida de este aspecto de la invención, la composición farmacéutica comprende promastigotes de las cepas de *Leishmania* de la invención. En otra realización preferida la composición de la invención además comprende excipientes farmacológicamente aceptables.

El término “promastigote” hace referencia al estado flagelar de un protozoo tripanosomátido en el que el flagelo surge de un kinetoplasto en frente del núcleo y emerge de la terminación anterior del organismo (polo apical). Generalmente es la fase extracelular, en el hospedador invertebrado intermediario o en cultivo, de los parásitos de *Leishmania*.

Por tanto, y como se ha descrito anteriormente, los inmunógenos (los organismos de *Leishmania* de la invención) de la invención presentarían secuencias antigénicas protectoras. Estos antígenos protectores son capaces de generar una respuesta inmune (inmunogénica) protectora del hospedador, es decir, una respuesta del hospedador que conduce a la generación de moléculas efectoras inmunes, anticuerpos o células que dañan, inhiben o matan a la entidad biológica invasora, “protegiendo” así al hospedador de una enfermedad clínica o sub-clínica y de una pérdida de productividad. Tal respuesta inmune protectora puede manifestarse comúnmente por la generación de anticuerpos.

Así pues, otro aspecto se refiere a los anticuerpos, de ahora en adelante anticuerpos de la invención, producidos tras la inmunización de un animal con organismos de *Leishmania* de la invención o la composición de la invención. En una realización preferida de este aspecto de la invención, el animal empleado para la inmunización es un mamífero no humano.

En otro aspecto de la invención, los anticuerpos producidos tras la inmunización del animal, de aquí en adelante anticuerpos de la invención, son usados como medicamento.

Los anticuerpos de la presente invención pueden formularse para su administración a un animal, y más preferiblemente a un mamífero, incluyendo al hombre, en una variedad de formas. Así, los anticuerpos pueden estar en disolución acuosa estéril o en fluidos biológicos, tal como suero. Las disoluciones acuosas pueden estar tamponadas o no tamponadas y tienen componentes activos o inactivos adicionales. Los componentes adicionales incluyen sales para modular la fuerza iónica, conservantes incluyendo, pero sin limitarse a, agentes antimicrobianos, antioxidantes, quelantes, y similares, y nutrientes incluyendo glucosa, dextrosa, vitaminas y minerales. Alternativamente, los anticuerpos pueden prepararse para su administración en forma sólida. Los anticuerpos pueden combinarse con varios vehículos o excipientes inertes, incluyendo pero sin limitarse a; aglutinantes tales como celulosa microcristalina, goma tragacanto, o gelatina; excipientes tales como almidón o lactosa; agentes dispersantes tales como ácido alginico

o almidón de maíz; lubricantes tales como estearato de magnesio, deslizantes tales como dióxido de silicio coloidal; agentes edulcorantes tales como sacarosa o sacarina; o agentes aromatizantes tales como menta o salicilato de metilo.

Los anticuerpos o sus formulaciones pueden administrarse a un animal, incluyendo un mamífero y, por tanto, al hombre, en una variedad de formas. Tales medios incluyen, pero sin limitarse a, intraperitoneal, intravenoso, intramuscular, subcutáneo, intracecal, intraventricular, oral, enteral, parenteral, intranasal o dérmico.

La dosificación de anticuerpos para obtener una cantidad farmacéuticamente eficaz depende de una variedad de factores, como por ejemplo, la edad, peso, sexo, tolerancia,... del animal.

Otro aspecto se refiere a la composición de la invención, para su uso como medicamento. Otro aspecto de la invención se refiere al uso de la composición de la invención, para la elaboración de un medicamento. Otro aspecto de la invención se refiere al uso de la composición de la invención, para la elaboración de un medicamento para el tratamiento o prevención de la leishmaniasis. En una realización preferida de este aspecto de la invención, el medicamento es una vacuna, de aquí en adelante vacuna de la invención. En una realización más preferida, la vacuna además comprende excipientes farmacológicamente aceptables. En otra realización preferida de este aspecto de la invención, la composición (o la vacuna) de la invención además comprende un adyuvante. En otra realización preferida la vacuna es polivalente.

En el contexto de la presente invención el término “vacuna” se refiere a una preparación antigénica empleada para establecer la respuesta del sistema inmune a una enfermedad. Son preparados de antígenos que una vez dentro del organismo provocan la respuesta del sistema inmunitario, mediante la producción de anticuerpos, y generan memoria inmunológica produciendo inmunidad permanente o transitoria.

El término “antígeno” en esta memoria se refiere a una molécula (generalmente una proteína o un polisacárido), que puede inducir la formación de anticuerpos. Hay muchos tipos de moléculas diferentes que pueden actuar de antígenos, como las proteínas o péptidos, los polisacáridos y, más raramente, otras moléculas como los ácidos nucleicos.

El término “medicamento”, tal y como se usa en esta memoria, hace referencia a cualquier sustancia usada para prevención, diagnóstico, alivio, tratamiento o curación de enfermedades en el hombre y los animales. En el contexto de la presente invención se refiere, también, a los organismos de la invención, o a la composición de la invención que comprende organismos de la invención en una cantidad terapéuticamente efectiva, que es capaz de generar una respuesta inmune frente a un organismo del género *Leishmania*, que está causando dicha enfermedad en el hombre o los animales. Incluye, por tanto, lo que se conoce como vacuna, tal y como se ha definido previamente en esta memoria.

En esta memoria, el término “adyuvante” se refiere a un agente, mientras no posea un efecto antigénico por si mismo, que puede estimular el sistema inmune incrementando su respuesta a la vacuna. Aunque sin limitarse a ellas, las sales de aluminio “fosfato de aluminio” e “hidróxido de aluminio” son los dos adyuvantes más comúnmente empleados en las vacunas. Otras sustancias, como por ejemplo el escualeno, también se pueden emplear como adyuvantes.

Tal y como se define en esta memoria, el término “polivalente” se usa para referirse a la vacuna que comprende la combinación de dos o más antígenos en total, incluyendo uno o más de cualquiera de las especies, tipos, variedades o mutantes que se incluyen dentro de la clasificación del género *Leishmania*.

En el sentido utilizado en esta descripción, la expresión “cantidad terapéuticamente efectiva” se refiere a la cantidad de organismos de *Leishmania* de la invención que permitan producir el efecto deseado. Los adyuvantes y vehículos farmacéuticamente aceptables que pueden ser utilizados en dichas composiciones son los vehículos conocidos por los técnicos en la materia.

Las composiciones proporcionadas por esta invención (que comprenden organismos las cepas de *Leishmania* de la invención, o anticuerpos de la invención) pueden ser facilitadas por cualquier vía de administración, para lo cual dicha composición se formulará en la forma farmacéutica adecuada y con los excipientes farmacológicamente aceptables a la vía de administración elegida.

Los términos “polinucleótido” y “ácido nucleico” se usan aquí de manera intercambiable, refiriéndose a formas poliméricas de nucleótidos de cualquier longitud, tanto ribonucleótidos (ARN ó RNA) como desoxirribonucleótidos (ADN ó DNA).

Los términos “secuencia aminoacídica”, “péptido”, “oligopéptido”, “polipéptido” y “proteína” se usan aquí de manera intercambiable, y se refieren a una forma polimérica de aminoácidos de cualquier longitud, que pueden estar, o no, química o bioquímicamente modificados.

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

Descripción de las figuras

Fig. 1. (A). Tasas de crecimiento de la línea de *Leishmania infantum* tipo silvestre, de la línea mutante Δ hsp70-II y de la línea reexpresante HSP70-II. Para las líneas Δ hsp70-II y reexpresante HSP70-II (mutante p70II-Pac-transfectado) fueron cultivados en presencia (+) o ausencia de antibióticos de selección. Los datos representan la media y la desviación estándar de al menos tres experimentos independientes. (B) La proliferación de los promastigotes del tipo silvestre, del mutante Δ hsp70-II y de la línea reexpresante HSP70-II se determinó por tinción CFSE.

Fig. 2. Morfología de los promastigotes del tipo silvestre de *Leishmania infantum*, de la línea mutante Δ hsp70-II y de la línea reexpresante HSP70-II. A diferentes tiempos a lo largo de la curva de crecimiento (las densidades celulares se muestran en la Fig. 1A), se recuperaron promastigotes del cultivo y se tiñeron con Giemsa. Se registró la morfología de los promastigotes mediante microscopía. Las imágenes se tomaron bajo aceite de inmersión usando el objetivo 63x. Las flechas señalan células con dos flagelos.

Fig. 3. Análisis por citometría de flujo de la interacción de los promastigotes del tipo silvestre de *Leishmania infantum*, de la línea mutante Δ hsp70-II y de la línea reexpresante HSP70-II con los monocitos humanos U937: (A) Macrófagos no infectados; (B) macrófagos infectados con promastigotes de tipo silvestre; (C) macrófagos infectados con promastigotes Δ hsp70-II; (D) macrófagos infectados con promastigotes reexpresantes HSP70-II (mutantes Δ hsp70-II transfectados con p70II-Pac). Los datos representan porcentajes de macrófagos CFSE etiquetados, al menos fueron contados 30.000. (E, F) Tasas de infección de macrófagos por promastigotes del tipo silvestre de *Leishmania infantum*, de la línea mutante Δ hsp70-II y de la línea reexpresante HSP70-II; (E) porcentaje de macrófagos infectados; (F) número de parásitos por célula infectada. Los datos son medias y desviaciones estándar de dos experimentos.

Fig. 4. Determinación de la presencia de nitritos en el medio de cultivo mediante el uso del reactivo de Griess a las cuatro semanas de la infección por promastigotes estacionarios de *L. infantum* silvestre, en ratones control y ratones vacunados con promastigotes en fase estacionaria (infectivos) de la línea Δ hsp70-II por vía intravenosa.

Fig. 5. Evolución de las lesiones causadas por la infección de ratones con *L. major* en los ratones control (A) y en los ratones vacunados (B) con promastigotes en fase estacionaria (infectivos) de la línea Δ hsp70-II por vía intravenosa.

Ejemplos

A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que pone de manifiesto la especificidad y efectividad de la cepa de *L. infantum* deficiente para el gen *hsp70-II* (línea Δ hsp70-II) para la elaboración de una vacuna frente a la leishmaniasis.

Ejemplo 1

Generación de una línea mutante de *Leishmania infantum* defectiva para el gen *hsp70-II*

Parásitos

Se cultivaron promastigotes de *Leishmania infantum* procedentes de la cepa MCAN/ES/96/BCN/150, MON-1 *in Vitro* a 26°C en el medio RPMI 1640 (Invitrogen), suplementado con un 10% (v/v) de suero fetal bovino (FCS, inactivado por calor durante 30 min. a 56°C), 0,1 mg/ml estreptomicina y 100 U/ml de penicilina.

Clones empleados

Las construcciones se realizaron en primer lugar sobre el vector pBICAT (Larreta *et al.*, 2004. *BMC Mol. Biol.* 5:3), un derivado de pBluescript que contiene el gen CAT, codificante para la enzima cloranfenicol acetil transferasa de *E. coli*. Finalmente, las construcciones fueron transferidas al vector de expresión para tripanosomátidos pX63Neo (LeBowitz *et al.*, 1991. *Gene* 103: 119-123).

Para la obtención de las regiones reguladoras de los genes *HSP70*, se partió de los clones pUCB2C, que contiene el fragmento *SalI* de 5,72 kb procedente del clon genómico B2g3, y pUCB2F, que contiene el fragmento *SalI* de 3,81 kb procedente del clon genómico B2g6 (Quijada *et al.*, 1997. *J Biol Chem* 272, 4493-4499).

Para clonar la 5'-UTR y secuencias reguladoras situadas corriente arriba, contenidas en el plásmido pUCB2F, se usaron como primers directo y reverso los oligonucleótidos recogidos en las secuencias (SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4) que llevan incluidos las regiones reconocidas por enzimas de restricción para facilitar la clonación. La digestión del producto de PCR con las enzimas *XbaI* y *EcoRV*, dio lugar a un fragmento de 1664 pb que fue clonado en el vector pBICAT para dar lugar al clon pCATC3'. pBICAT es un derivado de pBluescript conteniendo la región codificante del gen CAT (Larreta *et al.*, 2004. *BMC Mol. Biol.* 5, 3).

Para clonar la 3'-UTR_II junto con la secuencia aguas abajo, se empleó el clon pUCB2C como molde para la amplificación con primers específicos. Este clon es un derivado de pUC18 que contiene el fragmento de 5.72-kb Sall del clon genómico pB2g3 (Quijada *et al.*, 1997. *J. Biol. Chem.* 272, 4493-4499). Los primers específicos fueron, el directo (SEQ ID NO: 5), y el reverso (SEQ ID NO: 6). El fragmento de ADN amplificado fue digerido con HindIII mas Sall, y el fragmento de 1685pb fue clonado en CATC3' para obtener CATC3'C6. Este plásmido fue digerido con BglII, y el gen quimérico *CAT-HSP70-II* fue clonado en pX63NEO para generar pXcat70-II. Tanto las construcciones como los fragmentos amplificados por PCR fueron comprobados por secuenciación. La construcción del plásmido pX5HisCAT3His, que contiene el gen CAT flanqueado por UTRs derivadas del gen de la histona H2A, ha sido ya descrito (Larreta *et al.*, 2004. *BMC Mol. Biol.* 5: 3).

Generación de los mutante nulos $\Delta hsp70-II$

Los alelos HSP70-II fueron reemplazados secuencialmente con los ORF de los genes marcadores seleccionados comprendiendo o bien el gen *NEO* o el gen *HYG*. Las construcciones fueron preparadas y los genes marcadores fueron flanqueados por regiones específicas localizadas aguas arriba y aguas debajo del ORF del gen HSP70-II. Para este propósito, se eligió el clon CATC3'C6, que contiene el gen *CAT* flanqueada por la región aguas arriba más la 5'-UTR y la 3'-UTR mas las secuencias aguas abajo del gen *HSP70-II*. Se reemplazó el gen *CAT* en CATC3'C6 por doble digestión con BstBI más HindIII por los cassetes apropiados conteniendo o el gen *NEO* o el gen *HYG*. Para la amplificación del cassette NEO, el vector de clonación pcDNA3.1 (Invitrogen) se empleó como molde y los siguiente primers, directo (SEQ ID NO: 7) y reverso (SEQ ID NO: 8). Para la amplificación del cassette *HYG*, el vector de clonación pIRES1hyg (Clontech) se empleó como molde y los siguiente primers, directo (SEQ ID NO: 9) y reverso (SEQ ID NO: 10). Las construcciones resultantes se denominaron Neo70-II e Hyg70-II, respectivamente. 2 μ g de estas construcciones fueron cortadas con BglII, y los ADNs linearizados fueron empleados individualmente para la transfección del gen *HSP70-II* en *L. infantum*. Tras la transfección y selección, el mutante nulo *HSP70-II* resultante se denominó como $\Delta hsp70-II::NEO/\Delta hsp70-II::HYG$, siguiendo la nomenclatura genética de Clayton *et al.* 1998. (*Mol. Biochem. Parasitol.* 97: 221-224).

Transfección de los promastigotes de *Leishmania*

El ADN para la transfección se preparó empleando el sistema Maxi Kit (Qiagen, Hilden, Germany). Se recogieron los promastigotes de *L. infantum* en fase logarítmica tardía por centrifugación, y fueron suspendidos a 2×10^8 parásitos/ml en buffer Cytomix (van den Hoff, 1992. *Nucleic Acids Res.* 20: 2902), usando 10^8 parásitos por transfección. Se llevó a cabo la electroporación por medio del Bio-Rad GenePulser usando las condiciones descritas en Robinson & Beverley, 2003 (*Mol Biochem Parasitol* 128, 217-228). Para la selección clonal, los parásitos transfectados fueron cultivados en placas de agar-sangre (Quijada *et al.*, 2003. *Mol. Biochem. Parasitol.* 130, 139-141) suplementadas con 20 μ g/ml G418 (Roche Applied Science) o con 50 μ g/ml higromicina B (Sigma).

Por tanto, los promastigotes tanto de la línea silvestre de *L. infantum* (MCAN/ES/96/BCN150) como de la línea mutante $\Delta hsp70-II$, fueron cultivados *in vitro* como se describe en Larreta *et al.*, (2004). *BMC Mol. Biol.* 5:3). Para cultivar los mutantes, 20 μ g G418 (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)/ml, y 50 μ g higromicina B (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)/ml fueron añadidos al medio.

Ejemplo 2

Estudio de la cinética de crecimiento, examen microscópico y análisis del ciclo celular por citometría de flujo de la línea mutante $\Delta hsp70-II$

Cinética de crecimiento: Los promastigotes fueron recogidos de cultivos en fase estacionaria y diluidos hasta una concentración de 1×10^6 /ml en 10 ml de medio fresco. A intervalos de 24 horas, se determinó la densidad celular por enumeración en el hemocitómetro. Para la tinción fluorescente, se recogieron los promastigotes, se lavaron dos veces con buffer salino fosfato (PBS), y se resuspendieron hasta una concentración de 1×10^7 células/ml en PBS. Se añadió CFSE (5,6-carboxifluoresceína diacetato succinimidil ester; Invitrogen) hasta una concentración final de 5 μ M y las células se incubaron a 26°C durante 10 minutos en oscuridad. Se detuvo la reacción de tinción por adición de 5 volúmenes de medio de cultivo congelado. Finalmente, se lavaron los promastigotes dos veces con el medio, se resuspendieron a 1×10^6 células/ml, y seguidamente se cultivaron a 26°C. Se determinó la fluorescencia media CFSE tras la tinción a 1, 2, 3, 4, y 7 días de cultivo, mediante citometría de flujo en un citómetro FACSCalibur (Becton Dickinson, San José, CA) usando CellQuest software.

Examen microscópico: se tomaron los promastigotes cultivados a 26°C por 4, 7, 9, ó 12 días, se lavaron dos veces con PBS, y se depositaron sobre portas de microscopio. Las preparaciones fueron fijadas en metanol durante 5 minutos, secadas al aire durante 24 horas, y teñidas con azul-eosina-azul de metileno en solución según Giemsa (Merck, Darmstadt, Germany) diluida 1/20 en agua destilada y lavada cinco veces con agua destilada. Se tomaron imágenes usando un microscopio Axioskop2 plus y una cámara a color Coolsnap FX.

Análisis del ciclo celular por citometría de flujo: se cogieron cuatro millones de promastigotes por centrifugación, lavados dos veces con PBS, resuspendidos en 1 ml de solución fijadora (30% PBS/70% metanol) e incubadas a 4°C durante 1 hora. Las células fijadas fueron colectadas por centrifugación y resuspendidas en 500 µl de buffer de citrato pH 7 (45 mM MgCl₂, 20 mM MOPS, 30 mM de citrato sódico, y 0.1% Tritón X-100) conteniendo 20 µg de RNase A (Roche Diagnostics)/ml y 50 µg de yoduro de propidio (Sigma-Aldrich)/ml. Las muestras se incubaron a 37°C durante 20 min en oscuridad y después se midió la fluorescencia por citometría de flujo con un citómetro FACSCalibur.

Resultados

El mutante deleciónado *Δhsp70-II* fue viable, pero sus propiedades de crecimiento en medio axénico fueron diferentes de las de la línea parental, principalmente durante la fase exponencial tardía (Fig. 1 A). Las densidades del mutante de deleción ($12-14 \times 10^6$ por ml) durante la fase estacionaria fueron menores que los de la línea parental ($25-27 \times 10^6$ por ml). Específicamente, coincidiendo con la entrada en la fase estacionaria, la estabilidad del cultivo *Δhsp70-II* descendiendo gradualmente, mientras se mantuvo el número de microorganismos en el cultivo silvestre (e incluso se incrementó ligeramente). Curvas de crecimiento similares se obtuvieron cuando el mutante *Δhsp70-II* se creció en ausencia o presencia de higromicina B y G418. El crecimiento fue cuantitativamente medido con el tinte intracitoplasmático estable CFSE. Cuando la célula teñida con CFSE se divide, se distribuye el tinte entre las células hijas y la intensidad de fluorescencia desciende correlativamente. Tras la tinción de los promastigotes *Δhsp70-II* y silvestres con CFSE, se iniciaron los cultivos a una densidad inicial de 10^6 células/ml. La intensidad de fluorescencia CFSE se determinó a 0, 1, 2, 3, 4 y 7 días de cultivo. De manera notable, hasta el día 4, hubo un descenso similar en la intensidad de fluorescencia en los promastigotes *Δhsp70-II* y silvestres. Sin embargo, la distribución de los picos de fluorescencia fue más ancha en la población *Δhsp70-II* que en la silvestre. De nuevo, el crecimiento de los promastigotes *Δhsp70-II* expresando *HSP70-II* de manera episomal fue más homogéneo que el crecimiento de la línea mutante (Fig. 1B).

El examen de los cultivos bajo el microscopio de inmersión reveló que las morfologías de las células en los cultivos *Δhsp70-II* fue remarcablemente heterogénea. Esto se documentó mediante tinción de Giemsa de los promastigotes de los cultivos silvestres y *Δhsp70-II* a diferentes tiempos (Fig. 2). En los cultivos *Δhsp70-II*, un número significativo de células fueron más pequeñas que en los promastigotes silvestres. Además, formas redondeadas, promastigotes con dos flagelos, y formas dividiéndose fueron observadas con mayor frecuencia en el cultivo *Δhsp70-II*. El número de formas aberrantes se incrementó con el tiempo en el cultivo. En contraste, alteraciones morfológicas fueron raras tras la introducción de una copia episomal de *HSP70-II* dentro de la línea mutante (Fig. 2).

La distribución del ciclo celular mostró que el porcentaje de células en fase G₂/M fue mayor en los cultivos *Δhsp70-II* que en los cultivos silvestres, un modelo que se mantuvo a través del periodo de cultivo. De manera similar, los datos mostraron que en los días 4 y 5, el número de células en la fase S fue mayor en el cultivo *Δhsp70-II* que en el cultivo silvestre, indicando un retraso en la fase S de las células mutante.

Ejemplo 3

Análisis de la invasión de los macrófagos in vitro, de la interacción promastigote-macrófago, infección experimental en ratones BALB/c y análisis de la respuesta de anticuerpos

Los promonocitos de las líneas celulares humanas de linfoma histocítico U937 fueron inducidos a diferenciarse en macrófagos por la adición de 1×10^{-8} M forbol-miristato-acetato (PMA) al medio de cultivo. Estos macrófagos fueron seguidamente incubados en un medio de cultivo RPMI a 37°C/5% CO₂ con una fase estacionaria de promastigotes con un ratio protozoo:células de 5:1. Tras dos horas de incubación, los promastigotes no internalizados fueron eliminados y las células restantes se incubaron en un medio de cultivo RPMI a 37°C/5% CO₂ durante más de 4 días. A los días 1, 2, 3 y 4 las células fueron fijadas con metanol y teñidas con Giemsa como se ha descrito arriba. Se contabilizaron al menos 600 macrófagos por preparación; se determinó el porcentaje de macrófagos infectados y el número de promastigotes intracelulares por célula infectada.

Para evaluar las interacciones promastigote-macrófago, se tiñeron los promastigotes con CFSE (como se ha descrito previamente) y entonces se incubaron con macrófagos U937 (multiplicidad 5:1 protozoo macrófago) durante 24 horas a 37°C/5% CO₂. La fluorescencia CFSE asociada a macrófago se determinó en un citómetro FACSCalibur.

Grupos de ratones hembra de 7 semanas de edad BALB/c (n=4) fueron inoculados por vía intravenosa en la vena lateral de la cola con 10^7 promastigotes en fase estacionaria en 100 µl de PBS. El suero obtenido del ratón se guardó en 50% de glicerol a -20°C. Cuatro semanas después de la infección, se evaluó la carga parasitaria en el bazo y el hígado por dilución limitante. El recíproco de la mayor dilución que fue positiva para el crecimiento de los promastigotes fue considerado el número de microorganismos viables por órgano.

Para el análisis de la respuesta de anticuerpos se preparó el antígeno crudo de *Leishmania* a partir de promastigotes de *L. infantum* incubando el microorganismo en un buffer de lisis (1% Tritón X-100, 150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 8, y 1 mM PMSF) durante 15 min. La suspensión, guardada en hielo, fue sonicada hasta que se observó un descenso en la viscosidad. El material insoluble fue centrifugado hasta formar un pellet a $10,000 \times g$ durante 5 min, y el sobrenadante se guardó inmediatamente a -70°C hasta su uso.

Las muestras de suero fueron analizadas para anticuerpos específicos contra los antígenos totales de *Leishmania* mediante un ensayo ELISA estándar. Brevemente, placas estándar (NUNC A/S, Roskilde, Denmark) fueron guardadas toda la noche a 4°C con 100 µl de antígeno crudo de *Leishmania* (2 µg/ml en PBS). Se ensayó el suero de ratón a dilución 1:100. Como anticuerpos secundarios, fueron empleados los siguientes conjugados de peroxidasa (Nordic Immunology Laboratories, Tilburg, Netherlands): IgG anti-ratón de cabra (dilución 1:1000), IgG1 anti-ratón de cabra (dilución 1:1000), e IgG2a anti-ratón de cabra (dilución 1:1000). El sustrato de peroxidasa fue ortofenilenodiamina dihidroclorhidra (DAKO A/S, Glostrup, Denmark). Tras 30 minutos, se detuvo la reacción por la adición de 100 µl de H₂SO₄ 1M, y se leyó la absorbancia a 450 nm. La significancia de las diferencias fue examinada mediante el test de la t de Student; $P < 0.05$ fue considerada estadísticamente significativa.

Resultados

Los cultivos continuos y pases en cultivo de *Leishmania* dan lugar a una gradual pérdida de infectividad. Por tanto, puesto que la generación de un mutante $\Delta hsp70-II$ por doble reemplazamiento requiere la transfección repetida y la selección con fármacos, no debe excluirse la posibilidad de que la carencia de infectividad de la línea mutante sea consecuencia del prolongado cultivo *in vitro*. Para testar esta posibilidad, se inocularon ratones BALB/c con elevadas dosis de microorganismos mutantes. A los 28 días posteriores a la infección, se recobraron células de *Leishmania* del bazo del ratón infectado, lo que proporcionó una demostración directa de que el mutante $\Delta hsp70-II$ mantuvo su infectividad.

Se empleó citometría de flujo para analizar la interacción entre los macrófagos U937 y los promastigotes $\Delta hsp70-II$ (Fig. 3). Aunque el porcentaje de macrófagos fluorescentes fue comparable cuando estas células fueron cultivadas tanto con promastigotes $\Delta hsp70-II$ (76.54%) como con silvestres (92.22%), hubo marcadas diferencias en las intensidades de fluorescencia. La fluorescencia aumentada mostrada por los macrófagos incubados con promastigotes silvestres fue una indicación de que varios protozoos estaban interaccionando con un solo macrófago (Fig. 3B). La transfección del mutante $\Delta hsp70-II$ con la construcción p70II-Pac expresando *HSP70-II* mejoró notablemente su habilidad para interaccionar con los macrófagos (Figs.3C,D).

El análisis microscópico de la interacción *Leishmania*-macrófago tras 1, 2, 3, y 4 días de incubación protozoo-macrófago mostró que los promastigotes mutante y silvestre infectaron un número similar de macrófagos, sugiriendo que la deficiencia HSP70-II no afecta a la penetración en los macrófagos. Sin embargo, tras 48 horas, el número de amastigotes presentes en los macrófagos difirió significativamente entre los promastigotes $\Delta hsp70-II$ y silvestres, y la diferencia se incrementó aún más en los días 3 y 4. Más aún, la re-expresión de *HSP70-II* en el mutante delecionado no fue suficiente para recuperar su limitada capacidad para multiplicarse dentro del macrófago (Fig. 3F).

Se investigó también la habilidad del mutante de delección para causar leishmaniasis visceral en ratones BALB/c. Cuatro semanas tras la infección, elevados números de microorganismos estaban presentes en el hígado y bazo del ratón infectado con los promastigotes silvestres de *L. infantum* (Tabla 1). Sin embargo, en ratones infectados con el mutante $\Delta hsp70-II$, se recuperaron solo protozoos en bazo, y no en el hígado. En base al conteo celular, se determinó que el mutante nulo $\Delta hsp70-II$ fue alrededor de unas 1000 veces menos infectivo que la cepa parental en el bazo de los ratones BALB/c y avirulento en el hígado del ratón.

(Tabla pasa a página siguiente)

Log (promastigotes/órgano) ^a				
	Bazo	Hígado	DO ₄₅₀ ^b	IgG _{2a} /IgG ₁ ^c
5	Línea silvestre	6.27 ± 0.51	7.85 ± 0.07	0.39 ± 0.15
			0.61 ± 0.09	
10	<i>Δhsp70-II</i>	2.66 ± 0.29	ND ^d	0.27 ± 0.05
				0.71 ± 0.16 (*) ^e
15	<i>Δhsp70-II</i> (+p70II-Pac)	2.35 ± 0.51	ND	0.24 ± 0.04
				0.85 ± 0.20 (**) ^e

^aCuatro semanas tras la infección, se determinó la carga parasitaria por dilución limitante tanto en bazo como en el hígado, para cada ratón. Los datos representan la media más la desviación estándar.

^bSe determinó en el suero de cada ratón la reactividad de anticuerpos IgG frente a los antígenos totales de *L. infantum* a las cuatro semanas post-infección.

^cLos isotipos específicos de *Leishmania* IgG1 e IgG2 se determinaron también por ELISA para cada suero individual. Los datos representan la media (mas la desviación estándar) de la tasa IgG2a/IgG1 para cada grupo de ratones.

^dND, no detectado.

^eSe calcularon los valores p del test de Student por comparación con los valores encontrados en el suero de ratones infectados con promastigotes de la línea silvestre: *, 0.014; **, 0.005.

Se encontraron bajos números de protozoos en el bazo de ratones infectados con células reexpresando *HSP70-II* (el mutante *Δhsp70-II* transfectado con p70II-Pac). Tras la reintroducción del gen en el mutante *Δhsp70-II*, los niveles de *HSP70-II* mRNA fueron menores que en los promastigotes silvestres. El análisis de la respuesta humoral inducida en los ratones infectados con *Leishmania* mostró que los animales infectados con promastigotes silvestres tuvieron una pronunciada reactividad contra los antígenos totales de *Leishmania*. El suero de los ratones infectados con el mutante *Δhsp70-II* (o el mutante transfectado con p70II-Pac) también reaccionó positivamente contra los antígenos de *Leishmania*, pero en menor medida que los sueros de los animales infectados con el cultivo silvestre. El análisis de los isotipos IgG específicos mostró un ratio IgG2a/IgG1 significativamente mayor en animales infectados con el mutante *Δhsp70-II* (o el mutante re-expresando), indicando que existen diferencias cualitativas en la respuesta humoral del ratón infectado con el cultivo silvestre vs. el mutante.

Ejemplo 4

Estudio de la reversión de la virulencia

Para el estudio de la reversión de la virulencia se llevaron a cabo infecciones secuenciales en ratón, tal y como se ha realizado en otros casos (Spath *et al.*, 2004. *Infect Immun* 72, 3622-3627). Al realizarse las infecciones de forma secuencial, los parásitos recuperados del bazo de los ratones infectados con el mutante *Δhsp70-II* fueron empleados para realizar las infecciones sucesivas. La línea mutante *Δhsp70-II* produjo parasitemias muy bajas en bazo, que fueron entre mil y un millón de veces inferiores a la producida con una dosis igual de promastigotes silvestres de *L. infantum*. En ningún caso, se detectaron parásitos en el hígado de los ratones infectados con la línea *Δhsp70-II*, mientras que este órgano resultó altamente infectado con los parásitos de la línea silvestre de *L. infantum*. A lo largo del proceso no se detectó variación alguna en la virulencia de la línea mutante, lo que es una demostración de la estabilidad del genotipo alterado de la línea *Δhsp70-II*.

Ejemplo 5

*Ensayos de vacunación con el mutante Δ hsp70-II frente a la infección con *L. infantum**

Se infectaron 5 ratones con 10^7 promastigotes en fase estacionaria (infectivos) de la línea Δ hsp70-II por vía intravenosa. Tras doce semanas de infección, los animales fueron infectados con 10^6 promastigotes estacionarios de *L. infantum* silvestre. Cuatro semanas después de la infección, los ratones fueron sacrificados y se recogieron los macrófagos peritoneales. En paralelo, se recogieron los macrófagos presentes en el peritoneo de ratones control (infectados con *L. infantum* silvestre, pero no vacunados con el mutante Δ hsp70-II). Los macrófagos se depositaron sobre placas de 96-pocillos a una concentración de 10^6 células por ml y se incubaron durante 48 horas en ausencia o en presencia de $50 \mu\text{g/ml}$ de antígeno soluble de *Leishmania* (SLA; preparado a partir de promastigotes de *L. major* o de *L. infantum*).

Trascurrida la incubación, se determinó la presencia de nitritos en el medio de cultivo mediante el uso del reactivo de Griess (utilizado siguiendo el protocolo de la casa suministradora, Promega). Los resultados se muestran en la Fig. 4.

Los nitritos presentes en el medio de cultivo son el resultado de la producción de óxido nítrico por parte de los macrófagos en cultivo. La producción de óxido nítrico forma parte del mecanismo de defensa de los macrófagos (la célula hospedadora para *Leishmania*) frente a la infección del parásito y se considera como el mejor parámetro asociado a una respuesta inmunitaria protectora frente a *Leishmania* (Liew & O'Donnell, 1993). *Adv Parasitol* 32, 161-259). Estos resultados indican que la vacunación con la línea Δ hsp70-II está induciendo una inmunidad protectora ya que los macrófagos están preparados para producir grandes niveles de óxido nítrico al detectar el parásito (tanto sea *L. infantum* o *L. major*).

Ejemplo 5

*Ensayos de vacunación con el mutante Δ hsp70-II frente a la infección con *L. major**

La infección de ratones con *L. major* es utilizada como sistema modelo de ensayo de vacunas por dos razones fundamentales. Por un lado, al producir lesiones cutáneas en el sitio de inmunización (almohadilla plantar), el desarrollo de la infección se puede monitorizar sin necesidad de sacrificar al animal. Por otro lado, existe una clara asociación entre protección/susceptibilidad y la inducción de una respuesta Th1/Th2 (Liew & O'Donnell, 1993). *Adv Parasitol* 32, 161-259).

Se infectaron 5 ratones con 10^7 promastigotes en fase estacionaria (infectivos) de la línea Δ hsp70-II por vía intravenosa. Tras cuatro semanas de infección, los animales fueron infectados con 10^4 promastigotes estacionarios de *L. major* en la almohadilla de la pata trasera derecha. En paralelo, se infectó un grupo de ratones control (no vacunados) con la misma dosis de *L. major*. El tamaño de la lesión fue monitorizado semanalmente mediante la utilización de un calibre digital. Los resultados, representados de forma individual para cada ratón, se muestran en la Fig. 5a y 5b. Como se observa, la evolución de la lesión en los ratones vacunados fue mucho menor, siendo nula en tres de los 5 ratones.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Uso de organismos de *Leishmania* que tienen delecionado el gen *HSP70-II*, para la elaboración de un medicamento para el tratamiento o prevención de la leishmaniasis en un mamífero.
- 10 2. Uso de organismos de *Leishmania* que tienen delecionado el gen *HSP70-II* según la reivindicación anterior, donde los organismos que tienen delecionado el gen *HSP70-II* pertenecen a una especie de *Leishmania* que se selecciona de la lista que comprende: *Leishmania infantum*, *L. chagasi*, *L. major*, *L. tropica*, *L. mexicana*, *L. braziliensis* y/o *L. amazonensis*.
- 15 3. Uso de organismos de *Leishmania* que tienen delecionado el gen *HSP70-II* según cualquiera de las reivindicaciones 1-2, donde los organismos que tienen delecionado el gen *HSP70-II* pertenecen a la especie *Leishmania infantum*.
4. Uso de organismos de *Leishmania* según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde el mamífero es el perro.
5. Uso de organismos de *Leishmania* según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde el mamífero es el hombre.
- 20 6. Uso de organismos de *Leishmania* según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, donde la leishmaniasis es causada por parásitos de la especie *L. infantum*.
7. Composición farmacéutica que comprende un organismo de *Leishmania* que tienen delecionado el gen *HSP70-II*.
- 25 8. Composición farmacéutica según la reivindicación anterior, donde el organismo de *Leishmania* se encuentra en forma de promastigote.
9. Composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 7-8 que además comprende excipientes y/o adyuvantes farmacológicamente aceptables.
- 30 10. Composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 7-9, para su uso como medicamento.
11. Uso de una composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 7-9, para la elaboración de un medicamento para el tratamiento o prevención de la leishmaniasis.
- 35 12. Uso de la composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 7-9, para la elaboración de un medicamento para el tratamiento o prevención de la leishmaniasis en un mamífero.
- 40 13. Uso de la composición farmacéutica según la reivindicación 12, donde el mamífero es el hombre.
14. Uso de la composición farmacéutica según la reivindicación 12, donde el mamífero es el perro.

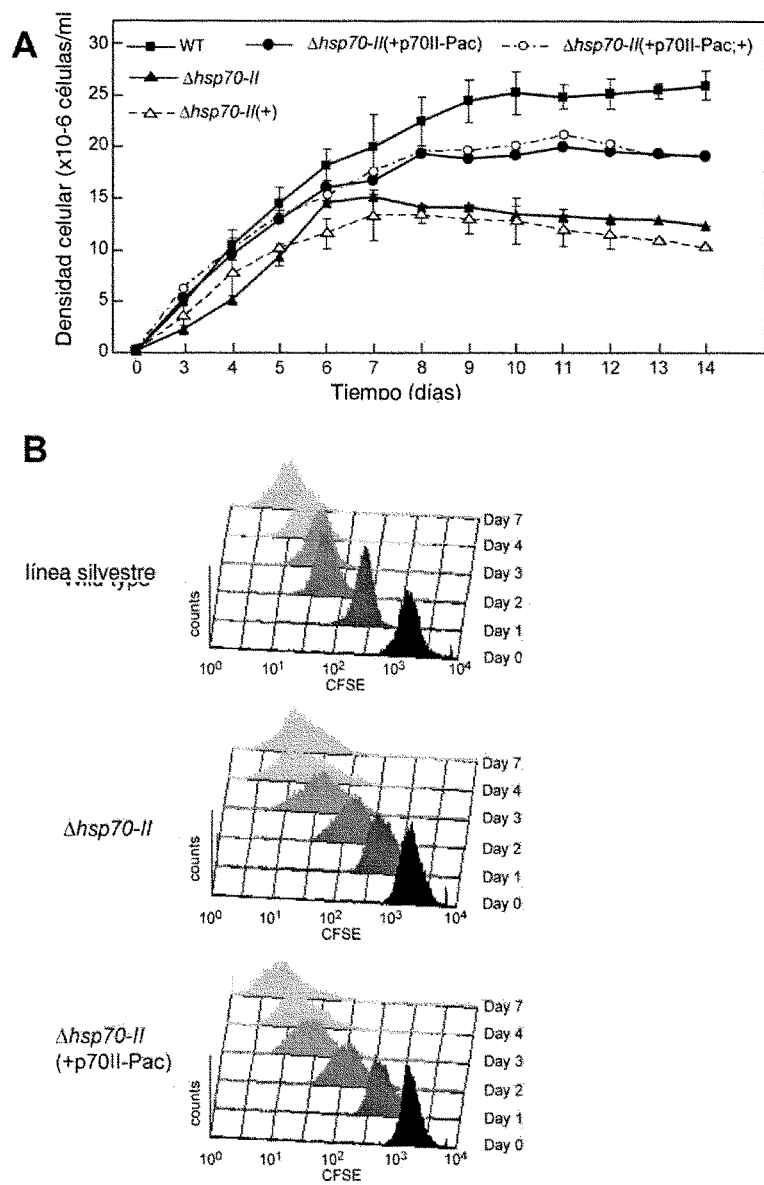


FIG: 1

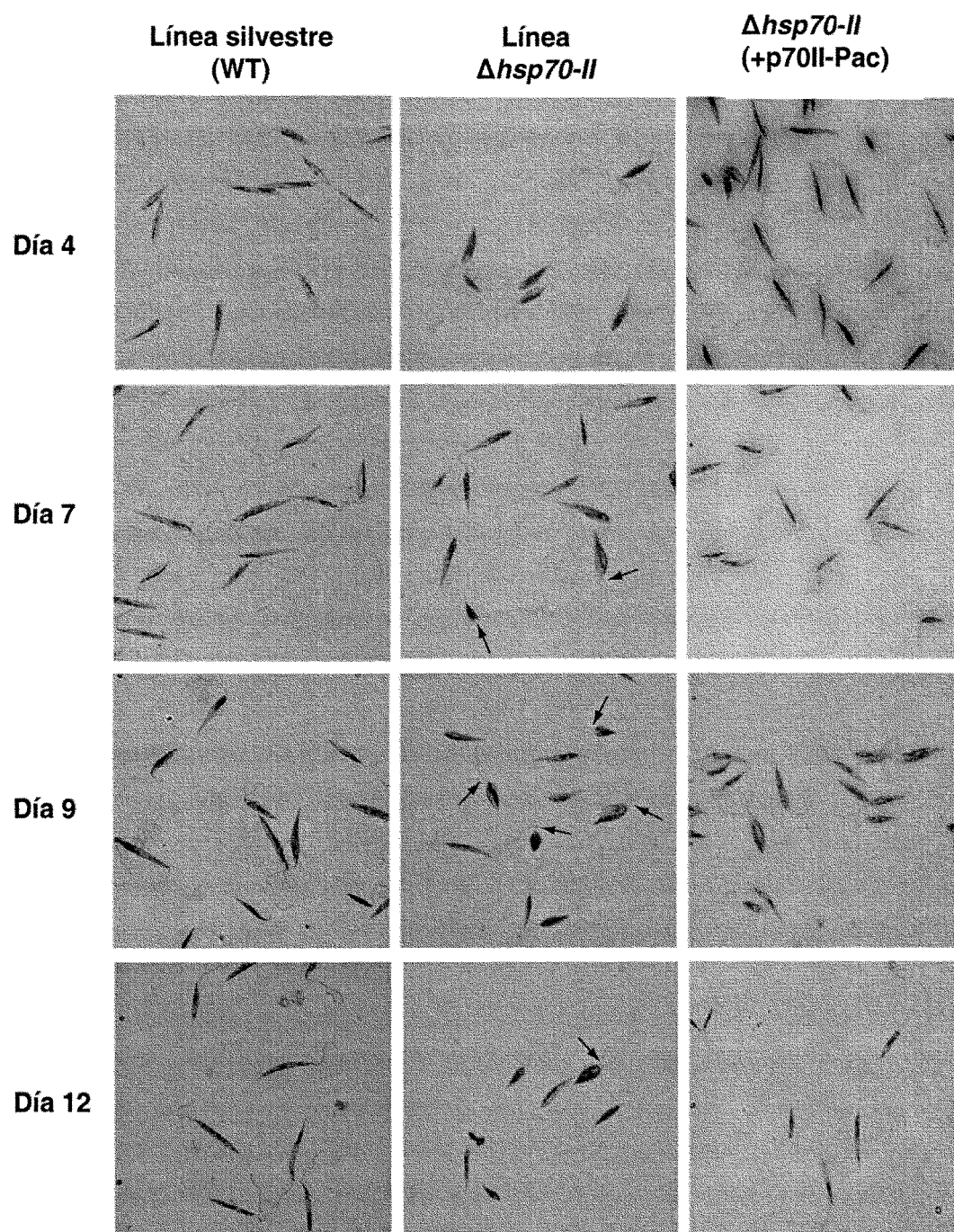


FIG: 2

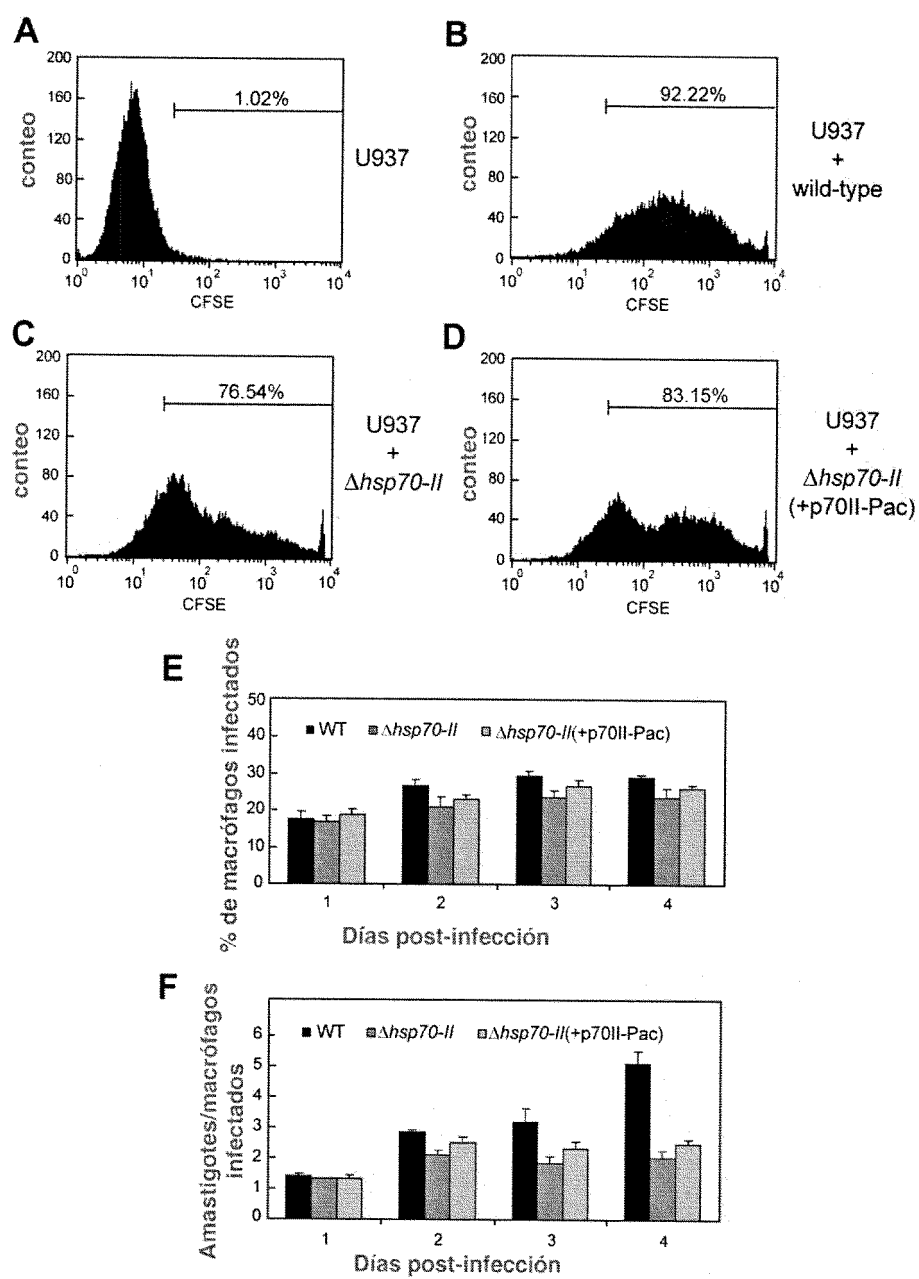


FIG: 3

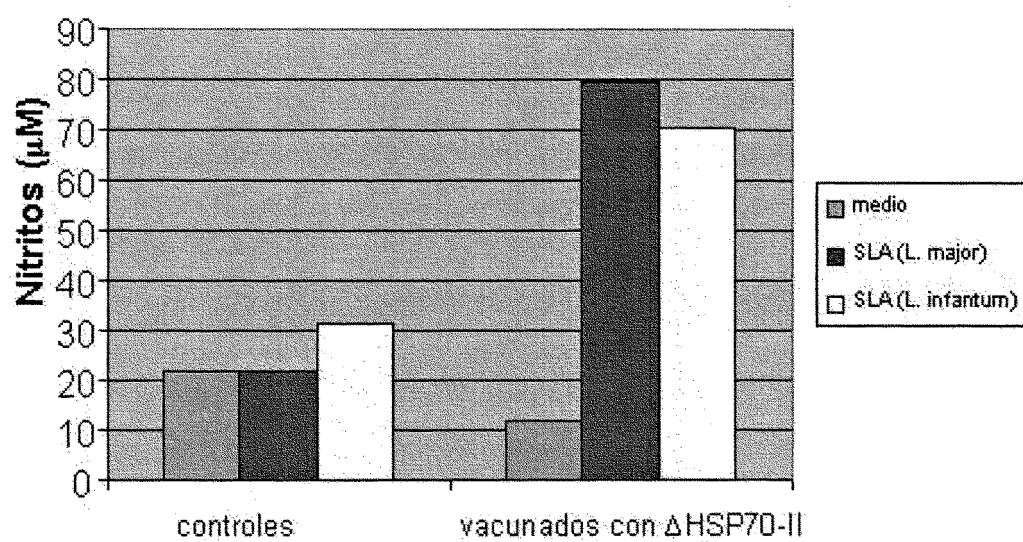
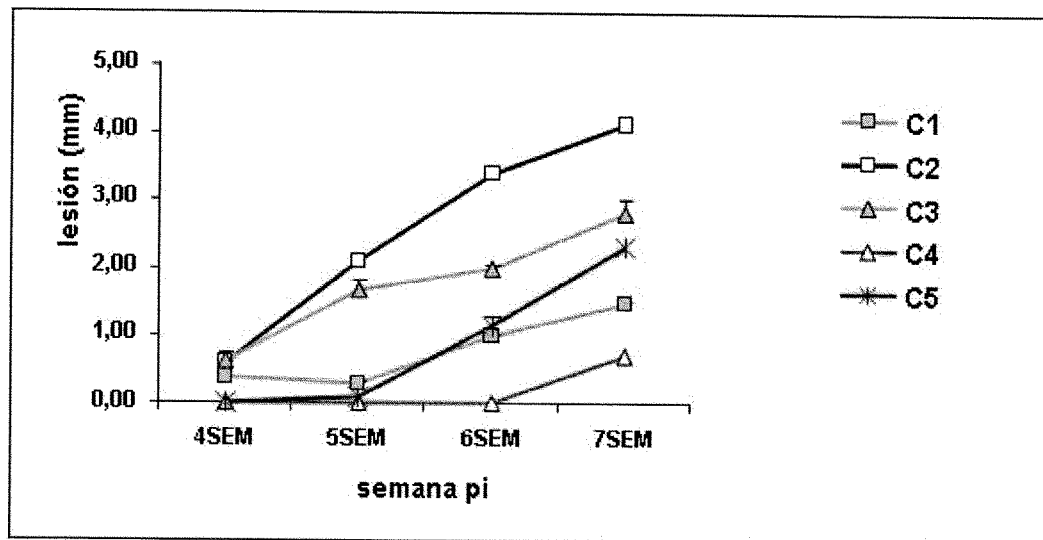


FIG: 4

A



B

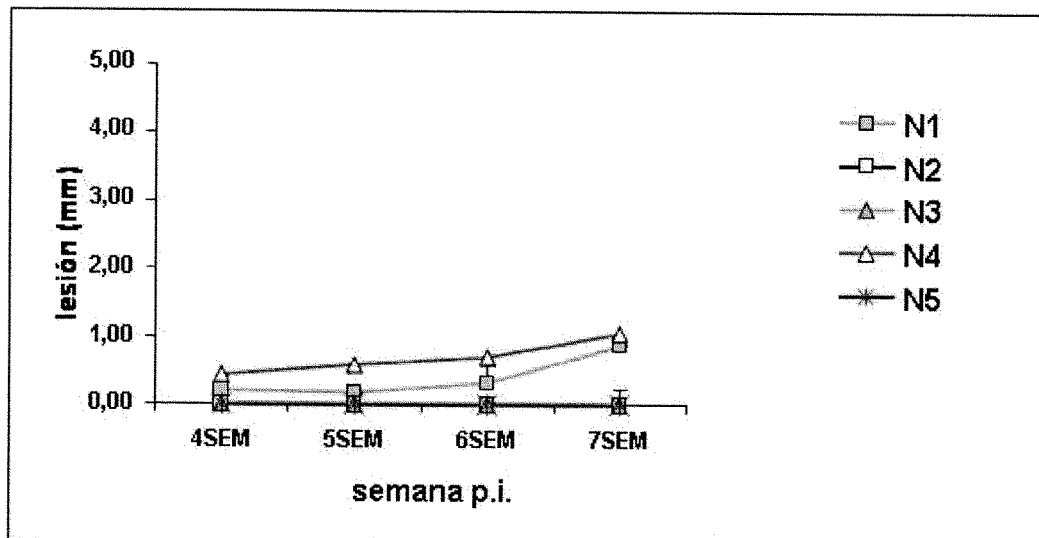


FIG: 5

ES 2 346 281 A1

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Universidad Autónoma de Madrid

5 <120> Uso de cepas de *Leishmania* Δ hsp70-II como vacuna.

<130> 1595.13

10 <160> 10

<170> PatentIn versión 3.4

15 <210> 1
 <211> 653
 <212> PRT
 <213> *Leishmania infantum*

20 <400> 1

25 Met Thr Phe Glu Gly Ala Ile Gly Ile Asp Leu Gly Thr Thr Tyr Ser
 1 5 10 15

Cys Val Gly Val Trp Gln Asn Glu Arg Val Asp Ile Ile Ala Asn Asp
 20 25 30

30 Gln Gly Asn Arg Thr Thr Pro Ser Tyr Val Ala Phe Thr Asp Ser Glu
 35 40 45

35 Arg Leu Ile Gly Asp Ala Ala Lys Asn Gln Val Ala Met Asn Pro His
 50 55 60

40 Asn Thr Val Phe Asp Ala Lys Arg Leu Ile Gly Arg Lys Phe Asn Asp
 65 70 75 80

Ser Val Val Gln Ser Asp Met Lys His Trp Pro Phe Lys Val Thr Thr
 85 90 95

45 Lys Gly Ala Asp Lys Pro Val Ile Ser Val Gln Tyr Arg Gly Glu Glu
 100 105 110

50 Lys Thr Phe Thr Pro Glu Glu Ile Ser Ser Met Val Leu Leu Lys Met
 115 120 125

55 Lys Glu Thr Ala Glu Ala Tyr Leu Gly Lys Gln Val Lys Lys Ala Val
 130 135 140

60 Val Thr Val Pro Ala Tyr Phe Asn Asp Ser Gln Arg Gln Ala Thr Lys
 145 150 155 160

Asp Ala Gly Thr Ile Ala Gly Leu Glu Val Leu Arg Ile Ile Asn Glu
 165 170 175

65 Pro Thr Arg Ala Ile Ala Tyr Gly Leu Asp Lys Gly Asp Asp Gly Lys
 180 185 190

ES 2 346 281 A1

Glu Arg Asn Val Leu Ile Phe Asp Leu Gly Gly Gly Thr Phe Asp Val
 195 200 205
 5 Thr Leu Leu Thr Ile Asp Gly Gly Ile Phe Glu Val Lys Ala Thr Asn
 210 215 220
 10 Gly Asp Thr His Leu Gly Gly Glu Asp Phe Asp Asn Arg Leu Val Thr
 225 230 235 240
 15 Phe Phe Thr Glu Glu Phe Lys Arg Lys Asn Lys Gly Lys Asn Leu Ala
 245 250 255
 20 Ser Ser His Arg Ala Leu Ala Arg Leu Arg Thr Ala Cys Glu Arg Ala
 260 265 270
 25 Lys Arg Thr Leu Ser Ser Ala Thr Gln Ala Thr Ile Glu Ile Asp Ala
 275 280 285
 30 Leu Phe Glu Asn Val Asp Phe Gln Ala Thr Ile Thr Ala Arg Ala Phe
 290 295 300
 35 Glu Glu Leu Cys Gly Asp Leu Phe Arg Ser Thr Ile Gln Pro Val Glu
 305 310 315 320
 40 Arg Val Leu Gln Asp Ala Lys Met Asp Lys Arg Ser Val His Asp Val
 325 330 335
 45 Val Leu Val Gly Gly Ser Thr Arg Ile Pro Lys Val Gln Ser Leu Val
 340 345 350
 50 Ser Asp Phe Phe Gly Gly Lys Glu Leu Asn Lys Ser Ile Asn Pro Asp
 355 360 365
 55 Glu Ala Val Ala Tyr Gly Ala Ala Val Gln Ala Phe Ile Leu Thr Gly
 370 375 380
 60 Gly Lys Ser Lys Gln Thr Glu Gly Leu Leu Leu Leu Asp Val Thr Pro
 385 390 395 400
 65 Leu Thr Leu Gly Ile Glu Thr Ala Gly Gly Val Met Thr Ala Leu Ile
 405 410 415
 70 Lys Arg Asn Thr Thr Ile Pro Thr Lys Lys Ser Gln Ile Phe Ser Thr
 420 425 430
 75 Tyr Ala Asp Asn Gln Pro Gly Val His Ile Gln Val Phe Glu Gly Glu
 435 440 445
 80 Arg Ala Met Thr Lys Asp Cys His Leu Leu Gly Thr Phe Asp Leu Ser

ES 2 346 281 A1

	450		455		460	
5	Gly 465	Ile Pro Pro Ala 470	Pro Arg Gly Leu Pro 475	Gln Ile Glu Val Thr Phe 480		
10	Asp Leu Asp Ala 485	Asn Gly Ile Leu Asn Val 490	Ser Ala Glu Glu Lys Gly 495			
15	Thr Gly Lys Arg 500	Asn Gln Ile Thr Ile 505	Thr Asn Asp Lys Gly Arg Leu 510			
20	Ser Lys Asp Glu Ile Glu Arg Met 515	Val Asn Asp Ala Met 520	Lys Tyr Glu			
25	Glu Asp Asp Lys Ala Gln Arg Asp Arg Val Glu Ala Lys Asn Gly Leu 530	535	540			
30	Glu Asn Tyr Ala Tyr Ser Met Lys Asn Thr Leu Ser Asp Ser Asn Val 545	550	555	560		
35	Ser Gly Lys Leu Glu Asp Ser Asp Lys Ala Thr Leu Asn Lys Glu Ile 565	570	575			
40	Asp Val Val Leu Glu Trp Leu Ser Ser Asn Gln Glu Ala Ala Lys Glu 580	585	590			
45	Glu Tyr Glu His Lys Gln Lys Glu Leu Glu Ser Val Cys Asn Pro Ile 595	600	605			
50	Met Thr Lys Met Tyr Gln Ser Met Gly Gly Ala Ala Gly Gly Met Pro 610	615	620			
55	Gly Gly Met Pro Gly Met Ser Gly Met Ser Gly Gly Ala Gly Pro Ala 625	630	635	640		
60	Gly Gly Ala Ser Ser Gly Pro Lys Val Glu Glu Val Asp 645	650				
65	<210> 2					
	<211> 1119					
	<212> DNA					
	<213> <i>Leishmania infantum</i>					
	<400> 2					
	agcgggtggtg caggccccggc cggcgggtgcg tcctccggcc ccaaggtcga ggaggtcgac					
	taaatacgccc gagtgctgtg aaacgtcagc tcatgttcgc actgcacttt tgttacggcg					
	ccaatgtgcc gaggtgatat gcgggggagc cttcgcggtt ccccatgaa cgcacccgcg					

ES 2 346 281 A1

cttgatagat tctgtgtgtg tgcgccctcc gtcgctctac cgcgctcgtc tccggcgcca
240

5 tgcgtgcgcg ggtcgtttgt gtctattgtg aataatttct ttttgttggt tttccatctt
300

atttcggaag attttcgcgc gcgctaaatc cccctaccc tccccccat aactctcccc
360

10 accccctttt ttgtctgcgt ctgtttcgcc atatatatag acatattata tatgcatggt
420

gccgccaccg ctcacgcgct cgcattcaca gcgcgccgtc cttctccccct ctccctccct
15 480

cgtgtccctc aaactgttcc tagtactacc caccctctcc cgccccact tttccgctgt
540

20 ggggcttccc agtccacacc caactaccac ggcgacggtg cgtgcggcac gttgtgtgtg
600

cgttgggtgtg cacattgcag gcttgttgac tctctgtttg cgttatcatt ccccttccac
660

25 cagtcgccag ctttaggcgc acagccctgt ctggctagtgt ctcgagggag gagaggccca
720

ctagcgctgc gtgtgtgcta cactctctgg tacggttgct tgccagcaga gtagcagagg
780

30 acatgggtag atcgcaccat gggaggcgaa gagaataggg agtgtgcagg gtgggtgaaa
840

gctcggcagg caggcgacgc acgcagtgtc gtgatacacg caagcggcct cagcaatcta
35 900

cgcgtctgtg tgtgtgcgag agagcgaatt aaagaagaga ataagaagag atatgacgga
960

40 agtgcgcgag caaaccagga aagccaacgg gcttccacac cgacaaaccc cccgtcgcgt
1020

ccgatctctc gttgtctggc acttacatga gctctctccc tctgtctctc ctttatggag
1080

45 catgacgatg cggtaacatg cagtgcgtgc actggaaaa
1119

<210> 3

50 <211> 30

<212> DNA

<213> Artificial

55 <220>

<223> cebador

<400> 3

60

tctagaagat ctcggaagtg ctgcagagca
30

65

<210> 4

<211> 27

ES 2 346 281 A1

<212> DNA
<213> Artificial

5 <220>
<223> cebador

<400> 4

10 gatatcgatg gcgccttcga atgtcat
27

15 <210> 5
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial

20 <220>
<223> cebador

25 <400> 5

aagcttattcg cccgagtgcg gtgaa
25

30 <210> 6
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial

35 <220>
<223> cebador

40 <400> 6

45 gtcgacagat cttgacgggt gaatgtgttt
30

50 <210> 7
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial

55 <220>
<223> cebador

<400> 7

60 ggttcgaaat tgaacaagat ggattgca
28

65 <210> 8
<211> 30

ES 2 346 281 A1

<212> DNA
<213> Artificial

5 <220>
<223> cebador

<400> 8

10 cccaagcttt cagaagaact cgtcaagaag
 30

15 <210> 9
<211> 28
<212> DNA
20 <213> Artificial

<220>
<223> cebador

25 <400> 9

 ggttcgaaga tagatccgga aagcctga
30 28

<210> 10
<211> 29
35 <212> DNA
<213> Artificial

<220>
40 <223> cebador

<400> 10

45 ccaagcttct attcctttgc cctcggacg
 29

50

55

60

65



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ ES 2 346 281

⑫ Nº de solicitud: 200900387

⑬ Fecha de presentación de la solicitud: 11.02.2009

⑭ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑮ Int. Cl.: Ver hoja adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑯ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	FOLGUEIRA, C., CARRIÓN, J., MORENO, J. et al. Effects of the disruption of the HSP70-II gene on the growth, morphology, and virulence of Leishmania infantum promastigotes. International Microbiology. Junio 2008, Vol. 11, Nº 2, páginas 81-89. ISSN 1139-6709. <DOI:10.2436/20.1501.01.47>	1-14
X	FOLGUEIRA FERNÁNDEZ, C. Los genes HSP70 de Leishmania: importancia de la regulación traduccional y relevancia biológica del gen HSP70-II. Tesis Doctoral. 2006, páginas 73,80-89,106,113. Universidad Autónoma de Madrid.	1-14
A	FOLGUEIRA, C., QUIJADA, L., SOTO, M. et al. The translational efficiencies of the two Leishmania infantum HSP70 mRNAs, differing in their 3'-untranslated regions, are affected by shifts in the temperature of growth through different mechanisms. The Journal of Biological Chemistry. Octubre 2005, Vol. 280, Nº 42, páginas 35172-35183. ISSN 0021-9258. <DOI:10.1074/jbc.M505559200>	1-8,10-14
A	SILVERMAN, J. M., CHAN, S. K., ROBINSON, D. P. et al. Proteomic analysis of the secretome of Leishmania donovani. Genome Biology. 2008, Vol. 9, Nº 2, páginas R35.1-R35.21, especialmente discusión, conclusión, tabla 2. ISSN 1465-6914.	1,2,4,5,7, 8,10-14
A	RODRÍGUEZ, N. Factores de virulencia en Leishmania y su relación con el desarrollo de la leishmaniasis. Dermatología Venezolana. 2003, Vol. 41, Nº 3, páginas 3-9, especialmente página 6, tabla 3.	1,2,4,5,7, 8,10-14

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

27.09.2010

Examinador

E. Relaño Reyes

Página

1/6



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ ES 2 346 281

⑫ Nº de solicitud: 200900387

⑬ Fecha de presentación de la solicitud: 11.02.2009

⑭ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑮ Int. Cl.: Ver hoja adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑯ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	DOBBIN, C. A., SMITH, N. C., JOHNSON, A. M. Heat shock protein 70 is a potential virulence factor in murine Toxoplasma infection via immunomodulation of host NF-kappaB and nitric oxide. The Journal of Immunology. Julio 2002, Vol. 169, N° 2, páginas 958-965. ISSN 0022-1767.	1,7,10

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

27.09.2010

Examinador

E. Relaño Reyes

Página

2/6

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

A61K 35/68 (2006.01)

C07K 14/44 (2006.01)

A61P 33/02 (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

A61K, C07K , A61P

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, MEDLINE, BIOSIS, XPESP, EMBASE, NPL

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 27.09.2010

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	1-14	SÍ
	Reivindicaciones		NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones		SÍ
	Reivindicaciones	1-14	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de **aplicación industrial**. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión:

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como ha sido publicada.

1. Documentos considerados:

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	FOLGUEIRA, C. et al. International Microbiology. Junio 2008, Vol. 11, N° 2, páginas 81-89.	06-2008
D02	FOLGUEIRA FERNÁNDEZ, C. Los genes HSP70 de Leishmania: importancia de la regulación traduccional y relevancia biológica del gen HSP70-II. Tesis Doctoral. 2006, páginas 73, 80-89, 106, 113. Universidad Autónoma de Madrid.	2006
D03	FOLGUEIRA, C. et al. The Journal of Biological Chemistry. Octubre 2005, Vol. 280, N° 42, páginas 35172-35183.	21-10-2005
D04	SILVERMAN, J. M. et al. Genome Biology. 2008, Vol. 9, N° 2, páginas R35.1-R35.21.	2008
D05	RODRÍGUEZ, N. Dermatología Venezolana. 2003, Vol. 41, N° 3, páginas 3-9.	2003
D06	DOBBIN, C. A. et al. The Journal of Immunology. Julio 2002, Vol. 169, N° 2, páginas 958-965.	07-2002

Observaciones sobre documentos:

En D01 se anticipan las características fenotípicas de *Leishmania infantum* que presentan el gen HSP70-II deletado (delta-hsp70-II), comprobándose que la delección afecta a la morfología celular, replicación y virulencia del parásito. Esta menor virulencia de los mutantes delta-hsp70-II, los hace potencialmente útiles en el desarrollo de vacunas vivas atenuadas frente a enfermedades causadas por *Leishmania*.

D02 divulga una serie de estudios sobre los genes hsp70, la regulación de su expresión y los efectos de la delección de Hsp70-II en *L. infantum*. Se realizaron ensayos de infección "in vivo" en ratones, resultando menos infectivos los *L. infantum* mutantes delta-hsp70-II.

En D03 se investiga la regulación de la expresión de los genes HSP70, obteniendo mutantes de *L. infantum* que presentan el gen HSP70-II deletado.

D04 anticipa un estudio proteómico de los factores de secreción de *L. donovani* en la célula huésped, con el fin de encontrar posibles factores de virulencia. Uno de los posibles candidatos a ser un factor de virulencia es la proteína hsp70.

En D05 se presenta una revisión sobre los factores de virulencia en *Leishmania*, indicando que hsp70 es un factor de virulencia en *L. major*.

D06 investiga la proteína HSP70 como factor de virulencia en *Toxoplasma gondii*. Los *T. gondii* virulentos a los que se les redujo la expresión de HSP70 presentaron un fenotipo atenuado con respecto a los silvestres.

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

El objeto de la solicitud, es el uso de organismos de *Leishmania* que tienen HSP70-II deletado, en la elaboración de un medicamento para el tratamiento o prevención de la leishmaniasis en mamíferos (reivindicaciones de la 1 a la 6 y de la 11 a la 14), así como una composición farmacéutica que comprenda organismos de *Leishmania* con el gen HSP70-II deletado (reivindicaciones de la 7 a la 10).

1. NOVEDAD (Art. 6 LP)

Las reivindicaciones de la 1 a la 14 cumplen con el requisito de novedad.

Hoja adicional

2. ACTIVIDAD INVENTIVA (Art. 8 LP)

La presente solicitud, tiene por objeto el uso de organismos de *Leishmania infantum* con el gen HSP70-II deletado, para fabricar un medicamento para el tratamiento o prevención de leishmaniasis en el perro o el hombre (reivindicaciones de la 1 a la 7); una composición farmacéutica que comprenda promastigotes de *Leishmania* que presenten HSP70-II deletado (reivindicaciones de la 8 a la 10); y el uso de esta composición en la elaboración de un medicamento para el tratamiento o prevención de la leishmaniasis en el hombre o el perro (reivindicaciones de la 11 a la 14).

En D01 se investigan las características fenotípicas de *Leishmania infantum* que tienen HSP70-II deletado, gen que se encuentra muy conservado en numerosas especies de *Leishmania*. Entre otros experimentos, se infectaron ratones con promastigotes de *L. infantum* silvestres y delta-hsp70-II. De este modo, se comprobó que los parásitos mutados, mostraban una menor capacidad de infección. Además, aunque los sueros de los ratones infectados con *L. infantum* delta-hsp70-II, reaccionaban frente a los antígenos de *Leishmania* con menor intensidad que los sueros infectados con *L. infantum* silvestre, el análisis de los isotipos mostró un mayor ratio IgG2a/IgG1, lo que está asociado en *L. major* a una mayor protección. Esta menor virulencia de los mutantes delta-hsp70-II, los hace potencialmente útiles en el desarrollo de vacunas vivas atenuadas frente a enfermedades causadas por *Leishmania*.

D02 demuestra mediante ensayos de infección "in vivo" con ratones, que los promastigotes mutantes delta-hsp70-II de *L. infantum* son menos infectivos que los protozoos silvestres.

Es decir, ambos documentos demuestran la relación de HSP70-II con la virulencia en *L. infantum*, mediante estudios de infección "in vivo" con promastigotes delta-hsp70-II.

Por lo tanto, un experto en la materia intentaría el uso de *Leishmania infantum* con el gen HSP70-II deletado, para fabricar un medicamento para el tratamiento o prevención de leishmaniasis en el perro o el hombre (reivindicaciones de la 1 a la 7); la obtención de una composición farmacéutica que comprenda promastigotes de *Leishmania* que presenten HSP70-II deletado (reivindicaciones de la 8 a la 10); y el uso de dicha composición, en la elaboración de un medicamento para el tratamiento o prevención de la leishmaniasis en el hombre o el perro (reivindicaciones de la 11 a la 14), con una expectativa razonable de éxito.

En consecuencia, las reivindicaciones de la 1 a la 14 no presentan actividad inventiva.