

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 395 923**

51 Int. Cl.:

A61K 39/008 (2006.01)

A61K 39/015 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

A61P 33/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.11.2004** **E 04799038 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.10.2012** **EP 1687023**

54 Título: **Uso de histonas específicas para el tratamiento de enfermedades parasitarias**

30 Prioridad:

05.11.2003 WO PCT/EP03/12421

23.02.2004 WO PCT/EP2004/001782

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

18.02.2013

73 Titular/es:

LABORATORIOS LETI, S.L. (100.0%)

Calle del Sol, 5

28760 Tres Cantos, Madrid, ES

72 Inventor/es:

ALVAREZ, MANUEL SOTO;

IBORRA, SALVADOR;

REQUENA, JOSÉ MARIA y

BEDATE, CARLOS ALONSO

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

ES 2 395 923 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

Uso de histonas específicas para el tratamiento de enfermedades parasitarias

5 Campo de la invención

[0001] La presente invención se refiere al uso de histonas para el tratamiento, o prevención de una enfermedad de Leishmaniasis. En particular, se refiere al uso de las cuatro proteínas histonas H2A, H2B, H3 y H4 para este tipo de usos, donde la enfermedad de Leishmaniasis es causada por una especie de *Leishmania* diferente de la especie de la que se derivaron las histonas.

Antecedentes de la invención

[0002] Protozoos de *Leishmania* son parásitos intracelulares obligados que infectan células del linaje de fagocitos mononucleares de sus huéspedes vertebrados. Estos parásitos son los agentes etiológicos de leishmaniasis, un grupo de enfermedades caracterizado por una variedad de manifestaciones clínicas en seres humanos, que varían de úlceras cutáneas de autocuración a infección visceral potencialmente fatal (Herwardt, Lancet (1999) 354:1191). El desarrollo de la enfermedad y la extensión de la infección varían mucho de un individuo a otro individuo dependiendo del contexto genético y del estado del sistema inmunológico del huésped infectado.

[0003] Modelos de murina de leishmaniasis cutánea han sido usados ampliamente para explorar los requisitos para la vacunación eficaz. La administración de diferentes antígenos a ratones codificados en vacunas de ADN, resulta en la prevención de la enfermedad en algunos casos (revisado en Handman, Clin. MicroboL Rev. (2001) 14:229). Vacunas con ADN que codifica las proteínas GP63, LACK y PSA-2 protegió los ratones de infección por *L. major* (ver por ejemplo Xu et al, Immunology (1955) 84:173. Además, una inmunización con una combinación de plásmidos expresando el LACK de proteínas, LmST11 y TSA ha sido probada para ser altamente eficaz contra el desafío de dosis baja con *L. major* (Mendez et al. J. ImmunoL (2001) 166: 5122, mientras que un cóctel de dos plásmidos que codifican las proteinasas de cisteína CPa y CPb protegieron parcialmente ratones BALB/c contra el desafío de dosis alta con *L. major* (Rafati et al, Vaccine (2001) 19 (25-26): 3369). La mayor parte de los experimentos de protección se restringen al nivel de laboratorio y con modelos animales. Así, ya que hay escasos estudios de campo en animales huéspedes reales no hay una prueba definitiva de que los candidatos sean vacunas exitosas.

[0004] Hay que señalar que un antígeno que produce una buena titulación de anticuerpos, es decir que es inmunogénico, no está siempre y per se ofreciendo protección contra una enfermedad. Al contrario, mientras algún anticuerpo o respuestas celulares contra un antígeno pueden estar asociados a protección, otro anticuerpo o respuestas celulares contra el antígeno pueden estar asociados a susceptibilidad y/o exacerbación de la enfermedad. Además, un adyuvante es frecuentemente necesario para un efecto de protección, ya que los antígenos sin adyuvante pueden producir respuesta de anticuerpo, pero no ofrecer protección. Ver por ejemplo, Stacey and Blackwell (Infect Immun. 1999 Aug, 67(8):3719-26) que reportó que vacunación subcutánea de ratones con antígenos solubles de *Leishmania* (SLA) sólo, SLA más alumbre, o SLA más no oligodesoxinucleótidos (ODN) que contienen motivos de inmunoestimuladores de CG (CpG ODN) resultaron en la enfermedad exacerbada en comparación con ratones no vacunados. Ratones que recibieron SLA más CpG ODN mostraron un efecto de protección altamente significativo en comparación con ratones vacunados con SLA y una supervivencia mejorada en comparación con los ratones no vacunados.

[0005] La diversidad antigénica entre especies de *Leishmania*, implicando epítomos específicos de especies, puede ser una dificultad en el desarrollo de una vacuna a base antígenos individuales (Handman, 2001, vide supra). Vacunas de ADN conocidas sólo protegen contra las especies donde el ADN se obtuvo. Melby and colleagues reportaron en Infect Immun. (2000) 68: 5595 esa inmunización con una codificación de banco y sub-bancos de expresión de ADNc para proteínas de leishmania donovani ratones protegidos contra la forma VL de la enfermedad provocada por *L. donovani*. Gurunatan et al., J. Exp. Med. (1977) 186: 1137 reportó que vacunación con ADN que codifica el antígeno de parásito LACK inmunodominante (homólogo de leishmania de receptores de la kinasa C activada) de *L. major* confiere protección contra *Leishmania major*. Melby et al. Infect Immun. (2001) 69:4719 muestran que este antígeno no confiere protección contra *L. infantum* en ratones. También reportan que aunque la vacuna de ADN de *L. donovani* p36 (LACK) es altamente inmunogénica, no es protectora contra la leishmaniasis visceral experimental. Este fenómeno que una molécula inmunogénica no confiere protección es decir no lleva a eliminación de una infección o a liberación de síntomas clínicos, es uno de los desafíos de encontrar una buena vacuna. Si una molécula antigénica o inmunogénica siempre diera protección automáticamente, sería fácil encontrar una vacuna. Encontrar una vacuna que se pueda usar contra más de una especie es incluso más de un desafío.

[0006] Melby P.C. et al (Melby P.C. et al, Infection and Immunity, American Society for Microbiology, Washington, US, Vol 68, no.10, Octubre 2000, páginas 5595-5602) describe el uso de histonas H2B, H3 y H4 de *L. donovani* para la protección contra *L. donovani*.

[0007] Soto M. et al (Soto M. et al, J. Of Clin. Microbiol., (1998), vol 36: 58-63) describen el uso de una proteína quimérica recombinante, a saber PQ conteniendo fragmentos de H2A como una vacuna.

[0008] US 2003/138451 describe el uso de un polipéptido quimérico que comprende H2A con otro antígeno como una vacuna.

5 Descripción detallada

[0009] La presente invención se refiere al uso de las cuatro proteínas histonas H2A, H2B H3 y H4 para el tratamiento, o prevención de una enfermedad de Leishmaniasis, donde la enfermedad de Leishmaniasis es causada por una especie de Leishmania diferente que la especie de la que se derivaron las histonas.

[0010] La ventaja de la presente invención es que permite la preparación de un medicamento para el tratamiento de un espectro más amplio de enfermedades es decir un medicamento con especificidad de especies cruzadas. En muchas enfermedades parasitarias, como Leishmaniasis una vacuna dirigida contra una especie específica, funciona contra esa especie específica. Por el momento, la enfermedad se controla mediante fármacos, pero el tratamiento con medicamentos no previene la extensión de la enfermedad y en muchos casos no es muy eficaz.

[0011] En un aspecto de la invención, las histonas se usan para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento de una enfermedad de Leishmaniasis, donde la enfermedad de Leishmaniasis es causada por una especie de Leishmania diferente que la especie de la que se derivaron las histonas.

[0012] En una forma de realización de la invención, en esta composición farmacéutica, cada histona está presente en cantidades equimolares.

[0013] La composición farmacéutica de la invención se puede utilizar para aumentar la capacidad del sistema inmunológico humano o animal para combatir infecciones. En particular, se puede usar para administración a un sujeto humano o animal. La composición farmacéutica es preferiblemente administrada parenteralmente, por ejemplo por inyección o infusión por vía intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, intraarterial o intralesional. La composición farmacéutica se puede combinar con un medio aceptable farmacéuticamente o vehículo de entrega por técnicas convencionales conocidas en la técnica. Métodos para preparar composiciones administrables parenteralmente se conocen bien en la técnica y se describen con más detalle en varias fuentes, incluyendo, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, Ed. AR Gennaro, 20ª edición, 2000, Williams & Wilkins, PA, USA. La composición farmacéutica es preferiblemente administrada en una dosis terapéuticamente efectiva, es decir una que aumentará la capacidad del sistema inmunológico humano o animal para combatir infecciones.

[0014] De interés particular es la composición farmacéutica que es una vacuna. La vacuna puede ser una vacuna a base de proteína.

[0015] La vacuna puede también ser una vacuna de ADN. La vacuna de ADN comprende un gen para cada histona que está presente en la vacuna. En esta aplicación, tales genes que codifican más de una histona se llaman genes quiméricos.

[0016] Los genes en una vacuna de ADN según la presente invención típicamente estarán presentes en vectores. Ejemplos de vectores adecuados son bien conocidos por el experto en la técnica, ver por ejemplo Donnelly et al, Ann. Rev. Immunol. (1997) 15: 617 e incluyen pero no se limitan a pcDNA3 y pcCMV.

[0017] El ADN en la vacuna puede ser cualquier ADN que es conveniente para expresión de proteína, por ejemplo ADNc o ADN bicatenario pero no ADN genómico o ADN monocatenario. También puede haber una mezcla de proteína y ADN en una vacuna por administración sucesiva o simultánea del ADN y proteína. También vacunas de ARN pueden ser utilizadas, aunque estas necesitan estabilizadores para estabilizar el ARN que va a ser administrado.

[0018] Hay más de 20 especies conocidas de Leishmania, incluyendo especies del subgénero de Leishmania, que comprende el complejo *L. major*, incluyendo *L. major*, el complejo *L. Donovanii*, incluyendo *L. chagasi*, *L. Donovanii* y *L. infantum*, el complejo *L. Mexicana*, incluyendo *L. amazonensis* y *L. Mexicana*, al igual que la subespecie *Viannia*, que comprende el complejo *L. braziliensis*, incluyendo *L. braziliensis* y *L. peruviana* y el complejo *L. guyanensis*, incluyendo *L. guianensis* y *L. panamensis*. Especies de *Plasmodium* de interés particular son *Plasmodium falciparum* y *Plasmodium vivax*.

[0019] - En una forma de realización de la invención, se usa una composición farmacéutica que comprende histonas de una especie para la preparación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad de Leishmaniasis causada por otras especies.

[0020] En particular, la Leishmaniasis causada por una especie del género de Leishmania puede ser tratada usando una composición farmacéutica basada en histonas de otras especies de *Leishmania*. En una forma de realización, la Leishmania causada por *L. major* es exitosamente tratada con una composición que comprende histonas de *L. infantum*.

[0021] En otro aspecto, la invención proporciona un método para prevenir la infección por Leishmaniasis funcionando

como una vacuna terapéutica. Típicamente, hay un período de tiempo entre la infección y la enfermedad. En este caso la vacuna actuaría como un producto farmacológico inmunológico que curaría la enfermedad obteniendo en el huésped una respuesta inmunitaria que contrarresta el efecto patológico de la infección. Una vacuna terapéutica difiere de una vacuna profiláctica en que una vacuna terapéutica inducirá protección en un paciente que ya tiene la infección o la enfermedad.

Breve descripción de las figuras

[0022] Fig. 1.

(A) Protección en ratones vacunados con tres dosis de agrupaciones de genes de histona. Ratones BALB/c inoculados con genes de histona de *Leishmania* y control (pcDNA3 o PBS) fueron desafiados con 5×10^4 promastigotos de *L. major* inyectados en la almohadilla plantar posterior izquierda. Hinchazón de almohadilla plantar se da como la diferencia entre el espesor de la almohadilla plantar infectada contra la contralateral no infectada. Mediciones de almohadilla plantar semanales representan las puntuaciones medias de almohadilla plantar $\pm$ SD. Desafío de *L. major* en ratones inmunizados de ADN es representativo de dos experimentos diferentes con prácticamente los mismos resultados. *En la cuarta semana las diferencias entre el hinchazón de la almohadilla plantar de ratones de control y vacunados fueron significativas ($P < 0,001$).

(B) Carga parasitaria en bazo y ganglios linfáticos ocho semanas después de la infección en los controles (pcDNA3) y diez semanas en los vacunados (histonas de pcDNA3). Suspensiones celulares fueron hechas desde el ganglio linfático poplíteo de la pierna infectada y el bazo. El número de parásitos viables fue determinado limitando la dilución. Los resultados se expresan como media $\pm$ SD del número total de parásitos por tejido (expresado como logaritmo decimal). *Diferencias entre controles y ratones vacunados fueron significativas tanto en bazo como en ganglios linfáticos poplíteos ($P < 0,001$).

EJEMPLOS

Ejemplo 1

Producción de una vacuna de ADN que comprende histonas de *L. infantum*

[0023] Para determinar si vacunas de ADN que codifican histonas de *Leishmania* fueron capaces de proteger ratones contra infección por *L. major*, genes H2A, H2B, H3 y H4 de *L. infantum* fueron subclonados en el vector de expresión eucariota pcDNA3 para la expresión bajo el control de un promotor de citomegalovirus fuerte (CMV). Luego, la expresión de histonas de *Leishmania* fue evaluada en células COS7 modificadas con los constructos pcDNA3. La expresión de las proteínas recombinantes por células mamíferas modificadas con ADN plásmido es una condición crítica para la estimulación del sistema inmunológico. Células COS7 modificadas fueron cultivadas durante 3 días y la expresión de las histonas de *Leishmania* fue evaluada por análisis de Western blot.

1.1 Clonación de ADNc en el vector de expresión mamífero pcDNA3

[0024] Para la expresión de las cuatro histonas de núcleo de *Leishmania infantum* en el vector de expresión mamífero pcDNA3 cuatro clones de ADNc de longitud completa fueron empleados: H2A (clon cL72; Soto et al, Eur.J. Biochem. 1992, 205(1):211-6); H2B (clon LiH2B; Soto et al., Clin. Exp. Immunol., 1999, 115(2):342-9); H3 (clon LiH6; Soto et al., Biochim. Biophys. Acta, 1994, 18:1219(2):533-5) y H4 (clon LiH4-1; Soto et al., Clin. Exp. Immunol. 1999, 115(2):342-9). Todos estos clones de ADNc fueron previamente aislados de una librería de expresión de ADNc λ gt11 de *L. infantum*. Los insertos EcoRI de los clones de ADNc fueron subclonados en el sitio de corte correspondiente del vector de expresión mamífero pcDNA3. El ADN de aquellos plásmidos recombinantes de pcDNA3 fue purificado por Giga-preparation Kit sin endotoxinas (Qiagen, Hilden, Alemania).

1.2 Expresión de histonas de *Leishmania* en células mamíferas.

[0025] Para confirmar que el constructo de ADN fue funcional y expresaba las proteínas mencionadas, células COS7 fueron modificadas con 20 μ g de cada constructo de pcDNA3 preparado en la sección 1.1 usando Lipofectin® Reagent (Gibco; BRL) según el protocolo del fabricante. Brevemente, células 3×10^6 fueron sembradas en placas de 100 mm en medio de Eagle modificado de Dulbecco más 5% de FCS y transfectadas cuando alcanzaron 50 a 75% de confluencia. Setenta y dos horas después de transfección, las células fueron recogidas, lavadas dos veces con PBS enfriado en hielo e inmediatamente lisadas añadiendo tampón de Laemmli. Proteína derivada de números equivalentes de células fueron resueltas por electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) y transferidas a membranas de nitrocelulosa (Amersham, Aylesbury, UK). Las manchas fueron evaluadas con los sueros de perros sufriendo de Leishmaniasis visceral (VCL) y purificadas por cromatografía de afinidad contra proteínas H2B, H3, H4 en la fase inmovilizada) o conejo inmunizado con rH2A.

[0026] Los resultados mostraron que células transfectadas expresaron niveles detectables de proteínas H2A, H2B, H3 y H4.

1.3 Clonación en vector de expresión pQE30

[0027] Para la expresión de las histonas de *L. infantum* como proteínas recombinantes, las regiones de codificación fueron amplificadas por PCR tomando como molde los constructos pcDNA3 de 1.1 y los siguientes nucleótidos como cebadores:

Para el gen H2A (sentido 5'-CGGGATCCATGGTACTCCTCGCAGC-3' (posiciones 1-17 de la región de codificación); antisentido 5'-CCCAAGCTTACGCGCTCGGTGTGCGCC-3' (inverso y complementario a posiciones de la región de codificación);

Para el gen H2B (sentido 5'-CGGGATCCGCCTCTTCTCGCTCTGC-3' (posiciones 1-17 de la región de codificación); antisentido 5'-CCCAAGCTTCAAGCCGACGCGCTCGACAC-3' (inverso y complementario a posiciones de la región de codificación);

Para el gen H3 (sentido 5'-CGGGATCCATGTCCCGACCAAGGAGA-3' (posiciones 1-19 de la región de codificación); antisentido 5'-CCCAAGCTTCTAGTGGCGCTCACC GCGCA-3' (inverso y complementario a posiciones de la región de codificación); y

Para el gen H4 (sentido 5'-CGGGATCCATGGCCAAGGGCAAGCGTT-3' (posiciones 1-19 de la región de codificación); antisentido 5'-CCCAAGCTTACGCGTAGCCGTACAGGA-3' (inverso y complementario a posiciones de la región de codificación).

[0028] Los nucleótidos subrayados representan los sitios de corte BamHI y HindIII incluidos para permitir la clonación de los productos PCR en el vector de expresión pQE30 (Qiagen, Hilden, Alemania). Los clones resultantes fueron nombrados pQE-H2A, pQE-H2B, pQE-H3 y pQE-H4.

1.4 Expresión y purificación de las proteínas recombinantes marcadas con His

[0029] Expresión y purificación de las proteínas recombinantes marcadas con His fue realizada en *Escherichia coli* M15 siguiendo procedimientos estándar (Qiagen). Después de inducción de la proteína, las bacterias fueron recogidas, y lisadas por sonicación bajo condiciones de desnaturalización (8 M de urea, 0,5 M de NaCl, 20 mM de Tris-HCl). La purificación de la proteína fue realizada en una columna de agarosa NI-NTA (Qiagen). Proteínas recombinantes fueron gradualmente redobladas en la columna de afinidad como se ha descrito (Shi, 1997). Después, la proteína recombinante fue eluida con 0,3 M de imidazol. Después de la elución, las fracciones con las histonas recombinantes fueron agrupadas y dializadas contra PBS. La proteína purificada fue adicionalmente pasada a través de una columna de polimixina-agarosa (Sigma, St Louis, MO) para eliminar las endotoxinas. La endotoxina residual fue medida con ensayo cuantitativo cromogénico de amebocitos de *Limulus* (QCL-1000, BioWhittaker, Walkersville, MD).

Ejemplo 2 Propiedades inmunogénicas de la vacuna de ADN

2.1 Preparación de antígeno de *Leishmania* total (SLA).

[0030] Antígeno de *Leishmania* soluble (SLA) fue preparado por tres ciclos de refrigeración y de descongelación de promastigotos fijos de *L. major* resuspendidos en PBS. Después de lisis celular, antígenos solubles fueron separados de la fracción insoluble por centrifugación.

2.2 Inmunizaciones y desafío de parásitos.

[0031] Experimentos de inmunización fueron realizados en grupos de diez ratones. Ratones fueron inoculados tres veces intramuscularmente (i.m.) a intervalos de 2 semanas en ambos cuádriceps de pierna posterior con 50 µg (25 µg por pierna) de cada ADN plásmido (pcDNA3-H2A, pcDNA3-H2B, pcDNA3-H3 y pcDNA3-H4) como preparados en la sección 1.1 en un volumen total de 100 µl de PBS. Ratones de control fueron inoculados siguiendo el mismo programa pero con 200 µg de pcDNA3 en cada inoculación o PBS solo. Catorce días después de cada inoculación, se desangraron los ratones por punción del plexo orbital. Cuatro semanas después de la inoculación final, bazo y ganglios linfáticos (LN) de ratones inmunizados fueron recogidos y grupos de cinco ratones inmunizados fueron desafiados con promastigotos de fase estacionaria cultivados 5×10^4 inyectados en la almohadilla plantar posterior izquierda. El hinchazón de la almohadilla plantar fue medido cada semana y se da como la diferencia entre el espesor de la almohadilla plantar infectada contra la almohadilla plantar de control colateral.

2.3 Determinación de títulos de anticuerpos e isotipos.

[0032] Muestras de suero fueron analizadas para anticuerpos de histonas anti-*Leishmania* específicos. Brevemente, placas ELISA estándares fueron revestidas durante la noche a temperatura ambiente con 100 µl de rH2A, rH2B, rH3 y rH4 (1 µg/ml en PBS) o SLA (2 µg/ml en PBS). Una dilución en serie de los sueros se efectuó para determinar la graduación, que se define como el inverso del factor de dilución de suero más alto que da una absorbancia > 0,2. Los análisis específicos de isotipo fueron hechos con las siguientes inmunoglobulinas anti-ratón conjugadas de peroxidasa de alfalfa (Nordic Immunological Laboratories, Tilburg, Países Bajos): anti-IgG1 (1:1000) y anti-IgG2a (1:500). Ortofenilo diamina dihidrocloruro -OPD- (Dako, A/S, Glostrup, Dinamarca) fue usado como sustrato de peroxidasa. Después de 15 min, la reacción fue detenida con la adición de 100 µl de H₂SO₄ 1 M, y la absorbancia fue leída a 450 nm.

2.4 Medición de citokinas en sobrenadantes.

[0033] La liberación de IFN- δ y IL-4 fue medida en los sobrenadantes de esplenocitos y cultivos de LNCs. Bazos y ganglios linfáticos de ratones BALB/C fueron eliminados asépticamente después de dislocación cervical. Esplenocito y suspensiones de células de ganglios linfáticos fueron sembradas en medio RPMI completo (RPMI 1640 suplementadas con 10% de FCS, 2mM de glutamina, y 10mM de 2-mercaptoetanol). 3×10^6 células fueron sembradas en placas de 48 pocillos durante 72 h a 37°C en presencia de rH2A, rH2B, rH3 y rH4 (12 μ g/ml), histonas de timo de ternero (SIGMA) o Con A (2 μ g/ml). La producción de citokina fue determinada por equipos comerciales ELISA (Diacclone, Besançon, Francia).

2.5 Cuantificación de parásitos.

[0034] El número de parásitos fue determinado en el ganglio linfático poplíteo de pierna y bazo infectados limitando la dilución (Buffet, et al., 1995). Los tejidos fueron homogenizados y diluidos en serie en una placa de microtitulación de 96 pocillos de fondo plano conteniendo medio de Schneider más 20% de FCS. El número de parásitos viables por ganglio linfático fue determinado a partir de la dilución mayor en la que los promastigotos podrían ser cultivados hasta 7 días de incubación a 26°C.

2.6 Análisis estadístico.

[0035] Análisis estadístico fue realizado por una prueba t de Student. Diferencias fueron consideradas significativas cuando $p < 0,05$.

2.7 Respuesta de anticuerpos después de vacunación con la vacuna de ADN

[0036] Para estudiar las propiedades inmunogénicas de los ADNcs, ratones BALB/c fueron inmunizados intramuscularmente dos o tres veces cada dos semanas con una mezcla de los cuatro plásmidos preparados en la sección 1.1 codificando las histonas de *Leishmania infantum* (50 μ g de ADNc cada uno). Anticuerpos específicos para estos antígenos fueron evaluados 2 semanas después de la última inmunización. Ninguno de los anticuerpos específicos fue detectado por ELISA después de dos inoculaciones mientras que anticuerpos IgG se volvieron detectables a graduaciones bajas después de la tercera inoculación IgG2a fue el isotipo predominante de anticuerpos en cualquier caso. Sólo una producción ligera de anticuerpos IgG1 fue también detectada contra las histonas H2A y H4.

2.8 Respuesta de células T después de vacunación con la vacuna de ADN

[0037] Para medir la respuesta de células T después de la vacunación con células mononucleares esplénicas y células del ganglio linfático (LNCs) fueron obtenidas 4 semanas después de la última inmunización de ADN y fueron estimuladas in vitro con las proteínas recombinantes preparadas en la sección 1.4. Después de 3 días de incubación, los sobrenadantes fueron recogidos y evaluados para IFN- δ y IL-4.

[0038] Fue observado que en ratones inmunizados las proteínas histonas recombinante estimularon la producción de IFN- δ en una cantidad que es más grande que aquella encontrada en controles tanto en esplenocitos como en células de LNCs. Ninguna producción de histona IL-4 específica podría ser detectada en los sobrenadantes de cualquiera de los cultivos.

2.9 Análisis de la dependencia IL-12

[0039] Para caracterizar con más detalle la respuesta inmunitaria suscitada en ratones por vacunación con ADN con los genes de histona *L. infantum* y su evolución después de desafío con *L. major*, la producción específica de antígeno de IFN- γ por esplenocitos de ratones vacunados fue evaluada. Veinticinco días después de la infección por *L. major*, esplenocitos de ratones vacunados continuaron produciendo más IFN- γ específico de histona que esplenocitos de ratones de control. De manera interesante, la producción de IFN- γ mediado por SLA fue 2 veces más alta en esplenocitos de ratones vacunados en comparación con aquellos de control. Como la producción dependiente de IL-12 de IFN- γ es el mecanismo principal asociado al control de infección por *L. major*, se evaluó si la adición de anticuerpo monoclonal anti-IL-12 para cultivos sustancialmente inhibía la producción de IFN- γ en esplenocitos de ratones vacunados. La inhibición de producción IFN- γ resultó ser más alta que 80% para los cuatro estímulos diferentes usados (histonas H2A, H2B, H3 y H4 de *L. infantum*). Esto indica que la producción de IFN- γ específica de histona es dependiente de IL-12 y, además, que la producción in vitro de IL-12 es también estimulada en esplenocitos por las histonas de *Leishmania*.

2.10 La implicación de células T CD4+ y CD8+ en la producción de IFN- γ .

[0040] Las contribuciones relativas de las células T CD4+ y CD8+ a la producción de IFN- γ fue determinada. La estimulación mediada por histona de producción de IFN- γ de esplenocitos de todos los grupos fue sustancialmente inhibida por adición a los cultivos de anticuerpos monoclonales anti-CD4. No obstante, la adición de anticuerpos

monoclonales anti-CD8 para los cultivos indujeron una reducción de secreción de IFN- γ sólo en los esplenocitos de ratones vacunados y estimulados in vitro bien con histona H2A o H3. Así, la vacunación con ADN con genes que codifican histonas H2A y H3 de *Leishmania* parece estar cebando más células CD8 que los otros dos genes de histona (H2B y H4).

[0041] Finalmente, para proporcionar otras revelaciones en el estado inmunológico asociado a la protección suscitada en ratones por vacunación con ADN con los genes que codifican para las histonas de *L. infantum*, la frecuencia de células T CD4+ y CD8+ produciendo IFN- γ en el LNCs fue evaluada por coloración de citokina intracelular al final de los estudios de protección (8 ratones de control y 10 ratones vacunados). La frecuencia tanto de células CD4+ como CD8+ produciendo IFN- γ fue más alta en ratones vacunados que en los de control. Así, estos datos son un soporte directo de que la protección contra la infección por *L. major*, conseguida por la vacunación con ADN con histonas de *Leishmania*, se correlaciona en los ratones vacunados con una frecuencia mejorada de células T (CD4+ y CD8+) produciendo IFN- γ .

[0042] Estos resultados concuerdan con el predominio de anticuerpos IgG2a en los sueros de los ratones inmunizados e indican que la inmunización de ADN con los genes de histona H2A, H2B, H3 y H4 suscitó preferentemente una respuesta inmunitaria tipo Th1 contra estos antígenos. Experimentos de prueba adicionales (véase ejemplo 3) debieron mostrar si los genes también tenían un efecto de protección.

Ejemplo 3 Protección contra *Leishmania major* inducida por las vacunas de ADN codificando para histonas de *Leishmania infantum*.

[0043] Dado que los experimentos de inmunogenicidad revelaron que la inmunización de ADN con histonas desencadenó la inducción de respuestas inmunológicas específicas de tipo Th1 nos preguntamos después la cuestión de si el régimen inmunogénico de ADNc usando los genes H2A, H2B, H3 y H4 podría proporcionar protección contra infección de ratones con *L. major*.

3.1 Vacuna de ADN que codifica histonas de *L. infantum* protegen contra infección por *L. major*.

[0044] Grupos de siete ratones BALB/c fueron inoculados intramuscularmente dos o tres veces como se ha descrito anteriormente, distanciados por dos semanas, con 50 μ g de cada constructo de ADN de histona como se ha preparado en la sección 1.1. Controles fueron inoculados de la misma manera con 200 μ g del vector vacío usado para la clonación de ADNc de los genes de histonas o con PBS solo. Cuatro semanas después de la última inmunización de ADN, los ratones fueron desafiados en la almohadilla plantar izquierda con formas de promastigotos fijos 5×10^4 cultivados de *L. major* como se ha preparado en la sección 2.1. La hinchazón de la almohadilla plantar fue medida semanalmente.

[0045] Los resultados mostrados en Fig. 1A indican que la vacunación con ADN con genes de histonas indujeron la protección contra la infección, mientras que el vector solo no lo hizo. Hemos observado un claro retraso de la hinchazón de la almohadilla plantar en los ratones vacunados. En cualquier caso, los ratones inmunizados muestran una inflamación más controlada (aproximadamente 1 mm ocho semanas después de la infección) que los de control (sobre cinco mm en la misma semana). Ninguna lesión fue observada en cuatro de siete ratones durante el curso de la infección. Este experimento ha sido reproducido con resultados similares.

3.2 Carga parasitaria de bazo y ganglio linfático después de vacunación con vacuna de ADN que codifica histonas.

[0046] Para determinar si la hinchazón de la almohadilla plantar reducida se correlacionó con la carga parasitaria en el bazo y ganglios linfáticos poplíteos, los ratones fueron eutanizados 10 semanas después de la infección del grupo de ratones vacunados y 8 semanas después de la infección de los controles). Los ratones vacunados expusieron una significativa carga parasitaria inferior que aquella determinada en los controles (Fig 1B). Notablemente, la visceralización del parásito fue homogéneamente observada en los controles (pcDNA3) mientras que en ratones vacunados la carga de parásito fue baja, y en algunos casos ningún parásito fue detectado. Todos estos datos sugieren que ratones vacunados están controlando la leishmaniosis cutánea inducida por *L. major*.

Ejemplo 4 Inmunización con histonas en una forma individual.

[0047] Los ejemplos precedentes han mostrado que la inyección con un cóctel de ADN de plásmidos de expresión eucarióticos pcDNA3 con los genes para las histonas de *Leishmania infantum* (H2A, H2B, H3 y H4) en ratones BALB/c, conduce a una respuesta inmunitaria Th1 específica que resulta en el control de infección por *L. major*. En el presente ejemplo, estudiamos el efecto de la inmunización genética con cada uno de estos pcDNA3 que codifican H2A, H2B, H3 y H4 nucleosomales, administrados separadamente. Condiciones experimentales fueron como se ha descrito anteriormente.

[0048] Los resultados indican que en todos los casos la administración de cada pcDNA3 de histona induce una reducción tanto de citocinas Th2 de IL-4 como de IL-10 9 semanas después de la infección por *L. major* concomitantemente con una respuesta humoral inferior contra antígeno SLA de *Leishmania* soluble y una respuesta humoral limitada contra las histonas (dominada por anticuerpos IgG2a), en comparación con ratones de control

inmunizados con un pcDNA3 vacío. Además, los resultados del análisis de la proliferación de esplenocitos en los ratones de control muestran la existencia de una respuesta inmunitaria celular deprimida a los mitógenos Con A, LPS y a SLA. Durante el curso de la infección, los ratones vacunados presentaron un retraso en la hinchazón de la almohadilla plantar y una carga parasitaria inferior en los ganglios linfáticos poplíteos en comparación con los ratones de control. En conclusión, la administración de cada pcDNA3 de histona que codifica las histonas nucleosomales de *Leishmania* reduce la respuesta conducida por Th2 inducida por infección por *L. major*, conduciendo a una producción baja de IL-4 y IL-10 en el bazo, y una respuesta humoral baja correlacionada con protección contra la leishmaniosis cutánea murina. Los resultados también indican que, entre histonas de *Leishmania*, la inmunización de ADN con H4 es la más eficaz en inducir la inmunidad de protección contra la leishmaniosis cutánea.

LISTADO DE SECUENCIAS

[0049]

<110> C.B.F. Leti S.L., Unipersonal

<120> Uso de histonas específicas para el tratamiento de enfermedades parasitarias

<130> P211394PCT

<160> 8

<170> Versión de patentIn 3.1

<210> 1

<211> 25

<212> ADN

<213> Leishmania infantum

<400> 1

cgggatccat ggtactcctc gcagc 25

<210> 2

<211> 27

<212> ADN

<213> Leishmania infantum

<400> 2

cccaagctta cgcgctcggg gtcgccc 27

<210> 3

<211> 25

<212> ADN

<213> Leishmania infantum

<400> 3

cgggatccgc ctcttctcgc tctgc 25

<210> 4

<211> 29

<212> ADN

<213> Leishmania infantum

<400> 4

cccaagcttc aagccgacgc gctcgacac 29

<210> 5

<211> 27

<212> ADN

<213> Leishmania infantum

<400> 5

cgggatccat gtcccgacc aaggaga 27

<210> 6

<211> 29

ES 2 395 923 T3

<212> ADN

<213> Leishmania infantum

<400> 6

5 cctaagcttc tagtggcgct caccgcgca 29

<210> 7

<211> 27

<212> ADN

10 <213> Leishmania infantum

<400> 7

cgggatccat ggccaagggc aagcggtt 27

15 <210> 8

<211> 27

<212> ADN

<213> Leishmania infantum

20 <400> 8

cccaagctta cgcgtagccg tacagga 27

REIVINDICACIONES

1. Uso de las cuatro histonas de *Leishmania* H2A, H2B, H3 y H4 para la preparación de un medicamento para el tratamiento o prevención de una enfermedad de Leishmaniasis, donde la enfermedad de Leishmaniasis es causada por una especie de *Leishmania* diferente de la especie de la que se derivaron las histonas.
2. Uso según la reivindicación 1, donde cada histona está presente en cantidades equimolares.
3. Uso según la reivindicación 1 o 2 donde el medicamento es una vacuna.
4. Uso según la reivindicación 3 donde la vacuna es una vacuna a base de proteína.
5. Uso según la reivindicación 3 donde la vacuna es una vacuna de ADN que comprende los genes que codifican al menos una de las histonas H2A, H2B, H3 y H4.
6. Uso según la reivindicación 5, donde uno o más genes de las histonas H2A, H2B, H3 y H4 se insertan en uno o más vectores.
7. Uso según las reivindicaciones 5 o 6 donde la vacuna comprende un gen quimérico que codifica dos o más histonas.
8. Uso de un vector que comprende los nucleótidos que codifican las histonas H2A, H2B, H3 y H4 de *Leishmania* para la preparación de un medicamento para el tratamiento o prevención de una enfermedad de Leishmaniasis, donde la enfermedad de Leishmaniasis es causada por una especie de *Leishmania* diferente de la especie de la que se derivaron las histonas.
9. Uso de anticuerpos dirigidos contra todas las histonas H2A, H2B, H3 y H4 de *Leishmania* para la preparación de un medicamento para el tratamiento o prevención de una enfermedad de Leishmaniasis, donde la enfermedad de Leishmaniasis es causada por una especie de *Leishmania* diferente de la especie de la que se derivaron las histonas.
10. Uso según las reivindicaciones 1-9 donde las histonas se obtienen de *Leishmania infantum*.
11. Uso según las reivindicaciones 1-10 donde la enfermedad de Leishmaniasis es causada por especies de *L. major* o *L. infantum*.
12. Composición farmacéutica que comprende todas las histonas H2A, H2B, H3 y H4 de *Leishmania* o genes que codifican estas histonas además de un adyuvante y/o portador farmacéuticamente aceptable.

