

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 486 365**

51 Int. Cl.:

C07K 14/44 (2006.01)

A61K 39/008 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.01.2009 E 09701571 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.05.2014 EP 2231700**

54 Título: **Vacuna que comprende un extracto de proteína ribosómica (RPE) y opcionalmente un adyuvante promotor de Th₁**

30 Prioridad:

18.01.2008 EP 08100634

18.01.2008 US 21928 P

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

18.08.2014

73 Titular/es:

**LABORATORIOS LETI, S.L. UNIPERSONAL
(100.0%)
GRAN VIA CORTS CATALANES, 184, 7 1
08038 BARCELONA, ES**

72 Inventor/es:

**SOTO ÁLVAREZ, MANUEL;
RUIZ ABÁNADES, DANIEL y
ALONSO BEDATE, CARLOS**

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

ES 2 486 365 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

Vacuna que comprende un extracto de proteína ribosómica (RPE) y opcionalmente un adyuvante promotor de Th₁

5 Campo de la invención

[0001] La invención se refiere a una composición que comprende un extracto de proteína ribosómica (RPE) y opcionalmente un adyuvante promotor de Th₁ para la preparación de un medicamento para el tratamiento o prevención de una enfermedad parasitaria y a su utilización.

10

Antecedentes de la invención

[0002] La leishmaniasis comprende diferentes enfermedades provocadas por protozoos parásitos intracelulares pertenecientes al género *Leishmania* que infecta principalmente a los macrófagos de una variedad de mamíferos que incluye a perros y humanos. Dependiendo en gran medida de la especie del parásito y del estado de inmunocompetencia del huésped humano, el espectro de la enfermedad comprende desde la leishmaniasis cutánea autocurativa (CL) hasta la leishmaniasis visceral letal (VL) o kala-azar (18). La leishmaniasis viscerocutánea canina (VCL) provocada por *Leishmania infantum* y *L. chagasi* es una importante zoonosis emergente encontrada en países de la cuenca mediterránea, en Oriente Medio y en Latinoamérica (16) considerándose a los perros como el gran asentamiento de dichos parásitos, que juegan un rol principal en la transmisión a humanos por medio de las moscas de arena (47). El alcance de la infección se determina a través de las interacciones entre el sistema inmunológico que lo alberga y las diferentes especies de parásito. Sin embargo, la patogénesis de la leishmaniasis es incierta y el conocimiento de los mecanismos implicados en la respuesta inmunitaria a la *Leishmania* en seres humanos y perros sigue siendo limitado. Generalmente, se asocia a la inmunidad protectora con una respuesta inmunitaria mediada por célula clásica que induce a la activación macrófaga por citocinas derivadas de linfocitos T, mientras que se asocia a las enfermedades incurables con la generación de fuertes respuestas humorales (15,26). La investigación para el desarrollo de vacunas de segunda generación basadas en partes ordinarias del parásito o en antígenos definidos del parásito se dirigió a la identificación de moléculas de distinta superficie o moléculas secretadas por el parásito que han sido probadas como candidatas para la vacuna en varios modelos experimentales usando diversos adyuvantes (1, 17, 22, 46, 48, 49, 52, 54). La investigación de bibliotecas de expresión con sueros de animales o humanos infectados también ha permitido la selección de algunos antígenos como candidatos vacunales (visto en (9)). Entre estos, aquellos que principalmente obtienen una respuesta inmunitaria de tipo Th₁ en las células de ratones infectados o de pacientes humanos independientemente de su ubicación celular, han sido implicados en la generación de respuestas protectoras en distintos modelos de animales (51, 55, 56). Por otro lado, algunos de los antígenos aislados son proteínas intracelulares conservadas que estimulan principalmente respuestas humorales en humanos o perros que padecen VL o respuestas humorales a través del linfocito Th₂ en ratones infectados para la experimentación (3, 36, 38, 40, 42). Se cree que la respuesta humoral inadecuada provocada contra estos antígenos en perros que sufren leishmaniasis da como resultado una inmunopatología, debido principalmente a los efectos adversos de los complejos inmunes, en particular uveitis (13), lesiones en el sistema nervioso central (14) o nefritis (23, 24, 33, 34). También se ha mostrado recientemente que la presencia de complejos inmunes de IgG en seres humanos con VL se correlaciona con la incapacidad para resolver infecciones, lo que demuestra que los complejos inmunes pueden ser perjudiciales para el huésped infectado (30).

[0003] A pesar de no ser consideradas en primer lugar como candidatas vacunales, se ha asociado a las proteínas que inducen altas respuestas humorales durante el proceso infeccioso con la producción de respuestas protectoras. Por ejemplo, tubulinas de parásitos y la histona H2B fueron reconocidas por clones de linfocitos T derivados de un donante inmune (39) y rk39 causa la proliferación y la producción de IFN- γ por linfocitos T de ratones inmunes (25). También se ha mostrado que la inmunización genética con los genes H2B, H3 y H4 del parásito induce protección en modelos murinos de leishmaniasis visceral (27). También, la inmunización del receptor con quinasa C activada (LACK) (32), algunas proteinasas de cisteína del parásito (38, 41) o las histonas que forman el nucleosoma del parásito (11, 20) administradas con los adyuvantes promotores de Th₁ generan también respuestas inmunológicas que se correlacionan con la protección contra la leishmaniasis cutánea en modelos murinos.

[0004] Entre los antígenos conservados evolutivos de *Leishmania*, diferentes pruebas sugieren que las proteínas ribosómicas son moléculas inmunológicamente relevantes en el proceso de Infección por *Leishmania*. En algunos casos, los constituyentes ribosómicos pueden contribuir a la disfunción del sistema inmunológico del huésped por medio de su capacidad para modular actividades celulares y liberar citocina durante la infección. Así, la inyección de proteína ribosómica S3a de *L. major* en ratones BALB/c ha provocado la expansión policlonal de clones de linfocitos B y la proliferación de linfocitos T inhibidos (10). Además, la inmunización genética con una vacuna de ADN codificante para la proteína ribosómica L31 putativa 60S exagera la enfermedad en ratones por la inducción de las citocinas de IL-10 y Th₂ (44, 53). También se han relacionado algunas proteínas ribosómicas de parásitos como las proteínas P ácidas de

60

parásitos con la generación de fuertes respuestas humorales en perros y seres humanos que padecen leishmaniasis (visto en (42)).

[0005] US6500437 divulga una vacuna que consta del antígeno ribosómico LbelF4A.

[0006] A pesar de los intentos realizados hasta el momento, continua sin existir una vacuna valiosa contra una enfermedad parasitaria tal como la leishmaniasis. Por lo tanto, sigue existiendo la necesidad de dicha vacuna.

Descripción de la invención

[0007] En el presente trabajo se muestra que un RPE, especialmente un RPE de *Leishmania* (LRPE) es un objetivo de la respuesta inmunitaria en perros naturalmente infectados con *L. infantum* y en ratones experimentalmente infectados con *L. major*. Demostramos además que se induce una fuerte respuesta inmunitaria protectora de Th₁ cuando se coadministra un LRPE con un adyuvante promotor de Th₁ tales como el oligodesoxinucleótido CpG (ODN). Dichas composiciones (un LRPE combinado con un adyuvante promotor de Th₁) son muy atractivas para su uso como vacuna. La invención será descrita más detalladamente a continuación.

Uso

[0008] En un primer aspecto de la invención, se prevé el uso de un RPE y opcionalmente un adyuvante promotor de Th₁ para la preparación de un medicamento para el tratamiento o prevención de una enfermedad parasitaria en un sujeto.

[0009] En una forma de realización preferida, se obtiene un RPE utilizando una célula de parásito que causa una enfermedad parasitaria cuando esté presente en un sujeto llevando a cabo los siguientes pasos:

- a. se mezcla una célula de parásito con un tampón de lisis,
- b. se centrifuga la mezcla obtenida para obtener un extracto citosólico,
- c. se prepara un RPE del extracto citosólico obtenido.

[0010] En el paso a, un parásito se refiere preferiblemente a un protozoo. Los parásitos preferidos se definirán a continuación aquí. Más preferiblemente, un protozoo se encuentra en la fase de promastigote. El experto en la materia conocerá aproximadamente la cantidad de células de parásito que son necesarias para preparar la cantidad deseada de RPE. De forma típica para preparar aproximadamente 500 microgramos de RPE se usarán en torno a $3 \cdot 10^9$ células de parásito. Un tampón de lisis es un tampón que descompondrá al menos algunas células del parásito. Un tampón de lisis preferido consta de un tensioactivo no iónico. Se han obtenido buenos resultados con Nonidet P 40 (NP40) como tensioactivo no iónico. No obstante, pueden utilizarse otros tensioactivos no iónicos. Un tampón de lisis preferido usado como se describe a continuación (Tampón A): 10mM Tris HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, 1,5 mM MgCl₂ y 0,5 % NP40 (Roche) y preferiblemente suplementado con inhibidores de proteasa tales como PMSF 1mM, Leupeptina 8 µg/ml, Aprotinina 4 µg/ml y Pentatina 8 µg/ml). Típicamente se aplica una cantidad adecuada de células de parásito (aproximadamente 10^9 células/ml del tampón A) mezclándolas gradualmente con dicho tampón de lisis utilizando una pipeta eppendorf.

[0011] En el paso b, se aplica al menos un paso de centrifugación a 4° C sobre la mezcla obtenida del paso a. Normalmente se realiza una primera centrifugación a 3.000 g aproximadamente durante unos 2 minutos. Preferiblemente vuelve a centrifugarse el sobrenadante obtenido a 13.000 g aproximadamente durante unos 15 minutos a 4° C una o dos veces.

[0012] En el paso c, el sobrenadante obtenido se usa para preparar un RPE como se describe en (45). El sobrenadante obtenido se somete brevemente a una centrifugación a velocidad rápida, a aproximadamente 90.000 r.p.m. durante unos 30 min a 4° C en un rotor Beckman TL100.3. El granulado obtenido es un granulado ribosómico crudo, que se resuspende en el tampón B (20 mM Tris-HCl, pH 7.4, 500 mM AcNH₄, 100 mM MgCl₂, 5mM β-mercaptoetanol) y se centrifuga a través de un gradiente discontinuo de sacarosa (20/40 %) en el tampón B a aproximadamente 90.000 r.p.m. a 4° C en un rotor TL100.3. El granulado obtenido consta de ribosomas. Este granulado es preferiblemente disuelto en PBS (Solución Salina de Tampón de Fosfato) sonificado y almacenado a - 70° C.

[0013] Las proteínas ribosómicas son proteínas citosólicas bien conservadas. Como fuente de RPE que se puede usar en el tratamiento de enfermedades parasitarias hay diferentes especies de *Leishmania* de protozoos tripanosomáticos. Existen más de 20 especies conocidas de *Leishmania*, incluyendo especies del subgénero de *Leishmania*, comprendiendo el complejo *L. major*, incluyendo el *L. major*, el complejo *L. Donovanii*, incluyendo *L. chagasi*, *L. donovani* y *L. infantum*, el complejo *L. Mexicana*, incluyendo *L. amazonensis* y *L. mexicana*, al igual que la subespecie *Viannia*,

que consta del complejo *L. braziliensis*, incluyendo *L. braziliensis* y *L. peruviana* y el complejo *L. guyanensis*, incluyendo *L. guyanensis* y *L. panamensis*.

En una forma preferida de realización, se obtiene un RPE de una de las especies de *Leishmania*, preferiblemente de *Leishmania major* y/o *Leishmania infantum*. El experto comprenderá que un RPE también puede prepararse mediante la mezcla de un RPE de varios organismos diferentes como se identifica aquí. El uso de un RPE en una vacuna en lugar del uso de una proteína dada es bastante atractivo ya que un RPE contiene un gran número de antígenos diferentes. Cada uno de estos antígenos podría causar potencialmente una respuesta de protección inmune en el sujeto tratado. Además, hay sujetos que responden al antígeno A y no al B y viceversa. Por lo tanto, se prevé que una vacuna tal y como se describe aquí está pensada para ser usada por un amplio espectro de población dado que contiene un gran número de antígenos diferentes.

[0014] Un adyuvante promotor de Th₁ (como un adyuvante que consta de un diseño ODN CpG) se define en la bibliografía (Liu N., *et al.*, (2003), *Nature Immunology*, 687-693) como un adyuvante capaz de promover o desencadenar una respuesta inmunitaria de Th₁ contra un antígeno dado cuando se usa junto con dicho antígeno (aquí RPE) como ha sido detectado en sobrenadantes de esplenocitos de un sujeto tratado cuando se ha cultivado con el antígeno. Como forma de control, se evalúa la promoción o activación de una respuesta inmunitaria de Th₁ en una población de esplenocitos del mismo sujeto que no ha sido tratado con el antígeno y el adyuvante, o con la misma población siendo solamente tratado con el antígeno. La activación o promoción de una respuesta inmunitaria de Th₁ es preferiblemente definida por la inducción de IFN γ como se detectó cultivando esplenocitos de un sujeto tratado con el antígeno y/o causando la producción de inmoglobulinas IgG2a específicas del antígeno. La evaluación de la inducción de esta citocina se lleva a cabo preferiblemente mediante ELISA en esplenocitos como se describe en el ejemplo. La evaluación de la inducción de IgG2a se lleva a cabo preferiblemente mediante ELISA o Western Blot como se describe en el ejemplo. La inducción de IFN γ y/o IgG2a después de la estimulación de esplenocitos con RPE y un adyuvante significa preferiblemente que se califica al adyuvante como un adyuvante promotor de Th₁. Alternativamente o en combinación con la primera definición de activación o promoción de una respuesta inmunitaria de Th₁ dada con anterioridad, la activación o promoción de una respuesta inmunitaria de Th₁ puede definirse además por la ausencia (o la ausencia de una inducción) de una respuesta inmunitaria de Th₂. Una respuesta inmunitaria de Th₂ se caracteriza por un aumento detectable en la inducción de IL-4, IL-10 y/o la producción de inmunoglobulinas IgG1 detectables cuando se compara con esplenocitos no tratados. La evaluación de la inducción de IL-4 y/o IL-10 se lleva a cabo preferiblemente mediante ELISA en esplenocitos como se describe en el ejemplo. La evaluación de la inducción de un IgG1 se lleva a cabo preferiblemente mediante ELISA o Western Blot como se describe en el ejemplo.

[0015] Alternativamente o en combinación con las dos primeras definiciones de activación o promoción de una respuesta inmunitaria de Th₁ dada con anterioridad, la activación o promoción de una respuesta inmunitaria de Th₁ puede definirse además por la generación de un aumento en la proporción de IFN γ / IL-10 y/o en la proporción de IFN γ / IL-4 y/o de una reducción en la proporción de IgG1/IgG2a contra un antígeno definido, en este caso un RPE. En una forma preferida de realización, un cambio (el aumento o la reducción indicadas anteriormente) en cualquiera de estas proporciones superior a 2 indica que un adyuvante tiene propiedades de Th₁. La evaluación de la inducción de cada una de las citocinas mencionadas se lleva a cabo preferiblemente sobre esplenocitos mediante ELISA como se describe en el ejemplo. La evaluación de la inducción de una inmunoglobulina IgG1 o IgG2a se lleva a cabo preferiblemente mediante ELISA o Western Blot como se describe en el ejemplo.

[0016] En una forma de realización preferida, un adyuvante promotor de Th-1 es o comprende o consiste en un oligodesoxinucleótido. Más preferiblemente, un oligodesoxinucleótido (ODN) comprende o consiste en CpG donde la C es (ODN CpG) no metilado: 3'purina-CpG-5'pirimidina. Un oligodesoxinucleótido preferido consiste o consta de una secuencia de ODN de fosforotioato modificada. El uso de oligodesoxinucleótidos con dicha modificación es ventajoso debido a que los oligodesoxinucleótidos usados son más estables que los oligonucleótidos no modificados y no se degradarán con facilidad una vez se encuentren en el sistema sanguíneo. El adyuvante promotor de Th-1 preferido consta o consiste en al menos uno, dos o tres motivos CpG. Las secuencias preferidas de los ODN inmunoestimuladores (de 5' a 3') fueron TCAACGTTGA y GCTAGCGTTAGCGT. Es posible diseñar otras secuencias y posteriormente probarlas para la propiedad promotora de Th-1 tal y como ha sido descrito anteriormente aquí. Este adyuvante preferido ODN CpG identificado es muy atractivo debido a que se ha demostrado en el ejemplo que la co-inoculación de LRPE con este adyuvante promotor de Th1 induce protección contra un estímulo con parásitos de *L. major* tanto en las cepas de ratones BALB/c como C57BL/6. En ambos modelos, la protección se correlaciona con una producción específica de IFN- γ . En BALB/c, se detectó una restricción de la producción de IL-4 e IL-10.

[0017] Una ventaja de la presente invención es que la misma permite la preparación de un medicamento para el tratamiento de un espectro más amplio de enfermedades parasitarias, es decir, un medicamento con especificidad en varias especies. En muchas enfermedades parasitarias, una vacuna contra especies específicas sólo funciona con dichas especies específicas. Un ejemplo de una enfermedad parasitaria en la que ocurre tal caso es la Leishmaniasis.

Actualmente, la enfermedad se controla con fármacos, pero el tratamiento con fármacos no previene la extensión de la enfermedad y en muchos casos no es muy eficaz. En otra forma de realización preferida, una enfermedad parasitaria es la leishmaniasis. Más preferiblemente, una enfermedad parasitaria es causada por especies de *Leishmania*. En otra forma de realización preferida, una enfermedad parasitaria es causada por especies diferentes a aquellas de las que deriva un RPE. En particular, la Leishmaniasis provocada por una especie del género *Leishmania* puede tratarse con el uso de una composición basada en un RPE de otra especie de *Leishmania*. En una forma de realización, la Leishmaniasis causada por *L. major* es tratada con éxito con una composición que consta de un RPE de *L. infantum*. Alternativamente, otras enfermedades parasitarias como la malaria pueden ser tratadas con éxito con una composición basada en un RPE de otras especies, por ejemplo basada en un RPE de *L. infantum*.

[0018] En el contexto de la invención, un sujeto se refiere a un humano o un animal. Un animal dentro del objeto de la invención incluye un mamífero, preferiblemente un perro.

[0019] En una forma de realización preferida, un medicamento tal y como se define aquí se utiliza para aumentar la capacidad de lucha de un sistema inmunitario humano o animal contra una infección y/o una enfermedad, más preferiblemente una infección parasitaria y/o una enfermedad parasitaria. En particular, puede usarse para su administración en un sujeto humano o animal. Un medicamento tal y como se describe aquí se administra preferiblemente por vía parenteral, por ejemplo, por inyección o infusión por vía intravenosa, subcutánea, intraperitoneal, intramuscular, intraarterial o intralesional. Un modo de administración preferido es subcutánea. Un medicamento puede combinarse con un medio farmacéuticamente aceptable o con sistemas de administración a partir de técnicas convencionales conocidas en la técnica. Por ejemplo, un RPE y de forma opcional un adyuvante promotor de Th₁ pueden ser disueltos en una solución salina de tampón de fosfato (PBS). Los métodos para preparar composiciones administrables por vía parenteral son bien conocidos en la técnica y descritos con más detalle en varias fuentes, incluyendo, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, Ed. AR Gennaro, 20^a edición, 2000, Williams & Wilkins, PA, EEUU. Un medicamento se administra preferiblemente en una dosis terapéuticamente efectiva, es decir, una que aumentará la capacidad del sistema inmunitario humano o animal para luchar contra una infección y/o una enfermedad tal y como se describe aquí. Preferiblemente, una dosis terapéuticamente efectiva de un medicamento de la invención prevendrá y/o retrasará el desarrollo de lesiones dérmicas y/o causará una reducción significativa de la cantidad de parásitos en el oído y/o en el ganglio linfático de drenaje (DLN). La evaluación de la presencia de lesiones dérmicas es descrita en las leyendas de la figura 6. La evaluación de la carga parasitaria se describe en el ejemplo. Una dosis terapéuticamente efectiva de un medicamento de la invención preferiblemente prevendrá el desarrollo de lesiones dérmicas y/o preferiblemente causará una reducción de la carga parasitaria en el oído de aproximadamente 3 niveles de magnitud y/o de aproximadamente una magnitud similar en un DLN después de un período de tiempo que conste de una primera vacunación usando una composición de la invención seguida de una infección secuencial con un parásito y un plazo de espera de aproximadamente ±6 semanas. En una forma de realización preferida, un medicamento tal y como se describe aquí es una vacuna. En una forma de realización más preferida, al menos 12 µg de RPE son utilizados en una vacuna. En una forma de realización aún más preferida, al menos 12-20 µg de un RPE deben usarse para proporcionar una respuesta inmunitaria opcionalmente combinada con al menos 50 µg de un adyuvante promotor de Th₁, como por ejemplo CpG ODN. Una vacuna tal y como se describe aquí puede ser una vacuna profiláctica o terapéutica. El volumen en el que el RPE y opcionalmente un adyuvante promotor de Th₁ pueden ser disueltos puede variar entre 100 y 500 microlitros.

Composición

[0020] En otro aspecto, se proporciona una composición que consta de un RPE y opcionalmente un adyuvante promotor de Th₁. Tanto el RPE como el adyuvante promotor de Th₁ han sido ya descritos aquí. En una forma de realización preferida, una composición consiste en un RPE y un adyuvante promotor de Th₁. Un adyuvante promotor de Th₁ preferido es CpG ODN. Una composición preferida consta o consiste en un RPE y opcionalmente un adyuvante promotor de Th₁ disuelto en PBS. En una forma de realización más preferida, se abarca también en la presente invención que un RPE y un adyuvante promotor de Th₁ se administran consecutivamente. Por lo tanto, ninguno de los dos componentes necesita estar físicamente presente en una única composición siempre que ambos se administren en el sujeto.

[0021] Tal composición puede constar además de un adyuvante y/o administrador farmacéuticamente aceptable.

[0022] Tal composición se usa preferentemente como un medicamento. El medicamento es preferiblemente una vacuna. Tanto el medicamento como la vacuna han sido extensamente descritos aquí.

Método

[0023] En otro aspecto, la invención proporciona un método para prevenir y/o tratar una enfermedad parasitaria y/o retrasar su progresión y/o prevenir y/o retrasar el desarrollo de lesiones dérmicas y/o causar una reducción significativa

de la carga parasitaria en un oído y/o en un drenaje de ganglio linfático (DLN) todos ellos tal y como se describe aquí. En este método, una vacuna de la invención funciona como una vacuna terapéutica. Típicamente, existe un período de tiempo entre la infección y la enfermedad. En este caso, una vacuna actuaría como un producto inmunitario farmacológico que prevendría y/o trataría la enfermedad y/o retrasaría su progresión mediante la obtención de una respuesta inmunitaria en el huésped que actuará como contrarreacción al efecto patológico de la infección. Una vacuna terapéutica difiere de una vacuna profiláctica en que una vacuna terapéutica inducirá la protección en un paciente que ya tiene la infección o la enfermedad.

[0024] En el presente documento y en sus reivindicaciones, el verbo "comprender" y sus diferentes conjugaciones se usan en su sentido no limitativo ya que quiere decir que los puntos de acuerdo con lo expuesto están incluidos, pero los artículos no mencionados específicamente no están excluidos. Además el verbo "consistir" se puede sustituir por "consistir esencialmente de" queriendo expresar que un producto o una composición o una mezcla de conservación tal y como la aquí definida puede comprender componente(s) adicional(es) a aquellos identificados específicamente, sin que dicho(s) componente(s) adicional(es) alteren la característica única de la invención.

[0025] Además, la referencia a un elemento mediante el artículo indefinido "un" o "una" no excluye la posibilidad de que haya más de un elemento presente, a menos que el contexto especifique claramente que sólo existe un único elemento. El artículo indefinido "un" o "una" tiene así normalmente el significado "al menos uno".

Descripción de las figuras

[0026]

Fig. 1. (A) Las proteínas ribosómicas *L. infantum* fueron sometidas a electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) en gradiente lineal 10-14 %, transferidas a manchas de nitrocelulosa e incubadas con suero de perros sanos (líneas 1-3), y suero de perros que padecían VCL (líneas 4-13). Los sueros se emplearon en una disolución 1/200. Como reactivo secundario se usó un anticuerpo IgG anticanino conjugado con peroxidasa de rábano (B-E). Se infectaron cuatro ratones BALB/c con 5×10^4 promastigotes de *L. major* en fase estacionaria en la almohadilla plantar izquierda y se obtuvieron sueros ocho semanas después. Cuatro ratones C57BL/6 fueron infectados con 300 promastigotos metacíclicos de *L. major* en la dermis del oído y se obtuvieron sueros tras el estímulo en la semana 14. También se obtuvo suero de preinfección para ambas cepas antes de llevarse a cabo el estímulo parasitario.

(B) Las proteínas ribosómicas de *L. major* fueron sometidas a electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) en gradiente lineal 10-14 %, transferidas a manchas de nitrocelulosa e incubadas con suero obtenido de ratones infectados BALB/c o C57BL/6. Se empleó suero en una disolución 1/200. Ningún suero preinfectado mostró reactividad contra LRP (no mostrado). (C) Los títulos para los anticuerpos IgG1 e IgG2a contra LRP en ambas cepas de ratones fueron determinadas individualmente por ELISA. (D) Ocho semanas después de la infección se practicó una eutanasia a los ratones BALB/c y se cultivaron *in vitro* sus células de DLN poplíteo durante 48 h en presencia de 12 µg de 1 ml de LRP de *L. major* o en el medio solo. Los niveles de IFN-γ, IL-4 e IL-10 fueron evaluados por ELISA en los sobrenadantes cultivados. (E) Catorce semanas después la infección se practicó una eutanasia a los ratones C57BL/6 y sus DLN retromaxilares se trataron como se describe en D.

Fig. 2. (A) análisis de la respuesta humoral específica inducida en ratones BALB/c. Los ratones BALB/c (seis por grupo) fueron inmunizados por vía subcutánea en la almohadilla plantar derecha con tres dosis de proteínas ribosómicas de *L. major* solas (LRP), o con el adyuvante CpG ODN (LRP + CpG), sólo con el adyuvante CpG ODN (CpG) o con PBS (solución salina). Cuatro semanas después de la tercera inmunización, se extrajo sangre a los ratones y los sueros fueron evaluados mediante ELISA para respuestas específicas de los anticuerpos anti-LRP tanto de los isotipos IgG1 (barras negras) como IgG2a (barras blancas). Ningún suero preinmunitario mostró reactividad (B-D). Cuatro semanas después de la vacunación se practicó una eutanasia a los ratones y se obtuvieron sus bazos y se cultivaron *in vitro* durante 48 h en presencia de LRP (barras grises) o del medio solo (barras negras). Los niveles de IFN-γ (B), IL-4 (C) e IL-10 (D) fueron evaluados por ELISA en los sobrenadantes cultivados.

Fig. 3. (A) Trayectoria de la infección por *L. major* en ratones vacunados BALB/c. Los ratones (seis por grupo) fueron inmunizados por vía subcutánea como se indica en la Fig. 2. Un mes después de la última inmunización, se infectó a los animales en la almohadilla plantar posterior izquierda con 5×10^4 promastigotes de *L. major* en fase estacionaria. La inflamación de la almohadilla plantar se determina con la diferencia de grosor entre la almohadilla plantar infectada y la contralateral no infectada. Los resultados representan la desviación típica y media para dos experimentos independientes. * $P < 0,001$ diferencias significativas en la inflamación para LRP + ratones vacunados CpG ODN frente al grupo de ratones CpG ODN ocho semanas después de que se produjera el estímulo. (B) En la semana ocho tras la infección el número de parásitos viables en el DLN poplíteo de la pierna infectada y el bazo fueron individualmente determinados limitando la disolución. Los resultados representan la desviación típica y media para dos experimentos

independientes. * $P < 0,01$ diferencias significativas en la carga parasitaria del poplíteo para LRP + ratones vacunados CpG ODN frente al grupo de ratones CpG ODN en la semana 8 después de que se produjera el estímulo. (C-D) La producción de citocina en ratones infectados y vacunados se determina ocho semanas después de que se produjera el estímulo con *L. major*. El DLN poplíteo de la pierna infectada se obtuvo y se cultivó *in vitro* durante 48 h en presencia de SLA (barras blancas), LRP (barras grises) o el medio solo (barras negras). Los niveles de IL-4 (C), IL-10 (D), e IFN- γ (E) en los sobrenadantes cultivados fueron evaluados mediante ELISA. Este experimento se repitió con resultados similares. (F) Análisis de la participación de IL-12 y de linfocitos T en la producción de IFN- γ asociada a la protección conferida por la vacunación con LRP + ODN CpG. El LN poplíteo de los ratones vacunados con ODN CpG (barras negras) y LRP + ODN CpG (barras blancas) fueron obtenidos ocho semanas después del estímulo con 5×10^4 promastigotes de *L. major* en fase estacionaria y estimulados y cultivados con LRP en presencia de bien anti-IL-12, anti-CD4 o anti-CD8, y anticuerpos monoclonales de control. Los niveles de IFN- γ fueron evaluados por ELISA 78h después de la incubación. Las diferencias en la producción de IFN- γ entre el tratamiento con anticuerpos monoclonales anti-CD8 y el tratamiento con anticuerpos de control monoclonales fueron estadísticamente significativas (* $P < 0,05$). Los datos corresponden a un experimento representativo de dos experimentos independientes con resultados similares.

Fig. 4. Análisis de la polarización de IgG1/IgG2a. (A) Las muestras de suero fueron obtenidas ocho semanas después del estímulo y el título para los anticuerpos IgG1 e IgG2a contra el LRP fueron determinados individualmente mediante ELISA. Las diferencias en el título del IgG1 entre ratones vacunados con LRP + ODN CpG y los otros tres grupos resultaron estadísticamente significativas (* $P < 0,01$). (B) El LRP de *L. major* fue redissuelto en gel SDS-PAGE en gradiente lineal 10-14% transferido en manchas de nitrocelulosa e incubados con suero obtenido de los grupos de ratones indicados con una disolución 1/200. Se muestran las respuestas de los anticuerpos tanto de los isotipos de IgG1 y IgG2a. (C) Se emplearon los mismos sueros para la determinación de las valoraciones de IgG1 e IgG2a frente a SLA. Las diferencias en el título de IgG1 entre los ratones vacunados con LRP + ODN CpG y los otros tres grupos fueron estadísticamente significativas (* $P < 0,02$).

Fig. 5. Seis ratones BALB/C fueron vacunados con LRP + ODN CpG e infectados en la almohadilla plantar izquierda como se indica en la Fig. 3. Dieciocho semanas después del primer estímulo parasitario se re infectó a los ratones en el oído con 300 promastigotes metacíclicos de *L. major*. Como control seis ratones que no habían sido expuestos a ningún antígeno también fueron estimulados en el oído. (A) curso de la infección por *L. major* en ratones BALB/c protegidos y re infectados. Los valores representan el diámetro de lesión media + desviación típica (DT). * $P < 0,0001$ Diferencias significativas en la inflamación por re infección frente a infección de control en ratones 7 semanas después del estímulo. (B) Siete semanas después de la re infección, se practicó una eutanasia a los ratones y se cuantificó individualmente la carga parasitaria en la dermis del oído, el bazo y el DLN local. Los resultados se expresan como \pm SD de doce oídos y DLN. * $P < 0,001$ Reducción significativa en ratones re infectados frente a ratones infectados por control. (C) Después de la eutanasia el DLN retromaxilar de los ratones de control (barras negras) y los ratones re infectados (barras blancas) fueron obtenidos y cultivados *in vitro* durante 48h en presencia de SLA, LRP o solo. Los niveles de IFN- γ , IL-4 e IL-10 fueron evaluados por ELISA en los sobrenadantes cultivados. (D-E) Se obtuvieron muestras de suero siete semanas después del re-estímulo y el título para los anticuerpos IgG1 y IgG2a contra LRP (D) y SLA (E) fue determinado individualmente por ELISA.

Fig. 6. Protección contra la infección de *L. major* en ratones C57BL/6. Los ratones (seis por grupo) fueron inmunizados por vía subcutánea en la almohadilla plantar derecha con tres dosis de LRP + ODN CpG y con ODN CpG solo (A) Producción de IFN- γ , IL-4 e IL-10 por esplenocitos de ratones vacunados C57BL/6. Cuatro semanas después de la vacunación con ODN CpG (barras negras) o LRP + ODN CpG (barras blancas) se practicó una eutanasia a los ratones y se extrajeron sus bazos y se cultivaron *in vitro* durante 48 h en presencia de LRP o solos. El nivel de citocinas fue evaluado por ELISA en el sobrenadante cultivado. (B) Trayectoria de la infección por *L. major* en ratones vacunados C57BL/6. Doce ratones de cada grupo fueron inmunizados como se ha descrito anteriormente y cuatro semanas después de la última inoculación se infectaron mediante inoculación en el oído con 300 promastigotes metacíclicos de *L. major*. Los valores representan el diámetro de lesión media + desviación típica (SD). * $P < 0,001$ Reducción significativa en la inflamación entre los dos grupos de ratones. (C) La carga parasitaria en la dermis del oído y en el DLN local de ratones vacunados con ODN CpG (barras negras) o LRP + ODN CpG (barras blancas) cuantificado en la semana cinco (seis ratones por grupo) y trece (seis ratones por grupo) post infección. Los resultados se expresan con \pm DT de doce oídos y DLN. * $P < 0,01$ Reducción significativa entre ambos grupos de ratones. (D-E) La producción de IFN γ en ratones vacunados con CpG (barras negras) o LRP + ODN CpG (barras blancas). Las células de los retromaxilares se obtuvieron 5 semanas después de la infección y se estimularon en el cultivo en presencia de SLA, LRP y solas (D) o con LRP en presencia de anti-IL-12, anti-CD4 o antiCD8, y anticuerpos de control monoclonales. El nivel de IFN- γ fue evaluado por ELISA después de 78 h de incubación. Las diferencias en la producción de IFN- γ entre el tratamiento con anticuerpos monoclonales antiCD8 y el tratamiento con anticuerpos de control fueron estadísticamente significativas (* $P < 0,01$). (F) Se obtuvieron muestras de suero en la semana 5 y 13 tras el estímulo y las valoraciones para los anticuerpos IgG1 e IgG2a contra la LRP fueron determinadas individualmente por ELISA. (G) Producción de IL-10 en

ratones vacunados con ODN CpG (barras negras) o LRP + ODN CpG (barras blancas). Se obtuvieron células de los retromaxilares 5 semanas después de la infección y fueron estimuladas en cultivo en presencia de SLA, LRP o solas. El nivel de IL-10 fue evaluado por ELISA después de 78 h de incubación.

5 Ejemplos

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas de ratones y parásitos.

10 [0027] Los ratones hembra Balb/C tuvieron un crecimiento de entre 6 a 8 semanas al inicio de los experimentos y fueron comprados a Harlan Interfauna Ibérica S.A. (Barcelona, España). Los parásitos de *L. major* (clon WHOM/IR/-173) y clon V1 (MHOM/IL/80(Friedlin) se mantuvieron en estado virulento al transmitirlos a los ratones BALB/c. Los amastigotes de *L. major* se obtuvieron de los ganglios linfáticos de drenaje poplíteos (DLN) y transformados en promastigotes por cultivo a 26 °C en el medio de Schneider (Gibco; BRL) suplementados con 20% de suero fetal de ternera (FCS) hasta que alcanzaron la fase estacionaria tardía. Los promastigotes de ambos clones fueron cultivados a 26 °C en el medio de Schneider (Gibco; BRL) suplementados con 20% de FCS. Los promastigotes en fase infecciosa (metacíclicos) de *L. major* (clon V1) se aislaron de cultivos estacionarios por selección negativa usando aglutinina de cacahuete (Laboratorios Vector, Burlingame, CA.). Los promastigotes de *L. infantum* (MCAN/ES/96/BCN/150, MON-1) fueron cultivados a 26 °C en medio RPMI (Gibco, BRL) suplementados con 10% de FCS.

ODN CpG y antígenos de *Leishmania*.

25 [0028] Para la preparación de los extractos de proteína ribosómica de *Leishmania* (LRP), se cosecharon promastigotes de *L. major* y *L. Infantum*, lavado dos veces en BFS preenfriado y resuspendidos en 1 ml NP40 (Roche Diagnostics, GmbH, Mannheim Alemania, cat. N. 11332473001) Buffer de lisis (Buffer A) (10 mM Tris ClH pH 8.0 150 mM NaCl 1.5 mM Mg12 y 0.5 % NP40, PMSF 1 mM, leupeptina 8 µg/ml, aprotinina 4 µg/ml y Pentatin 8 µg/ml). Y pipeteada arriba y abajo 10 veces. Después de la lisis, las muestras se microcentrifugaron a 3,000 x g durante 2 min a 4 °C para granular los núcleos. El sobrenadante se microcentrifugó dos veces a 13,000 x g durante 15 min a 4 °C y los ribosomas se prepararon a partir del sobrenadante citosólico como se describe en (45). Brevemente, el citosol fue sometido a un centrifugado de alta velocidad a 90,000 r.p.m. durante 30 min a 4 °C en un rotor Beckman TL100,3. El crudo del granulado ribosómico fue resuspendido en el buffer B (20 mM Tris-HCl, pH 7,4,500 mM AcNH4,100 mMMgCL2,5mM β - mercaptoetanol) y centrifugado a través de un gradiente discontinuo de sacarosa (20/40%) en el buffer B a 90,000 r.p.m. a 4 °C en un rotor TL100,3. El granulado de ribosomas lavados fue disuelto en BFS, sonicado y almacenado a - 70 °C.

35 [0029] Las proteínas totales de *L. major* (antígeno soluble de *Leishmania* soluble [SLA]) fueron preparadas en tres ciclos de congelación y descongelación de promastigotes en fase estacionaria de *L. major* suspendidos en BFS. Tras la lisis celular, los antígenos solubles fueron separados de la fracción insoluble por centrifugado durante 15 min a 12,000 g utilizando un microcentrifugado y almacenado a - 70 °C. Las secuencias de ODN modificadas con fosforiotato que contenían motivos CpG (ODN CpG) fueron sintetizadas por Isogen (Holanda). Las secuencias de los ODN inmunoestimuladores (5' a 3') fueron TCAACGTTGA y GCTAGCGTTAGCGT.

Inmunizaciones y parásito challege.

45 [0030] Los ratones BALB/c fueron inoculados subcutáneamente (s.c.) en la almohadilla plantar adecuada con bien 12 µg de LRP de *L. major* LRP solo o añadiendo 50 µg de ODN CpG (25 µg de cada ODN inmunoestimulador), ODN CpG (50 µg) adyuvante solo, o buffer fosfato salino (BFS). Cada grupo fue estimulado 2 y 4 semanas más tarde utilizando el mismo régimen. El primer estímulo parasitario se efectuó por inoculación s.c. con 5×10^4 promastigotes en fase estacionaria de *L. major* (clon WHOM/IR/- 173) en la almohadilla plantar izquierda (no tratada) cuatro semanas después de la última inoculación. El progreso de la infección fue seguido por la medición del grosor con un calibrador métrico. La almohadilla plantar contralateral de cada animal representaba el valor de control, y la inflamación fue calculada de la siguiente manera: grosor de la almohadilla plantar izquierda menos grosor de la almohadilla plantar derecha. Se practicó eutanasia a los animales cuando las lesiones se volvieron necróticas. Para la reinfección seis ratones BALB/c fueron vacunados e infectados como ha sido descrito anteriormente. Después de dieciocho semanas, 300 promastigotes metacíclicos de *L. major* (clon V1) fueron inyectados en la dermis de ambos oídos de cada ratón. La evolución de la infección fue monitoreada por medición del diámetro de los endurecimientos de las lesiones del oído con un calibrador métrico. Como control un grupo de seis ratones BALB/c que no habían sido expuestos a ningún antígeno también fueron infectados en la dermis de oreja.

60 [0031] Los ratones C57BL/6 fueron inyectados s.c. en la almohadilla plantar con 12 µg de LRP de *L. major* + 50 µg ODN CpG (25 µg de cada ODN inmunoestimulador), y 50 µg de ODN CpG (50 µg) solo el adyuvante. Estos ratones fueron

estimulados dos y cuatro semanas más tarde con el mismo régimen de inmunización. La infección se llevó a cabo 4 semanas después de la última vacunación por inoculación intradérmica (i.i.) de 300 promastigotes metacíclicos de *L. major* (clon V1) en la dermis de ambos oídos del ratón. La evolución de la infección fue monitoreada por medición del diámetro de los endurecimientos de la lesión de oído con un calibrador métrico.

5

Cuantificación parasitaria.

[0032] El número de parásitos en los oídos se determinó limitando la evaluación de la disolución (6). Sucintamente se recuperaron los oídos de los ratones infectados. Se separaron las hojas dorsales y ventrales de los oídos infectados. Se depositaron las láminas del oído en un medio Eagle modificado de Dulbecco que contenía una mezcla de enzimas Liberase CI (50 µg 1 de ml). Tras 2 horas de incubación a 37 °C, los tejidos fueron cortados en pequeños trozos, homogeneizados y filtrados utilizando un depurador celular (tamaño de poro de 70 µM). El tejido homogeneizado fue diluido en serie en una buena placa de microtitulación de fondo plano de 96 pocillos que contenía medio de cultivo de Schneider más 20% de suero fetal de ternera (FCS).

10

15

El número de parásitos viables se determinó a partir de la mayor dilución a la que los promastigotes podían crecer en 7 días de incubación a 26 °C. El número de parásitos también se determinó en los ganglios linfáticos de drenaje (DLN) locales de oídos infectados (retromaxilar), en la almohadilla plantar (poplíteo) y en el bazo. Se recuperaron los órganos, se disociaron mecánicamente y luego se diluyeron en serie como se describe. La carga parasitaria se expresa como el número de parásitos en el órgano por completo.

20

Medición de citocinas en sobrenadantes.

[0033] Los bazos y los DLN locales correspondientes se eliminaron asépticamente, disociándose mecánicamente y sembrándose en el medio RPMI completo (RPMI 1640 suplementado con 10% FCS, 2 mM glutamina, y 10 mM 2-mercaptoetanol). 5×10^6 células ml^{-1} se sembraron en placas de 48 pocillos durante 48 h a 37°C en presencia de LRP (12 µg ml^{-1}) o SLA (12 µg ml^{-1}). La liberación de IFN-γ, IL-10 e IL-4 se midió en los sobrenadantes de esplenocitos y las células de DLN cultivadas mediante equipos comerciales de ELISA (Diacclone, Besançon, Francia). En algunos casos, las células de DLN estimuladas con 12 µg ml^{-1} de LRP se incubaron en presencia de 10 µg ml^{-1} de anticuerpo monoclonal (mAb) contra ratones tanto de CD4 (GK 1.5), IL-12 (C17.8) o CD8 (53-6.7). También se analizaron en el ensayo controles apropiados de isotipo conjugados. Los anticuerpos (endotoxina baja™ sin ácido) se compraron en BD (PharMingen).

25

30

Análisis de las respuestas humorales.

[0034] Las muestras de suero fueron analizadas para anticuerpos específicos contra LRP o SLA mediante ELISA o Western Blot. Las placas estándar de ELISA se recubrieron durante la noche a temperatura ambiente con 100 µl de LRP (5 µg ml^{-1}) en BFS) o SLA (2 µg ml^{-1} en BFS). El título se determinó por una disolución en serie del suero y se definió como lo inverso al mayor factor de disolución de suero dada una absorbancia > 0.2. Los análisis específicos de isotipos se realizaron con las siguientes inmunoglobulinas con un conjugado de peroxidasa de *Armoracia rusticana* anti-ratón (Nordic Immunological Laboratories, Tilburg, Países Bajos): anti-IgG1 (1/1000) y anti-IgG2a (1/500). Se usó dihidrocloruro de ortofenilendiamina - OPD- (Dako, A/S, Glostrup, Dinamarca) como sustrato de peroxidasa para ensayos con ELISA. Tras 15 min, la reacción se detuvo por adición de 100 µl de H₂ SO₄ 1 M y la absorbancia se leyó a 450 nm.

35

40

[0035] Para análisis con Western Blot, se obtuvieron proteínas ribosómicas de *L. infantum* y *L. major*, se resuspendieron en buffer Laemmli, resuelto en gel de poliacrilamida con docecilsulfato sódico (SDS-PAGE) y transferido a membranas de nitrocelulosa (Amersham, Aylesbury, Reino Unido). Las manchas fueron evaluadas con suero para perros de control, perros que padecían leishmaniasis vicerocutánea canina (LVC), o sueros de diferentes grupos de ratones empleados en el presente trabajo en las disoluciones indicadas. Se usaron como anticuerpos secundarios inmunoglobulina con un conjugado de peroxidasa de *Armoracia rusticana* anti-IgG (1/1000), anti-igG1 (1/1000), anti-IgG2a (1/500), e IgG anti-canino (1/2000) comprados en Nordic Immunological Laboratories (Tilburg, Países Bajos).

45

50

Análisis estadístico.

[0036] El análisis estadístico se realizó por una prueba T de student. Las diferencias se consideraron significativas cuando P < 0.05.

55

Resultados

Antigenicidad del LRP durante la infección.

[0037] Para analizar la antigenicidad de las proteínas ribosómicas de *Leishmania* (LRP) se evaluó la reactividad contra LRP de *L. infantum* de suero de perros infectados naturalmente mediante Western blot. Se observó que el suero de

60

perros que padecían la enfermedad de manera activa reconocía un gran número de bandas proteicas en el extracto de LRP (Fig. 1A). El suero de ratones BALB/c y C57BL/6 experimentalmente infectados con *L. major* también reconoció muchas bandas proteicas en la LRP de *L. major*, siendo el número de proteínas ribosómicas reconocido por anticuerpos IgG presentes en suero de ratones susceptibles BALB/c superior al número de proteínas reconocidas por estos anticuerpos en sueros de ratones resistentes C57BL/6 (Fig. 1B).

[0038] Debido a que la inducción de anticuerpos IgG1 e IgG2a se puede usar como un marcador respuestas inmunitarias (8) del tipo Th₂ y del tipo Th₁, realizamos análisis de polarización de IgG1/IgG2a contra LRP de ratones infectados con *L. major*. En ratones BALB/c la respuesta anti-LRP fue predominantemente del isotipo IgG1 mientras que fue del isotipo IgG2a en ratones C57BL/6 (Fig. 1C). También se determinó la producción de IFN γ , IL-4 e IL-10 tras la estimulación in vitro de células de DLN con LRP en ambas cepas. Se detectó la producción de IFN γ específico de LRP en ratones BALB/c que padecían CL pero también la producción de IL-4 e IL-10 fue fuertemente estimulada siendo la proporción de IFN γ /IL-4 \approx 2.4 y la de IFN γ /IL-10 \approx 1.4 (Fig. 1D). En cambio, no se obtuvo IL-4 (< 7.5 pg 1 de ml) ni una proporción alta de IFN γ IL-10 (\approx 15) cuando se estimularon con LRP células de DLN de ratones C57BL/6 curados (Fig. 1E).

Inmunogenicidad de la LRP en ratones BALB/c.

[0039] Las respuestas inmunitarias a LRP fueron evaluadas en ratones BALB/c después de la administración de proteínas ribosómicas en ausencia y en presencia de ODN CpG. Tras la vacunación con LRPE + ODN CpG la respuesta humoral anti-LRPE fue predominantemente del isotipo IgG2a, mientras que se detectó un título inferior de anticuerpos del isotipo IgG 1 en el suero de ratones inmunizados con LRPE solo (Fig. 2A). Después de la estimulación in vitro con LRPE las células del bazo de ratones inmunizados con LRPE + ODN GpG segregaron mayores niveles de IFN γ que aquellas células de bazo de ratones de control e inmunizados con LRPE solo (Fig. 2B). No se observó ningún aumento en la producción de IL-4 tras la estimulación con LRPE en ningún grupo (Fig. 2C). Se detectó de manera notable IL-10 específico en el sobrenadante de cultivos establecidos de bazos de LRPE + ODN CpG de ratones vacunados siendo la proporción de IFN γ /IL-10 \approx 40 (Fig. 2D). En general, estos resultados demostraron que el LRPE administrado sin adyuvantes induce sólo débiles respuestas humorales de IgG 1, pero la coadministración con ODN CpG estimula una respuesta de tipo Th₁ contra estos antígenos en ratones BALB/c.

La vacunación con LRPE + ODN CpG protege a los ratones BALB/c contra los estímulos de *L. major*.

[0040] Dado que la redirección de las respuestas Th₂ inducidas por antígenos asociados a la enfermedad hacia una respuesta Th₁ ha sido considerada como un método prometedor para el desarrollo de vacunas contra la *Leishmania* (7) analizamos si la vacunación con LRPE + ODN CpG era capaz de proteger contra la infección de *L. major*. La Fig. 3A muestra que LRPE + CpG OND protege eficazmente ya que se redujo la inflamación en las almohadillas plantares de estos ratones (valor medio de 0.7 mm en la semana 8) en comparación con aquellos ratones de control y ratones vacunados con LRPE solo (valor medio \approx 5.5 mm). Luego analizamos la carga parasitaria en el drenaje de ganglios poplíteos linfáticos y en el bazo de cuatro grupos de ratones. El DLN de ratones inmunizados con LRPE-CpG mostró una reducción de \approx 3-log en la carga parasitaria en relación a los otros grupos. Además, mientras que se encontraron cargas parasitarias similares en el bazo de ratones de control y de ratones inmunizados con LRPE solo no se detectaron parásitos en el bazo de los ratones vacunados con LRPE + ODN CpG (Fig. 3B).

[0041] Para determinar los parámetros inmunológicos asociados a la protección inducida con LRPE + ODN CpG, se evaluó la producción de SLA o de LRPE de IL-4; IL-10 e IF- γ . Se detectó la producción de IL-4 e IL-10 de SLA o LRPE específicamente inducidos en la producción de células de control de DLN (solución salina y CpG) y en ratones inmunizados con LRPE solo (Fig. 3C-D). En cambio, las células de DLN de ratones inmunizados con LRPE + ODN CpG produjeron cantidades más altas de IFN- γ que aquellas detectadas en los otros tres grupos (Fig. 3E). También se analizó la aportación de linfocitos T CD⁴⁺ y CD8⁺ y la dependencia de IL-12 en la producción de IFN- γ con producción específica de LRPE. Como se muestra en la Fig.3F, la producción de IFN- γ fue inhibida por completo con anticuerpos monoclonales anti-IL-12 o anti-CD4. La adición de anticuerpos anti-CD8 al cultivo de células de DLN redujo solo parcialmente las cantidades de esta citocina en el sobrenadante.

[0042] Dado que se asocia la producción dependiente de IL-4 de altas valoraciones de anticuerpos en ratones Balb/C con la progresión de la enfermedad, nosotros analizamos las respuestas humorales suscitadas contra el LRPE en la semana ocho tras la infección mediante ELISA. Los anticuerpos contra el LRPE suscitados por el estímulo parasitario en ratones inmunizados con LRPE + ODN CpG fueron principalmente del isotipo IgG2a. También, estaba presente un título inferior de los anticuerpos anti-LRPE del isotipo IgG 1 en el suero de ratones protegidos cuando se comparaba con aquellos inmunizados con LRPE solo y con los dos grupos de control (Fig. 4 A). La reducción del título del IgG1 1 contra LRPE se correlaciona con una reducción en el número de bandas de proteínas ribosómicas reconocidas por los anticuerpos IgG I de sueros de los ratones vacunados con LRPE + ODN CpG. Como se muestra en la Fig. 4B, los

anticuerpos del isotipo IgG1 a partir de suero de ratones inmunizados con una solución salina, CpG o LRPE solo reconocieron un número más alto de bandas proteicas en LRPE mediante Western Blot, mientras que solo unas cuantas bandas fueron reconocidas por los anticuerpos IgG de los ratones protegidos. El análisis de Western Blot también mostró que no hubo un aumento en el número de bandas proteicas reconocidas por los anticuerpos IgG2a en el suero de ratones vacunados con LRPE + ODN CpG cuando se comparaban con los otros tres grupos (Fig. 4B). La vacunación con LRPE + ODN CpG también condicionó la respuesta humoral global anti-*Leishmania* inducida por infección por *L. major*. Los anticuerpos contra SLA suscitados por el estímulo parasitario en ratones inmunizados con LRPE + ODN CpG fueron principalmente del isotipo IgG2a, siendo el título anti-SLA de los anticuerpos del isotipo IgG 1 significativamente inferior a aquellos detectados en los otros tres grupos (Fig. 4C).

Los ratones vacunados e infectados con LRPE + ODN CpG son más resistentes contra la reinfección por *L. major* en la dermis del oído.

[0043] Para determinar si los ratones vacunados e infectados con LRPE + ODN CpG fueron capaces de controlar un segundo estímulo parasitario, se vacunó e infectó a seis ratones BALB/c en la almohadilla plantar como se ha descrito anteriormente. La inflamación de la almohadilla plantar de este grupo de ratones fue < 0.7 mm durante 18 semanas (datos no mostrados). Luego, estos ratones protegidos fueron reinfectados con 300 promastigotes metacíclicos de *L. major* en la dermis del oído. También se infectó a un grupo de control de seis ratones que no habían sido expuestos a ningún antígeno. Se observó que se protegió los ratones reinfectados vacunados con LRPE + ODN CpG contra el desarrollo de lesiones dérmicas debido a que no se observó ninguna patología en estos ratones, mientras que los ratones de control desarrollaron lesiones en el oído en la semana siete (Fig. 5A). La carga parasitaria en la dermis del oído y en el drenaje del ganglio linfático retromaxilar fue también significativamente diferente en ambos grupos (Fig. 5B). La baja carga parasitaria en el oído y en el DLN de ratones vacunados y reinfectados se correlaciona con la ausencia de parásitos en el bazo. Para conocer la respuesta celular tras la reinfección se analizó la secreción de IFN- γ , IL-4, e IL-10 por células de DLN retromaxilares tras la estimulación in vitro con LRPE o SLA (Fig. 5C).

En los ratones de control, como también ocurrió cuando los ratones fueron infectados en la almohadilla plantar (Fig. 3C-E) se detectó una producción específica de IFN- γ pero también una producción fuertemente estimulada de IL-4 e IL-10. En contraste, las células de DLN de los ratones vacunados y reinfectados produjeron altas cantidades de IFN- γ específico, sin detectarse apenas IL-4 o IL-10 (Fig. 5C). De acuerdo con esto, su respuesta humoral 1gG contra LRPE (Fig. 5D) y SLA (Fig. 5E) fue del isotipo IgG2a.

La vacunación con LRPE + ODN CpG confiere protección contra la patología dérmica debido a un estímulo de *L. major* en ratones C57BL/6.

[0044] Dado que la vacunación con LRPE + ODN CpG protege contra la infección por *L. major* en ratones BALB/c por la redirección de la respuesta inmunitaria de Th₂ contra LRPE hacia una respuesta Th₁, analizamos el efecto de la administración de esta vacuna en ratones C57BL/6, un modelo que naturalmente desarrolla respuestas Th₁ contra los antígenos de la *Leishmania*. Se inmunizó a un grupo de ratones C57BL/6 con tres dosis de LRPE + ODN CpG y los ratones de control recibieron solo el adyuvante ODN CpG. La inoculación indujo una respuesta Th₁ demostrada por la producción in vitro de IFN- γ en el sobrenadante de células del bazo cultivadas y estimuladas con LRPE. También se detectó la presencia de IL-10 en el sobrenadante de cultivos de células de bazo establecido a partir de ratones vacunados con LRPE + ODN CpG, mientras que no se observó la producción específica de IL-4 tras la estimulación (Fig. 6A). Los ratones vacunados con LRPE + ODN CpG fueron protegidos contra el desarrollo de lesiones dérmicas debido a que no se observaron patologías o de poca importancia (Fig. 6B). Los ratones inmunizados con ODN CpG desarrollaron lesiones que alcanzaron un valor máximo en la semana siete y que sanaron casi por completo en la semana 13. Dado que en este modelo el número de parásitos se encuentra en el valor máximo de infección justo antes del desarrollo de la lesión (5), determinamos la carga parasitaria en el oído y en DLN local (retromaxilar) en la semana cinco. El número de parásitos en la dermis del oído en ratones vacunados tuvo una reducción de ≈ 300 por pliegue (1.0×10^4 parásitos por LRPE + ODN CpG y 3×10^6 parásitos para ratones inmunizados por CpG-ODN) y una reducción de ≈ 40 por pliegue en el DLN (5.0×10^4 parásitos para LRPE + ODN CpG y 2×10^6 parásitos para ratones con ODN CpG). Tras la curación, se observó una reducción en el número de parásitos en los ratones de control de todos los grupos (13 semanas después del estímulo).

[0045] Para determinar los parámetros inmunológicos asociados a la protección, se evaluó la producción del antígeno conductor de IL-4; IL-10 e IFN- γ . En la semana cinco tras el estímulo los cultivos de las células de DLN fueron establecidos y estimulados con LRPE o SLA. Como se muestra en la Fig. 6D las células de ratones vacunados produjeron más SLA e IFN- γ específico de LRPE que aquellas de ratones de control. Se analizó también la aportación de los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ y la dependencia de IL-12 en la producción de IFN- γ específico de LRPE. La secreción de IFN- γ fue completamente inhibida por los anticuerpos monoclonales anti-IL-12 o anti-CD4. El tratamiento con anticuerpos anti-CD8 sólo redujo parcialmente el nivel de esta citocina. Estos datos demostraron que en C57BL/6, la vacunación con

LRPE + ODN CpG indujo a una reducción en la patología y en la carga parasitaria en la piel y en el DLN local que se correlaciona con la inducción de una respuesta previa específica de Th₁ contra LRPE. De acuerdo a esto, se detectaron previamente anticuerpos IgG2a específicos anti-LRPE y con mayores valoraciones en ratones vacunados frente a ratones de control (Fig. 6F). También se detectó que una producción IL-10 específica de antígenos de SLA o LRPE no era estadísticamente diferente entre ratones vacunados y de control.

EXPOSICIÓN

[0046] En este trabajo hemos mostrado que los anticuerpos que reaccionan con muchas de las proteínas ribosómicas de parásitos se observan en los sueros de perros con VCL y en ratones infectados con *L. major*, indicando que son fuertes antígenos en la infección experimental y natural de *Leishmania*. La respuesta de los ratones BALB/c infectados contra LRPE fue del tipo Th₂ debido a que la respuesta del anticuerpo anti-LRPE fue predominantemente del isotipo IgG1. Esta observación se vio reforzada por el hecho de que después de la estimulación in vitro con células de DLN de ratones infectados con LRPE, se detectaron altas cantidades de IL-4 en los sobrenadantes de cultivo. Aunque el LRPE también se vio implicado en la producción in vitro de IFN- γ se detectaron niveles comparables de IL-10, una citocina anti-inflamatoria pleiotrópica que desarrolla macrófagos infectados indiferentes a las señales de activación para la destrucción del parásito (31). Además, dado que los efectos de IL-4 e IL-10 en la promoción de la enfermedad en ratones BALB/c parecen ser aditivos (visto en (37)), la estimulación de estas citocinas por LRPE se pueden tomar como una indicación de que las respuestas del huésped contra los antígenos ribosómicos favorece la expansión del parásito y la persistencia en los ratones BALB/c. Podríamos asumir que tras la infección por *Leishmania*, el sistema inmunitario del huésped está ocupado por la abundante liberación de LRPE por citólisis parasitaria que, después, podría ser estimulada como resultado de la proliferación del parásito. Así, la fuerte inmunogenicidad del LRPE y su papel patoantigénico depende probablemente de su abundancia y especificidad antigénica (en lugar de su carácter evolutivo conservado). Por el contrario, las respuestas de los ratones C57BL/6 contra el LRPE fueron de tipo Th₁, con la generación de anticuerpos IgG2a específicos y la producción in vitro de altos niveles IFN- γ específico, sin que los niveles IL-4 pudieran detectarse. También encontramos una producción de LRPE específica de IL-10 en la semana 14 tras la infección. Dado que la proporción de IFN- γ /IL-10 era similar a la obtenida cuando las células fueron estimuladas con SLA (datos no mostrados) sugerimos que la producción de IL-10 inducida por estos antígenos podría asociarse con la respuesta reguladora que favorece la persistencia del parásito que ha sido vista en este modelo (4). Nuestros datos indican que la respuesta contra el LRPE está en línea con la inducción de respuestas humorales mediadas por Th₂ relacionadas con patologías en huéspedes vulnerables y respuestas protectoras asociadas con Th₁ en huéspedes resistentes.

[0047] Dado que la redirección de las respuestas Th₂ se encontraba en contra de algunos epítomos de *Leishmania* hacia una respuesta Th₁ es probable que se muestre como una estrategia prometedora en la protección contra la infección de *L. major* (7) en primer lugar decidimos analizar la inmunogenicidad en ratones BALB/c del LRPE coadministrado con ODN CpG, un adyuvante que confiere una inmunidad relacionada a Th₁ a largo plazo y que protege cuando se inmuniza con diferentes antígenos de *Leishmania* (43) y que también puede evitar algunas respuestas parasitarias específicas de Th₂ en el ratón (12,57). Como se muestra en la Fig. 2, la respuesta inmunitaria desarrollada en BALB/c resultó ser del tipo Th₁ debido a que los ratones inmunizados desarrollaron anticuerpos anti-LRPE del isotipo IgG2a y los esplenocitos de ratones vacunados produjeron altas cantidades de IFN- γ después de la estimulación in vitro con LRPE, pero no del isotipo IL-4. Se generaron respuestas inmunológicas específicas similares en ratones C57BL/6 cuando se inmunizaron con LRPE + ODN CpG (Fig. 6A). Se observó también una producción de IL-10 motivada por LRPE en ambas cepas tras la inmunización.

[0048] Aunque se ha reseñado que la vacunación con vacunas genéticas que codifican para L31 puede verse involucrada en la producción de IL-10 específico tras la vacunación genética (44), creemos que la producción de IL-10 podría estar además relacionada con el control homeostático de las respuestas de Th₁ que ocurren tras la administración de LRPE + ODN CpG. De hecho, se ha reseñado recientemente que cuando el IFN- γ produce células Th₁ puede también involucrarse en la producción de IL-10 como un mecanismo de control por repercusión bilateral (2). Por otra parte, la alta proporción de los valores de IFN- γ /IL-10 obtenidos puede proporcionar una buena predicción de los resultados de vacuna (44).

[0049] Los datos aquí mostrados indican que la coadministración de LRPE + ODN CpG induce protección en dos modelos diferentes de leishmaniasis cutánea experimental: altas dosis de inóculos en la almohadilla plantar de los ratones BALB/c (usados con gran asiduidad en los ensayos de vacunas contra la leishmaniasis cutánea), y bajas dosis en los oídos de los ratones C57BL/6 (un modelo que imita con más fidelidad la enfermedad humana en cuanto a vía y dosis infecciosa). Los ratones BALB/c vacunados redujeron la carga parasitaria en el ganglio poplíteo con la ausencia de diseminación parasitaria en el bazo. También se detectó una inflamación muy leve en las almohadillas plantares infectadas. Se protegió a los ratones C57BL/6 vacunados contra la patología dermal del oído mostrando una reducción en la carga parasitaria en la piel y en el DLN. Esta protección es comparable a la que mostraron los ratones C57BL/6 vacunados con

antígenos de *Leishmania* muertos por calor más ODN CpG y una vacuna de varios componentes como LACK, LmSTI 1 y TSA también evaluada en el presente modelo (28, 29,43).

5 [0050] La protección en ambas cepas se correlaciona de forma importante con la generación de respuestas inmunitarias específicas de Th₁ contra el LRPE. El análisis *in vitro* de las respuestas celulares fue medido en ratones BALB/c en la semana 8 tras la infección y en ratones C57BL/6 (coincidiendo con el valor máximo en la carga parasitaria (4)) en la semana 5. Las células de DLN de ambas cepas de ratones vacunados con LRPE + ODN CpG segregaron niveles más altos de IFN- γ que los grupos de control correspondientes cuando fueron estimulados con LRPE. La respuesta IFN- γ resultó ser dependiente de IL-12 y producida por el linfocito T CD4+ con una aportación inferior para los linfocitos T CD8+. Como se preveía, La producción de SLA específica de IFN- γ fue más alta para los ratones protegidos de ambas cepas. En ratones BALB/c, la generación de respuestas Th₁ en los ratones protegidos se correlaciona con la generación de anticuerpos IgG2a específicos predominantes contra LRPE (Fig. 4A). Se observaron algunas diferencias entre las cepas en la producción *in vitro* de IL-10. Nuestros datos muestran que los ratones BALB/c produjeron niveles significativamente inferiores de IL-10 que los de control tras la estimulación *in vitro* tanto con LRPE como con SLA, de acuerdo con la implicación de esta citocina con la vulnerabilidad en el presente modelo (35). Por otro lado, tanto los ratones de control como los vacunados C57BL/6 LNC produjeron IL-10 tras la estimulación *in vitro* con LRPE o SLA durante la fase aguda de infección (Fig. 6F). Como sucedió con IFN- γ , los niveles de IL-10 fueron más altos cuando las células se estimularon con LRPE que con SLA. El hecho de que la producción de IFN- γ e IL-10 siguiera un perfil similar puede tomarse como una indicación de que la producción de IL-10 tras la vacunación refleja los mecanismos homeostáticos que controlan los efectos nocivos que un fuerte Th₁ provocaría en el huésped (4). Hemos encontrado de forma remarcable que la protección mostrada en los ratones BALB/c tras la vacunación con LRPE + ODN CpG se relaciona también con una reducción significativa de la producción de antígenos motivados por IL-4 tras la estimulación *in vitro* con LRPE o SLA. Estas respuestas celulares se correlacionan *in vivo* con la reversión de las respuestas de los anticuerpos con Th₂ contra las proteínas ribosómicas. Así, el suero de ratones BALB/c protegidos presentó una reducción significativa en el título y, sobre todo, en el número de antígenos reconocidos por los anticuerpos IgG1 específicos para LRPE. Además, la inmunización de los ratones Balb/C con LRPE + ODN CpG también tuvo un claro efecto en la respuesta humoral global suscitada en ratones por la infección de *L. major* (Fig. 5C). Así, la infección de ratones vacunados induce anticuerpos específicos anti-*Leishmania* IgG 1 limitados, mientras que la respuesta humoral inducida en los otros grupos de ratones de control evaluados fue más alta y con un predominio de los anticuerpos de tipo Th₂ (es decir, el isotipo IgG1). Como conjunto, la protección observada en ratones vacunados de ambas cepas se correlaciona con la generación de respuestas Th₁ contra el LRPE que también suponen la reducción del IL-4 motivado por Th₂ y de las respuestas IL-10 contra SLA en ratones BALB/c.

35 [0051] Nuestros datos indican que los ratones BALB/c protegidos adquirieron un estado inmunológico que les confería la capacidad de resistir a otra infección (una característica atractiva para una vacuna que puede emplearse en áreas endémicas, donde la reexposición al parásito sería muy frecuente). Tras la re-estimulación en la dermis del oído dichos ratones mostraron una fuerte protección contra la infección de *L. major*. Se encontró un desarrollo de lesiones dérmicas muy leves (en algunos casos se detectó una ausencia completa de lesiones dérmicas) y una reducción sustancial en el número de parásitos en el oído infectado y en el DLN. Aunque las células de DLN de ratones protegidos no produjeron mayores cantidades de IFN- γ que los ratones de control (medido en la semana 7 tras la infección), el título de los anticuerpos IgG2a contra LRPE y SLA puede tomarse como una indicación de que dichos ratones aumentaron una respuesta protectora Th₁ específica tras el estímulo derivado. La producción específica de las citocinas asociadas a enfermedad IL-4 y de IL-10 fue significativamente baja en dichos ratones. Estos datos indican que el estado inmunitario generado tras el primer estímulo parasitario es extremadamente potente, llevando a una eliminación eficaz y rápida del parásito en el foco de reinfección.

50 [0052] Los datos aquí presentados demuestran que la vacunación con LRPE + ODN CpG tiene influencia directa en las decisiones del sistema inmunológico durante la infección de *Leishmania* tanto en ratones vulnerables como resistentes. En nuestra opinión, la generación de vacunas contra un parásito tan complejo como lo es el de la *Leishmania*, se optimizaría con la incorporación de antígenos con diferentes objetivos en la formulación de la vacuna, aprovechando dichos antígenos, los cuales inducen la inmunidad requerida (principalmente respuestas mediadas por IFN- γ de CD4⁺ y CD8⁺), y redirigen hacia un Th₁ inclinado hacia respuestas inmunitarias de tipo patoantigénico que dan como resultado una patología (IL-4 motivado por Th₂ y respuestas desactivantes de IL-10). No obstante, debe tenerse en cuenta que la respuesta Th₂ contra algunos de estos antígenos puede que no sea redirigida por los inductores de Th₁ usuales, como ocurre con el antígeno meta 1 de *L. major* (50).

REFERENCIAS

60 [0053]

ES 2 486 365 T3

1. Aguilar-Be, I., R. da Silva Zardo, E. Paraguai de Souza, G. P. Borja-Cabrera, M. Rosado-Vallado, M. Mut-Martin, R. Garcia-Miss Mdel, C. B. Palatnik de Sousa, and E. Dumonteil. 2005. Cross-protective efficacy of a prophylactic *Leishmania donovani* DNA vaccine against visceral and cutaneous murine leishmaniasis. *Infect Immun* 73:812-9 .
- 5 2. Anderson, C. F., M. Oukka, V. J. Kuchroo, and D. Sacks. 2007. CD4(+)/CD25(-)/Foxp3(-) Th1 cells are the source of IL-10-mediated immune suppression in chronic cutaneous leishmaniasis. *J Exp Med* 204:285-97 .
- 10 3. Badaro, R., D. Benson, M. C. Eulalio, M. Freire, S. Cunha, E. M. Netto, D. Pedral-Sampaio, C. Madureira, J. M. Burns, R. L. Houghton, J. R. David, and S. G. Reed. 1996. rK39: a cloned antigen of *Leishmania chagasi* that predicts active visceral leishmaniasis. *J Infect Dis* 173:758-61 .
- 15 4. Belkaid, Y., K. F. Hoffmann, S. Mendez, S. Kamhawi, M. C. Udey, T. A. Wynn, and D. L. Sacks. 2001. The role of interleukin (IL)-10 in the persistence of *Leishmania major* in the skin after healing and the therapeutic potential of antiIL-10 receptor antibody for sterile cure. *J Exp Med* 194:1497-506 .
- 20 5. Belkaid, Y., S. Kamhawi, G. Modi, J. Valenzuela, N. Noben-Trauth, E. Rowton, J. Ribeiro, and D. L. Sacks. 1998. Development of a natural model of cutaneous leishmaniasis: powerful effects of vector saliva and saliva preexposure on the long-term outcome of *Leishmania major* infection in the mouse ear dermis. *J Exp Med* 188:1941-53 .
- 25 6. Buffet, P. A., A. Sulahian, Y. J. Garin, N. Nassar, and F. Derouin. 1995. Culture microtitration: a sensitive method for quantifying *Leishmania infantum* in tissues of infected mice. *Antimicrob Agents Chemother* 39:2167-8 .
- 30 7. Campos-Neto, A. 2005. What about Th1/Th2 in cutaneous leishmaniasis vaccine discovery? *Braz J Med Biol Res* 38:979-84 .
8. Coffman, R. L. 1993. Mechanisms of helper T-cell regulation of B-cell activity. *Ann N Y Acad Sci* 681:25-8 .
9. Coler, R. N., and S. G. Reed. 2005. Second-generation vaccines against leishmaniasis. *Trends Parasitol* 21: 244-9 .
- 35 10. Cordeiro-Da-Silva, A., M. C. Borges, E. Guilvard, and A. Ouassii. 2001. Dual role of the *Leishmania major* ribosomal protein S3a homologue in regulation of T- and B-cell activation. *Infect Immun* 69:6588-96 .
- 40 11. Chenik, M., H. Louzir, H. Ksontini, A. Dilou, I. Abdmouleh, and K. Dellagi. 2006. Vaccination with the divergent portion of the protein histone H2B of *Leishmania* protects susceptible BALB/c mice against a virulent challenge with *Leishmania major*. *Vaccine* 24:2521-9 .
- 45 12. Chiaramonte, M. G., M. Hesse, A. W. Cheever, and T. A. Wynn. 2000. CpG oligonucleotides can prophylactically immunize against Th2-mediated schistosome egg-induced pathology by an IL-12-independent mechanism. *J Immunol* 164:973-85 .
- 50 13. Garcia-Alonso, M., A. Blanco, D. Reina, F. J. Serrano, C. Alonso, and C. G. Nieto. 1996. Immunopathology of the uveitis in canine leishmaniasis. *Parasite Immunol* 18:617-23 .
14. Garcia-Alonso, M., C. G. Nieto, A. Blanco, J. M. Requena, C. Alonso, and I. Navarrete. 1996. Presence of antibodies in the aqueous humour and cerebrospinal fluid during *Leishmania* infections in dogs. Pathological features at the central nervous system. *Parasite Immunol* 18:539-46 .
- 55 15. Gradoni, L. 2001. An update on antileishmanial vaccine candidates and prospects for a canine *Leishmania* vaccine. *Vet Parasitol* 100:87-103 .
- 60 16. Gramiccia, M., and L. Gradoni. 2005. The current status of zoonotic leishmaniasis and approaches to disease control. *Int J Parasitol* 35:1169-80 .
17. Handman, E., A. H. Noormohammadi, J. M. Curtis, T. Baldwin, and A. Sjolander. 2000. Therapy of murine cutaneous leishmaniasis by DNA vaccination. *Vaccine* 18:3011-7 .

ES 2 486 365 T3

18. Herwaldt, B. L. 1999. Leishmaniasis. *Lancet* 354:1191-9 .
- 5 20. Iborra, S., M. Soto, J. Carrion, C. Alonso, and J. M. Requena. 2004. Vaccination with a plasmid DNA cocktail encoding the nucleosomal histones of *Leishmania* confers protection against murine cutaneous leishmaniasis. *Vaccine* 22:3865-76 .
- 10 22. Jaafari, M. R., A. Ghafarian, A. Farrokh-Gisour, A. Samiei, M. T. Kheiri, F. Mahboudi, F. Barkhordari, A. Khamesipour, and W. R. McMaster. 2006. Immune response and protection assay of recombinant major surface glycoprotein of *Leishmania* (rgp63) reconstituted with liposomes in BALB/c mice. *Vaccine* 24:5708-17 .
- 15 23. Lopez, R., R. Lucena, M. Novales, P. J. Ginel, E. Martin, and J. M. Molleda. 1996. Circulating immune complexes and renal function in canine leishmaniasis. *Zentralbl Veterinarmed B* 43:469-74 .
24. Mancianti, F., A. Poli, and A. Bionda. 1989. Analysis of renal immune-deposits in canine leishmaniasis. Preliminary results. *Parassitologia* 31:213-30 .
- 20 25. Martins, D. R., S. M. Jeronimo, J. E. Donelson, and M. E. Wilson. 2006. *Leishmania chagasi* T-cell antigens identified through a double library screen. *Infect Immun* 74:6940-8 .
26. McMahon-Pratt, D., and J. Alexander. 2004. Does the *Leishmania* major paradigm of pathogenesis and protection hold for New World cutaneous leishmaniasis or the visceral disease? *Immunol Rev* 201:206-24 .
- 25 28. Mendez, S., Y. Belkaid, R. A. Seder, and D. Sacks. 2002. Optimization of DNA vaccination against cutaneous leishmaniasis. *Vaccine* 20:3702-8 .
29. Mendez, S., S. Gurunathan, S. Kamhawi, Y. Belkaid, M. A. Moga, Y. A. Skeiky, A. Campos-Neto, S. Reed, R. A. Seder, and D. Sacks. 2001. The potency and durability of DNA- and protein-based vaccines against *Leishmania* major evaluated using low-dose, intradermal challenge. *J Immunol* 166:5122-8 .
- 30 30. Miles, S. A., S. M. Conrad, R. G. Alves, S. M. Jeronimo, and D. M. Mosser. 2005. A role for IgG immune complexes during infection with the intracellular pathogen *Leishmania*. *J Exp Med* 201:747-54 .
- 35 31. Moore, K. W., R. de Waal Malefyt, R. L. Coffman, and A. O'Garra. 2001. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol* 19:683-765 .
32. Mougneau, E., F. Altare, A. E. Wakil, S. Zheng, T. Coppola, Z. E. Wang, R. Waldmann, R. M. Locksley, and N. Glaichenhaus. 1995. Expression cloning of a protective *Leishmania* antigen. *Science* 268:563-6 .
- 40 33. Nieto, C. G., R. Barrera, M. A. Habela, I. Navarrete, C. Molina, A. Jimenez, and J. L. Serrera. 1992. Changes in the plasma concentrations of lipids and lipoprotein fractions in dogs infected with *Leishmania infantum*. *Vet Parasitol* 44:175-82 .
- 45 34. Nieto, C. G., I. Navarrete, M. A. Habela, F. Serrano, and E. Redondo. 1992. Pathological changes in kidneys of dogs with natural *Leishmania* infection. *Vet Parasitol* 45:33-47 .
- 50 35. Noben-Trauth, N., R. Lira, H. Nagase, W. E. Paul, and D. L. Sacks. 2003. The relative contribution of IL-4 receptor signaling and IL-10 to susceptibility to *Leishmania major*. *J Immunol* 170:5152-8 .
36. Pateraki, E., R. Portocala, H. Labrousse, and J. L. Guesdon. 1983. Antiactin and antitubulin antibodies in canine visceral leishmaniasis. *Infect Immun* 42:496-500 .
37. Peters, N., and D. Sacks. 2006. Immune privilege in sites of chronic infection: *Leishmania* and regulatory T cells. *Immunol Rev* 213:159-79 .
- 55 38. Pollock, K. G., K. S. McNeil, J. C. Mottram, R. E. Lyons, J. M. Brewer, P. Scott, G. H. Coombs, and J. Alexander. 2003. The *Leishmania mexicana* cysteine protease, CPB2.8, induces potent Th2 responses. *J Immunol* 170: 1746-53 .
- 60 39. Probst, P., E. Stromberg, H. W. Ghalib, M. Mozel, R. Badaro, S. G. Reed, and J. R. Webb. 2001. Identification and characterization of T cell-stimulating antigens from *Leishmania* by CD4 T cell expression cloning. *J Immunol* 166: 498-505.

40. Rafati, S., A. Nakhaee, T. Taheri, A. Ghashghaii, A. H. Salmanian, M. Jimenez, M. Mohebbali, S. Masina, and N. Fasel. 2003. Expression of cysteine proteinase type I and II of *Leishmania infantum* and their recognition by sera during canine and human visceral leishmaniasis. *Exp Parasitol* 103:143-51.
- 5 41. Rafati, S., A. H. Salmanian, T. Taheri, M. Vafa, and N. Fasel. 2001. A protective cocktail vaccine against murine cutaneous leishmaniasis with DNA encoding cysteine proteinases of *Leishmania major*. *Vaccine* 19:3369-75 .
42. Requena, J. M., C. Alonso, and M. Soto. 2000. Evolutionarily conserved proteins as prominent immunogens during *Leishmania* infections. *Parasitol Today* 16:246-50 .
- 10 43. Rhee, E. G., S. Meridez, J. A. Shah, C. Y. Wu, J. R. Kirman, T. N. Turon, D. F. Davey, H. Davis, D. M. Klinman, R. N. Coler, D. L. Sacks, and R. A. Seder. 2002. Vaccination with heat-killed *Leishmania* antigen or recombinant leishmanial protein and CpG oligodeoxynucleotides induces long-term memory CD4+ and CD8+ T cell responses and protection against *Leishmania major* infection. *J Exp Med* 195:1565-73 .
- 15 44. Roberts, M. T., C. B. Stober, A. N. McKenzie, and J. M. Blackwell. 2005. Interleukin-4 (IL-4) and IL-10 collude in vaccine failure for novel exacerbatory antigens in murine *Leishmania major* infection. *Infect Immun* 73:7620-8 .
45. Rodriguez-Gabriel, M. A., M. Remacha, and J. P. Ballesta. 2000. The RNA interacting domain but not the protein interacting domain is highly conserved in ribosomal protein P0. *J Biol Chem* 275:2130-6 .
- 20 46. Rosa, R., C. Marques, O. R. Rodrigues, and G. M. Santos-Gomes. 2007. Immunization with *Leishmania infantum* released proteins confers partial protection against parasite infection with a predominant Th1 specific immune response. *Vaccine* 25:4525-32 .
- 25 47. Santos-Gomes, G. M., R. Rosa, C. Leandro, S. Cortes, P. Romao, and H. Silveira. 2002. Cytokine expression during the outcome of canine experimental infection by *Leishmania infantum*. *Vet Immunol Immunopathol* 88:21-30 .
- 30 48. Santos, W. R., V. M. de Lima, E. P. de Souza, R. R. Bernardo, M. Palatnik, and C. B. Palatnik de Sousa. 2002. Saponins, IL12 and BCG adjuvant in the FML-vaccine formulation against murine visceral leishmaniasis. *Vaccine* 21:30-43.
- 35 49. Saraiva, E. M., A. de Figueiredo Barbosa, F. N. Santos, G. P. Borja-Cabrera, D. Nico, L. O. Souza, C. de Oliveira Mendes-Aguiar, E. P. de Souza, P. Fampa, L. E. Parra, I. Menz, J. G. Dias, Jr., S. M. de Oliveira, and C. B. Palatnik-de-Sousa. 2006. The FML-vaccine (Leishmune) against canine visceral leishmaniasis: a transmission blocking vaccine. *Vaccine* 24:2423-31 .
- 40 50. Serezani, C. H., A. R. Franco, M. Wajc, J. K. Umada Yokoyama-Yasunaka, G. Wunderlich, M. M. Borges, and S. R. Uliana. 2002. Evaluation of the murine immune response to *Leishmania meta* 1 antigen delivered as recombinant protein or DNA vaccine. *Vaccine* 20:3755-63 .
- 45 51. Skeiky, Y. A., J. A. Guderian, D. R. Benson, O. Bacelar, E. M. Carvalho, M. Kubin, R. Badaro, G. Trinchieri, and S. G. Reed. 1995. A recombinant *Leishmania* antigen that stimulates human peripheral blood mononuclear cells to express a Th1-type cytokine profile and to produce interleukin 12. *J Exp Med* 181:1527-37 .
- 50 52. Stager, S., D. F. Smith, and P. M. Kaye. 2000. Immunization with a recombinant stage-regulated surface protein from *Leishmania donovani* induces protection against visceral leishmaniasis. *J Immunol* 165:7064-71 .
54. Tonui, W. K., J. S. Mejia, L. Hochberg, M. L. Mbow, J. R. Ryan, A. S. Chan, S. K. Martin, and R. G. Titus. 2004. Immunization with *Leishmania major* exogenous antigens protects susceptible BALB/c mice against challenge infection with *L. major*. *Infect Immun* 72:5654-61 .
- 55 55. Webb, J. R., A. Campos-Neto, Y. A. Skeiky, and S. G. Reed. 1997. Molecular characterization of the heat- inducible LmST11 protein of *Leishmania major*. *Mol Biochem Parasitol* 89:179-93 .
56. Webb, J. R., D. Kaufmann, A. Campos-Neto, and S. G. Reed. 1996. Molecular cloning of a novel protein antigen of *Leishmania major* that elicits a potent immune response in experimental murine leishmaniasis. *J Immunol* 157:5034-41 .
- 60 57. Zimmermann, S., O. Egeter, S. Hausmann, G. B. Lipford, M. Rocken, H. Wagner, and K. Heeg. 1998. CpG oligodeoxynucleotides trigger protective and curative Th1 responses in lethal murine leishmaniasis. *J Immunol* 160: 3627-30.

ES 2 486 365 T3

LISTADO DE SECUENCIAS

[0054]

5 <110> Laboratorios LETI, S.L. unipersonal
<120> Vacuna consistente en un extracto de proteína ribosómica y un adyuvante promotor de Th1
<130> P6019394PCT
10 <150> EP 08100634.8
<151> 2008-01-18
<150> US 61/021,928
15 <151> 2008-01-18
<160> 2
<170> Versión PatentIn 3.3
20 <210> 1
<211> 10
<212> ADN
<213> Artificial
25 <220>
<223> Oligodesoxinucleótido
<400> 1
30 tcaacgttga 10
<210> 2
<211> 14
<212> ADN
35 <213> Artificial
<220>
<223> Oligodesoxinucleótido
40 <400> 2
gctagcgta gcgt 14

REIVINDICACIONES

- 5 1. Uso de un Extracto de Proteína Ribosómica de Leishmania, y opcionalmente un adyuvante promotor de Th₁, para la preparación de un medicamento, donde dicho Extracto de Proteína Ribosómica de Leishmania se lleva a cabo mediante la realización de los siguientes pasos utilizando una célula de Leishmania causante de la Leishmaniasis en caso de que esté presente en el sujeto:
- 10 a) se mezcla una célula de Leishmania con un buffer de lisis,
b) se centrifuga la mezcla obtenida para obtener un extracto citosólico,
c) se prepara el Extracto de Proteína Ribosómica de Leishmania a partir del extracto citosólico obtenido sometiendo el extracto citosólico a centrifugación de alta velocidad a 90.000 r.p.m. durante 30 min a 4 °C en un rotor Beckman TL100,3 y resuspendiendo el granulado obtenido en el buffer B constando de 20 mM Tris-HCl, pH 7,4,500 mM AcNH₄,100 mM MgCl₂,5mM β-mercaptoetanol y centrifugándolo mediante un gradiente discontinuo de sacarosa (20/40%) en el buffer B a 90.000 r.p.m. a 4 °C en un rotor TL100.3.
- 15 2. Uso de acuerdo con la reivindicación 1, donde el medicamento es usado para el tratamiento o la prevención de Leishmaniasis en un sujeto.
- 20 3. Uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, donde el medicamento es una vacuna.
4. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 3, donde el Extracto de Proteína Ribosómica de Leishmania se obtiene de Leishmania mayor.
- 25 5. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 4, donde el adyuvante promotor es un ODN CpG.
6. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 5, donde la enfermedad parasitaria es causada por especies diferentes de las especies de las que se deriva el Extracto de Proteína Ribosómica.
- 30 7. Composición para su uso como medicamento, donde dicha composición consta de un Extracto de Proteína Ribosómica de Leishmania, y opcionalmente un adyuvante promotor de Th₁, donde el Extracto de Proteína Ribosómica de Leishmania se obtiene mediante la realización de los siguientes pasos usando una célula de Leishmania causante de la Leishmaniasis en caso de estar presente en un sujeto:
- 35 a) se mezcla una célula de Leishmania con un buffer de lisis,
b) se centrifuga la mezcla obtenida para obtener un extracto citosólico,
c) se prepara el Extracto de Proteína Ribosómica de Leishmania a partir del extracto citosólico obtenido someténdolo a un centrifugado de alta velocidad a 90.000 r.p.m. durante 30 min a 4 °C en un rotor Beckman TL100.3 y resuspendiendo el granulado obtenido en el buffer B que consta de 20 mM Tris-HCl, pH 7,4,500 mM AcNH₄, 100 mM MgCl₂, 5mM β-mercaptoetanol y centrifugándolo mediante un gradiente discontinuo de sacarosa (20/40%) en el buffer B a 90.000 r.p.m.
- 40 a 4 °C en un rotor TL100.3.
8. Composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 7, consistiendo en un Extracto de Proteína Ribosómica de Leishmania y un adyuvante promotor de Th₁.
- 45 9. Composición para su uso de acuerdo con cualquier reivindicación de 7 a 8, donde el adyuvante promotor es un ODN CpG.
- 50 10. Composición para su uso de acuerdo con cualquier reivindicación de 7 a 9, que consta además de un adyuvante y/o portador farmacéuticamente aceptable.
11. Composición para su uso de acuerdo con cualquier reivindicación de 7 a 10, donde el medicamento es una vacuna.

Fig 1

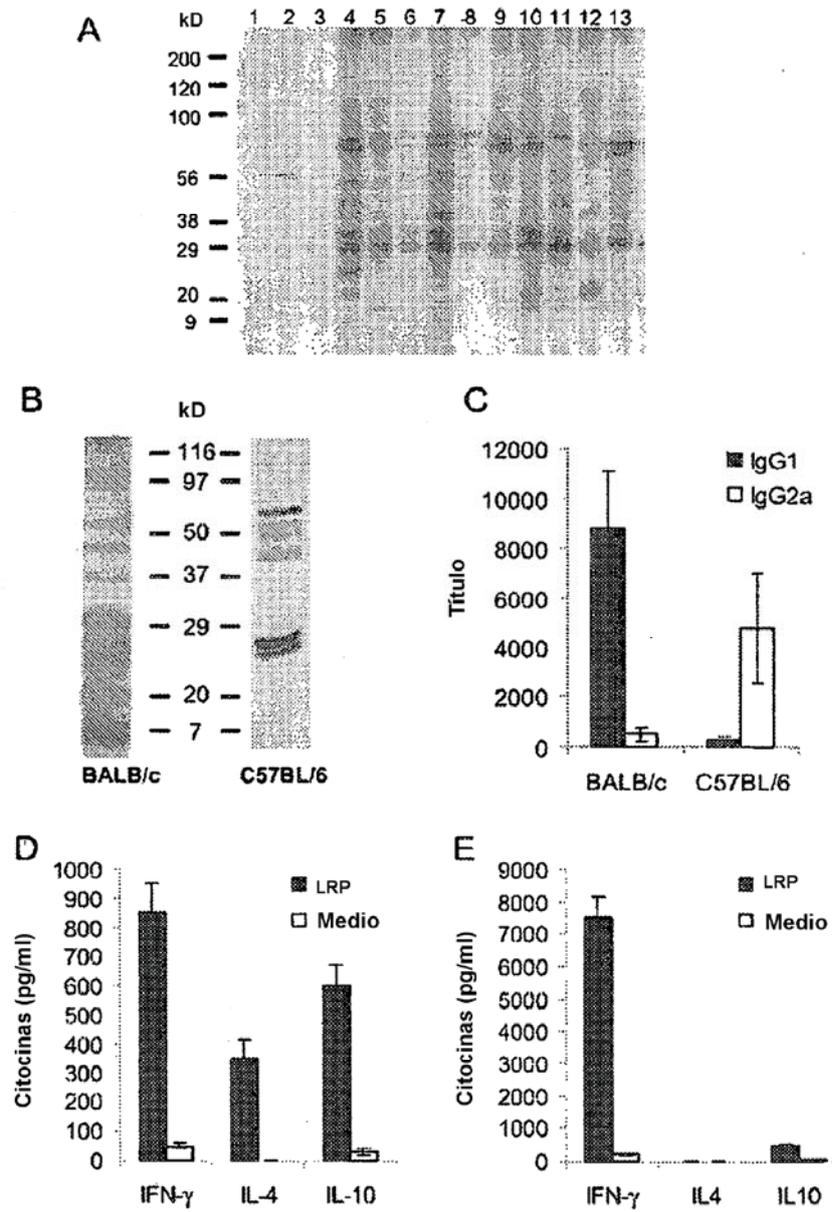


Fig 2

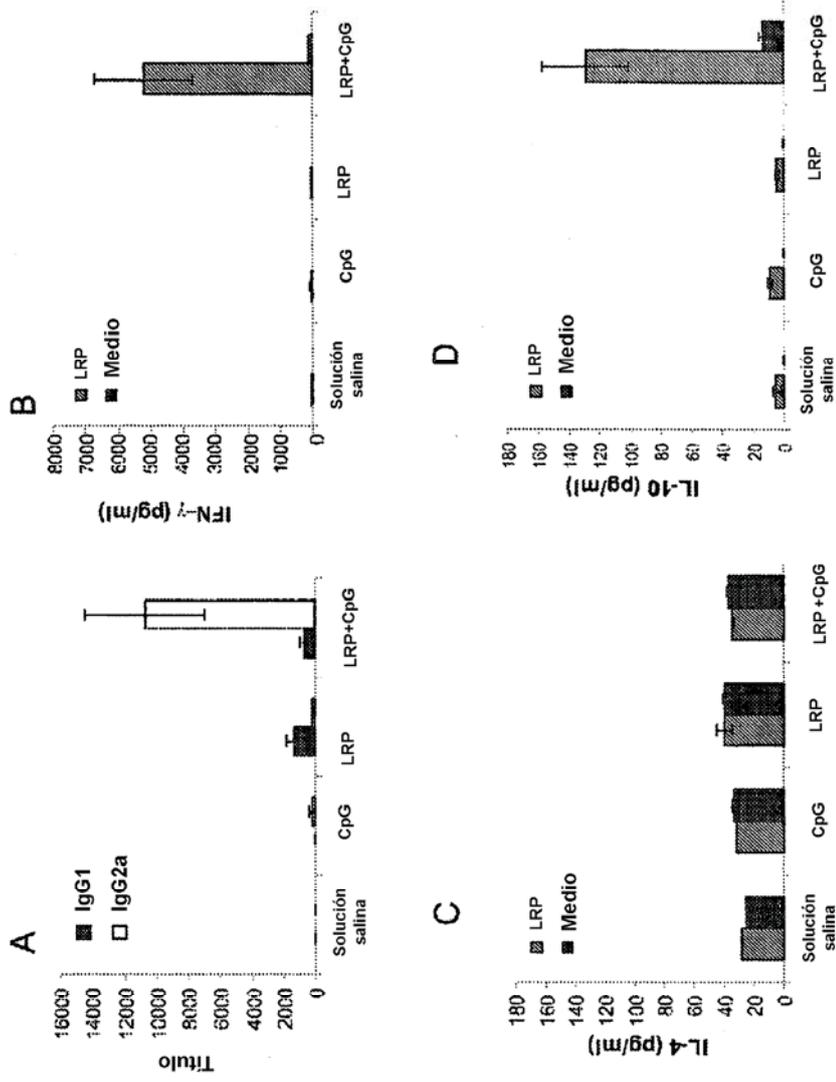


Fig 3

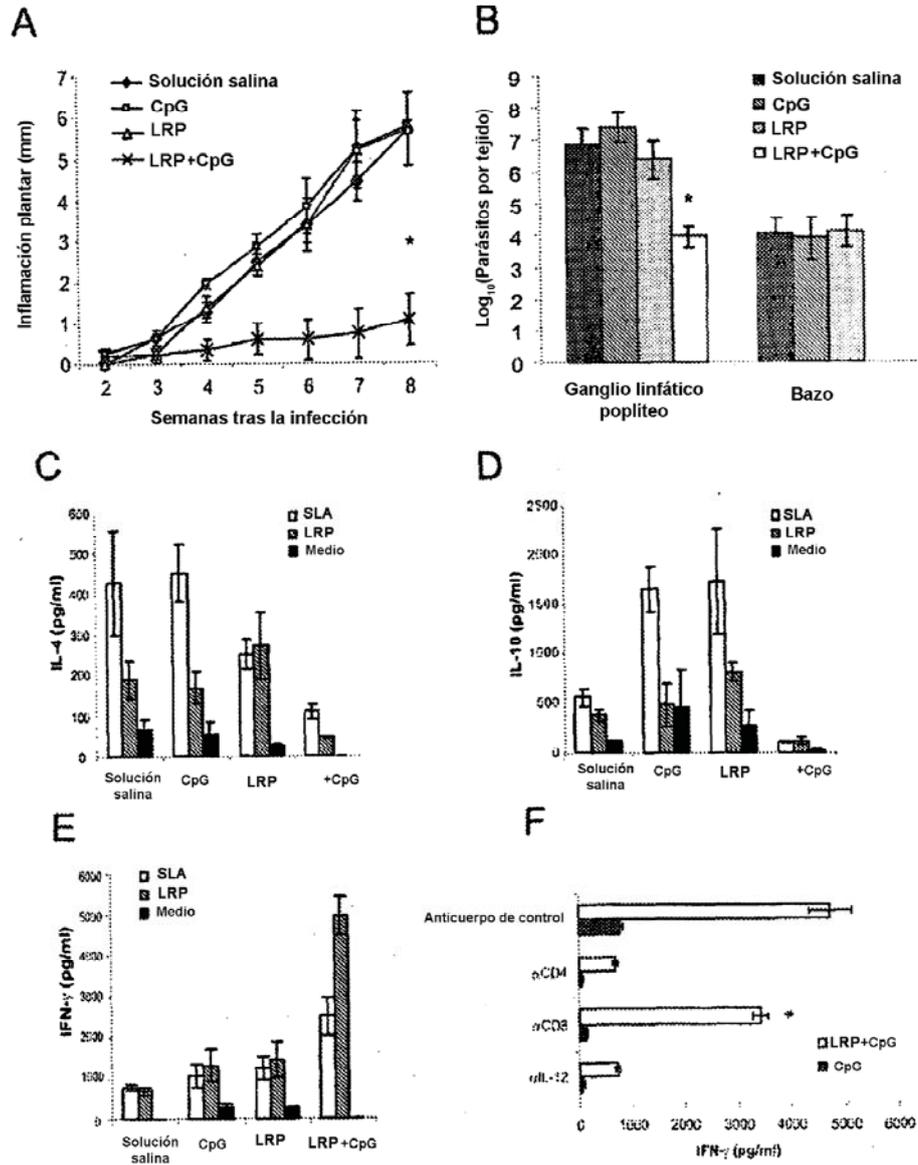


Fig 4

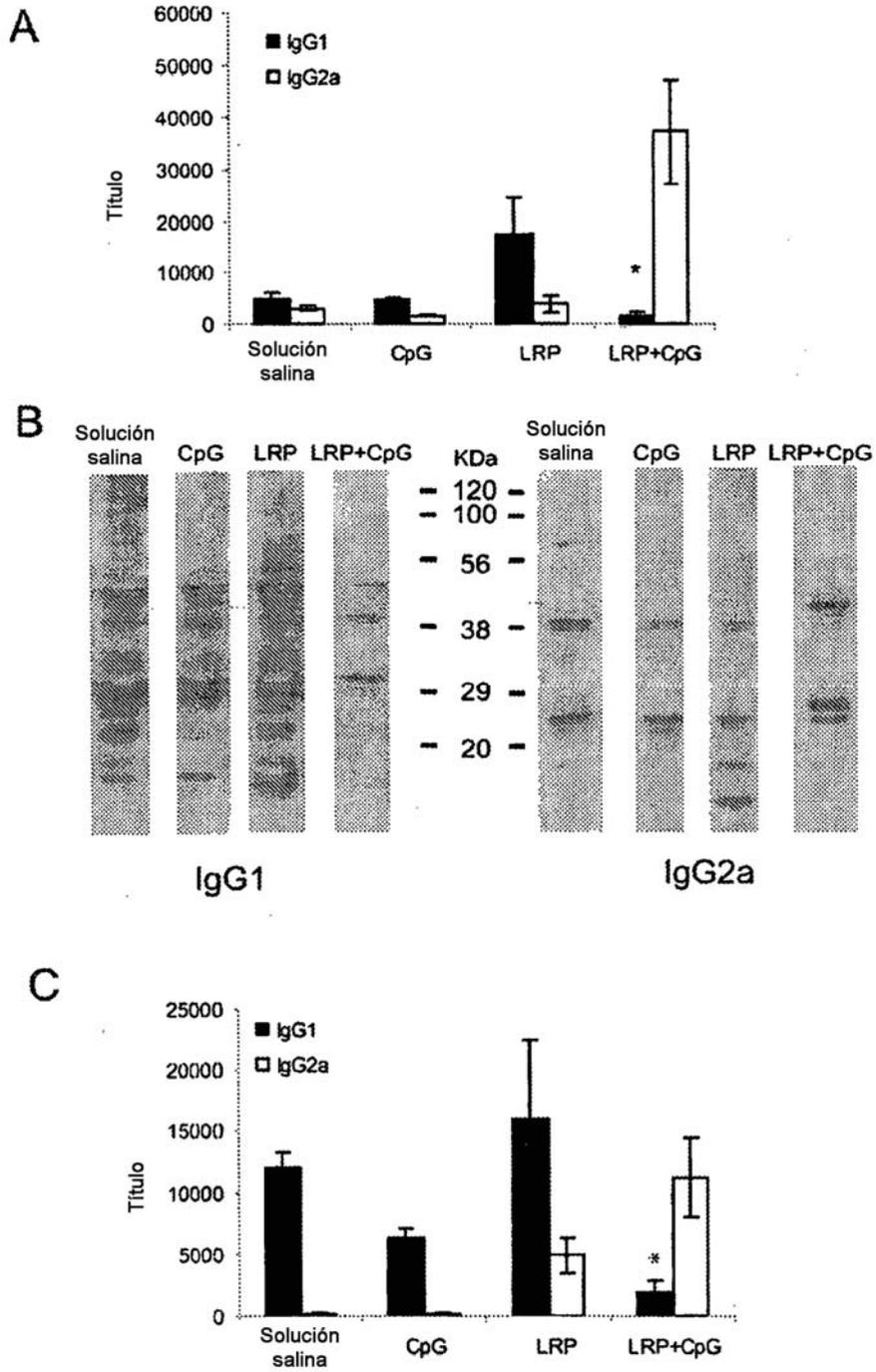


Fig 5

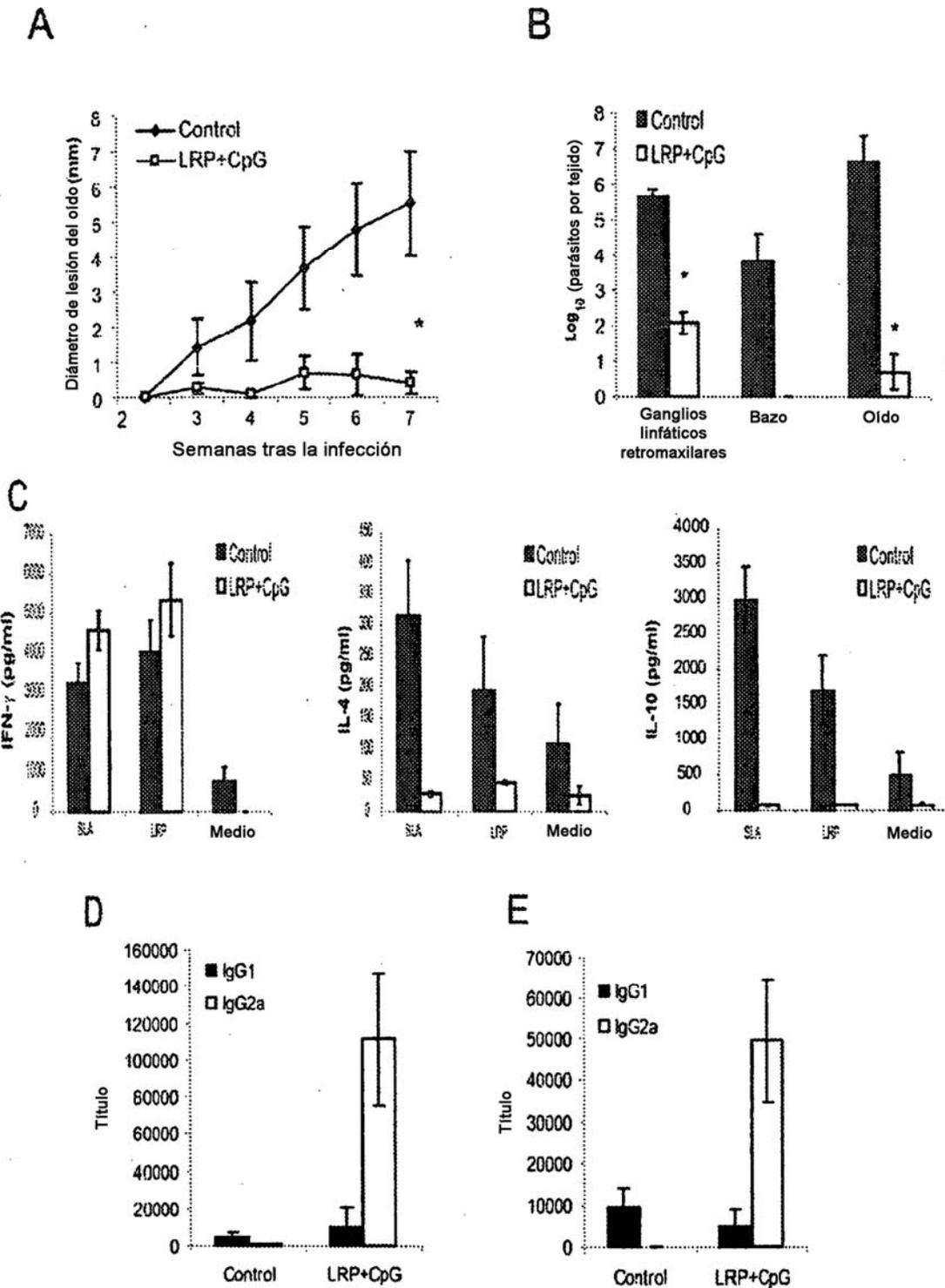


Fig 6

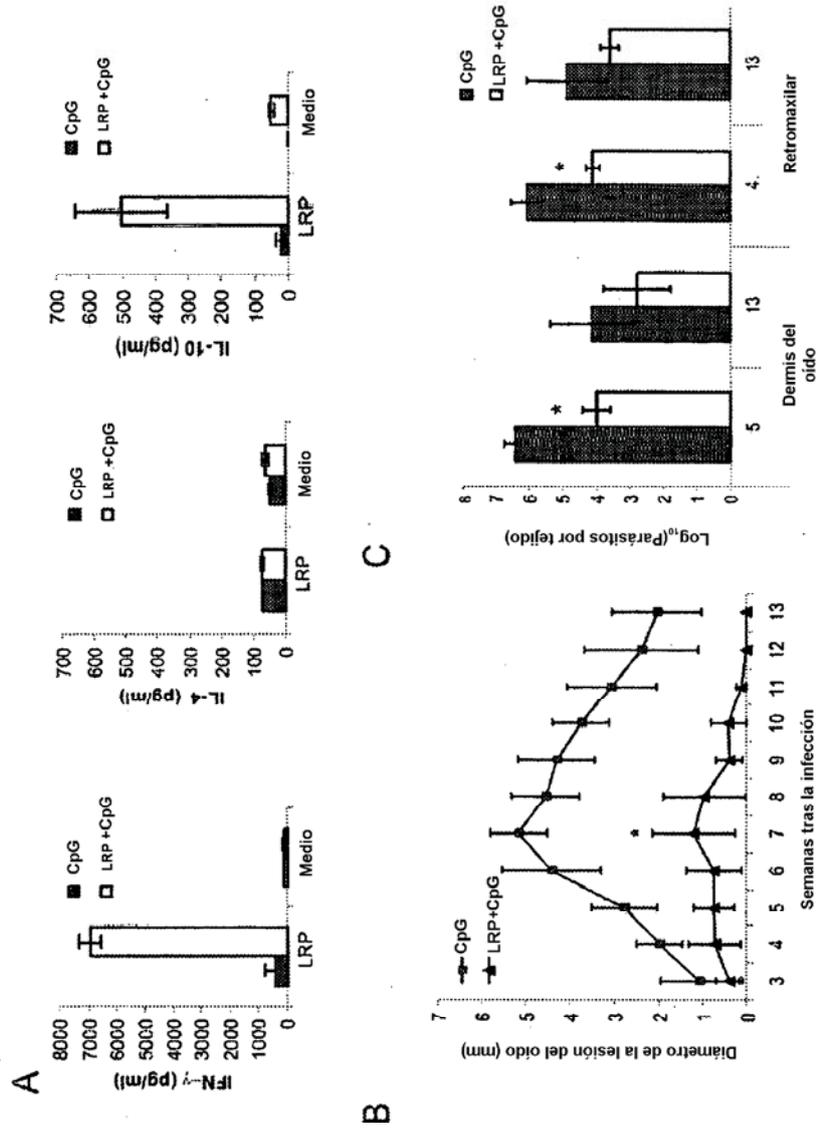
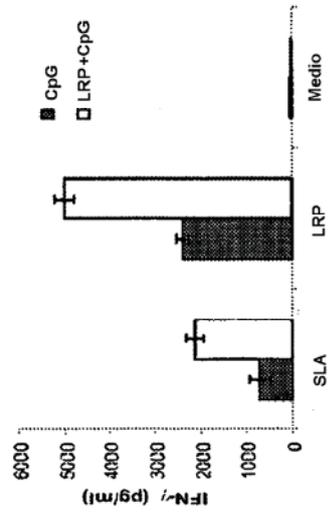
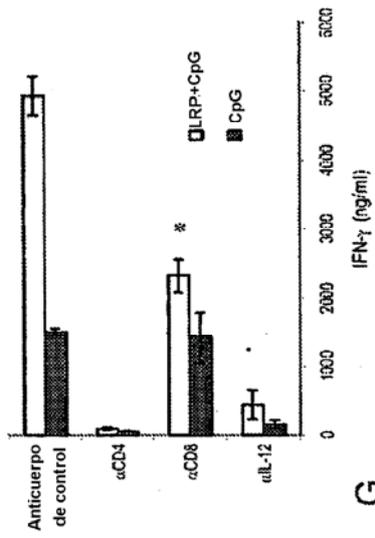


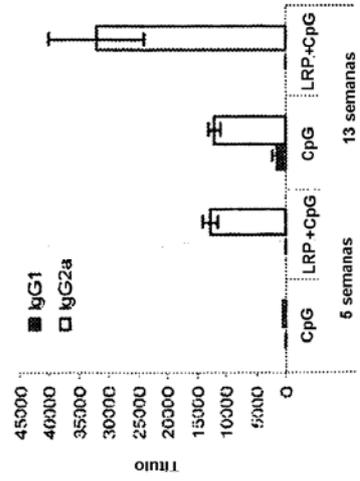
Fig 6 D



E



F



G

