

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 393 610**

51 Int. Cl.:

C12N 15/30 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04805294 .8**

96 Fecha de presentación: **25.10.2004**

97 Número de publicación de la solicitud: **1678305**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **12.07.2006**

54 Título: **Cepa de protozoo de la especie Leishmania infantum de virulencia atenuada y su utilización**

30 Prioridad:

29.10.2003 FR 0312689

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:

26.12.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:

26.12.2012

73 Titular/es:

**INSTITUT DE RECHERCHE POUR LE
DÉVELOPPEMENT (IRD) (50.0%)
213, RUE LA FAYETTE
75480 PARIS CEDEX 10, FR y
UNIVERSIDADE DO PORTO (50.0%)**

72 Inventor/es:

**CORDEIRA DA SILVA, ANABELA;
OUAISSI, ALI;
SERENO, DENIS y
VERGNES, JEAN-BAPTISTE**

ES 2 393 610 T3

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).

DESCRIPCIÓN

Cepa de protozoo de la especie *Leishmania infantum* de virulencia atenuada y su utilización.

5 La presente invención tiene por objeto unas cepas de protozoos de virulencia atenuada y su utilización.

Los protozoos flagelados de la familia de *Trypanosomatidae* son responsables de numerosas enfermedades que afectan al ser humano y al animal.

10 Así, entre los protozoos del género *Trypanosoma*, *T. brucei* y *T. cruzi* son, por ejemplo, responsables respectivamente de la enfermedad del sueño y de la enfermedad de Chagas.

15 Los protozoos del género *Leishmania*, tales como *L. aethiopica*, *L. donovani*, *L. infantum*, *L. major*, *L. mexicana* o *L. tropica* son responsables de las leishmaniasis. Estas infecciones son endémicas en más de 88 países, y afectan a una porción notable del territorio francés. En el perímetro mediterráneo, y en Francia en particular, las leishmaniasis se deben esencialmente a *L. infantum*. En el mundo, la OMS estima en 12 millones el número de individuos parasitados y más de 350 millones de personas estarían expuestas diariamente. Existen tres formas principales de leishmaniasis cuya forma más severa, la leishmaniasis visceral, puede ser mortal en ausencia de tratamiento. Esta situación se ha agravado, desde la emergencia del VIH, por el hecho de que estas infecciones se encuentran cada vez más como enfermedades oportunistas en las personas que padecen el síndrome de la inmunodeficiencia adquirida (SIDA), en particular en el suroeste de Europa. El parásito utiliza el estatus inmunitario deprimido de su huésped para implantarse o reactivarse.

20 Los tratamientos actuales de leishmaniasis recurren a medicamentos de difícil manejo, tales como la anfotericina B o a medicamentos que pertenecen a la familia de los antimoniales, cuyos efectos secundarios son importantes.

25 Hoy en día, no existen vacunas que permitan prevenir las infecciones por *Leishmania*. La puesta a punto de dichas vacunas constituye el objeto de numerosos programas de investigación. Se destacan tres ejes principales; la preparación de vacunas muertas, de vacunas vivas atenuadas o de vacunas sub-unitarias. Entre estos tres ejes, la preparación de vacunas vivas atenuadas parece ser la más prometedora; este tipo de vacuna permite, en efecto, la inmunización más parecida a la realizada por el parásito salvaje. Además, las técnicas modernas de biología molecular permiten preparar cepas de virulencia atenuada por desactivación específica de ciertos genes de virulencia. Se han preparado así varias cepas de *Leishmania*, de las que un gen de virulencia se ha inactivado, (Titus *et al.* (1995) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92:10267-10271, WO 98/44943, EP 0 716 697, EP 0 806 476). La elección del gen a inactivar es crucial debido a que condiciona la obtención de una cepa adecuadamente atenuada, es decir, que tiene una capacidad replicativa suficiente para estimular el sistema inmunitario y sin embargo limitada con el fin de evitar cualquier riesgo infeccioso, en particular en el sujeto inmunodeprimido.

30 Las proteínas SIR2, descubiertas originalmente en la levadura, son conocidas porque intervienen en la condensación de la cromatina por desacetilación de las histonas al nivel de ciertas regiones cromosómicas: los loci *HMR* y *HML* responsables de la conmutación de tipo sexual, las regiones sub-teloméricas y las repeticiones de ADN en las que SIR2 previene la formación de minicírculos extra-cromosómicos mediante recombinación homóloga (Guarente *et al.* (1999) Nat. Genet. 23:281-5; Gartenberg *et al.* (2000) Curr. Opin. Microbiol. 3:132-7; Min *et al.* (2001) Cell 105:269-79). Otros trabajos han demostrado su implicación en los mecanismos de reparación de ADN (Tsukamoto *et al.* (1997) Nature 388: 900-3).

35 Sin embargo, el papel biológico de SIR2 no está limitado al "silencing" y a la reparación del ADN, y la función más sorprendente atribuida al SIR2 es sin duda aumentar la longevidad de los organismos que poseen una copia suplementaria de este gen. Esto se ha demostrado en la levadura y en *Caenorhabditis elegans* (Guarente *et al.* (2000) Genes Dev. 14:1021-6; Tissenbaum *et al.* (2001) Nature 410:227-30).

40 Los programas de secuenciación sistemática han permitido caracterizar otras proteínas emparentadas con SIR2 en diferentes organismos eucariotas y procariotas. Se habla desde entonces de familia proteica, que comprende las proteínas SIR2 nucleares propiamente dichas y los homólogos de SIR2 indiferentemente denominados "Hst" por "Homologue of SIR Two" o "sirtuin" (Frye *et al.* (2000) Biochem. Biophys. Res. Commun. 273:793-8). El significado biológico de esta diversidad de proteínas SIR2 no está todavía claramente establecido, pero diferentes trabajos muestran que todos los Hst estudiados poseen, al igual que SIR2, una actividad enzimática de tipo histona desacetilasa que es estrictamente dependiente de NAD. Esta particularidad ha permitido agrupar las proteínas SIR2 en una nueva clase de histona desacetilasa denominada de clase III en oposición a las clases I y II ya caracterizadas.

45 La existencia de homólogos de SIR2 que tienen unas localizaciones estrictamente citoplásmicas, y la presencia de Hst en las procariotas que no poseen histonas, supone sin embargo que estas enzimas poseen otros sustratos fisiológicos diferentes de las histonas y, por lo tanto, otras funciones biológicas. Los trabajos recientes publicados en este campo muestran, efectivamente, un número creciente de "dianas" caracterizadas de SIR2 o de sus homólogos. El SIRT1 en el ser humano y su homólogo murino son así capaces de fijarse específicamente a p53 e inactivarlo

mediante desacetilación (Vaziri *et al.* (2001) Cell 107:149-59; Luo *et al.* (2001) Cell 107:137-48). El SIRT1, de este modo, previene la entrada en apoptosis de células sometidas a un estrés. El factor de transcripción TAF168 en el ratón (Muth *et al.* (2001) Embo J. 20:1353-62), la proteína Alba en la arqueobacteria *S. solfataricus* (Bell *et al.* (2002) Science 296: 148-51) o, más recientemente, el proto-oncogen BCL6 en el ser humano (Bereshchenko *et al.* (2002) Nat. Genet. 32:606-13) son todos desacetilados por SIR2 o sus homólogos. Esta diversidad de parejas sin interrelación directa y el número de procesos biológicos en los que están implicadas denotan la importancia desempeñada por esta familia proteica en el seno de la célula.

El gen *SIR2* de *Leishmania major* (*LmSIR2*) que codifica para una proteína que presenta una fuerte homología de secuencia con el SIR2 de levadura se caracterizó por primera vez por el Dr. Ali Ouaiissi y su equipo en 1996 (Yahiaoui *et al.* (1996) Gene 169:115-8). Unos homólogos de esta proteína han sido puestos en evidencia mediante transferencia Western en todas las demás especies de *Leishmania* estudiadas (*L. infantum*, *L. mexicana*, *L. braziliensis*) así como en *Trypanosoma cruzi* (Zemzoumi *et al.* (1998) Biol. Cell. 90:239-45). Esta proteína presenta una localización citoplásmica heterogénea según el estado de desarrollo y según las especies. Se encuentra asociada a unos gránulos citoplásmicos en las formas promastigotas y presenta una localización citoplásmica difusa en la amastigota. La proteína recombinante es asimismo capaz de fijarse en la superficie de los macrófagos J774 y ser internalizada.

Para conocer el papel biológico de esta proteína en el parásito, se realizó la sobreexpresión de la proteína *LmSIR2* y de su homólogo, la proteína *LiSIR2*, en *L. infantum*. Los resultados obtenidos demuestran que la expresión de estas dos proteínas aumenta la vida útil de los parásitos en fase estacionaria; estando este fenómeno correlacionado con una prevención de la entrada en apoptosis de los parásitos (Vergnes *et al.* (2002) Gene 296:139-50).

La presente invención tiene por objetivo proporcionar una nueva cepa de protozoos de la familia de las *Trypanosomatidae*, en particular del género *Leishmania*, de virulencia atenuada mediante la desactivación de un gen cuyo carácter de virulencia se ha demostrado nuevamente, siendo dicha cepa más eficaz que algunas cepas conocidas hoy en día para inducir una inmunidad contra las infecciones por protozoos.

La presente invención tiene asimismo por objeto la utilización de esta cepa para la preparación de medicamentos, en particular de vacunas, destinados a prevenir o tratar las enfermedades por protozoos.

La presente invención se refiere a una cepa de protozoos de la especie *Leishmania infantum* cuya virulencia es inferior a la de la cepa salvaje correspondiente, caracterizada porque una sola copia del gen *SIR2* presente en el genoma de dicha cepa está inactivada.

La virulencia de una cepa de protozoos se puede medir mediante métodos bien conocidos por el experto en la materia y en particular tal como se describe en los ejemplos 2 y 3 siguientes. En particular, es posible medir la carga parasitaria a lo largo del tiempo de un animal modelo, tal como un ratón, infectado por una cepa de protozoos de la cual se desea evaluar la virulencia y compararla con la de un animal modelo similar infectado por la cepa salvaje correspondiente. La cepa de la cual se desea evaluar la virulencia se denominará de virulencia inferior, o atenuada, si la carga parasitaria de esta cepa disminuye más rápidamente a lo largo del tiempo que la de la cepa salvaje correspondiente.

La desactivación de un gen se puede realizar según diferentes métodos bien conocidos por el experto en la materia, y en particular tal como se describe en el ejemplo 1 de la presente descripción. En particular, es posible sustituir, mediante recombinación homóloga, la secuencia cromosómica de un gen dado por una secuencia idéntica en la que se ha insertado la secuencia de un gen de resistencia a un fármaco de selección, tal como un antibiótico. Alternativamente, es posible sustituir la totalidad o parte de la secuencia cromosómica de un gen dado, por ejemplo la secuencia de un gen de resistencia a un fármaco de selección, tal como un antibiótico, mediante recombinación homóloga en los extremos.

La identificación de un gen *SIR2* para una especie de la familia de las *Trypanosomalidae*, para la cual no se ha identificado aún, se puede realizar según unas técnicas bien conocidas por el experto en la materia, a partir de las secuencias ya conocidas de *SIR2* de especies diferentes, y en particular las de *Leishmania infantum* (GenBank AF487351, SEC ID nº 3), *Leishmania amazonensis* (GenBank AF534109, SEC ID nº 5), *Leishmania major* (GenBank L40331, SEC ID nº 4) y *Trypanosoma brucei* (GenBank AF102869, SEC ID nº 6). Si se dispone de la secuencia completa o parcial del genoma de la cepa para la cual se desea identificar el gen *SIR2*, es posible utilizar un programa de comparación de secuencia de tipo BLAST (Altschul *et al.* (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410) que permita detectar las secuencias que presentan una similitud de secuencia suficiente con las secuencias ya conocidas de *SIR2*. Alternativamente, tal como se describe en el ejemplo 1 de la presente descripción, también es posible fabricar unas sondas, por ejemplo mediante PCR, a partir de las secuencias ya conocidas de *SIR2*, marcarlas con la ayuda de un marcador fluorescente o radioactivo por ejemplo, y proceder a un cribado, por ejemplo según el método de Southern, de un banco de ADN complementario o cromosómico de una cepa para la cual se desea identificar un gen *SIR2*.

El genoma de los protozoos es diploide, es decir que cada gen está presente en dos copias respectivamente

presentes en cada uno de los cromosomas homólogos.

La utilización de dicha cepa es ventajosa en la medida en la que la desactivación de una sola copia del gen *SIR2* es suficiente para inducir una disminución de la virulencia de la cepa para la cual se ha inactivado este gen.

5 Una cepa protozoaria pertenece al género *Trypanosoma* o al género *Leishmania*.

Una cepa protozoaria pertenece al género *Leishmania* y en particular a las especies seleccionadas de entre el grupo que comprende *L. donovani*, *L. major*, *L. tropica*, *L. mexicana*, *L. infantum*, *L. amazonensis* y *L. braziliensis*.

10 La presente invención se refiere asimismo a una composición inmunógena caracterizada porque comprende una cepa tal como se ha definido anteriormente.

15 La presente invención se refiere asimismo a una composición farmacéutica, en particular vacunal, que comprende, a título de sustancia activa, una cepa tal como se ha definido anteriormente en asociación con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

20 Según un modo de realización particular, dicha composición farmacéutica, en particular vacunal, comprende además un adyuvante, tal como una cepa de *Mycobacterium vaccae* o BCG, de alúmina, de lípido A monofosforilado o interleucina 12.

25 La utilización de adyuvante es bien conocida por el experto en la materia. Los compuestos adyuvantes permiten en particular aumentar la respuesta inmunitaria del organismo al que se administra una composición inmunógena, farmacéutica o vacunal, frente al compuesto inmunógeno comprendido en dicha composición.

La *Mycobacterium vaccae* o la BCG son unos agentes bacterianos vivos, bien conocidos por el experto en la materia, susceptibles de inducir una activación del sistema inmunitario y mejorar la respuesta inmunitaria frente a los protozoos de la invención.

30 Los demás adyuvantes mencionados anteriormente están descritos en particular en «*Report on the fourth TDR/IDRI Meeting on Second-Generation Vaccines against Leishmaniasis*» de Dumonteil *et al.*, disponible en la OMS y en Hadman (2002) Clin. Microbiol. Rev. 14:229-43.

35 Según otro modo de realización particular, dicha composición farmacéutica, en particular vacunal, conviene para la administración de una dosis unitaria de aproximadamente $5 \cdot 10^4$ a aproximadamente $5 \cdot 10^7$ protozoos por kg.

La expresión “por kg” se refiere a la masa corporal del sujeto a tratar.

40 Dicha composición farmacéutica, en particular vacunal, comprende, a título de sustancia activa, una cepa de *Leishmania infantum* para la cual se ha inactivado una copia del gen *SIR2*, tal como se ha definido anteriormente.

45 Según un modo de realización preferido, dicha composición farmacéutica, en particular vacunal, comprende asimismo uno o varios compuestos que se pueden utilizar para la prevención y/o el tratamiento de las enfermedades relacionadas con una infección por un protozoo, tales como las enfermedades por tripanosomas y las leishmaniasis, tales como:

- la miltefosina, los antimoniales, la anfotericina B, el benznidazol, el nifurtimox, la pentamidina, y sus derivados, los derivados arsénicos, el melarsopol y la difluorometilornitina,
- 50 - unos protozoos, en particular del género *Trypanosoma* o *Leishmania*, inactivados o de virulencia atenuada por desactivación de un gen diferente de *SIR2*,
- unos antígenos de protozoos, tales como las proteínas gp46, gp63, LACK, TSA, STI1, Hsp80, SLA, FPA, 1 G6, 4H6, GBP, CPA, CPB, LelF, A2 o el lipofosfoglicano, o
- 55 - unas secuencias de ácidos nucleicos que codifican para dichos antígenos proteicos de protozoos.

60 La enfermedades por tripanosomas corresponden en particular a la enfermedad del sueño (*T. brucei*) y a la enfermedad de Chagas (*T. cruzi*).

Las leishmaniasis pueden ser, en particular, provocadas por *L. donovani*, *L. major*, *L. tropica*, *L. mexicana*, *L. infantum*, *L. amazonensis* o *L. braziliensis*, y se manifiestan en cuatro formas principales: la leishmaniasis visceral (*kala azar*), la leishmaniasis cutánea, la leishmaniasis muco-cutánea y la leishmaniasis cutánea difusa.

65 Ventajosamente, la adición de uno o varios de los compuestos mencionados anteriormente permite activar el sistema inmunitario del organismo al que se ha administrado dicha composición de manera sinérgica con las cepas

de protozoos de la invención.

Los protozoos denominados inactivados corresponden a unos protozoos muertos en particular por una autoclave.

- 5 Los protozoos denominados de virulencia atenuada mediante desactivación de un gen diferente de *SIR2*, corresponden en particular a unos protozoos, en particular de la *Leishmania*, para los cuales se han inactivado uno de los genes *DHFR-TS*, *CPA*, *CPB*, *A2*, o *TR*.

10 Los antígenos de protozoos mencionados anteriormente corresponden en particular a unos antígenos de *Leishmania* y están descritos en particular en «*Report on the fourth TDRI/DRI Meeting on Second-Generation Vaccines against Leishmaniasis*» de Dumonteil *et al.*, disponible en la OMS, y en Handman (2002) Clin. Microbiol. Rev. 14:229-43.

La invención se refiere asimismo a un producto que comprende:

- 15 • por lo menos una cepa tal como se ha definido anteriormente, y
- por lo menos un compuesto que se puede utilizar para la prevención o el tratamiento de las enfermedades relacionadas con una infección por un protozoo, tales como las enfermedades por tripanosomas y las leishmaniasis, tales como:
- 20 - la miltefosina, los antimoniales, la anfotericina B, el benznidazol, el nifurtimox, la pentamidina, y sus derivados, los derivados arsénicos, el melarsopol y la difluorometilornitina,
- 25 - unos protozoos, en particular del género *Trypanosoma* o *Leishmania*, inactivados o de virulencia atenuada por desactivación de un gen diferente de *SIR2*,
- unos antígenos de protozoos, tales como las proteínas gp46, gp63, LACK, TSA, STI1, Hsp80, SLA, FPA, 1G6, 4H6, GBP, CPA, CPB, LelF, A2 o el lipofosfoglicano, o
- 30 - unas secuencias de ácidos nucleicos que codifican para dichos antígenos proteicos de protozoos.

como producto de combinación para una utilización simultánea, separada o espaciada en el tiempo para la prevención y/o el tratamiento de las enfermedades relacionadas con una infección por un protozoo, tales como las enfermedades por tripanosomas y las leishmaniasis.

35 La invención se refiere asimismo a la utilización de una cepa tal como se ha definido anteriormente, para la preparación de un medicamento, en particular una vacuna, destinado a la prevención y/o el tratamiento de las leishmaniasis.

40 La invención se refiere asimismo a la utilización mencionada anteriormente de una cepa de *Leishmania infantum* para la cual se ha inactivado una copia del gen *SIR2*, tal como se ha definido anteriormente, para la preparación de un medicamento, en particular una vacuna, destinado a la prevención y/o el tratamiento de las leishmaniasis, en particular de las leishmaniasis por *Leishmania infantum*.

45 Por otra parte, un modo de realización particular de la invención prevé asimismo la utilización de una cepa tal como se ha definido anteriormente, estando dicha cepa además muerta, en particular mediante tratamiento térmico o químico, con la ayuda de glutaraldehído por ejemplo, para la preparación de medicamentos o vacunas, en particular en el ámbito de la prevención y/o el tratamiento de las enfermedades relacionadas con una infección por un protozoo, tales como las enfermedades por tripanosomas y las leishmaniasis.

50 La invención se refiere asimismo a las composiciones farmacéuticas que comprenden dichas cepas muertas, en asociación con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Descripción de las figuras

55 Figura 1A, figura 1B

60 Las figuras 1A y 1B representan los locus de los alelos salvajes (*LiSIR2*)(figura 1A) o inactivados mediante los genes de resistencia a la neomicina (*LiSIR2::NEO*) (figura 1B). Los sitios de restricción están representados por H: *Hind* III, P: *Pst* I, C : *Cla* I, S: *Sac* I. Las flechas indican el tamaño de los fragmentos de restricción obtenidos.

Figura 2A, figura 2B

65 La figura 2A representa un análisis según el método de transferencia de Southern del ADN genómico que procede de clones salvajes de *L. infantum* digerido por *Pst* I (pista 1), de clones para los cuales se ha inactivado una copia del gen *LiSIR2* (pistas 2 y 3) e hibridado con la sonda *LiSIR2*.

La figura 2B representa un análisis mediante transferencia Southern del ADN genómico de clones salvajes de *L. infantum* digerido por *Sac I* (pista 1), de clones para los cuales se ha inactivado una copia del gen *LiSIR2* (pistas 2 y 3), e hibridado con la sonda *NEO*.

5
Figura 3A y figura 3B

Las figuras 3A y 3B representan las cinéticas de crecimiento de los parásitos en formas promastigotas (figura 3A) y amastigotas (figura 3B) de los diferentes clones: salvaje (cuadrados negros) y *LiSIR2/LiSIR2::NEO* (círculos y triángulos blancos) inoculados con $2 \cdot 10^6$ parásitos/ml. El eje de las abscisas representa el tiempo (en días) y el eje de las ordenadas el número de parásitos por ml (a multiplicar por $\log 10^4$ para la figura 3A y por 10^4 para la figura 3B).

15
Figura 4A y figura 4B

Las figuras 4A y 4B representan el efecto del anticuerpo monoclonal IIIIG4 dirigido contra la proteína SIR2 de *L. major* sobre el crecimiento de los amastigotas de *L. infantum* salvajes (figura 4A) o para los cuales se ha inactivado una copia del gen *LiSIR2* (figura 4B). En la figura 4A la curva representada por los triángulos negros representa el efecto de IIIIG4 diluido al 1/20 y la curva representada por los cuadrados negros el efecto del anticuerpo de control IIIB9F10 dirigido contra una proteína flagelar de *T. cruzi* (la Tc24). En la figura 4B, las curvas representadas respectivamente por los círculos blancos, los cuadrados blancos, los círculos negros y los cuadrados negros representan el efecto de IIIIG4 diluido al 1/20, de IIIB9F10, de IIIIG4 diluido al 1/40 y de un control.

25
Figuras 5A y 5B

La figura 5A representa la variación con respecto a los parásitos salvajes (en porcentaje, eje de las ordenadas) de la cantidad de parásitos en fase G0/G1 (1), en fase S (2) o en fase G2/M (3) para unos parásitos que sobreexpresan la proteína SIR2 de *L. major* (columna blanca), o que tienen una copia inactivada del gen *SIR2* (*LiSIR2/LiSIR2::NEO*) (columna negra).

30
La figura 5B representa el porcentaje de parásitos en apoptosis para unos parásitos salvajes (1), que tienen una copia inactivada del gen *SIR2* (*LiSIR2/LiSIR2::NEO*) (2) o que sobreexpresan la proteína SIR2 de *L. major* (3), en presencia de Sirtinol con $25 \mu\text{g/l}$ (inhibidor de SIR2) y de YOPRO-1 (marcador de apoptosis, Idzioreck *et al.* (1995) *J. Immunol. Methods* 185:249-258).

35
Figuras 6A y 6B

La figura 6A representa la reducción de la incorporación de uracilo tritiado (eje de las ordenadas, en porcentaje) en unos macrófagos derivados de la línea TPH1 infectados por unas cepas mutantes independientes de tipo *LiSIR2/LiSIR2::NEO* (columnas blancas y negras) con respecto a unos macrófagos infectados por una cepa salvaje.

45
La figura 6B representa la carga parasitaria en el bazo de ratones BALB/c infectados (eje de las ordenadas, log del número de parásitos por gramo), mediante una cepa de *L. infantum* salvaje (rombos negros), o bien mediante una cepa de *L. infantum* para la cual se ha inactivado una copia del gen *SIR2* (*LiSIR2*+/- cuadrados blancos), en función del tiempo (eje de las abscisas, en semanas), se observa una reducción progresiva de la carga parasitaria en los ratones infectados por los clones mutantes, y no se ha podido detectar ningún parásito vivo 6 semanas después de la infección.

50
Figura 7

La figura 7 representa la carga parasitaria en el bazo de ratones BALB/c infectados (eje de las ordenadas, log del número de parásitos por gramo) mediante una cepa de *L. infantum* salvaje (barra negra), o bien mediante una cepa de *L. infantum* para la cual se ha inactivado una copia del gen *SIR2* (*LiSIR2*+/- barra blanca), y después re infectados después de 6 semanas mediante una cepa de *L. infantum* salvaje. La carga parasitaria se determina 6 semanas después de la reinfección. Se observa una reducción significativa de la carga parasitaria en los ratones que han sido primo-infectados por los clones mutantes.

Ejemplos

60
La presente invención se desprende de la demostración por parte de los inventores del carácter virulento del gen *SIR1* en los protozoos de la familia de las *Trypanosomatidae*.

Ejemplo 1

65
Obtención de una cepa de *Leishmania infantum* para la cual el gen *SIR2* está inactivado

1. Desactivación del gen *SIR2* de *L. infantum* (*LiSIR2*)

Se inactivó el gen único *LiSIR2* en el parásito mediante recombinación homóloga.

- 5 Las cepas promastigotas de *L. infantum* (clon MHOM/67/ITMAP-263) y los clones mutantes que se derivan de las mismas se obtuvieron mediante dilución límite y cultivo a 26°C en un medio SDM-79 (Brun *et al.* (1979) Acta Trop. 36: 289-292) suplementado con 10% de suero de ternero fetal inactivado a 56°C, 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomina, y 10 µg/ml de neomicina (G418) durante un periodo de selección de los clones recombinantes. Las poblaciones clonales de amastigotes axénicos se han mantenido a 36 +/- 1°C en presencia de 5% de CO₂ en un medio acelular MAA/20 (Serenio *et al.* (1997) Antimicrob. Agents Chemother. 41:972-976).

Se ha cribado un banco de ADN genómico de *L. infantum* con la sonda que tiene la secuencia del gen *SIR2* de *L. major* con el fin de aislar un gran fragmento genómico que contiene el gen *LiSIR2* y sus regiones flanqueantes.

- 15 Brevemente, se amplificó el gen *SIR2* de *L. major* (Yahiaoui *et al.* (1996) Gene 169:115-8) mediante PCR utilizando dos cebadores específicos *LmSIR2-A* (5'-gaattcGATATGACAGGGTCTCCG-3') (SEC ID nº 1) y *LmSIR2-B* (5'-ctcgagCAGTCACCATGTTGGCAG-3') (SEC ID nº 2). El fragmento amplificado de 1200 pb obtenido se clonó en el vector pCR2.1 utilizando el kit de clonación comercial "TA cloning kit" (Invitrogen). El fragmento radiomarcado con $\alpha^{32}\text{P}$ dCTP se utilizó para cribar el banco genómico de *L. infantum* utilizando unos protocolos estándares (Yahiaoui *et al.* (1996) Gene 169:115-8) bien conocidos por el experto en la materia. Se analizaron unos clones positivos mediante unas enzimas de restricción y se analizaron según el método de transferencia de Southern utilizando la misma sonda radiomarcada. Un fragmento de 6 kb generado por la enzima *Hind* III que tiene el gen *LiSIR2* se subclonó en el plásmido pUC18 (designación: pUC-SIR) y se secuenció. La determinación de los cuadros de lectura permitió identificar una secuencia nucleotídica de 1119 pb (SEC ID nº 3) que codifica una proteína de 373 aa que muestra 93% de similitud con el gen *LmSIR2* de *L. major*. Esta secuencia se sometió a Genbank bajo el código AF487351. Una representación esquemática del alelo salvaje que tiene el fragmento de 6 kb se da en la figura 1A. Se ha abierto el plásmido pUC-SIR mediante la enzima *Cla* I que tiene un sitio único en el gen *LiSIR2* y se ha tratado sucesivamente por la nucleasa de judía mungo y la fosfatasa con el fin de generar unos extremos francos desfosforilados. El casete que contiene el gen que codifica para la neomicina fosfotransferasa (*NEO*) utilizado para la construcción del vector para la desactivación se derivó de la construcción pSP *Yneo* (Papadopoulou *et al.* (1994) J. Biol. Chem. 269:7310-7315). El casete *NEO* bajo el control de las regiones ricas en bases pirimídicas se aisló mediante una digestión por *Bam* HI-*Bgl* II y tratado por la polimerasa de Klenow para generar extremos francos. El gen de resistencia a la neomicina se integró entonces en el sitio único *Cla* I presente en la secuencia que codifica *LiSIR2* (figura 1B). La construcción linealizada por *Hind* III se ha electroporado después en los promastigotes de la fase de crecimiento logarítmico del clon salvaje *L. infantum* MON1 (clon: MHOM/67/ITMAP-263). Después de la selección, los parásitos obtenidos se clonaron mediante dilución límite y se caracterizaron.

- 40 Brevemente, se transfectaron los promastigotes mediante electroporación con 1 µg de ADN linealizado purificado sobre gel de agarosa tal como se ha descrito anteriormente (450 V.cm⁻¹ 450 µF) (Vergnes *et al.* (2002) Gene 296:139-50). En un primer momento, los promastigotes se incubaron en 5 ml de medio SDM-79 sin adición de antibiótico de selección durante 24h. Después de esta etapa, se añadió el antibiótico neomicina (G418) en el medio de cultivo a razón de 10 µg/ml durante dos semanas. Los parásitos obtenidos se clonaron mediante el método de dilución límite en presencia de 10 µg/ml de G418.

45 2. Caracterización molecular de los mutantes *LiSIR2*+/-

- La desactivación de un alelo del gen *LiSIR2* se realizó integrando la construcción que contiene el gen de resistencia a la neomicina (mutante *LiSIR2*+/- o *LiSIR2/LiSIR2::NEO*). La transferencia Southern revela en todos los clones recombinantes la presencia de un alelo salvaje de 4 kb y dos fragmentos suplementarios de 2,8 kb y 2,5 kb que corresponden al alelo *LiSIR2::NEO*, de acuerdo con el perfil de restricción obtenido por *Pst* I (figuras 1A, 1B y 2A).

3. Caracterización fenotípica de los parásitos mutantes *LiSIR2*+/-a. *LiSIR2* es indispensable para la multiplicación de las formas amastigotas axénicas

- 55 Para estudiar el efecto de la desactivación de un alelo del gen *LiSIR2* sobre la proliferación de los parásitos en cultivo axénico, los inventores realizaron unas cinéticas de crecimiento en los dos estados parasitarios utilizando el yoduro de propidio como marcador de viabilidad. Las curvas de crecimiento del clon salvaje y de los mutantes se realizaron inoculando el medio de cultivo SDM-79 o MAA/20 con respectivamente 2.10⁶ ó 4.10⁶ promastigotes o amastigotes; los recuentos se realizaron a intervalos de 24h, tal como se ha descrito anteriormente (Vergnes *et al.* (2002) Gene 296: 139-50). La desactivación de un alelo del gen *LiSIR2* no afecta el crecimiento de los parásitos en forma promastigota (figura 3A). Se observa, por el contrario, en estos mismos parásitos en forma amastigota, una fuerte disminución de su capacidad para proliferar en cultivo con respecto a los parásitos salvajes (figura 3B).

- 65 Para confirmar la implicación directa del nivel de síntesis de *LiSIR2* en la capacidad de proliferación de los parásitos

en forma amastigota, se realizaron unas cinéticas de crecimiento de amastigotes salvajes (figura 4A) o que han perdido una copia del gen *LiSIR2* (figura 4B) en presencia del anticuerpo monoclonal IIIIG4 (Vergnes *et al.* (2002) Gene 296:139-50) dirigido contra la proteína LmSIR2. Se utilizó como control un anticuerpo monoclonal IIIB9F10 (Ouasssi *et al.* (1992) Biol. Cell. 75:11-17) del mismo isotipo dirigido contra la proteína Tc24 de *Trypanosoma cruzi*. La adición del anticuerpo IIIIG4 a la dilución 1/20 ralentiza considerablemente el crecimiento de los parásitos salvajes, con la aparición de una fase de latencia muy prolongada. Los mismos parásitos en presencia de IIIB9F10 a una concentración idéntica tienen una cinética de crecimiento comparable a la del clon salvaje (figura 4A). El mismo experimento realizado con un clon parasitario desprovisto de una copia del gen *LiSIR2* (clon *LiSIR2*^{+/-}) muestra que el anticuerpo IIIIG4 utilizado al 1/20 bloquea totalmente la proliferación y mata los parásitos. El mismo anticuerpo diluido al 1/40 o el IIIB9F10 diluido al 1/20 no modifican la cinética de crecimiento de los amastigotes con respecto al clon control *LiSIR2*^{+/-}. La acción de IIIIG4 parece ser por lo tanto dosis-dependiente, lo cual sugiere que la proteína LiSIR2 sea indispensable a los amastigotes para multiplicarse.

b. La desactivación de un alelo del gen *LiSIR2* bloquea los parásitos en fase G0/G1 del ciclo celular

Para conocer el modo de acción de LiSIR2 en las formas amastigotas, se realizaron unos estudios del ciclo celular sobre los parásitos mutantes que tienen diferentes niveles de expresión de la proteína LiSIR2 con respecto a los parásitos salvajes. Los clones inactivados *LiSIR2*/*LiSIR2*::*NEO* no poseen un fuerte porcentaje de células bloqueadas en fase G0/G1 del ciclo (figura 5A). En cambio, se observa un enriquecimiento de las células en fase G2/M en los parásitos que sobreexpresan la proteína LmSIR2 (clon pTEX-LmSIR2).

Se realizaron otros experimentos utilizando el Sirtinol (Calbiochem), que es un inhibidor específico de las proteínas SIR2. Se observa a una concentración de 25 µg/ml un enriquecimiento de los parásitos en fase G0/G1 con la aparición en el clon 2 de un pico pre-G0/G1 que corresponde a la fragmentación del ADN genómico observada durante la fase final de la apoptosis. Los clones salvajes y sobreexpresantes presentan unos fenotipos respectivamente intermedios. La utilización de YOPRO-1, un marcador de apoptosis (Idzioreck *et al.* (1995) J. Immunol. Methods 185: 249-258), sobre estos mismos parásitos en presencia de Sirtinol muestra que el nivel de expresión de la proteína LiSIR2 es directamente proporcional al porcentaje de apoptosis observado en los parásitos (figura 5B).

Ejemplo 2

Virulencia atenuada de los parásitos mutantes *in vitro*

La virulencia de varios clones que han perdido un alelo del gen *LiSIR2* se determinó *in vitro* comparando el nivel de incorporación de Uracile ³H entre unos macrófagos infectados por unos parásitos salvajes e infectados por las cepas mutantes. La infección de los macrófagos derivados de la línea THP1 por unos amastigotes se realizó de forma rutinaria tal como se ha descrito anteriormente (Serenio *et al.* (1998) Antimicrob. Agents Chemother. 42:3097-3102). Se observa en todos los clones analizados *LiSIR2*/*LiSIR2*::*NEO* una reducción significativa de aproximadamente 50% del nivel de incorporación con respecto a los parásitos salvajes (figura 6A).

Ejemplo 3

Virulencia atenuada de los parásitos mutantes *in vivo*

La virulencia de estos parásitos se determinó asimismo *in vivo* midiendo la carga parasitaria en el bazo de ratones BALB/c infectados por el clon *L. infantum* salvaje (WT) o bien por un clon desprovisto de una copia del gen *LiSIR2* (*LSIR2*^{+/-}).

Se infectaron unos ratones machos de 7 semanas de edad (Harlan Iberica, España) por vía intraperitoneal (i.p.) con 10⁸ promastigotes del clon mutante en el que se inactivó una copia del gen *LiSIR2* (*LiSIR2*^{+/-}), como control, y se infectaron unos ratones de misma edad y sexo por vía intraperitoneal (i.p.) con 10⁸ promastigotes del clon salvaje. Los bazos extraídos de los dos grupos de ratones se homogeneizaron y se sometieron a una dilución seriada (1 a 4.10⁻⁶) en placas de microtitulación de 96 pocillos. Después de 15 días de incubación a 26°C, se registró la presencia o ausencia de promastigotes en los pocillos de cultivo. El título es la última dilución que permite objetivar un parásito por pocillo. El número de parásitos por gramo de tejido (carga parasitaria) se calcula como sigue:

Carga parasitaria = (media geométrica de la inversa del título de cada pocillo por triplicado/peso del homogenado de bazo) x la inversa de la fracción del homogenado de bazo inoculado en el primer pocillo de la placa de cultivo.

A pesar de que los clones *LiSIR2*^{+/-} sean infecciosos (carga parasitaria sustancialmente idéntica en los dos casos después de dos semanas de infección), se observa una reducción progresiva de la carga parasitaria en los ratones infectados por los clones mutantes, y no se ha podido detectar ningún parásito vivo 6 semanas después de la infección (figura 6B), lo que hace de estos clones unas cepas particularmente adaptadas para la preparación de una vacuna viva atenuada.

Ejemplo 4

Vacunación de ratones mediante los parásitos mutantes

5 Se utilizaron los clones *LiSIR2+/-* con el fin de proceder a ensayos de vacunación de ratones BALB/c.

Se infectó un grupo de ratones machos de 7 semanas de edad (Harlan Iberica, España) (n = 3) por vía intraperitoneal con 10^8 promastigotes del clon mutante, en el que se desactivó una copia del gen *LiSIR2* (*LiSIR2+/-*). Como control, se infectó otro grupo de ratones (n = 4) de mismo sexo y edad con 10^8 promastigotes del clon salvaje.

10 Al cabo de 6 semanas, los animales de cada grupo recibieron una infección de prueba de 10^8 promastigotes del clon salvaje.

Después, 6 semanas más tarde, se midió la carga parasitaria tal como se ha descrito en el ejemplo 3.

15 Los resultados obtenidos (figura 7) indican que la carga parasitaria media es de aproximadamente 20.000 parásitos por gramo de tejido para el grupo de ratones que han recibido una inyección del clon *LiSIR2+/-* y de aproximadamente 440.000.000 parásitos por gramo de tejido para el otro grupo. Esto confirma el potencial de vacunación de las cepas *LiSIR2+/-* de la invención.

20 Por otra parte, se estudió asimismo el efecto protector inducido por unos parásitos *LiSIR2+/-* inactivados, es decir muertos, por el glutaraldehído.

25 Por último, se realizaron asimismo unos experimentos de vacunación similares a los descritos anteriormente, implicando un número más grande de ratones (n = 12), o bien con los clones mutados, o bien con los clones mutados inactivados, con el fin de medir diferentes parámetros después de la infección, tal como la carga parasitaria, la producción de anticuerpos antiparásitos (clase y sub-clase), los niveles de proliferación celulares, así como el perfil de secreción de las citoquinas.

30 **Listado de secuencias**

<110> INSTITUT POUR LA RECHERCHE ET LE DEVELOPPEMENT

35 <120> CEPAS DE PROTOZOO DE VIRULENCIA ATENUADA Y SU UTILIZACIÓN

<130> WOB 03 BZ IRD LEIS

<160> 6

40 <170> PatentIn versión 3.1

<210> 1

<211> 24

<212> ADN

45 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador PCR

50 <400> 1

gaattcgata tgacagggtc tccg 24

<210> 2

55 <211> 24

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

60 <223> Cebador PCR

<400> 2

ctcgagcagt caccatgttg gcag 24

65 <210> 3

ES 2 393 610 T3

<211> 1122
 <212> ADN
 <213> *Leishmania infantum*

5 <400>

atgacagcgt ctccgagagc gccacatcag gagcatgtcc tcggagagcc gaccttgaa 60
 gggcttgccg actacatcag ggagaagaat gtgcggcgca ttctcgtgct cgtcggagca 120
 ggcgccagt tagctgccgg catcccagac ttctcgtcac ctgacaccgg gatctacgcc 180
 aacctcggca agtacaacct cgaagaccgg accgatgcct ttctactgac ccttctgcgc 240
 gagaagccag agatattcta ctctatcgca cgggagctga acttgtggcc tgggcacttt 300
 cagcccaccg cgggtacatca ctctatccga ctgttgcaag acgagggcgg tctcctgcgc 360
 tgctgcacgc agaacattga cggcctggag aaggcagcgg gcgtgtcgcc ggagctcctc 420
 gtcgagggcg atgggtcttt cgtcgtcgtc gcctgcattg aatgccacac accattcagc 480
 attgagcaga actacctgga ggcgatgagc ggtacgggtct cccgctgctc tacatgcggc 540
 ggcattgtga agcccaacgt cgttttcttt ggtgaaaatt tgccggacgc gttcttcgac 600
 gcgctgcacc acgacgcccc gatcggcgag ctggtcatca tcatcgggac atcgatgcag 660
 gtgcaccctg tcgcgttgct gccgtgcgtc gtgcccgaat cagtcgccgg cgttctcatg 720
 aaccgtgagc gagttggcgg cctcctcttc cgctttcctg atgaccggct caacaccgct 780
 cagcaggatg cgggtgcca ggagggacgc tcgtcctctt cgcagagtcg tccccgctcc 840
 gcgtcgccac ggcgcgagga ggggggaaca gaggacagcc cctcgtcgcc aaacgaggag 900
 gtcgaagagg cgtcgacgtc cagctcgagc gacggctacg ggcagtagcg tgactaccac 960
 gcccaccccg atgtctgccc ggatgttctc ttccgcgggc actgccagga gaacgtggtg 1020
 acgctggcgg agtacctggg tctgagcgag gcgctggcaa agcgcagtcg cttatccgat 1080
 gcagcaccag ctactgcaca gagggcggcg aatgagacgt ga 1122

<210> 4
 <211> 1146
 <212> ADN
 <213> *Leishmania major*

10

<400>

15

atgacagggc ctccgagagc gccgatcag gaacatgccc tcggagagcc gactgtggaa 60
 gggcttgccg gctacatcag ggagaaggat gtgcggcgca ttctcgtgct cgtcggagca 120
 ggcgccagcg tagctgccgg catcccagac ttctcgtcat ctgacaccgg gatctacgcc 180
 aagctcggca agtacaacct cgacgaccgg accgatgcct ttctcgtgac tcttctgcgc 240
 gagaagccag agatattcta ctctatcgca cgggagctga acttgtggcc tgggcacttt 300
 cagcccaccg cgggtcatca ctctatccga ctggtgcaag acgagggcgg tcttctgcgc 360
 tgctgcacgc agaacattga tggctctggag aaggcagcgg gcgtgtcgcc ggagctcctg 420
 gtcgagggcg atgggtcttt cgtcggcgcc gcctgcattg aatgccacac gccattcagc 480
 attgagcaga actacctgga ggcgatgagc ggcacgggtg cccgctgctc tacatgcggc 540
 ggcattgtga agcccaacgt cgttttcttt ggtgaaaatt tgccggacgc gttcttcgac 600
 gcgctgcacc acgacgcccc gatcggcgag ctggtcatca tcatcgggac atcgatgcag 660
 gtgcaccctg tcgcgttact gccgtgcgtc gtgcccgaat ccatcccgcg cgttctcatg 720
 aaccgcgagc gagttggcgg cctcctcttc cgctttcctg atgaccggct cgacaccatc 780

ES 2 393 610 T3

cacgacgatg cggttgccaa ggaggggacgc tcgtcctctt cgcagagccg ttccccgtcc 840
 gcgctcgggc ggcgcgagga gggggggacg gaggacggct cctcgtcgcc gaacgaggag 900
 gtcgaagacg cgtcgacgtc cagttcgagt gacggctacg gtcagtagcg tgactactac 960
 gccacccccg atgtctgccg ggatgttttc ttccgcgggc actgccagga gaacgtgctg 1020
 aagctggccg agtgccctggg cctcagggag gcgctggcca agcagtagcg ttctccgggtg 1080
 cggcaccagc tacggcacga aagacgtcga atgagacgtg agtctgaatt gctgccaaca 1140
 tgggtga 1146

<210> 5

<211> 775

5 <212> ADN

<213> *Leishmania amazonensis*

<400> 5

ccctccaacc tagcaagtac aacctcgacg acccgaccga cgccttttca ctgacccttc 60
 tgcgggagag acccgagata ttctactcga tcgcacggga gctgaacttg tggcctgggc 120
 actttcagcc caccocggta catcaactca tccgactgtt gcaagatgag ggtcgtctac 180
 tgcgctgctg cacgcagaac attgacggcc tggagaaggc cgcgggctg tcgccagagc 240
 tcctcgtcga ggcacatggg tcttttctg cgcgcgctg cattgaatgc cacacgccat 300
 tcagcattga gcagaactac ctggaggcga tgagcggtag ggtctcccgc tgetctacat 360
 gcggcggaaat tgtaaaacca aacgttgttt tcttcggtag aaatttgccg gacgctttct 420
 tcgacgcgct acaccacgat gccccgatcg cggagctgac tatcatcatc gggacatcga 480
 tgcaggtgca cccgttcgcg ctgctgccgt gcgctcgtgcc caagtcagtc ccgcgcgctg 540
 tcatgaaccg cgagcgagtt ggtggcctcc tcttcgctt tcctgatgac ccgctgaaca 600
 ctgtccacga cgatgcggtt gccaaaggag gtcaatcgtc ttcttcgag agtcgttccc 660
 catccgcgtc ggcgcggtgc gagaaggag gggtagagga cagatcttca tcgccgaagg 720
 10 aggaggtcga cgaagcgtcg acgtccggct cgagcgacgg ctacgggag tacgg 775

<210> 6

<211> 1056

15 <212> ADN

<213> *Trypanosoma brucei*

<400> 6

atgacagaac cgaagttagc aaccacgcac gtagtgggtg aaccacactt cgaaggactg 60
 gcacggttca ttgagcgaaa caacatcacc aaaatatttg ttatgggtggg cgcagggata 120
 agcgttgtag ctggaatccc cgacttccgc tctccccaca ccggttgta cgctaaactc 180
 agtcgctaca atctcaactc accggaggac gccttctcac tccctctctt gcgtcaaaaa 240
 ccaagtgtgt tttacaacat tctgatggat atggacctct ggcccgggaa gtattgtcct 300
 acgacggttc accactttat cagtctactc gccaaaggag gcatgttatt atgctgttgt 360
 acgcagaaca tagacgggtt ggaacgcgcc tgcggaattc cagagctctt actagttgaa 420
 gcccatggtt ctttctcttc cgcacatcatgt gttgactgtc acgcgaaata tgacatcaac 480
 20 atcgcgaggg cggagacaag ggctggaaaa gtgcctcatt gcaatcaatg tgggtgtata 540

ES 2 393 610 T3

```
gtgaaacccg acgtggtttt ctttggcgag aatctcccgg aggcgttttt taacgtagcg 600
ggactcattg aggaaacgga attgctgctt attttgggaa cctcacttca agtccacca 660
tttgccgacc ttgcgctcat ggtgccctct gacgtgccac gagtgttgtt taacttggag 720
cgtgtgggcy ggaggatgtt ccgctttcct acggaccgaa cacccaattt ccgcgccagt 780
tcctatcgtc tcagcactgg aaatggcaat ggcagtaaaa ttagcagtgg ggacagcagc 840
agcagcagca gcgtcgacgg gtatgaccag tttacgctcg cagagaatga cgagacgggt 900
gtgttgcytg acattttctt tcctggtgac tgtcaggtgt ctgttcgttc ctttgcctag 960
gcgttgggct tcggagagca gcttgacgcc tctgtacgtg agggaaggga aatatttgag 1020
cgcactcggc gtagggaaaa agtcgttgag ggttaa 1056
```

REIVINDICACIONES

- 5 1. Cepa de protozoo de la especie *Leishmania infantum* cuya virulencia es inferior a la de la cepa salvaje correspondiente, caracterizada porque se inactiva una sola copia del gen *SIR2* presente en el genoma de dicha cepa.
2. Composición inmunógena, caracterizada porque comprende una cepa según la reivindicación 1.
- 10 3. Composición farmacéutica, en particular vacunal, que comprende a título de sustancia activa una cepa según la reivindicación 1 en asociación con un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 15 4. Composición farmacéutica, en particular vacunal, según la reivindicación 3, que comprende además por lo menos un adyuvante, tal como una cepa de *Mycobacterium vaccae* o BCG, alúmina, lípido A monofosforilado, o interleucina 12.
5. Composición farmacéutica, en particular vacunal, según la reivindicación 3 ó 4, que conviene para la administración de una dosis unitaria de aproximadamente $5 \cdot 10^4$ a aproximadamente $5 \cdot 10^7$ protozoos por kg.
- 20 6. Composición farmacéutica, en particular vacunal, según una de las reivindicaciones 3 a 5, que comprende asimismo uno o varios compuestos que se pueden utilizar para la prevención y/o el tratamiento de las enfermedades relacionadas con una infección por un protozoo, tales como las enfermedades por tripanosomas y las leishmaniasis, tales como:
- 25 - la miltefosina, los antimoniales, la anfotericina B, el benznidazol, el nifurtimox, la pentamidina y sus derivados, los derivados arsénicos, el melarsopol y la difluorometilornitina,
- unos protozoos, en particular del género *Trypanosoma* o *Leishmania*, inactivados o de virulencia atenuada por desactivación de un gen diferente de *SIR2*,
- 30 - unos antígenos de protozoos, tales como las proteínas gp46, gp63, LACK, TSA, STI1, Hsp80, SLA, FPA, 1G6, 4H6, GBP, CPA, CPB, LelF, A2 o el lipofosfoglicano, o
- unas secuencias de ácidos nucleicos que codifican para dichos antígenos proteicos de protozoos.
- 35 7. Producto que comprende:
- por lo menos una cepa según la reivindicación 1, y
 - por lo menos una composición que se puede utilizar para la prevención o el tratamiento de las enfermedades relacionadas con una infección por un protozoo, tales como las enfermedades por tripanosomas y las leishmaniasis, tales como:
- 40 - la miltefosina, los antimoniales, la anfotericina B, el benznidazol, el nifurtimox, la pentamidina y sus derivados, los derivados arsénicos, el melarsopol y la difluorometilornitina,
- 45 - unos protozoos, en particular del género *Trypanosoma* o *Leishmania*, inactivados o de virulencia atenuada por desactivación de un gen diferente de *SIR2*,
- 50 - unos antígenos de protozoos, tales como las proteínas gp46, gp63, LACK, TSA, STI1, Hsp80, SLA, FPA, 1G6, 4H6, GBP, CPA, CPB, LelF, A2 o el lipofosfoglicano, o
- unas secuencias de ácidos nucleicos que codifican para dichos antígenos proteicos de protozoos,
- 55 como producto de combinación para una utilización simultánea, separada o espaciada en el tiempo para la prevención y/o el tratamiento de las enfermedades relacionadas con una infección por un protozoo, tales como las enfermedades por tripanosomas y las leishmaniasis.
8. Utilización de una cepa según la reivindicación 1, para la preparación de un medicamento, en particular una vacuna, destinado a la prevención y/o el tratamiento de las leishmaniasis.

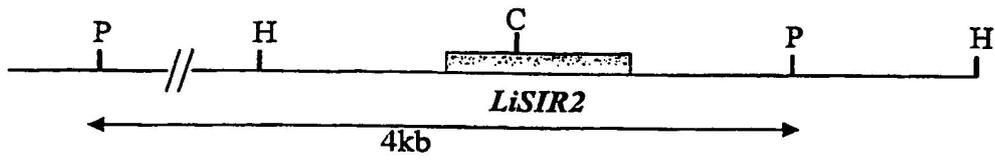


FIGURA 1A

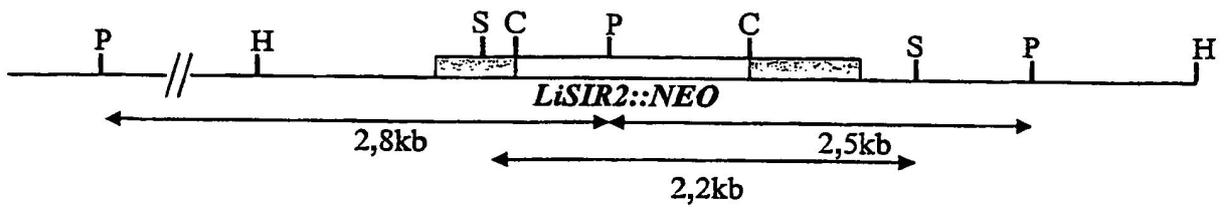


FIGURA 1B

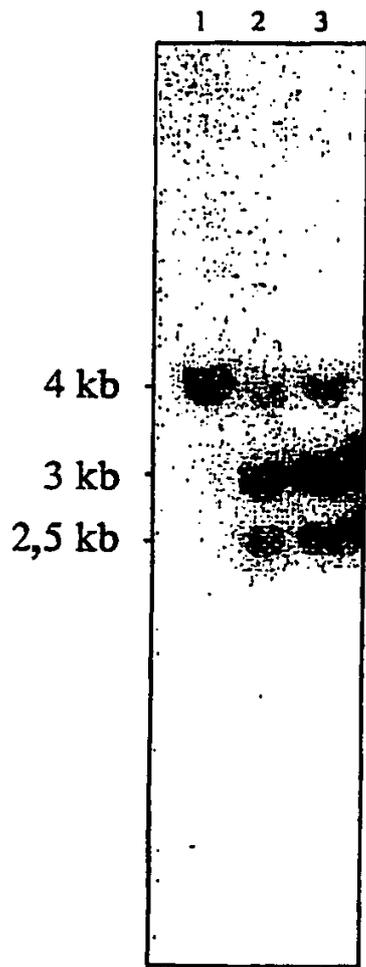


Figura 2A

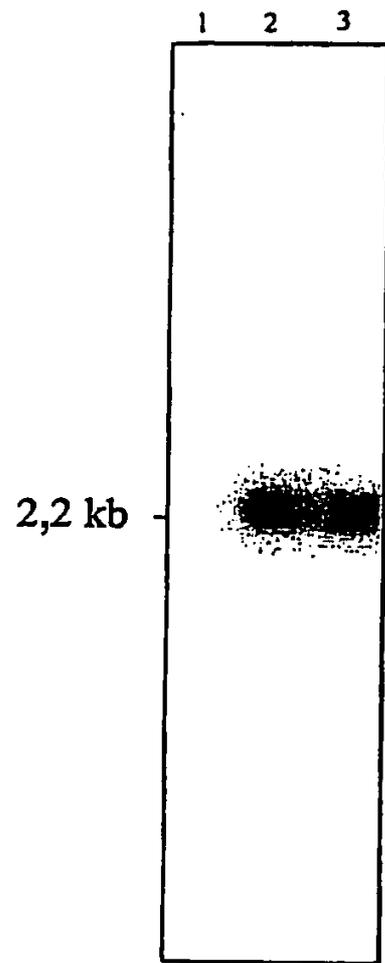


Figura 2B

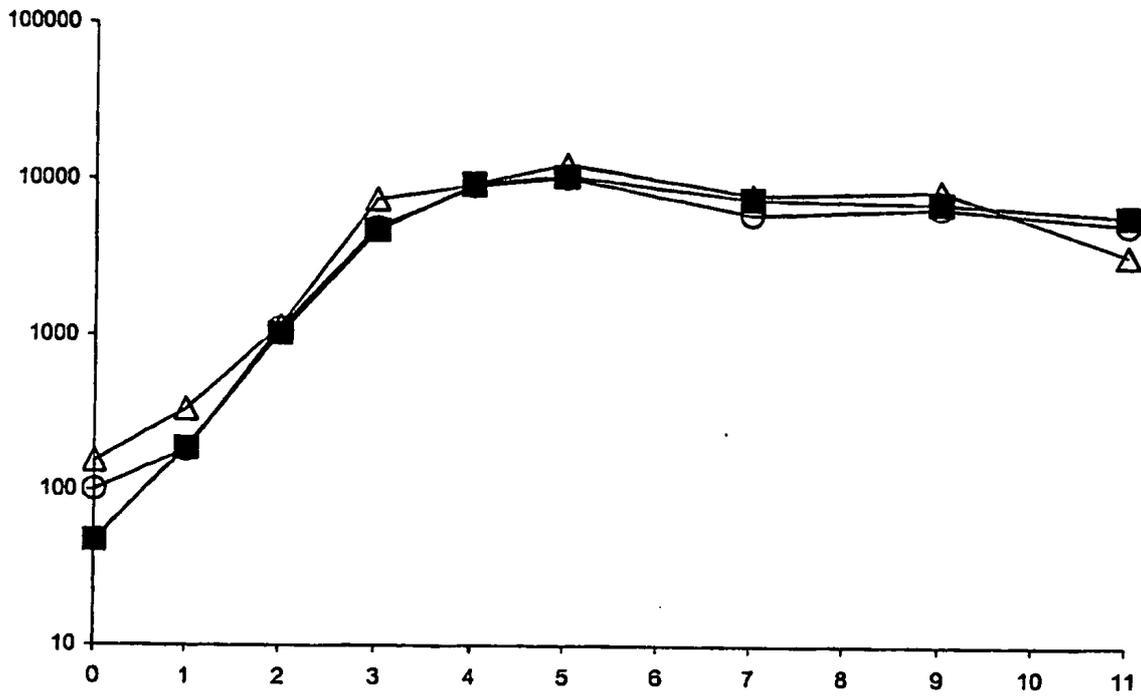


Figura 3A

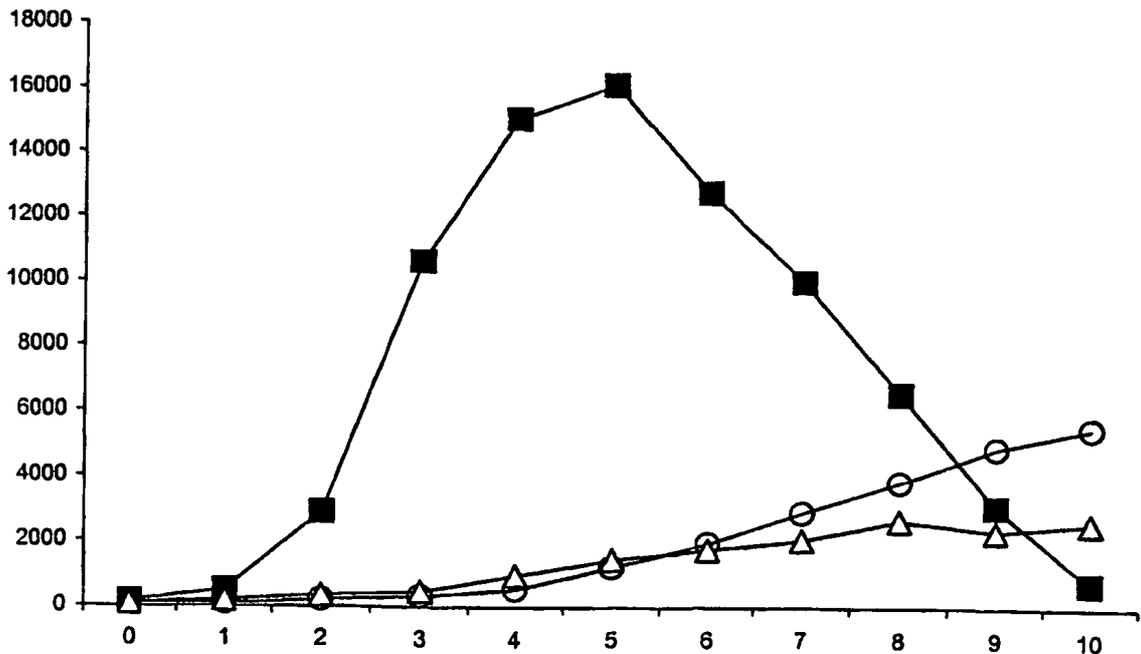


Figura 3B

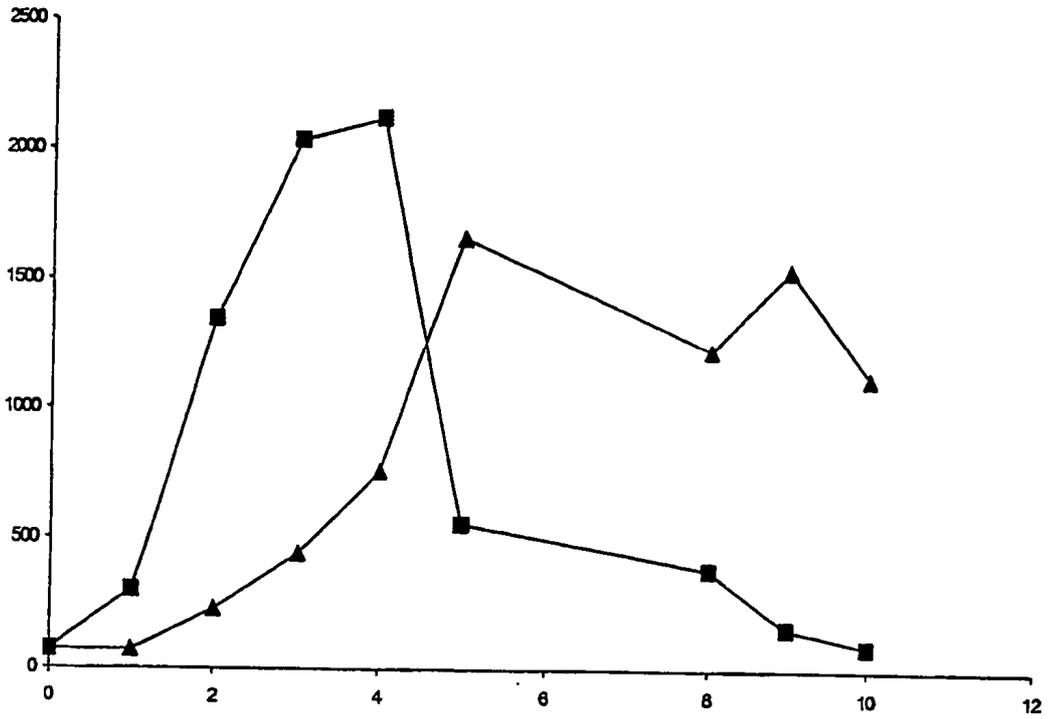


Figura 4A

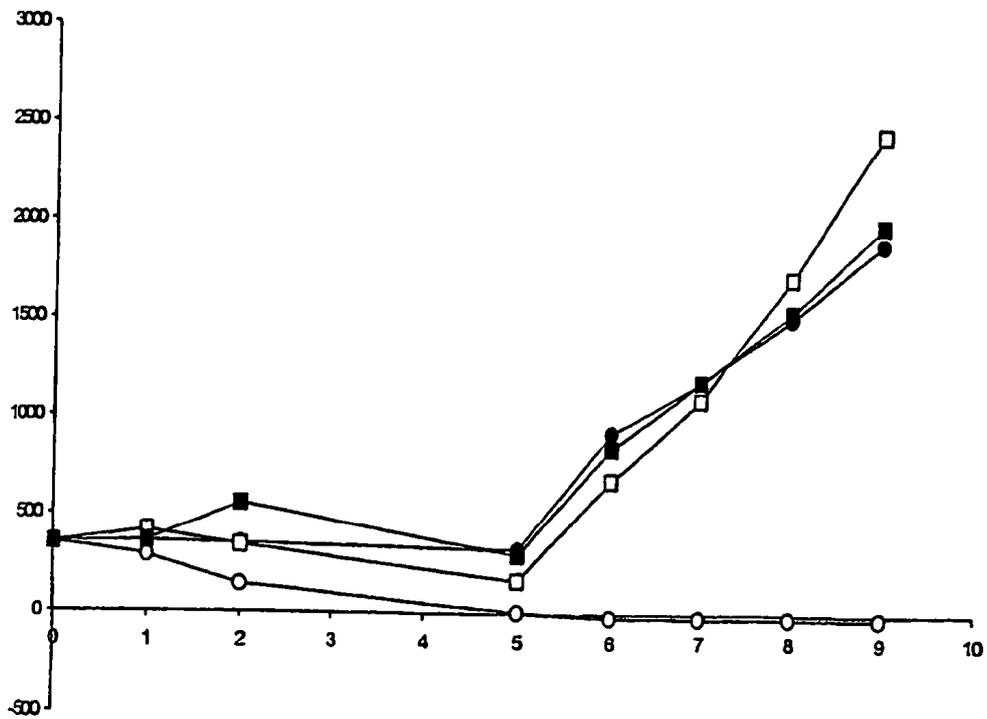


Figura 4B

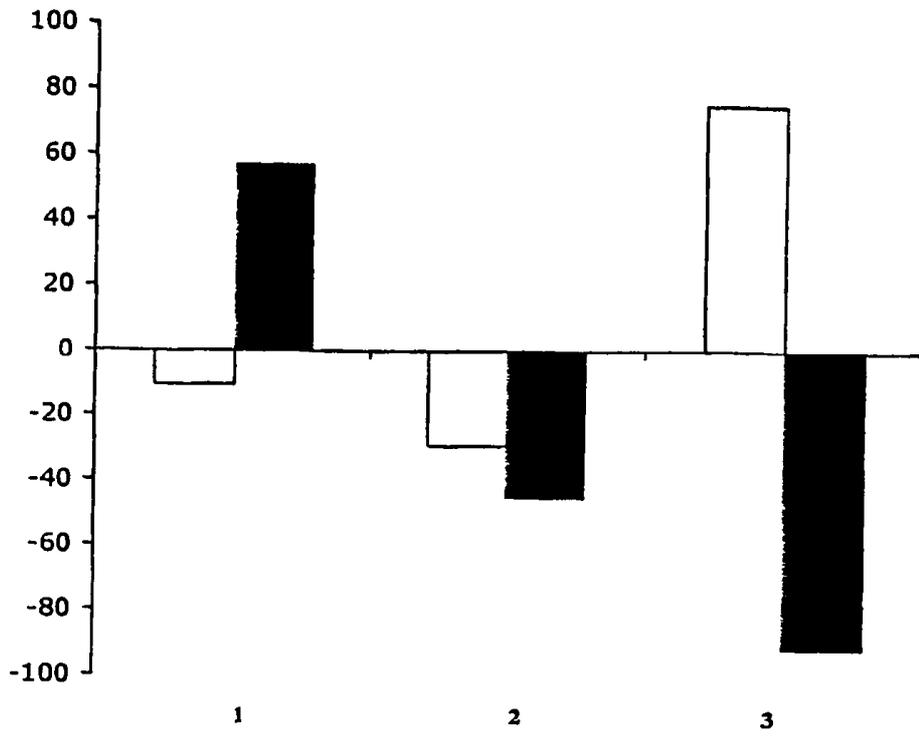


Figura 5A

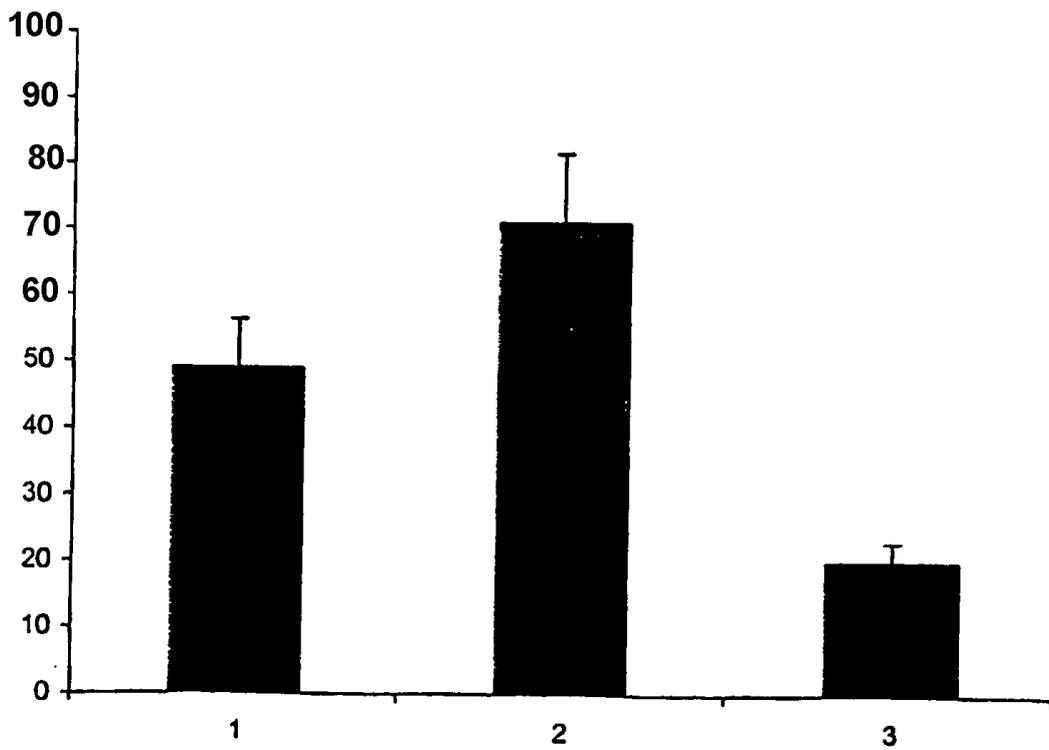


Figura 5B

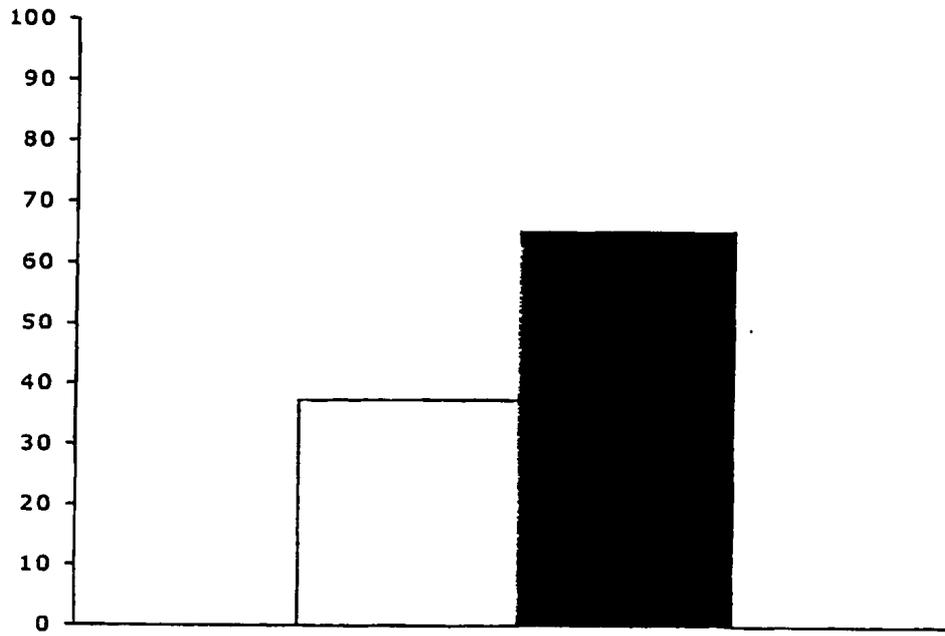


Figura 6A

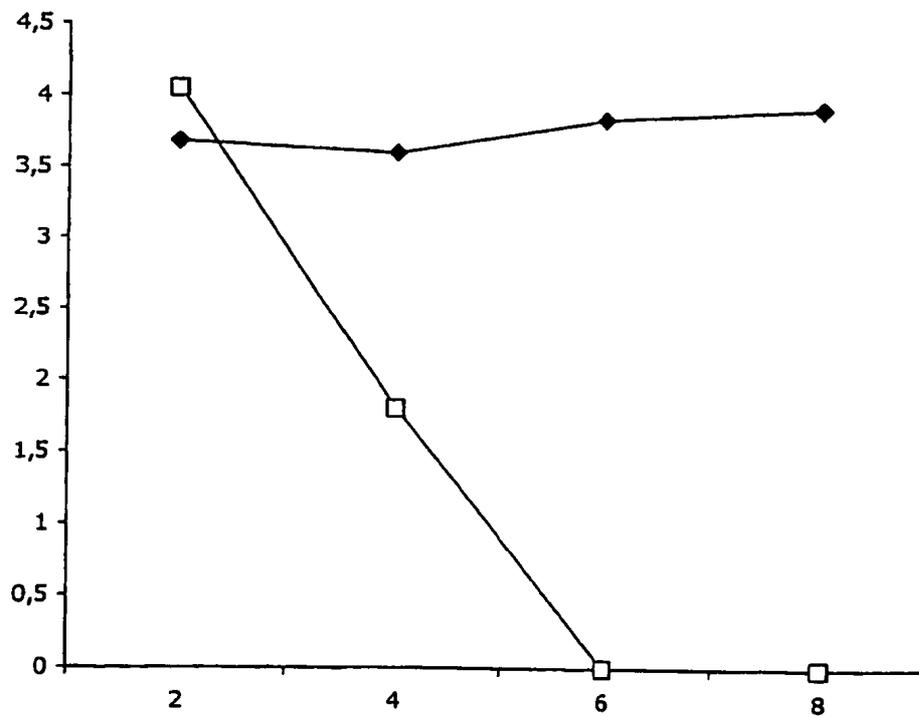


Figura 6B

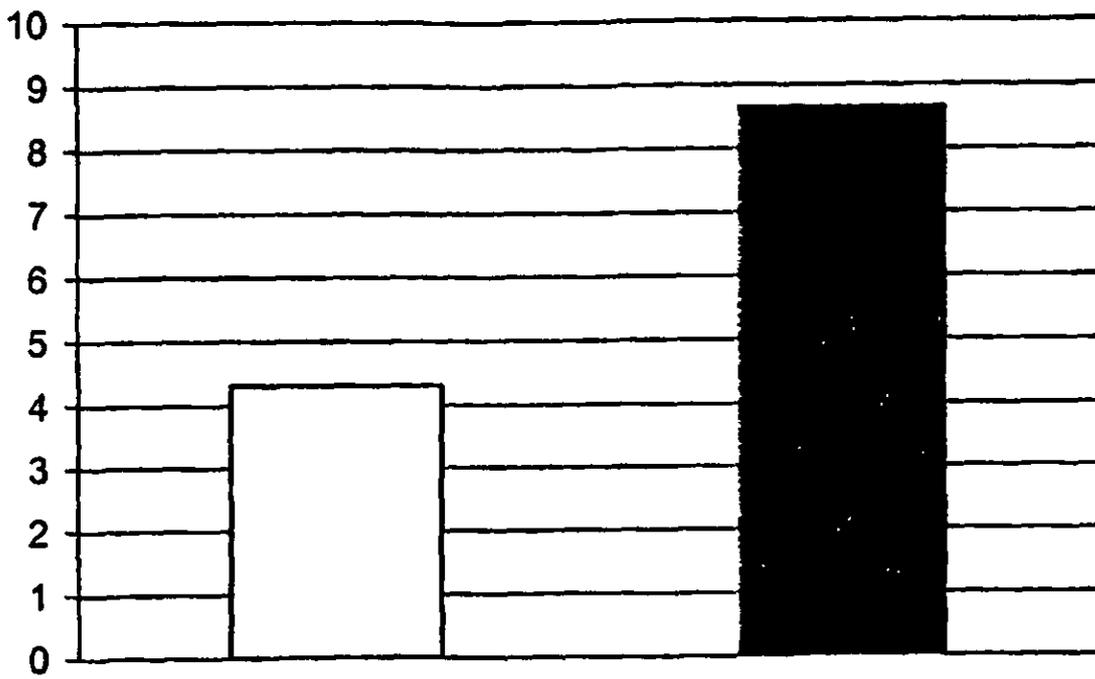


Figura 7