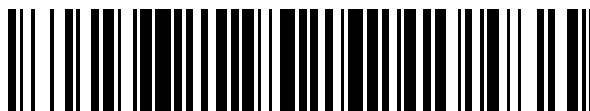


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 382 003**

51 Int. Cl.:
A61K 39/008 (2006.01)
C12N 5/16 (2006.01)
A61P 33/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **07766931 .5**
96 Fecha de presentación: **15.06.2007**
97 Número de publicación de la solicitud: **2037958**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **25.03.2009**

54 Título: **Vacuna de células híbridas contra la leishmaniasis [KALA-AZAR]**

30 Prioridad:
15.06.2006 IN DE14292006

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
04.06.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
04.06.2012

73 Titular/es:
**COUNCIL OF SCIENTIFIC AND INDUSTRIAL
RESEARCH
ANUSANDHAN BHAVAN RAFI MARG
NEW DELHI - 110 001, IN**

72 Inventor/es:
**BHAUMIK, Suniti;
BASU, Rajatava;
NASKAR, Kshudiram y
ROY, Syamal**

74 Agente/Representante:
Ungría López, Javier

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

ES 2 382 003 T3

DESCRIPCIÓN

Vacuna de células híbridas contra la Leishmaniasis [KALA-AZAR]

- 5 La presente invención se refiere a una vacuna de células híbridas contra la Leishmaniasis que comprende un macrófago singeneico con un antígeno-KMP-11 de *Leishmania* electrofusionado con células dendríticas alogénicas, particularmente para su uso contra leishmaniasis visceral. La vacuna de la presente invención fue capaz de conseguir la eliminación completa de la carga de parásitos esplénica y hepática en fase tardía de infección por *L. donovani* en ratones BALB/c genéticamente susceptibles.
- 10 La Leishmaniasis Visceral (LV), conocida también como Kala-azar, está provocada por miembros del complejo de *L. donovani* dando como resultado síntomas clínicos de fiebre amarilla, caquexia, hepatoesplenomegalia y citopenia sanguínea. La LV activa está asociada con la ausencia de respuesta inmune mediada por células específicas de parásitos (9, 10). La LV también se ha reconocido cada vez mas como una infección oportunista en individuos infectados por el virus VIH (11). La OMS ha identificado la Leishmaniasis como un problema de salud pública principal y en aumento (12). Si no se trata, la forma visceral de la Leishmaniasis es letal con epidemias recientes en Sudán y en India que han producido más de 100.000 muertes (13).
- 15 Las formas actuales del régimen quimioterapéutico contra Kala-azar en todo el mundo tienen graves limitaciones debido al efecto tóxico, a la duración del tratamiento prolongada, y en algunos casos, a un elevado coste prohibitivo de tratamiento. El fracaso de los antiamoniocales pentavalentes - la actual forma principal de tratamiento quimioterapéutico en todo el mundo, se atribuye a la aparición de resistencia al antimonio de las cepas de *Leishmania* dando como resultado frecuentes reincidencias después del tratamiento (14, 15). En la India, el antimonio ya no es útil como un fármaco ya que el 65% de los pacientes con LV no responden o reinciden inmediatamente (16). Los tratamientos quimioterapéuticos alternativos con anfotericina B y su formulación lipídica tienen graves limitaciones debido al efecto tóxico y elevado coste prohibitivo de tratamiento (15).
- 20 Limitaciones en aumento en cuanto a las estrategias quimioterapéuticas disponibles debido a la aparición de cepas resistentes y a la ausencia de una estrategia de vacuna terapéutica eficaz contra la LV intensifican la crisis. Por lo tanto, se han realizados intentos para usar un enfoque terapéutico de células híbridas contra la Leishmaniasis visceral. Las vacunas basadas en células dendríticas [CD] modificadas por ingeniería genética representan una herramienta poderosa para la inmunoterapia, aunque hasta ahora solo se ha implementado en el modelo contra el cáncer. La presente invención sostiene, por primera vez, que la terapia de células híbridas basada en CD puede implementarse en diseños de futuras vacunas contra el estado avanzado de la Leishmaniasis Visceral [LV] y tiene el potencial de usarse en enfermedades parasitarias intracelulares en general.
- 25 Una evaluación realista de la eficacia de una vacuna contra la Leishmaniasis depende de 3 importantes variables que los autores de la presente invención han considerado - (i) constitución genética del hospedador; (ii) naturaleza del antígeno sometido a ensayo; (iii) naturaleza de la vacuna. Considerando la primera variable, el objetivo de la presente invención fue formular una estrategia de vacuna que se basó en su implementación en un modelo de hámster dorado ya que las características clinicopatológicas reflejan ampliamente la LV progresiva humana, mostrando un incesante aumento en la carga visceral, caquexia progresiva, hepatoesplenomegalia, pancitopenia, hipergammaglobulinemia y finalmente la muerte (1).
- 30 Basándose en la selección de la Proteína 11 de la Membrana de Kinetoplastidos [KMP-11] se trató la segunda variable como un antígeno candidato de vacuna. La Proteína 11 de la Membrana de Kinetoplastidos [KMP-11], una proteína de membrana de superficie muy conservada presente en todos los miembros de la familia *Kinetoplastidae*, se expresa diferencialmente en formas amastigotas y promastigotas de *Leishmania* (2 - 4). En un informe previo, se había realizado la implicación hacia una asociación de la expresión de la KMP-11 con la posible vacuna de una cepa de *Leishmania* UR6 avirulenta, atenuada (5). Además, se había descrito la capacidad de la KMP-11 para inducir IFN- γ a partir de PBMC derivada de pacientes curados de LV de Kenia (6). En las formas de Leishmaniasis cutánea y visceral se indican diversos hallazgos hacia una respuesta del hospedador dispar contra diferentes antígenos parasitarios. La glucoproteína 63 (gp63) de la *Leishmania* no induce IFN- γ significativa a partir de linfocitos de pacientes curados de LV (6). Por otro lado, el mismo antígeno, gp63, induce altos niveles de IFN- γ a partir de linfocitos de pacientes curados de LC (8). A diferencia de gp63, KMP-11 induce producción significativa de IFN- γ a partir de linfocitos de pacientes curados de LV (6). Por tanto, la naturaleza del antígeno que ejerce influencia sobre la respuesta inmune del hospedador contra diferentes especies de *Leishmania* se encuentra en observación.
- 35 Teniendo en cuenta los hechos hasta ahora conocidos en cuanto a que el plásmido transfectado que codifica al antígeno inmunodominante se expresa a través de la ruta de la clase I y que las CD son los miembros más importantes de la clase general de CPA (células presentadoras de antígenos), los inventores de la presente invención se percataron de que la transfección del plásmido que codifica el antígeno KMP-11 podría ayudar a centrar la respuesta inmune para generar antígenos específicos de LCT (linfocitos citolíticos) contra este antígeno inmunodominante definido. Adicionalmente, se espera reforzar la antigenicidad de las CPA transfectadas por la contribución de la clase II del MHC alogénico para dar lugar a una respuesta T_H más potente y un mecanismo efector en términos de generación de LCT mediado por un epitopo presentador de células común para las moléculas de

clase I del MHC singénicas y de clase II alogénicas. Por lo tanto, en la presente invención se proporciona una terapia de células híbridas basadas en CD modificadas por ingeniería genética en un modelo de LV experimental, obtenido por transfección de CD con el antígeno KMP-11 dominante.

5 El documento EP 1130088 se refiere a métodos para el tratamiento y prevención del cáncer y enfermedades infecciosas usando células híbridas formadas por fusión de células dendríticas alogénicas y células no dendríticas autólogas. Se dice que tales células híbridas combinan la enérgica aloreactividad de las CD maduras con la antigenicidad específica de células tumorales autólogas, suscitando así una alta especificidad y respuesta enérgica de LCT. Se dice que los métodos desvelados en el presente documento pueden tratar o prevenir infecciones causadas por protozoos patógenos tales como, pero sin limitación, *Entamoeba histolytica*, *Trichomonas tenax*, *Trichomonas hominis*, *Trichomonas vaginalis*, *Trypanosoma gambiense*, *Trypanosoma rhodesiense*, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania donovani*, *Leishmania tropica*, *Leishmania braziliensis*, *Pneumocystis pneumonia*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium falciparum* y *Plasmodium malaria*.

10 Por tanto, el principal objeto de la presente invención es proporcionar una vacuna de células híbridas contra la Leishmaniasis que comprende un macrófago singeneico con un antígeno-KMP-11 de *Leishmania* dominante electrofusionado con células dendríticas alogénicas.

Otro objeto de la presente invención es proporcionar una vacuna de células híbridas en la que el antígeno KMP-11 de *Leishmania* se obtiene de *Leishmania donovani*. Otro aspecto de la presente invención es proporcionar una vacuna en la que la vacuna estimula respuestas de anticuerpos, respuestas de LCT, respuestas proliferativas de células T, generación de IL-2, reducción de carga parasitaria en bazo e hígado junto con una cura estéril contra la *Leishmania* tras la vacunación terapéutica a un mamífero.

25 Otro objeto de la presente invención es proporcionar una vacuna en la que dicha vacuna puede proteger al bazo y al hígado de parásitos hasta seis veces la dosis eficaz de dicha vacuna.

Otro aspecto más de la presente invención es proporcionar una formulación de vacuna híbrida contra la Leishmaniasis que comprende un macrófago singeneico con un antígeno-KMP-11 de *Leishmania* dominante electrofusionado con células dendríticas alogénicas junto con un adyuvante y/o una citocina.

30 Un objeto adicional de la presente invención es proporcionar un proceso para la preparación de una vacuna de células híbridas contra la Leishmaniasis.

35 Un enfoque de vacunación de células híbridas con células dendríticas se ha usado ampliamente con éxito solo en modelos tumorales. Diseñando una nueva estrategia de transfección de líneas celulares de macrófagos singeneicos procedentes de ratones BALB/c con un antígeno-KMP-11 de *Leishmania* dominante y electrofusionando con CD alogénicas de C57BU6, los autores de la presente invención obtuvieron una eliminación completa de la carga parasitaria en bazo e hígado en fase tardía de infección por *L. donovani* en ratones BALB/c genéticamente susceptibles. La respuesta curativa resultó de una alta respuesta de LCT CD8⁺ restringida a la clase I del MHC específica de la KMP-11. Este es el primer estudio que hizo realidad la posibilidad de una vacuna de células híbridas en el campo de enfermedades infecciosas y claramente demuestra la contribución de la respuesta de citocinas Th2 para conferir protección contra infección por *Leishmania donovani* en un modelo de LV experimental.

45 Por consiguiente, la presente invención proporciona una vacuna de células híbridas contra Leishmaniasis que comprende macrófagos singeneicos con un antígeno-KMP-11 de *Leishmania* dominante electrofusionado con células dendríticas alogénicas.

Adicionalmente la invención proporciona una formulación de vacuna híbrida contra Leishmaniasis que comprende un macrófago singeneico con un antígeno-KMP-11 de *Leishmania* dominante electrofusionado con células dendríticas alogénicas junto con un adyuvante y/o una citocina.

50 La invención también proporciona un proceso para la preparación de una vacuna de células híbridas contra Leishmaniasis como se reivindica en la reivindicación 9. En una realización la presente invención proporciona una vacuna de células híbridas que comprende la fusión de MDMO singeneicos, que expresan antígenos de superficie parasitarios conocidos como Proteína-11 de Membrana de Kinetoplastidos (KMP-11), con células dendríticas derivadas de médula ósea (CDMO) alogénicas

En otra realización de la presente invención, el macrófago se obtiene de ratones BALB/c por métodos conocidos.

60 En otra realización adicional de la presente invención, el gen del antígeno-KMP-11 de *Leishmania* se obtiene de *Leishmania donovani*.

En otra realización adicional de la presente invención, la célula dendrítica alogénica se obtiene a partir de progenitores de médula ósea por métodos conocidos.

En una realización adicional de la presente invención, la vacuna provoca una respuesta inmunocelular que es una respuesta de células Th1/Th2 mixta.

En otra realización de la presente invención, la vacuna estimula una respuesta de linfocitos T citotóxicos CD8+ específicos de KMP-11.

En otra realización más de la presente invención, la vacuna estimula una respuesta de anticuerpos, una respuesta de LCT, una respuesta proliferativa de células T, generación de IL-2, reducción de la carga parasitaria en bazo e hígado junto con cura estéril contra *Leishmania* tras vacunación terapéutica a un mamífero.

En otra realización adicional de la presente invención, la administración de la vacuna es eficaz para eliminar el parásito del mamífero.

En otra realización, la presente invención proporciona una formulación de vacuna híbrida contra Leishmaniasis que comprende macrófagos singeneicos con un antígeno-KMP-11 de *Leishmania* dominante electrofusionado con células dendríticas alogénicas opcionalmente junto con un adyuvante y/o una citocina.

En una realización adicional, la presente invención proporciona una formulación farmacéutica que comprende la vacuna de células híbridas, mencionada anteriormente, opcionalmente junto con un vehículo o un excipiente.

En otra realización adicional de la presente invención, las células presentadoras de antígenos (CPA) alogénicas son células dendríticas derivadas de médula ósea (CDMO) obtenidas de la cepa de ratón C57BU6.

En otra realización adicional de la presente invención, el antígeno comprende una proteína de superficie celular inmunodominante de *Leishmania* KMP-11.

En una realización de la presente invención, la administración terapéutica de la vacuna de células híbridas es eficaz para eliminar parásitos de los órganos de los mamíferos infectados por *Leishmania*.

En otra realización de la presente invención, la cepa de *Leishmania* es *L. donovani*.

También se describe un ADNc que es un polinucleótido que comprende una región codificante que codifica el antígeno y el antígeno es una proteína de membrana superficial celular de *Leishmania*.

También se describe un método para el tratamiento de Leishmaniasis, que comprende administrar al sujeto que lo necesite, una cantidad eficaz, no tóxica de la formulación de vacuna como se reivindica en la reivindicación 7.

Una realización adicional de la presente invención proporciona una vacuna de células híbridas de la invención, cuya administración terapéutica es eficaz para eliminar parásitos de órganos de los mamíferos infectados por *Leishmania*.

En otra realización de la presente invención, la dosis intravenosa terapéuticamente eficaz de dicha vacuna es de 5×10^5 células/100 g de peso corporal / PBS 100 μ l con 5 días de diferencia.

En otra realización más de la presente invención, dicha dosis se inyecta como una serie de dosis durante un periodo de apenas cuatro semanas.

Otra realización de la presente invención proporciona una vacuna de células híbridas de la invención, cuya administración terapéutica es eficaz para obtener una eliminación completa de la carga parasitaria en bazo e hígado en una infección de fase tardía del parásito.

KMP-11, *Proteína 11 de la Membrana de Kinetoplastos*;
LD, *Leishmania donovani*;
LV, *Leishmaniasis Visceral*;
LC, *Leishmaniasis Cutánea*;
ALS *Antígeno de Leishmania Soluble*;
MDMO, macrófago derivado de médula ósea;
CDMO células dendríticas derivadas de médula ósea
CPA células presentadoras de antígeno alogénicas

Breve descripción de los dibujos y figuras

Figuras 1 A, B, C y D: normalización y optimización de Parámetros de Electrofusión para la generación de células híbridas

Figura 1 E y F: cálculo de la generación de híbridos: las células se analizaron por citometría de flujo y se calculó el % de generación de células híbridas viables a partir de células doble positivas en el tercer cuadrante de un gráfico

de puntos.

Figuras 1G, H e I: microfotografías de fluorescencia de células híbridas generadas por electrofusión

- 5 (G) campo observado a través de un filtro rojo
 (H) campo observado a través de un filtro verde e
 (I) finalmente se realizó superposición de dos colores para permitir la visualización de células doble positivas.

10 **Figura 2:** ensayo de la carga parasitaria en Órganos por el método de ensayo de dilución limitante. La carga parasitaria en órganos total se calculó a partir del peso del bazo o hígado. Los datos representan la media $\pm$ ET de 12 animales por grupo.

15 **Figura 3:** respuesta de LCT anti-KMP-11 en ratones post infectados con *L. donovani* a los 105 días de vacunar con CDMO singénicas transfectadas con ADN de KMP-11 o células híbridas en comparación con grupos de control respectivos.

Figura 4: proliferación de células T, ensayo IL-2 e IL-4 en respuesta a estimulación con SLA entre diferentes grupos de ratones experimentales.

20 **Figura 5 A, 5 B y 5 C:** titulaciones de Ab de IgG completa, IgG1 e IgG2 anti-KMP-11 en el suero de células híbridas o de ratones BALB/c infectados con AG83 105 días tratados con CDMO singénicas transfectadas con ADN de KMP-11 (n=5/grupo).

25 **Figura 5D:** proporción de titulaciones anti-KMP-11 de IgG2a/IgG1 en suero de diferentes ratones BALB/c infectados y terapéuticamente vacunados.

Descripción detallada de la invención

Preparación de células híbridas

1. Clonación de KMP-11

30 10^8 promastigotes lavados con PBS, pH 7,4, (NaCl 1,37 mM, KCl 2,7 mM, Na_2HPO_4 , K_2HPO_4 1,47) y STE (Tris-HCl 10, pH 7,5, NaCl 100 mM, EDTA 1 mM) se suspendieron en tampón STE y se incubaron con Proteinasa K (1 mg/ml) (Invitrogen, Grand Island, NY), SDS al 0,5% a 50°C durante 4 h. Los ácidos nucleicos se extrajeron por extracción con fenol: cloroformo: alcohol isoamílico y precipitación con etanol. El ADN genómico se enrolló y se sometió a tratamiento con RNasa (100 $\mu\text{g/ml}$). El AND genómico de músculos se extrajo como se ha descrito previamente (16). Se extrajo ADN completo de todos los tejidos con Tampón de Extracción (Tris 10 mM, pH 8,0, EDTA 0,1 M, 20 g/ml de RNasa pancreática, SDS al 0,5% y 100 g/ml de Proteinasa K) seguido por el método de extracción con fenol: cloroformo: alcohol isoamílico y precipitación con etanol. Todas las amplificaciones PCR del ADN de KMP-11 se realizaron usando cebadores específicos del gen KMP-11: cebador directo 5'-ATGGCCACCACGTACGAGGAG-3' y cebador inverso 5'-TTACTTGGACGGGTACTGGGC-3' con una desnaturalización inicial a 94 °C durante 5 min seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 30 s, hibridación del cebador a 60°C durante 30 s, y extensión a 72 °C durante 30 s. El vector pCMV-LIC usado para la clonación se adquirió en Pharmingen (San Diego, CA).

El gen KMP-11 del ADN genómico de *L. donovani* se amplificó usando Taq™ Polimerasa de Alta Fidelidad (Invitrogen, Grand Island, NY) que tenía una actividad 3'-5' exonucleasa. Las reacciones PCR se realizaron usando los siguientes reactivos: Tris-Cl 50 mM, MgCl_2 1,5 mM y 10 μM de cada uno de los dNTP (Invitrogen, Grand Island, NY) y cebadores específicos de KMP-11 con una homología de secuencia adicional de 13 pb con el plasmido vectorial, cebador directo 5' CTGGTTC-CGGCGAATGGCCACCACGTACGAGGAG 3'; cebador inverso: 5' CTCGCTCCGGCGATTACTTGGACGGGTACT-GCGC 3' durante 35 ciclos en un Termociclador (Gene Amp® PCR System 9700, AB Applied Biosciences) con las siguientes condiciones: 94 °C durante 2 min, 94 °C durante 30 s, 62 °C durante 30 s y 72 °C durante 30 s. Los productos PCR amplificados se sometieron a electroforesis en gel de agarosa y se eluyeron del gel por columnas spin con EtBr Gen Elute™ Minus (Sigma, St. Louis, MO). Para la generación de proyecciones monocatenarias de 13 pb compatibles con el vector, se trataron 100 μg de ADN purificado con 5U de ADN polimerasa de T4 (Invitrogen, Grand Island, NY) en un volumen de reacción de 10 μl (Tris acetato 165 mM, acetato de sodio 330 mM, acetato de magnesio 50 mM, DTT 2,5 y BSA 100 $\mu\text{g/ml}$) en presencia de dTTP 0,5 mM a 37 °C durante 20 min. El pCMV-LIC lineal (7,5 ng) con la secuencia homóloga monocatenaria de 13 pb y los productos de la PCR tratados con la ADN polimerasa de T4 (50 ng) se mezclaron en 10 μl y se dejó hibridar a 22 °C durante 30 min. Después de inactivación con calor de la ADN polimerasa de T4, se usaron 5 μl de mezcla de hibridación para transformar células DH5 α competentes. Los transformantes se exploraron para determinar la presencia de plásmidos recombinantes con KMP-11 inserto por PCR en condiciones similares a las mencionadas anteriormente. Clones aislados positivos se secuenciaron mediante el secuenciador de ADN (ABI PRISM, modelo 377). El vector de control sin inserto se generó por digestión con enzimas de restricción doble de pCMV-LIC KMP-11

en los sitios EcoR1 y Apa1 que flanqueaban el inserto. Inicialmente se digirieron 2 µg de la construcción con EcoR1 10 U a 37 °C en un volumen total de 40 µl (Tris 500 mM, pH 8,0, MgCl₂ 100 mM, NaCl 500 mM) seguido por una carga en el extremo 5' con un fragmento Klenow en presencia de los dNTP en un volumen total de 20 µl (mezcla de dNTP 0,5 mM, fragmento Klenow 2 U) y se incubó durante 10 min a 37 °C. Después de la purificación, el ADN se digirió con Apa1 a 30 °C durante 1 h seguido de la retirada de las proyecciones- 3' generadas por Apa1 una mezcla de reacción que contenía ADN purificado, tampón de reacción de ADN polimerasa de T4 1 x y se añadieron 20 µM de cada uno de los dNTP junto con 10 U de ADN polimerasa de T4 y se incubó a 15 °C durante 30 min. Después de inactivación con calor de la ADN polimerasa de T4 a 75 °C durante 10 min, el ADN se purificó como se ha mencionado anteriormente. Finalmente 50 ng de ADN lineal se ligó por ligamiento en el extremo romo en un volumen final de 50 µl (Tris-HCl 250 mM, pH 7,6, MgCl₂ 50 mM, ATP 5 mM, DTT 5 mM, solución PEG 8000 al 25% (p/v), ADN Ligasa de T4 2 U) a 14 °C durante 24 h. La ADN ligasa de T4 se inactivó calentando a 70 °C durante 10 min. La mezcla de reacción se usó directamente para la transformación y las colonias negativas para KMP-11 se controlaron por PCR y se seleccionaron.

2. Cultivo de células dendríticas y macrófagos derivados de médula ósea:

Las CDMO se generaron a partir de progenitores de médula ósea en presencia de CM-CSF e IL-4 como se ha indicado anteriormente (17, 18 y 19). Brevemente, células de médula ósea, recogidas después de pasar médula de tibias y fémures de ratones C57BU6 o BALB/c a través de una malla de nylon se suspendieron en RPMI 1640 completo y se incubaron a 37 °C en presencia de CO₂ al 5% suministrado durante 2 h. Después 10⁶/ml de células no adherentes se re-sembraron en una placa de 24 pocillos en presencia de rmGM-CSF (150 U/ml) y rmlL-4 (75 U/ml) y se cultivaron durante 3 días en una incubadora con CO₂. El día 3 las células no adherentes (2,5 x 10⁶/2 ml/pocillo) se transfirieron de nuevo a una placa de seis pocillos complementada con medio completo y citocinas y posteriormente a los cultivos se les suministró rmGM-CSF y rmlL-4 los días 5 y 7. Después de 10 días, se recogieron las células no adherentes y se demostró que poseían una morfología típica de CD. Las características fenotípicas de estas células se evaluaron por citometría de flujo. Las últimas 14-18 h de cultivo de CDMO se dejaron en presencia de rmTNF-α con estímulos para maduración de CD (20 ng/ml). Ahora estas CDMO se usaron en experimentos posteriores.

Los MDMO se obtuvieron cultivando 10⁶ células de médula ósea en medio RPM11640 completo que contenía rmGM-CSF 0,2 ng/ml y rmM-CSF 50 ng/ml en una placa de 6 pocillos y se incubó a 37 °C durante 24 h. Después de esto las células no adherentes se transfirieron a un nuevo pocillo con el mismo medio y citocinas y se cultivó durante 5-7 días más a 37 °C en una incubadora con CO₂ (20).

3. Transfección de las CDMO y de los MDMO

El plásmido de ADN KMP-11 sin endotoxina aislado usando el Kit EndoFree® Plasmid Mega (Qiagen, GmbH, Hilden, Alemania) de acuerdo con las instrucciones del fabricante se usó para la transfección de CD y macrófagos derivados de médula ósea con el Reactivo Effectene (Qiagen, GmbH, Hilden, Alemania) de acuerdo con los protocolos del fabricante. La eficacia de la transfección de MDMO y CDMO se calculó contando células fluorescentes rojas con un microscopio fluorescente invertido cuando se transfectaron con un plásmido portador de proteína roja fluorescente pD-sRED (Clontech). Las CDMO mostraron una eficacia de transfección < 6% mientras que los MDMO mostraron una eficacia de transfección de ~18% (21).

4. Parámetros de Electrofusión y Generación de Células híbridas

Las CDMO alogénicas se fusionaron con pCMV-LIC/KMP-11 transfectado con MDMO singénico/CDMO por electrofusión, como se ha descrito anteriormente (22, 23, 24, 25). Brevemente, CDMO y pCMV-LIC/KMP-11 transfectado con MDMO/CDMO se lavaron cuidadosamente con solución de sacarosa isotónica estéril 0,3 M. Inmediatamente antes de la fusión 2 X 10⁷/ml de las CDMO viables y 2 X 10⁷/ml de pCMV-LIC/KMP-11 transfectado en primer lugar con Mφ/CD se mezclaron a una proporción de 1:1 para producir una densidad de 2 X 10⁷/ml en una cubeta galvanizada cubierta con cera inerte (Bio-Rad). La cera inerte se aplicó a un electrodo de la cubeta pipeteando 100-200 µl de cera líquida en una cubeta que se mantuvo horizontalmente para generar un campo eléctrico no homogéneo. Ahora las células mezcladas suspendidas en solución de sacarosa isotónica se alinearon primero dielectroforéticamente para poner a las células en íntimo contacto aplicando un campo eléctrico espacialmente no uniforme de bajo voltaje (20 por 20 s) en una cámara de electrofusión (diseñada a medida) seguido de un solo pulso cuadrático aplicado simultáneamente de 625 V/cm en un escenario de pulsador génico (Bio-Rad) (26). Después de la electrofusión, la cubeta se dejó reposar durante 5 min antes de que las células se dejaran suspendidas en tampón de relajación durante 15 min (KCl 100mM, NaCl 3mM, EDTA 1,25 mM, HEPES 10 mM, ATP 0,5 mM). La viabilidad celular determinada por exclusión con colorante fue normalmente >90%.

5. Normalización y optimización de Parámetros de Electrofusión para la generación de células híbridas

Como resultado del movimiento Browniano y de las fuerzas electrostáticas repelentes que surgen de la carga negativa neta de la superficie de la membrana externa, células en suspensión no se pondrán en contacto íntimo. Por lo tanto, el contacto íntimo de membrana es uno de los requisitos previos para la fusión que se consigue por

alineamiento dielectroforético e interacción mutua de células aplicando un voltaje de alineamiento bajo. Después del alineamiento de las células suspendidas en un campo eléctrico no uniforme la fusión de las membranas en el sitio de contacto se consiguió aplicando un voltaje de pulso de una longitud de pulso específica y la fusión de varias células en suspensión se consiguió aumentando la densidad celular. Las condiciones óptimas para la fusión inducida por el campo eléctrico se consiguieron cuando las membranas de dos células adyacentes se aplanaron o se pusieron en contacto entre sí, formando así una zona de contacto relativamente grande aplicando un voltaje de alineamiento de 20 V (50 V/cm) y aplicando simultáneamente un voltaje de pulso cuadrático de 250 V (625 V/cm) en una cubeta cubierta con cera (logitud de trayecto de 0,4 cm) que contenía dos tipos de células diferentes (2×10^7 /ml cada una) concretamente CDMO alogénica y CDMO singénica transfectada con KMP-11 (**Figura 1A y 1B**) o CDMO alogénica ($H-2^b$) y pCMV-LIC/KMP-11 transfectado con MDMO singénico ($H-2^d$) (**Figura 1C y 1D**).

6. Generación de híbridos

Para la electrofusión, 2×10^7 de CDMO alogénica viable ($H-2^d$) y 2×10^7 /ml de KMP-11 viable transfectada con MDMO singénico ($H-2^d$) suspendidos en una solución de sacarosa isotónica (0,3 M) mezclados a una proporción de 1,1 para producir una densidad de 2×10^7 /ml en una cubeta galvanizada cubierta con cera inerte de 0,4 cm de longitud de trayecto (Bio-Rad) se alinearon primero dielectroforéticamente poniendo las células en contacto íntimo aplicando un campo eléctrico espacialmente no uniforme de bajo voltaje (50 V/cm durante 20 s) en una cámara de electrofusión (realizada a medida) seguido de un solo pulso cuadrático simultáneamente aplicado de 625 V/cm en un escenario de pulsador génico (Bio-Rad). Después de la electrofusión, la cubeta se dejó en reposo durante 5 min antes de que las células se dejaran suspendidas en un tampón de relajación durante 15 min. La viabilidad celular se comprobó por el método de exclusión con colorante. Para cuantificar el porcentaje de generación de células híbridas viables, el pCMV-LIC/KMP-11 transfectado con MDMO singénico ($H-2^d$) se tiñó con un colorante de membrana PKH26 y las CDMO de C57BL/6($H-2^b$) se tiñeron con tinción intracelular CFSE. 2×10^7 /ml de las CDMO viables se fusionaron con 2×10^7 /ml de macrófagos transfectados con KMP-11 formando híbridos [MDMO-KMP-11 + CDMO alogénicos singénico] o una mezcla de células CDMO alogénicas ($H-2^b$) y MDMO singénicos ($H-2^d$)- KMP-11 se analizaron por citometría de flujo y se calculó el % de generación de células híbridas viables a partir de células doble positivas en el tercer cuadrante de un gráfico de puntos [**figura 1E y 1F**].

La carga de parásitos en el bazo e hígado de ratones BALB/c infectados 105 días con *L. donovani* (AG83) que recibieron 6 inyecciones i.v. de terapia con CDMO singénica transfectada con ADN de KMP-11 ($H-2^d$) o terapia con células híbridas [MDMO singénico-KMP-11 + CDMO alogénica ($H-2^b$)] se comparó con los grupos de CDMO singénicas no transfectados respectivos ($H-2^d$) o híbridos de MDMO singénicos no transfectados ($H-2^d$)/CDMO alogénicas ($H-2^b$) y de control infectados. Para la vacunación, al principio, ratones BALB/c idénticos de 4-6 semanas de vida se expusieron a promastigotes vivos AG83 (1×10^6) a través de la vía cardíaca y 60 días después de la infección los ratones se trataron con 6 inyecciones i.v. de células híbridas 5×10^5 o CDMO sinérgico 5 días después. Los ratones vacunados se sacrificaron 15 días después de la última inyección. La carga de parásitos en los órganos se evaluó por el método de ensayo de dilución limitante en todos los casos. Los resultados se representan en la **figura 2**. La cantidad recíproca de la dilución más alta que fue positiva para el crecimiento de parásitos se consideró que era la concentración del parásito/mg de tejido. La carga total del parásito en el órgano se calculó a partir del peso del bazo o hígado. Los datos representan la media $\pm$ ET de 12 animales por grupo.

La carga parasitaria en los bazos de ratones BALB/c infectados con AG83 105 días tratados terapéuticamente con diferentes tipos de células híbridas o CDMO singénicas se comparó con la de los grupos de ratones de control infectados. *, $p < 0,0005$ (CDMO singénicas-KMP-11 frente al grupo expuesto a AG83); **, $p < 0,05$ [(MDMO singénico + CDMO alogénica) frente al grupo expuesto a AG83] Los asteriscos representan el nivel de varianza significativo en comparación con los grupos mencionados [**véase la figura 2A**].

Se comparó la carga de parásitos en el hígado de ratones BALB/c infectados con AG83 de 105 días tratados terapéuticamente con diferentes tipos de células híbridas o CDMO singénicas con grupos de ratones de control infectados. En cuanto a la carga de parásitos en el hígado se observó protección estéril para todos los ratones vacunados con células híbridas (MDMO-KMP-11 singénicos + CDMO alogénicas). o, $p < 0,0005$ (CDMO singénicas - KMP-11 frente a Inf con AG83); oo, $p < 0,05$ [(MDMO + CDMO singénicos) frente al grupo expuesto a AG83 [**véase la figura 2B**].

La Figura 3 representa la respuesta de LCT Anti-KMP-11 en ratones post-infectados con *L. donovani* 105 días vacunados con CDMO singénicas transfectadas con ADN de KMP-11 o células híbridas en comparación con grupos de control respectivos. Las células diana fueron la línea celular de macrófagos RAW 264.7 y marcadas con ^{51}Cr después de transfectar con el ADN del plásmido pCMV-LIC/KMP-11 o pCMV-LIC y se usaron como diana. Esplenocitos (Efectores) de diferentes grupos de ratones vacunados y de control se pulsaron con SLA durante 7 días. La liberación espontánea fue menor del 15%. Los resultados son representativos de 5 experimentos individuales. El experimento se realizó con 5 animales/ grupo y los datos representan la media $\pm$ ET. A una proporción de 50:1 y 6:1 de E(efectoras)/D(diana) los ratones vacunados con células híbridas mostraron *, $p < 0,0005$; ** $p < 0,0001$ respectivamente en comparación con grupos de control infectados respectivos, mientras que los ratones vacunados con CDMO singénicas transfectadas con ADN de KMP-11 a una proporción de 50:1 y 6:1 de E/D mostraron, $p < 0,00001$; oo, $p < 0,5$ respectivamente en comparación con el control infectado.

La proliferación de linfocitos T, ensayo de IL-2 e IL-4 en respuesta a estimulación con SLA entre diferentes grupos de ratones experimentales se representa en la **figura 4**. Se usó un sobrenadante de 24 h procedente de un ensayo de proliferación de linfocitos T estimulado con SLA para el ensayo funcional IL-2 y ensayo de citocina IL-4. Los resultados son representativos de 3 experimentos individuales (n=5/grupo) y los datos representan la media de pocillos por triplicado $\pm$ DT.

La **Figura 4 A** representa la respuesta proliferativa contra SLA (5 μ g/ml) por esplenocitos de diferentes tipos de células híbridas o ratones BALB/c infectados con AG83 tratados con CDMO singénicos modificados por ingeniería genética en comparación con controles respectivos. La proliferación se midió por incorporación de 3 H-timidina. A 5 μ g/ml la estimulación SLA *, p<0,0005 para el grupo tratado híbrido (MDMO singénico / CDMO alogénico) y CDMO singénico-KMP-11 con respecto al grupo expuesto a *L. donovani* (AG83).

La **Figura 4 B** representa la producción de IL-2 por células esplénicas a partir de ratones tratados terapéuticamente vacunados con diferentes tipos de células híbridas o comparados con CDMO sinérgicos con grupos de control en términos de crecimiento de una línea celular murina dependiente de IL-2 HT2 proporcional a la incorporación de 3 H-timidina. A una estimulación de SLA de 5 μ g/ml **, p<0,005 para células híbridas (MDMO singénicas - KMP-11/CDMO alogénicas) grupo tratado con respecto a el grupo expuesto con *L. donovani* (AG83) y ***, p<0,0005 para CDMO singénico-KMP-11 con respecto a grupo expuesto a AG83 de *L. donovani*.

La **Figura 4 C** representa la cuantificación de IL-4 en el sobrenadante de esplenocitos estimados con SLA durante 24 h (SLA 5 μ g/ml) de diferentes grupos de ratones BALB/c tratados y no tratados por ELISA.

Titulaciones de Ab anti-KMP-11 IgG completo, IgG1 e IgG2 en el suero de células híbridas o ratones BALB/c infectados con AG83 durante 105 días tratados con CDMO singénico transfectado con ADN de KMP-11 (n=5/grupo) se representan en la **figura 5A, 5B y 5C**. Los resultados son representativos de otros experimentos y los datos representan la media $\pm$ DT. En el caso de IgG completa *, p<0,0005 de células híbridas tratadas (MDMO singénico - KMP-11 / CDMO alogénico) frente al grupo expuesto con *L. donovani* a una dilución de suero 1/100 y **, p<0,05 (CDMO singénico transfectado con ADN de KMP-11 frente al grupo expuesto a *L. donovani* a una dilución de suero de 1/100); para IgG1| p<0,5 células híbridas tratadas (MDMO singénico - KMP-11 / CDMO alogénico) frente al grupo expuesto a *L. donovani* a una dilución en suero de 1/100 y ||, p<0,5 (CDMO singénico transfectado con ADN KMP-11 frente al grupo expuesto con *L. donovani* a una dilución en suero de 1/100) que no fue estadísticamente significativa. En el caso de IgG2a °, p<0,005 [(MDMO singénico - KMP-11 + CDMO alogénico) frente al grupo expuesto con *L. donovani* a una dilución en suero de 1/100] °°, p<0,0005 (CDMO singénico transfectado con ADN de KMP-11 frente al grupo expuesto a *L. donovani* a una dilución en suero de 1/100).

La Figura 5D representa la proporción de titulaciones anti-KMP-11 de IgG2a/IgG1 en el suero de diferentes ratones BALB/c infectados y vacunados terapéuticamente.

Los siguientes ejemplos se proporcionan a modo de ilustración de la presente invención y no deben por lo tanto considerarse como que limitan el alcance de la presente invención.

Ejemplo 1

Análisis FACS y microscopía fluorescente para determinar la eficacia de la fusión:

Para evaluar la eficacia de la fusión las células compañeras se tiñeron por separado con diferentes colorantes fluorescentes. En el caso de la presente invención antes de la electrofusión de CDMO alogénico se marcaron con colorante intracelular CFSE (Molecular Probes) y células MDMO singénicas transfectadas con pCMV-LIC/KMP-11 se tiñeron con un colorante de membrana PKH26 (Sigma, St. Louis, MO) de acuerdo con las instrucciones del fabricante y se sometieron al procedimiento de electrofusión anterior. Las eficacias de fusión fueron >30% como resulta evidente a partir de células doble teñidas por citometría de flujo y microscopía fluorescente cuando se solapan (27).

Ejemplo 2

Protocolo de Vacunación Terapéutico:

Para la vacunación, se dividieron ratones BALB/c infectados con AG83 [*L. donovani*(AG83)] de dos meses en diversos grupos recibiendo al menos 6 inyecciones i.v. de 5×10^5 células/animal/PBS 100 μ l con 5 días de diferencia: un grupo se vacunó con los CDMO singénicos transfectados con KMP-11 que contenía el vector de expresión de mamíferos pCMV-LIC [CDMO singénico - KMP-11] o CDMO singénico no transfectado [CDMO singénico]. Los otros dos grupos de ratones infectados con AG83 uno se vacunó con híbridos de MDMO singénico transfectado con pCMV-LIC-KMP-11 y CDMO alogénico derivado de médula ósea (C57BU6) [MDMO singénico - KMP-11 + CDMO alogénico] y otros grupos se trataron con híbridos de MDMO singénico no transfectado y CDMO

aloténico [MDMO singénico + CDMO aloténico]. También se tuvo en cuenta la vacunación terapéutica con CDMO singénico transfectado con una construcción de vector control que no alojaba el gen KMP-11g (pCMV-LIC) a híbridos de CDMO singénicos transfectados con pCMV-LIC y CDMO aloténicos (datos no mostrados). Los ratones en todos los grupos se sacrificaron 15 días después de recibir la última vacuna (105 días post infección) para la determinación de la carga parasitaria y posteriores experimentos.

Vacunación terapéutica con células híbridas CDMO aloténicas/MDMO transfectadas con KMP-11 eliminan la carga parasitaria esplénica y hepática

La cepa AG83 de *L. donovani* virulenta (MHOM/IN/1983/AG83) (Originalmente aislada a partir de un paciente Kala-azar, esta cepa de parásito de *Leishmania donovani* se mantiene rutinariamente en este instituto. MHOM es una nomenclatura convencional de la Organización Mundial de la Salud: IN significa el país de origen "India"; 1983 significa el Año del Descubrimiento; AG83 significa el nombre específico de la cepa. La cepa está disponible con los inventores a IICB, Kolkata, India o se solicita por cualquier persona interesada/organización para propósitos académicos y de investigación) usada en este estudio (31) posee diferentes cinéticas de infección a las *L. donovani* sudanesa (LV9, LV82) y de Etiopía usada en otros estudios (32, 33, 34). Después de la exposición de AG83, un exponencial aumentado en la carga parasitaria esplénica y hepática se observa, al menos, en un modelo de ratones BALB/c en 5 mo de post-infección. Por lo tanto se tomó un ratón infectado en un estadio temprano (modelo infectado de 60 días), para estudiar la eficacia de la terapia en el estado avanzado de la enfermedad. El diseño del experimento se basó en esta base conceptual de combinar la asociación de KMP-11 inmunodominante con la clase I singénica en combinación con la clase II aloténica portadora de CD en una entidad de células híbridas sencillas esperada realizar una colaboración vigorosa T-T e inducción de una especificidad fuerte de antígenos de CTL dirigida contra KMP-11 de *Leishmania*. Para estudiar la eficacia terapéutica de la vacuna de células híbridas sobre las vacunas CDMO modificadas por ingeniería genética en un modelo de ratón BALB/c infectado con *L. donovani* durante 60 días, CDMO singénico transfectado con ADN de KMP-11 o MDMO transfectado con ADN de KMP-11 (H-2^d) electrofusionado con CDMO aloténico (H-2^b) se inyectó 6 veces por vía intravenosa cada 5 días. 15 días después de la última inyección, los ratones se sacrificaron para experimentos posteriores. De manera destacable en todos los ratones BALB/c infectados que recibieron la vacuna de células híbrida [MDMO (H-2^d)-KMP-11 + CDMO (H-2^b)] (5×10^5 células/inyección) hubo una complete ausencia de amastigotes en las impresiones de frotis de secciones transversales de bazo e hígados cuando se observaba a microscopía óptica (datos no mostrados). De manera coherente cultivos celulares de bazo de > 66% de ratones tratados con híbridos de MDMO singénico transfectado con AND de KMP-11 (H-2^d)/CDMO aloténico (H-2^b) mostraron una ausencia complete de promastigotes en el cultivo diluido en serie (solo 8 de 24 ratones mostraron > 98% de reducción de carga parasitaria esplénica por el ensayo de dilución en serie) (Figura 2A). El ensayo de dilución en serie confirma una complete eliminación de la carga parasitaria hepática de >90% de los ratones vacunados con células híbridas (3 de 24 ratones mostraron una reducción de ~99% en la carga parasitaria hepática según se determina por el ensayo de dilución en serie convencional) (Figura 2B). Por otro lado ratones tratados con CDMO singénico transfectados con KMP-11 pCMV/LIC solamente podrían conferir aproximadamente una eliminación del 64% de la carga parasitaria esplénica ($p < 0,0005$) y aproximadamente 67% de reducción de la carga parasitaria hepática ($p < 0,0005$). Los dos grupos de control de CDMO singénico no transfectado ($p < 0,5$) e híbridos de MDMO singénico no transfectado/CDMO aloténico ($p > 0,05$) podría no inducir ninguna protección significativa en la carga parasitaria en órganos.

Ejemplo 3

Determinación de la carga parasitaria esplénica y hepática por el método de dilución en serie:

La carga parasitaria se cuantificó en el tejido de bazo e hígado por el ensayo de dilución en serie como se describe anteriormente (28). Se pesó un trozo de bazo o hígado de ratones BALB/c experimentales previamente homogeneizados entre dos portaobjetos de vidrio esmerilados estériles en medio M199 completo y se diluyó con el mismo medio a una concentración final de 1 mg/ml 10 veces de diluciones en serie de las suspensiones tisulares homogeneizadas en las que después se sembraron en placa en una placa de 96 pocillos y se incubaron a 22 °C durante 2-3 semanas. Los pocillos se examinaron para detectar los promastigotes viables y motiles a intervalos de 3 días y recíproco de la dilución más alta que fue positivo para parásitos se consideró que era la concentración parásita por tejido mg. La carga parasitaria de órgano total se calculó usando los pesos de los órganos respectivos.

Ejemplo 4

Parámetros de Electrofusión y Generación de Células Híbridas

Células dendríticas de médula ósea se fusionaron con P388D1 transfectadas con pCMV-LIC/KMP-11 por fusión eléctrica como se ha descrito anteriormente. Brevemente, células CDMO y P388D1 transfectadas con pCMV-LIC/KMP-11 se lavaron cuidadosamente con solución de sacarosa isotónica 0,3 M/NaCl estéril (la formulación molecular de la sacarosa isotónica/solución de NaCl se realizó a partir del manual de Bergey de soluciones químicas. Inmediatamente antes de la fusión 2×10^7 /ml de CDMO viables y 2×10^7 /ml de células P388D1 transfectadas con pCMV-LIC/KMP-11 viables se mezclaron a una proporción de 1:1 para producir una densidad de 2

X 10^7 /ml en una cubeta galvanizada cubierta con cera inerte (Bio-Rad). La cera inerte se aplicó a un electrodo en la cubeta pipeteando cera líquida 100-200 μ l en una cubeta mantenida horizontalmente para generar un campo eléctrico no homogéneo. Ahora las células mezcladas suspendidas en la solución de sacarosa/NaCl isotónica se alinearon di-electroforéticamente poniendo primero las células en contacto directo aplicando un campo eléctrico espacialmente no uniforme y de bajo voltaje (20V durante 20S) en una cámara de electrofusión seguido por un solo pulso cuadrático aplicado simultáneamente de 625V/cm en un escenario de pulsador génico (Bio-Rad). Después de la electrofusión, la cubeta se dejó reposar durante 5 min antes de que las células se mantuviesen suspendidas en un tampón de relajación durante 15 minutos. La viabilidad celular determinada por exclusión con colorante fue normalmente >90%. Después, las células fusionadas se lavaron con PBS y se irradiaron con 100 Gy y se usaron para la vacunación directamente.

El pulso de onda cuadrático a 625 V/cm a un alineamiento de voltaje de 20 V (50 V/cm) da como resultado un % mayor de 30 de células híbridas MDMO transfectados con KMP-11 (H-2^d)/CDMO (H-2^b) fusionadas

La electrofusión, una técnica más adecuadamente usada para fusionar dos tipos de células, excluye productos químicos y virus fusogénicos no deseables, demostrando superioridad sobre otros medios de generación de células híbridas en cuanto a su eficacia. La normalización inicial de la electrofusión se obtuvo mediante una serie de condiciones de optimización sometiendo células en asociación (MDMO singénicos con CDMO alogénicas y CDMO singénicas con CDMO alogénicas) a un intervalo de voltaje de alineamiento (10-40V) y voltaje de pulso (100-400V) y se observó la correspondiente generación de células híbridas (Figura 1 A, B, C y D). La transferencia de energía por pulsos de onda cuadráticos de la misma anchura y altura es mucho más eficaz que los pulsos de ondas exponenciales.

Dado que la viabilidad celular y la fusión de membrana eficaz son los dos aspectos importantes de la formación de células híbrida, la disminución de la altura de pulso de acuerdo con el aumento de la anchura de pulso sugiere a los autores de la presente invención escoger un pulso de onda cuadrática para la fusión completa de membranas a su sitio de contacto, en el que las células se alinearon en un campo di-electroforético de cubeta cubierta con cera (longitud de trayectoria de 0,4 cm) (44). Para ambos conjuntos de células en asociación participantes en los procesos de fusión (MDMO singénico/KMP/CDMO alogénica y CDMO singénica/KMP/CDMO alogénica), los resultados demostraron que aunque a un mayor voltaje de alineamiento superior (>25 V), el porcentaje de formación de híbridos aumentó, la viabilidad de las células resultantes disminuyó considerablemente manteniendo constante el voltaje de pulso. De manera similar a un voltaje de alineamiento constante, la viabilidad rápidamente disminuyó a un voltaje de pulso superior a pesar de una mayor eficacia de fusión (Figura 1 A, B, C y D). En caso de fusión de CDMO singénica con CDMO alogénica, la formación de híbrido DC-DC nunca superó 15,5% (datos FACS no mostrados) con una viabilidad correspondiente del 40% (Figura 1A y B). La viabilidad total de híbridos DC-DC nunca superó 43% en ninguna combinación de voltaje de alineación y voltaje de pulso. En caso de electrofusión de MDMO singénico con CDMO alogénico a un voltaje de alineamiento de alimentación constante de 20 V, se generó un campo alto de células híbridas fusionadas mediante un pulso cuadrático superior de 225 V alcanzando el máximo de rendimiento a 300 V junto con una disminución continua en la viabilidad de células híbridas. Por tanto se obtuvieron células fusionadas viables > 85% (híbrido MDMO transfectado con KMP-11/CDMO alogénico) a un voltaje de alineamiento de 20 V (50 V/cm) y a un pulso de onda cuadrático de 250 V (1000 V/cm).

La fusión de DC alogénica con MDMO transfectado con KMP-11 cuando se comparó con MDMO no transfectado no mostró variabilidad significativa en cuanto a la formación de híbridos o viabilidad a estos parámetros optimizados. Por tanto para los propósitos de la vacunación terapéutica los híbridos de BMBM-CDMO se usaron para su mayor porcentaje de fusión (>30%) y correspondiente elevada viabilidad (>85%). Los análisis de células híbridas usadas para los propósitos de vacunación se realizaron por análisis FACS y posteriormente se verificaron por microscopía fluorescente. Las células de MDMO transfectadas, por un lado, se tiñeron con colorante fluorescente rojo PKH26 y por otro lado, las CDMO alogénicas se tiñeron con el colorante fluorescente verde intracelular CFSE. Después de la electrofusión, se realizó citometría de flujo para controlar los eventos de fluorescencia doble. La población mixta de células sin electrofusión se tomó como un control que recuperó escasos eventos de fluorescencia doble (Figura 1 E y F). Dado que los datos FACS en algunos casos podría conducir erróneamente debido a la presencia de agregados celulares también se observó las células electrofusionadas con microscopía fluorescente para determinar los eventos de fusión de las membranas verdaderas. Por tanto las células híbridas se visualizaron por separado con el filtro rojo y verde por separado y se realizó un solapamiento de dos colores para observar la tinción de las células híbridas para el rojo (PKH26) y el verde (CFSE) (Figura 1 G, H e I):

Ejemplo 5

Ensayo de Proliferación de células T:

El ensayo de proliferación de células T se realizó como se ha descrito (29). Se preparo una sola suspensión celular de esplenocitos de diferentes grupos de ratones BABL/c experimentales 95 días post infección con AG83 después de centrifugación en gradiente de densidad Ficoll y después se suspendieron en RPMI 1640 completo. Las células se sembraron en placa por triplicado a concentraciones de 10^5 células/pocillo en placas de 96 pocillos y se dejaron

proliferar durante 3 días a 37 °C en una incubadora con CO₂ al 5% en presencia de diferentes concentraciones de SLA (0,5, 5, 50 µg/ml) y también sin SLA. 18 horas antes de recogerse, las células se pulsaron con [³H] timidina 1 µCi (6,7 Ci/mmol) / pocillo. La captación de ³H-timidina, como un índice de proliferación, se midió por Recuento de Centelleo Líquido (TRI CARB 2100TR, Packard).

La SLA induce significativamente una mayor proliferación de células T con mayor producción de IL-2 e IL-4 en ratones tratados terapéuticamente con células híbridas.

La respuesta inmune mediada por células está deteriorada en pacientes con LV así como en modelos experimentales característicos por anergia de células T específicas contra *Leishmania* Ag (30). Dado que la vacunación con células híbridas podría invertir la respuesta inmune mediada por células deteriorada induciendo generación fuerte de LCL, los autores de la presente invención se interesaron en observar el efecto de la terapia con células híbridas en respuestas proliferativas de células T específicas de antígenos. Para evaluar la respuesta de linfocitos T contra SLA en grupos de ratones no tratados y tratados, se estimularon esplenocitos con diversas concentraciones de SLA. Los ratones tratados con CDMO singénicas transfectadas con ADN de KMP-11 mostraron una respuesta de potenciación de proliferación de linfocitos de 4,3 veces ($p < 0,0005$), los ratones tratados con células híbridas mostraron una potenciación proliferativa de 8,84 veces ($p < 0,0005$) a una concentración de SLA de 5 µg/ml con respecto al grupo infectado (Figura 4 A). Por tanto los ratones vacunados con células híbridas mostraron un índice de proliferación de aproximadamente 2 veces más ($p < 0,05$) con respecto a los ratones tratados con CDMO singénicas transfectadas con ADN de KMP-11. Dado que se sabe que la IL-2 posee actividad leishmanicida en el modelo de ratones BALB/c experimental para LV (36), la producción de IL-2 se evaluó en el sobrenadante de esplenocitos estimulados con SLA durante 24 h de ratones vacunados como un índice de captación de ³H timidina por células HT2 portadoras de receptores de alta afinidad para IL-2/IL-4 (37, 38). Los ratones tratados con células híbridas mostraron una generación de IL-2 de aproximadamente 5,11 veces más ($p < 0,005$) mientras que los ratones tratados con MDMO transfectados con ADN de KMP-11 singénicos mostraron una generación de IL-2 de aproximadamente 6,19 veces más ($p < 0,0005$) en comparación con el grupo de ratones de control infectados a una concentración de SLA de 5 µg/ml (Figura 4 B). Sorprendentemente, a pesar de la protección parcial conferida por el grupo tratado con CDMO transfectado con ADN de KMP-11, la generación de IL-2 fue 1,21 veces más ($p < 0,5$ a 5 µg/ml SLA), 1,61 veces más ($p < 0,5$ a SLA 0,5 µg/ml) y 1,81 veces más ($p < 0,5$ a SLA 50 µg/ml) en comparación con el grupo tratado con células híbridas. Se demostró que IL-2R γ como un componente funcional del receptor IL-4 basándose en los datos de entrecruzamiento químico, la capacidad de IL-2R gamma para aumentar la afinidad de unión a IL-4 (39). Debido a la cantidad comparable de generación de IL-2 a pesar de la protección que confiere parcial y completa en la CD transfectada y los grupos tratados con células híbridas respectivamente a pesar de 2 veces más la proliferación celular en la última, se examinó la función de IL-4 en el ensayo de proliferación de linfocitos específico de antígenos debido a su papel establecido como un factor de crecimiento de linfocitos T (40) y esta función en la proliferación de receptor IL-4 portador de células HT2. IL-4 se midió por ELISA al mismo punto en el tiempo de la medición de IL-2 (sobrenadante de los esplenocitos reestimulados con SLA durante 24 h) los autores de la presente invención observaron una potenciación notable de IL-4 en el sobrenadante de los esplenocitos de ratones tratados con células híbridas (115 pg/ml $\pm 20,5$) en comparación con el grupo tratado con CDMO singénicas transfectadas con ADN de KMP-11 (24,8 pg/ml $\pm 6,43$) (Figura 4 C). La IL-4 podría no detectarse en los esplenocitos de grupos de ratones infectados u otros de control. Esto indica generación hacia IL-2 e IL-4 como resultado de la respuesta inmune curativa en ratones tratados terapéuticamente.

Ejemplo 6

Ensayo IL-2

Esplenocitos de ratones BALB/c (5×10^5 células/pocillo) de diferentes grupos de animales experimentales se post infectados con AG83 durante 105 días se estimularon durante 24 h con SLA (0,5, 5, 50 µg/ml) o sin SLA en medio RPMI 1640 completo en una incubadora con CO₂ al 5% a 37 °C. Los sobrenadantes de cultivo se analizaron para detectar la presencia de IL-2 por proliferación de la línea celular murina dependiente de IL-2 (HT-2) y el grado de proliferación se midió por captación de ³H-timidina. 10^4 células/pocillo de HT-2 se incubaron con 100 µl de sobrenadante de cultivo durante 48 horas. Las células después se impulsaron con 1 µCi de ³H-timidina (6,7 Ci/mmol) durante 18 h (29). La incorporación de timidina radiactiva se evaluó por Recuento de Centelleo Líquido (TRI CARB 2100TR, Packard).

Ejemplo 7

Ensayo de Linfocitos T Citotóxicos

Esplenocitos no adherentes de diferentes grupos de ratones BALB infectados con mo AG82 recibieron tratamiento terapéutico cuando se estimularon con SLA durante 7 días seguido por incubación con dianas marcadas con ⁵¹Cr (transfectadas con RAW 264,7 con pCMV-LIC, pC-MV-LIC KMP-11 o pEGFP-N1) en placas de 96 pocillos de fondo redondo (200 µl) a diferentes proporciones de efectora: diana (E/D) (6:1, 12,5:1, 25:1, 50:1) durante 4 h. Las células diana (106) se marcaron con Na₂CrO₄ 100 µCi (2,5 mCi/38,4 µg/ml, BARC, Mumbai, India) durante 1 h a 37 °C en

una incubadora con CO₂ al 5% y se lavaron varias veces hasta que no se detectara ningún recuento de radiación γ en el sobrenadante. Después de 4 h de incubación, 100 μ l de sobrenadante de cultivo se recogió y se contó en triplicados en Recuentos de Centelleo Líquido (TRI CARB 2100TR, Packard). La lisis específica se calculó de acuerdo con la fórmula: % de Lisis Específica = (Muestra - Liberación Espontánea) / (Liberación Máxima - Liberación Espontánea) X 100.

Vacunación Terapéutica con Células Híbridas induce una alta respuesta de linfocitos T citotóxicos anti-KMP-11 en ratones BALB/c infectados con *L. donovani* durante 2 meses

La inducción de la respuesta CTL específica de antígeno parasitario es uno de los objetivos importantes de la estrategia de vacunación con células híbridas y puede posiblemente inducir respuesta Th y CTL por moléculas MHC alogénicas (H-2^b) presentadas en uno de los compañeros de las células híbridas. Por tanto se procedió a medir la generación CTL específica de KMP-11 en grupos curados terapéuticamente de ratones tratados con células híbridas. La anulación de la eficacia protectora de la vacunación con LACK-ADN en modelos CL murinos como una consecuencia de agotamiento de linfocitos T DC8⁺ sugiere el papel dominante inducido por vacunación de la respuesta inmunoprotectora mediada por linfocitos T CD8⁺ aunque el papel de CTL restringe CD8⁺ no se ha implicado exclusivamente (35). En este caso los esplenocitos estimulados con SLA durante 7 días de ratones tratados terapéuticamente con células híbridas [MDMO (H2^d)-KMP-11 + CDMO (H-2^b)] (105 días después de la infección) mostraron una lisis del 58% de macrófagos singénicos transfectados con KMP-11 marcados con ⁵¹Cr a una proporción de 50:1 de E/D (p<0,0005) y una lisis del 18% de dianas marcadas con ⁵¹Cr a una proporción de 6:1 de E/D (p<0,05). Mientras que los ratones tratados con CDMO transfectados con ADN de KMP-11 mostraron una lisis máxima de 29% a una proporción del 50:1 de E/D (p<0,005) (Figura 3). El grupo de ratones infectados y de control mostró una lisis menor del 11% de las dianas marcadas a una proporción de 50:1 E/D y no mostró diferencias significativas y no difirió significativamente entre los grupos de control tratados con CDMO alogénicos y MDMO singénicos no transfectados e híbridos (p<0,5 a una proporción 50:1 E/D) lo que sugiere una respuesta CTL defectuosa debido a la infección de *L. donovani* en modelo BALB/c. La especificidad de la lisis se corroboró posteriormente por el fracaso de células de linfocitos T esplénicos no adherentes a la lisis de macrófagos transfectados singénicos con la Proteína Fluorescente Verde Potenciada (EGFP) que expresa la construcción pEGFP-N1 (datos no mostrados). La función de MCH alogénica en la respuesta CTL vigorosa también se apoya por la observación de que los ratones tratados con células híbridas muestran niveles estadísticamente significativos de generación CTL a una proporción 50:1 (p<0,005) 25:1 (p < 0,0005), 12,5:1 (p<0,005) y 6:1 (p<0,05) que los ratones tratados terapéuticamente con CDMO singénico transfectado con ADN de KMP-11.

Ejemplo 8

Medición de titulaciones de Ig en suero específica de KMP-11 en ratones terapéuticamente vacunados

La proteína KMP-11 en condiciones nativas se purificó del plásmido pQE-30 [al igual que otros vectores plasmidiales (vectores de clonación) pQE-30 se encuentra disponible en el mercado] que contiene una ORF de KMP-11 de *L. infantum* alineada en fase con His-tag como se describe anteriormente (30). Las muestras de suero de diferentes grupos de ratones BALB/c (n=5/grupo) se obtuvieron 105 días de la exposición al parásito y se analizaron para detectar la titulación Ab específica de KMP-11. Placas ELISA de 96 pocillos (Nunc, Wiesbaden, Alemania) se revistieron con KMP-11 (2 μ g/ml) en PBS durante una noche a 4 °C. Las placas se bloquearon con FCS al 5% en PBS a temperatura ambiente durante 1 h para impedir la unión no específica. El suero de diferentes grupos de hamsters se añadió a diferentes diluciones (1:10, 1:100 y 1:1000) y se incubó durante 2 h a temperatura ambiente. El mAb de IgG anti-ratón de rata conjugado con AKP, el mAb de IgG anti-ratón de rata se añadió durante 1 h a temperatura ambiente seguido por otros 30 min de incubación con reactivo de sustrato pNPP (3 mM) como sustrato fosfatasa alcalina en tampón (Tris 50 mM pH 8,5, MgCl₂ 1 mM) seguido por la detención de la reacción con NaOH 3 M y la absorbancia se leyó sobre un lector de placa ELISA (Multiskan MS, Labsystem) a 405 nm.

La terapia de vacunación de células híbrida induce una respuesta inmune humoral de tipo Th2 asociada con la producción de IgG completa específica de antígeno reducida pero aumenta la IgG1 e IgG2a específica de antígeno. Aunque la estrategia de vacunación exitosa destaca la diana antigénica exitosa con respecto a la ruta de procesamiento de clase I MHC y provoca la producción de citocinas específicas que favorecen el cebado y diferenciación de linfocitos CD8⁺, recientes estudios demuestran la importancia de anticuerpos naturales en procesos ineficaces (42). Además, la clase de anticuerpo que se activa es un marcador accesorio fiable de la diferenciación Th1 y Th2 de linfocitos T CD4⁺ sin tratar. Por lo tanto, se analizó el perfil de IgG completo junto con sus isotipos (IgG1 e IgG2a) en respuesta a la proteína KMP-11. Se observó disminución significativa en la titulación de IgG completa específica anti-KMP-11 en células híbridas (MDMO singénicas / KMP-11 / CDMO alogénicas) ratones tratados (p<0,0005) y ratones tratados con CDMO singénicos transfectados con ADN de KMP-11 (p<0,05) en comparación con ratones BALB/c infectados con *L. donovani* (Figura 5 A). Sin embargo con respecto a los ratones vacunados con células híbridas del grupo tratado con CDMO singénico transfectado con ADN de KMP-11 (p<0,5) no mostró disminución significativa en IgG anti-KMP-11 completa en la titulación del suero. Por tanto, el hallazgo de los presentes inventores da crédito a información previa de que tanto en el modelo experimental CL como LV humano en el que la titulación IgG anti-leishmanial elevada está significativamente disminuida con la

resolución de la enfermedad (43).

5 Sorprendentemente, tanto la titulación anti-KMP-11 IgG1 como IgG2a a una dilución de suero 1/100 se potenció significativamente en ratones tratados con CDMO híbridos ($p < 0,05$ y $p < 0,005$) (Figura 5 B y C). Mientras que en
 10 respuesta a la proteína KMP-11 solo IgG2a ($p < 0,0005$) pero no IgG1 ($p < 0,5$) se potenció significativamente en la respuesta pericialmente curativa de ratones tratados con CDMO transfectados con ADN de KMP-11 en comparación con controles infectados. Con respecto a ratones vacunados con células híbridas, CDMO singénicos transfectados con KMP-11 mostraron un nivel estadísticamente significativo de respuesta IgG anti-KMP-11 ($p < 0,05$) pero no una
 15 respuesta IgG2a ($p = 0,6601$). Coherentes con la idea de activar una clase Ab como un supuesto marcador para la diferenciación de linfocitos T $CD4^+$ auxiliares, el suero de ratones vacunados con células híbridas que contenía altos niveles de IgG1 específico de KMP-11 y bajos niveles de Ab de IgG2a y mostraron una proporción IgG2a/IgG1 menor (0,603) que es 1,25 veces más baja que la del grupo control infectado (0,751) y 1,8 veces menor que la del grupo tratado con CDMO transfectado con KMP-11 singénico terapéuticamente (Figura 5 D). Esto indica que una respuesta Th2 dominante con una alta proporción IgG2a/IgG1 podría no siempre asociarse con una curación en
 20 modelo experimental LV en ratones BALB/c.

Los mamíferos para todos los experimentos de la presente invención son ratones y tienen el potencial de ensayos de aplicación terapéutica en primates y seres humanos en el futuro.

20

Referencias Bibliográficas:

1. Liew F.Y., and C. A. O'Donnell. 1993. Immunology of leishmaniosis. *Adv. Parasita.* 32: 161- 259.
2. Bottrel, R. L., W. O. Dutra, F. A. Martins, B. Gontijo, E. Carvalho, M. Barral-Netto, A. Barral, R. P. Almeida, W.
5 Mayrink, R. Locksley, and K. J. Gollob. 2001. Flow cytometric determination of cellular sources and frequencies of
key cytokine-producing lymphocytes directed against recombinant LACK and soluble Leishmania antigen in human
cutaneous leishmaniosis. *Infect. Immun.* 69: 3232-3239.
3. Melby, P. C., V. V. Tryon, B. Chandrasekar, and G. L. Freeman. 1998. Cloning of Syrian hamster (*Mesocricetus*
auratus) cytokine cDNAs and analysis of cytokine mRNA expression in experimental visceral leishmaniosis. *Infect.*
10 *Immun.* 66: 2135.
4. Jardim, A., S. Hanson, B. Ullman, W. D. McCubbin, C. M. Kay, and R. W. Olafson. 1995. Cloning and structure-
function analysis of the Leishmania donovani kinetoplastid membrane protein-11. *Bio-chem. J.* 305: 315.
5. Jardim, A., V. Funk, R. M. Caprioli, and R. W. Olafson. 1995. Isolation and structural characterization of the
Leishmania donovani kinetoplastid membrane protein-11, a major immunoreactive membrane glycoprotein. *Biochem.*
15 *J.* 305: 307.
6. Berberich, C., G. Machado, G. Morales, G. Carrillo, A. Jimenez-Ruiz, and C. Alonso. 1998. The expression of the
Leishmania infantum KMP-11 protein is developmentally regulated and stage specific. *Bi-ochim. Biophys. Acta.* 1442:
230.
7. Kurtzhals, J. A., A. S. Hey, A. Jardim, M. Kemp, K. U. Schaefer, E. O. Odera, C. B. Christensen, J. I. Githure, R.
20 W. Olafson, T. G. Theander, et al. 1994. Dichotomy of the human T cell response to Leishmania antigens. II. Absent
or Th2-like response to gp63 and Th1-like response to lipophosphoglycan-associated protein in cells from cured
visceral leishmaniosis patients. *Clin. Exp. Immunol.* 96: 416.
8. Trefzer U, Weingart G, Chen Y, Herberth G, Adrian K, Winter H, Audring H, Guo Y, Sterry W, Walden P. Hybrid
cell vaccination for cancer immune therapy: first clinical trial with metastatic melanoma. *Int J Can-cer.* 2000 Mar 1;
25 85(5): 618-26.
9. Carvalho, E. M., R. S. Telxela, and W. D. Johnson, Jr. 1981. Cell-mediated Immunity In American visceral
leishmaniasis: reversible Immunosuppression during acute Infection. *Infect. Immun.* 33: 498.
10. Carvalho, E. M., R. Badaro, S. G. Reed, T. C. Jones, and W. D. Johnson, Jr. 1985. Absence of g Interferon and
Interleukin 2 productions during active visceral leishmaniasis. *J. Clin. Invest.* 76: 2066.
- 30 11. Pintado, V., P. Martín-Rabadán, M. L. Rivera, S. Moreno, and E. Bouza. 2001 .Visceral leishmaniasis In human
Immunodeficiency virus (HIV)-Infected and non-HIV-Infected patients. A comparative study. *Medicine (Baltimore)*; 80:
54.
12. United Nations Development Program/World Bank/World Health Organization 1989. The Leishmaniasis. WHO
Special Program for Research and Training In Tropical Diseases. Ninth program Report. Tropical diseases: progress
35 In International research, 1987-1988.
13. Melby, P. C., G. B. Ogden, H. A. Flores, W. Zhao, C. Geldmacher, N. M. Bledlger, S. K. Ahuja, J. Uran-ga, and M.
Melendez. 2000. Identification of vaccine candidate for experimental visceral leishmaniosis by Immunization with
sequential fraction of a cDNA expression library. *Infect. Immun.* 68: 5595.
14. Kafetzis, D. A., and H. C. Maltezou. 2002. Visceral leishmaniosis In paediatrics. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 15: 289.
- 40 15. Murray, H. W. 2001 .Clinical and experimental advances in treatment of visceral leishmaniasis. *An-timicrob.*
Agents Chemother. 45: 2185.
16. Xu, D., and F.Y. Liew. 1995. Protection against leishmaniasis by Injection of DNA encoding a major surface
glycoprotein, gp63, of L. major. *Immunology* 84: 173.
17. Ramlrez-Pineda JR, Frohlich A, Berberich C, Moll H. Dendritic cells (DC) activated by CpG DNA ex vivo are
45 potent inducers of host resistance to an intracellular pathogen that is independent of IL-12 derived from the
immunizing DC. *J Immunol.* 2004 May 15; 172(10): 6281 -9.
18. Ghosh M, Pal C, Ray M, Maltra S, Mandai L, Bandyopadhyay S. Dendritic cell-based Immunotherapy combined
with antimony-based chemotherapy cures established murine visceral leishmaniasis. *J Immunol.* 2003 Jun 1 ;
170(11):5625-9.
- 50 19. Lutz MB, Kukutsch N, Ogilvie AL, Rossner S, Koch F, Romani N, Schuler G. An advanced culture method for
generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow. *J Immunol Methods.* 1999 Feb 1 ;
223(1):77-92.
20. Li Y, Chen B. Differential regulation of fyn-associated protein tyrosine kinase activity by macrophage colony-
stimulating factor (M-CSF) and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF). *J Leukoc Biol.* 1995
55 Mar; 57(3): 484-90.
21. Chaudhry A, Das SR, Hussain A, Mayor S, George A, Bal V, Jameel S, Rath S. The Nef Protein of HIV-1 Induces
Loss of Cell Surface Costimulatory Molecules CD80 and CD86 in APCs. *J. Immunol.* 2005, 175: 4566-4674.
22. Scott-Taylor TH, Pettengell R, Clarke I, Stuhler G, La Barthe MC, Walden P, Dagleish AG. Human tumour and
dendritic cell hybrids generated by electrofusion: potential for cancer vaccines. *Biochim Bi-ophys Acta.* 2000 Mar 17;
60 1500(3): 265-79.
23. Trefzer U, Walden P. Hybrid-cell vaccines for cancer immune therapy. *Mol Biotechnol.* 2003 Sep; 25(1): 63-9.
24. Trevor KT, Cover C, Ruiz YW, Akporiaye ET, Hersh EM, Landais D, Taylor RR, King AD, Walters RE. Generation
of dendritic cell-tumor cell hybrids by electrofusion for clinical vaccine application. *Cancer Immunol Immunother.* 2004
Aug; 53(8):705-14. Epub 2004 Mar 26.
- 65 25. Haenssle HA, Krause SW, Emmert S, Zutt M, Kretschmer L, Schmidberger H, Andreesen R, Soruri A. Hybrid cell
vaccination in metastatic melanoma: clinical and immunologic results of a phase I/II study. *J Immunother.* 2004 Mar-

Apr; 27(2): 147-55.

26. Zimmermann U, Vienken J. Electric field-induced cell-to-cell fusion. *J Membr Biol.* 1982; 67(3): 165-82.

27. Parkhurst MR, DePan C, Riley JP, Rosenberg SA, Shu S. Hybrids of dendritic cells and tumor cells generated by electrofusion simultaneously present immunodominant epitopes from multiple human tumor-associated antigens in the context of MHC class II and class II molecules. *J Immunol.* 2003 May 15; 170(10): 5317-25.

28. Melby PC, Chandrasekar B, Zhao W, Coe JE. The hamster as a model of human visceral leishmaniasis: progressive disease and impaired generation of nitric oxide in the face of a prominent Th 1-like cytokine response. *J Immunol.* 2001 Feb 1; 166(3): 1912-20.

29. Roy S, Scherer MT, Briner TJ, Smith JA, Geffer ML. Murine MHC polymorphism and T cell specificities. *Science.* 1989 May 5; 244(4904): 572-5.

30. Basu R, Bhaumik S, Basu JM, Naskar K, De T, Roy S. Kinetoplastid membrane protein-11 DNA vaccination induces complete protection against both pentavalent antimonial-sensitive and -resistant strains of *Leishmania donovani* that correlates with inducible nitric oxide synthase activity and IL-4 generation: evidence for mixed Th1- and Th2-like responses in visceral leishmaniasis. *J Immunol.* 2005 Jun 1; 174(11): 7160-71.

31. Basak SK, Saha B, Bhattacharya A, Roy S. Immunobiological studies on experimental visceral leishmaniasis. II. Adherent cell-mediated down-regulation of delayed-type hypersensitivity response and up-regulation of B cell activation. *Eur J Immunol.* 1992 Aug; 22(8): 2041-5.

32. Alexander J, Carter KC, Al-Fasi N, Satoskar A, Brombacher F. Endogenous IL-4 is necessary for effective drug therapy against visceral leishmaniasis. *Eur J Immunol.* 2000 Oct; 30(10): 2935-43.

33. Stager S, Smith DF, Kaye PM. Immunization with a recombinant stage-regulated surface protein from *Leishmania donovani* induces protection against visceral leishmaniasis. *J Immunol.* 2000 Dec 15; 165 (12):7064-71.

34. Kaye PM, Gorak P, Murphy M, Ross S. Strategies for immune intervention in visceral leishmaniasis. *Ann Trop Med Parasitol.* 1995 Dec; 89 Suppl. 1:75-81. Review.

35. Gurunathan S, Sacks DL, Brown DR, Reiner SL, Charest H, Glatchenhaus N, Seder RA. Vaccination with DNA encoding the immunodominant LACK parasite antigen confers protective immunity to mice infected with *Leishmania major*. *J Exp Med.* 1997 Oct 6; 186(7):1137-47.

36. Murray HW, Miralles GD, Stoeckle MY, McDermott DF. Role and effect of IL-2 in experimental visceral leishmaniasis. *J Immunol.* 1993 Jul 15; 151 (2): 929-38.

37. Kupper T, Horowitz M, Lee F, Robb R, Flood PM. Autocrine growth of T cells independent of interleukin 2: identification of interleukin 4 (IL 4, BSF-1) as an autocrine growth factor for a cloned antigen-specific helper T cell. *J Immunol.* 1987 Jun 15; 138(12): 4280-7.

38. Kupper T, Flood P, Coleman D, Horowitz M. Growth of an interleukin 2/interleukin 4-dependent T cell line induced by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF). *J Immunol.* 1987 Jun 15; 138(12):4288-92.

39. Russell SM, Keegan AD, Harada N, Nakamura Y, Noguchi M, Leland P, Friedmann MC, Miyajima A, Puri RK, Paul WE, et al. Interleukin-2 receptor gamma chain: a functional component of the interleukin-4 receptor. *Science.* 1993 Dec 17; 262(5141): 1880-3.

40. Locksley RM, Heinzel FP, Holaday BJ, Mutha SS, Relner SL, Sadick MD. Induction of Th1 and Th2 CD4+ subsets during murine *Leishmania major* infection. *Res Immunol.* 1991 Jan; 142(1):28-32.

41. Satoskar A, Bluethmann H, Alexander J. Disruption of the murine interleukin-4 gene inhibits disease progression during *Leishmania mexicana* infection but does not increase control of *Leishmania donovani* infection. *Infect Immun.* 1995 Dec; 63(12): 4894-9.

42. Stager S, Alexander J, Kirby AC, Botto M, Rooijen NV, Smith DF, Brombacher F, Kaye PM. Natural antibodies and complement are endogenous adjuvants for vaccine-induced CD8+ T-cell responses. *Nat Med.* 2003 Oct; 9(10):1287-92.

43. Miles SA, Conrad SM, Alves RG, Jeronimo SM, Mosser DM. A role for IgG immune complexes during infection with the intracellular pathogen *Leishmania*. *J Exp Med.* 2005 Mar 7; 201 (5): 747-54.

REIVINDICACIONES

1. Una vacuna de células híbridas contra la Leishmaniasis que comprende un macrófago (o macrófagos) singénico con un antígeno de *Leishmania* Proteína-11 de la Membrana de Kinetopláستidos inmunodominante electrofusionado con una célula (o células) dendrítica alogénica.
2. Una vacuna de células híbridas de acuerdo con la reivindicación, en el que el macrófago se obtiene de ratones BALB/c por métodos conocidos.
3. Una vacuna de células híbridas de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en la que la cepa de *Leishmania* es *L. donovani* a partir de la cual se obtiene el gen de la Proteína-11 de la Membrana de Kinetopláستidos antígeno de *Leishmania* y el antígeno comprende una proteína de superficie celular inmunodominante de la Proteína-11 de la Membrana de Kinetopláستidos de *Leishmania*.
4. Una vacuna de células híbridas de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que la célula dendrítica alogénica se obtiene de progenitores de médula ósea o de células Dendríticas Derivadas de Médula Ósea (CDMO) obtenidas de la cepa de ratón C57BL/6.
5. Una vacuna de células híbridas de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que esta provoca una respuesta inmunocelular que es una respuesta de células Th1/Th2 mixta que estimula una respuesta de linfocitos T citotóxicos CD8+ específica de la Proteína-11 de la Membrana de Kinetopláستidos.
6. Una vacuna de células híbridas de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que esta estimula una respuesta de anticuerpos, una respuesta de LCT, una respuesta proliferativa de linfocitos T, generación de IL-2, reducción de la carga de parásitos en bazo e hígado junto con cura estéril contra *Leishmania* después de vacunación terapéutica a un mamífero.
7. Una formulación de vacuna híbrida contra la Leishmaniasis que comprende la vacuna de células híbridas de acuerdo con la reivindicación 1 junto con un adyuvante y/o una citocina.
8. Una formulación farmacéutica que comprende una vacuna de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores junto con un vehículo o un excipiente.
9. Un proceso para la preparación de la vacuna de células híbridas de acuerdo con la reivindicación 1, contra la Leishmaniasis que comprende las siguientes etapas:
 - [a] aislar macrófagos de ratones BALB/c singénicos;
 - [b] transfectar los macrófagos obtenidos en la etapa [a] con ADNc de la Proteína-11 de la Membrana de Kinetopláستidos que contiene el vector de expresión de mamíferos pCM-LIC KMP-11;
 - [c] aislar células dendríticas de ratones C57BL/6 alogénicos;
 - [d] electrofusionar los macrófagos singénicos transfectados en la etapa [b] con células dendríticas alogénicas obtenidas en la etapa [c] para obtener células híbridas fusionadas para usar para la vacunación terapéutica contra la Leishmaniasis.
10. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 9 en el que la administración terapéutica de la vacuna de células híbridas es eficaz para eliminar parásitos de órganos de los mamíferos infectados con *Leishmania*.
11. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 9, en el que la electrofusión es una técnica de fusión en la que se mezclan dos tipos de células diferentes: [a] Macrófagos Derivados de Médula Ósea singénicos que expresan el antígeno de *Leishmania* y [b] células dendríticas alogénicas, a una proporción de 1:1 y después se alinean di-electroforéticamente en una cubeta cubierta con cera aplicando un voltaje de alineamiento de 50 V/cm que asciende a 20 V para una cubeta de una longitud de trayecto de 0,4 cm optimizando entre 17 V y 25 V junto con aplicación simultánea de un voltaje de pulso cuadrático de 625 V/cm que asciende a 250 V para una cubeta de una longitud de trayecto de 0,4 cm optimizando entre 150 V- 300 V para una fusión de membrana.
12. Una formulación de vacuna híbrida de acuerdo con la reivindicación 7 para su uso en el tratamiento de Leishmaniasis, en la que la administración de la vacuna es eficaz para eliminar el parásito de los órganos de un mamífero infectado con *Leishmania*.
13. Una formulación de vacuna híbrida de acuerdo con la reivindicación 12 para su uso en el tratamiento de la Leishmaniasis, en el que dicha formulación se inyecta, por vía intravenosa, como una serie de dosis durante un periodo de cuatro semanas y la dosis es de 5×10^5 células/100 g de peso corporal /PBS 100 µl con un intervalo de 5 días.
14. Una formulación de vacuna híbrida de acuerdo con la reivindicación 12 o reivindicación 13 para su uso en el tratamiento de la Leishmaniasis en el que la administración terapéutica de la vacuna es eficaz para obtener la eliminación completa de la carga de parásitos en el bazo e hígado en la fase tardía de infección del parásito.

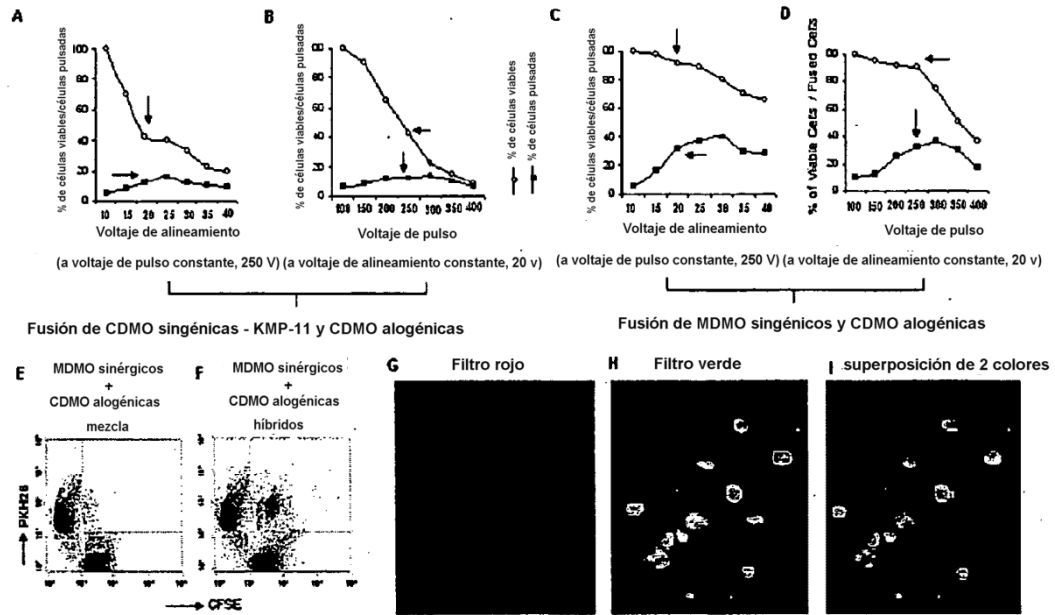


Figura 1

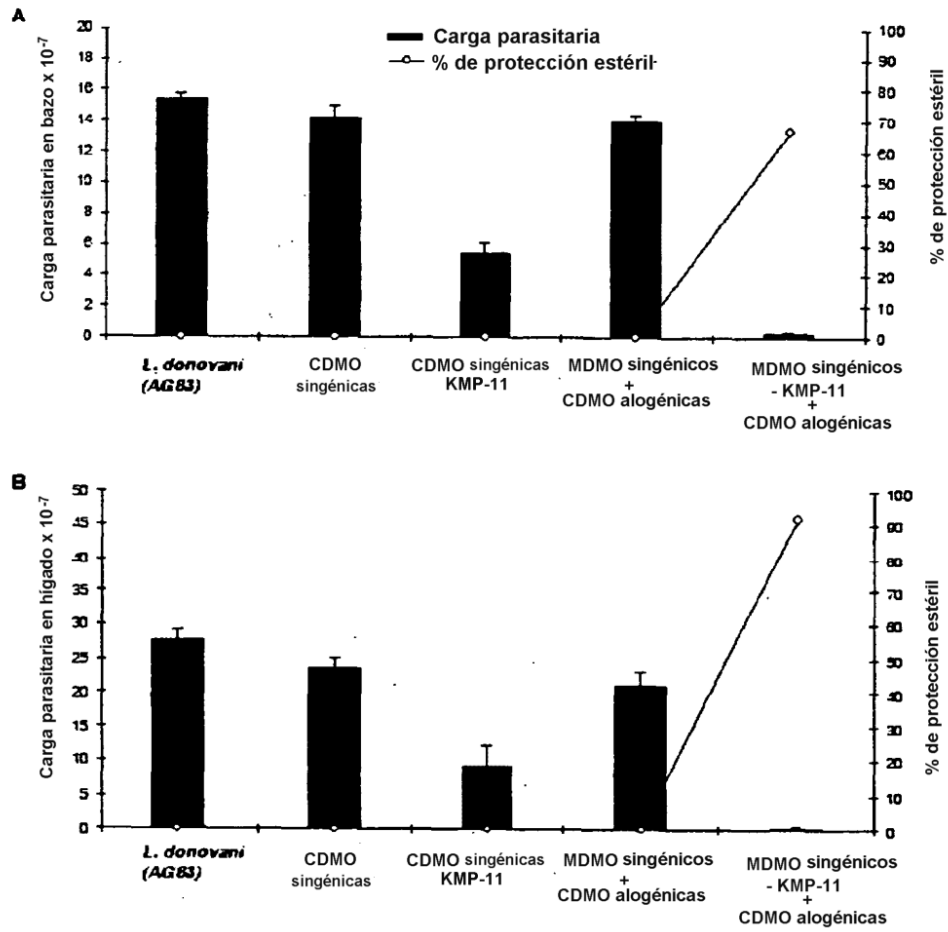


Figura 2

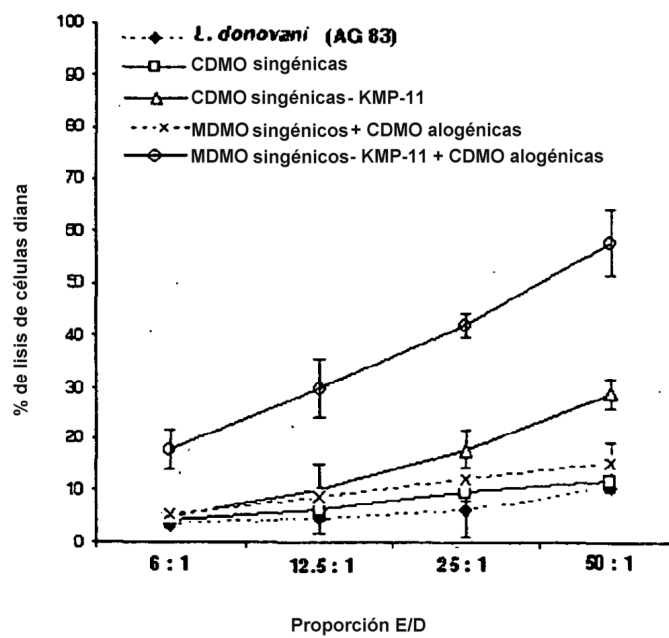


Figura 3

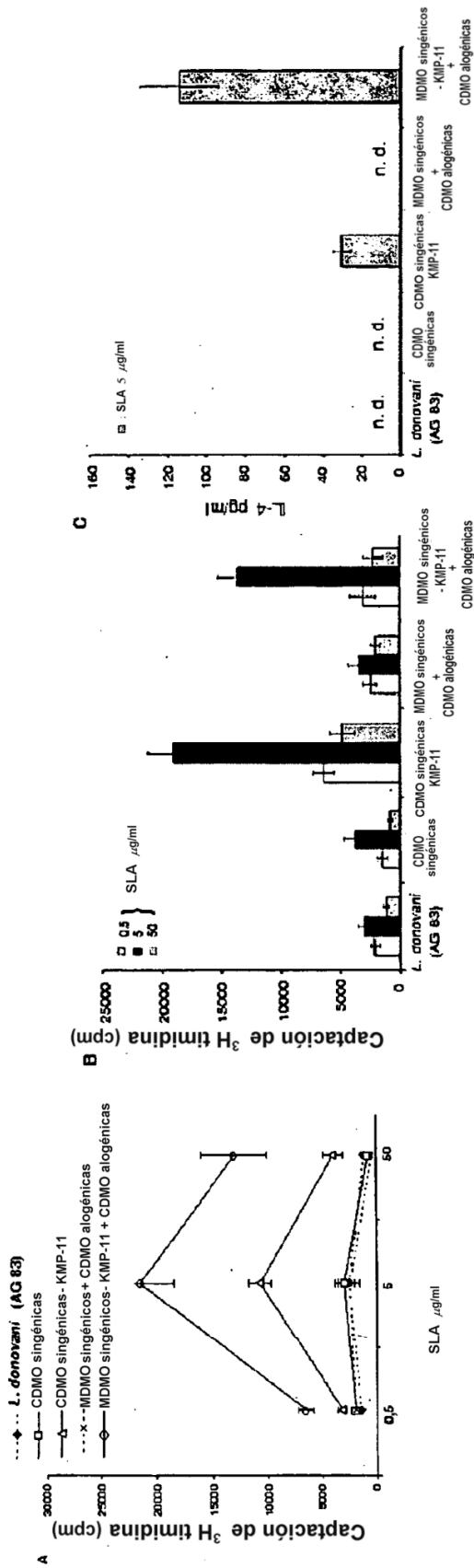


Figura 4:

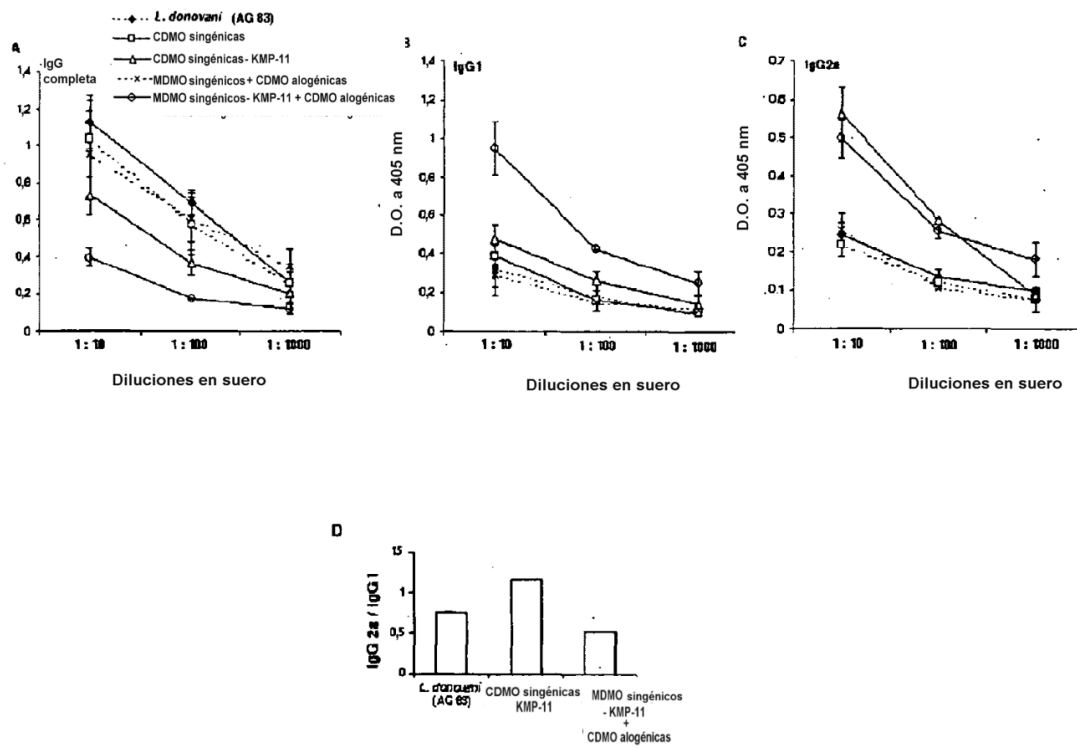


Figura 5: