

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 540 088**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/435** (2006.01)

**C07K 4/12** (2006.01)

**A61P 33/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.05.2006 E 06721644 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.04.2015 EP 1893640**

54 Título: **Composiciones que comprenden ligando de fucosa-manosa (FML) y saponina para la preparación de vacunas que bloquean la transmisión de la leishmaniasis en humanos y animales**

30 Prioridad:

**16.05.2005 BR PI0503187**

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

**08.07.2015**

73 Titular/es:

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO - UFRJ (100.0%)**

**Av. Brigadeiro Trompowski, S/N Cidade Universitária**

**20.530-310 Ilha do Governador, Rio de Janeiro, BR**

72 Inventor/es:

**PALATNIK DE SOUZA, CLARISA B. y CHEQUER BOU-HABIB, ELVIRA MARIA SARAIVA**

74 Agente/Representante:

**CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel**

**Observaciones :**

**Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

**ES 2 540 088 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**

Composiciones que comprenden ligando de fucosa-manosa (FML) y saponina para la preparación de vacunas que bloquean la transmisión de la leishmaniasis en humanos y animales.

Campo de la Invención

- 5 La presente invención se refiere a una composición farmacéutica adecuada para la preparación de vacunas que bloquean la transmisión de leishmaniasis en humanos y animales, a partir de promastigotes de Leishmania y de fracciones de amastigotes de Leishmania. Dicha composición, cuando es administrada en combinación con un adjuvante de saponina, bloquea la transmisión de la leishmaniasis visceral en humanos y animales.

Antecedentes de la invención

- 10 En América y el Mediterráneo, la leishmaniasis, también llamada kala-azar, es una zoonosis canina. Cuando los insectos Phlebotominae se alimentan de cánidos salvajes adquieren el agente etiológico, transmitiéndolo mas tarde a los perros. La subsecuente transmisión a humanos por los insectos Phlebotominae causa Leishmaniasis visceral humana, una seria enfermedad que puede resultar fatal sino se la trata de modo adecuado.

- 15 Aproximadamente hay 1.000.000 de nuevas ocurrencias de kala-azar al año en el mundo. Una vacuna protectora para la profilaxis contra la enfermedad en humanos no esta disponible. Los mejores resultados fueron logrados con vacunas experimentales de primera generación, las cuales inducen un 12% de protección, pero solo entre aquellas personas que convirtieron a positivo en tests intradermales para lisados de Leishmania luego de una completa vacunación. Aun hoy, la quimioterapia contra kala-azar es altamente toxica y no siempre efectiva.

- 20 Estos vectores son una zoonosis canina transmitida por insectos y presentan una reducción de la infección a través de la ingestión de anticuerpos anti-Leishmania presentes en suero de perros sometidos a una vacunación protectora teniendo un gran impacto para la reducción de la incidencia de la enfermedad en humanos.

- 25 La patente brasileña PI9302386 describe un producto llamado antígeno FML, o "Ligando fucosa-manosa" de *Leishmania donovani* que comprende un complejo glicoproteico del cual su porción de carbohidratos presenta un 10% de fucosa y un 47% de manosa, justificando el nombre utilizado. Este complejo inhibe fuertemente la infección de macrófagos del peritoneo de ratón debida a promastigotes y amastigotes de *L.donovani* y es especie-especifica en el genero Leishmania. FML es fuertemente inmunogénico en ratones, hámsteres y conejos, estimulando una intensa producción de anticuerpos. Es antigénico en humanos y es reconocido por altos niveles de anticuerpos específicos.

- 30 El análisis bioquímico inicial de FML ha revelado que es un compuesto glicoproteico conteniendo un 29% de azucares neutros, un 44% de proteína, un 11% de fosfatos y trazas de hexamina compuestas por bandas de proteínas con pesos moleculares que van desde 9 a 95 kDa, algunas bandas presentan carbohidratos: 36 y 54 a 68 kDa. La parte glicídica de FML resalta la presencia de un 10% de fucosa y un 47% de manosa. También fue posible observar la presencia de un 30% de glucosa, 12% de galactosa y trazas de xilosa.

- 35 El N-oligosacarido asociado a FML forma parte de una cadena ramificada de unidades alternantes de Manp 4-o, 3-o, Glc Nac 4-o asociadas; N-acetil glucosamina como punto de ramificación y fucopiranososa y manopiranososa como residuos terminales, u oligosacáridos lineares compuestos por unidades de Manp 4-o, 3-o y 2-o asociados, 2-o asociados, fucopiranososa y galactopiranososa como residuos terminales (Tesis presentada en UFRJ el 14 de abril de 1998 por Robson R.Bernardo).

- 40 El análisis de los aminoácidos de FML ha revelado la presencia de acido glutámico, alanina, acido aspartico y glicina en cantidades que van desde 20 a 10%, serina, histidina, lisina, leucina, treonina, prolina y valina entre un 5 y un 10% y arginina, metionina, isoleucina, tirosina y fenilalanina entre un 2 y un 5%.

- 45 La disertación para obtener el grado de Master "Estudios de la glicoproteína GP36 y su potencial en la vacunación contra kala-azar experimental", presentada en la UFRJ por Edilma Paraguai de Souza identifica una glicoproteina de un peso molecular de 36 kDa como el antígeno predominante de FML, llamado GP36. En Acta Tropica, 53:59-72 se hicieron estudios sobre Leishmania donovani que confirman que GP36 es reconocida por el suero hiperinmune de ratón producido contra FML total. Los anticuerpos monoclonales obtenidos en contra de FML reconocen en gran medida a GP36. La antigenicidad de GP36 fue susceptible al tratamiento con periodato de sodio, indicando la naturaleza glicídica del epítoto envuelto en la reacción con los anticuerpos monoclonales, (anticuerpo ACE10), confirmando su naturaleza glicoproteica. Más aun la disertación para obtener el grado de Master presentada a la UFRJ el 25 de marzo de 1988 por Emilse de Souza, muestra que esta fracción posee entre sus aminoácidos, de 10 a 20% de acido aspartico, acido glutámico, alanina y leucina, entre 5 y 10% de glicina, treonina, valina y lisina, y entre 2 y 5% de serina, histidina, arginina, prolina ,tirosina, metionina, isoleucina y fenilalanina y que su N-oligosacarido revela residuos de fucosa con dos tipos de sustitución (2,3-Me<sub>2</sub>-fucosa, 2,4-Me<sub>2</sub> -fucosa) y

predominancia de residuos de manopiranososa del tipo 2, 3, 6-Me<sub>3</sub>-manosa, además de tri-Me<sub>3</sub>-galactosa correspondientes a cadenas lineares de manopiranososa 4-o sustituidas con sustituciones 3-o y residuos 4-o de fucopiranososa.

5 La anteriormente mencionada Acta Trópica también revela que no existe reactividad cruzada entre FML y la glicoproteína 63, GP 63, previamente aislada de Leishmania. Los anticuerpos monoclonales específicos L 3.2 y L 3.9 obtenidos por David Russel contra GP63 no desarrollaron ninguna reacción con FML, ni en ensayos de Western Blot, ni en ensayos tipo ELISA, siendo considerado este último más sensible. Este resultado es previsible y coherente considerando los diferentes métodos de extracción. La extracción acuosa de FML, incluyendo un doble calentamiento a 100°C privilegia que la obtención de glicoconjugados de los cuales su fracción glicídica es resistente a esas condiciones.

10 La porción proteica de GP 36 fue recientemente clonada en E.coli de acuerdo al sistema mencionado en "Molecular and Biochemical Parasitology", 120:315-319. Es una nucleósido hidrolasa de 34 kDa de L.donovani que posee un 75% de identidad con la uridín inosina hidrolasa (IUNH) de Crithidia Fasciculata y un 90 % de homología con la rNH (IUNH) de L.major. La nucleósido hidrolasa de L.donovani es un marcador específico para la diagnosis de kala-azar en perros, como se describe en esa publicación. La secuencia de bases y aminoácidos de la nucleósido hidrolasa de L donovani, descrita en la Tesis de Doctorado "Molecular cloning of L donovani antigen GP 36" presentada en la UFRJ el 14 de mayo del 2002, se muestra a continuación.

**ATGCCGCGCAAGATTATTCTCGATTGTGATCCCGGGATCGATGATGCCGTGGCCATCTTTCTCGC**  
**CCACGGCAACCCGGAGGTTCGAG 87**  
 MPRKIILDGDPGIDDAVAIFLAHGNPEVE  
**CTGCTGGCCATTACGACGGTGGTGGGCAACCAGACCCTGGAGAAGGTGACCCGGAACGCGCGG**  
**CTGGTAGCTGACGTAGCCGGCATC 174**  
 LLAITTVVGNQTLKVRNARLVADVAGI  
**GTTGGTGTGCCGCTCGCGGCTGGTTGCACCAAGCCCCTCGTGC GCGGTGTGCGGAATGCCTCTC**  
**AGATTCATGGCGAAACCGGCATG 261**  
 VGVVVAAGCTKPLVRGVRNASQIHGETGM  
**GGTAACGTCTCCTACCCACCAGAGTTCAAGACAAAGTTGGACGGCCGTCATGCAGTGCAGCTGA**  
**TCATCGACCTTATCATGTTCGCAC 348**  
**GGTAACGTCTCCTACCCACCAGAGTTCAAGACAAAGTTGGACGGCCGTCATGCAGTGCAGCTGA**  
**TCATCGACCTTATCATGTTCGCAC 348**  
 GNVSYPPFEFKTKLDGRHAVQLIIDLIMSH  
**GAGCCGAAGACGATCACGCTTGTGCCTACGGGTGGCCTGACGAACATTGCGATGGCTGTCCGTC**  
**TTGAGCCGCGCATCGTGGACCGT 435**  
 EPKTITLVPTGGLTNIAMAVRLEPRIVDR  
**GTGAAGGAGGTGGTTCTGATGGGTGGCGGCTACCATACTGGTAATGCGTCCCCTGTAGCGGAGT**  
**TCAACGTCTTCGTCGACCCGGAG 522**  
 VKEVVLMMGGGYHTGNASPVAEFNVFVDPE  
**GCGGCGCACATTGTGTTCAACGAGAGCTGGAACGTAACGATGGTGGGGCTGGACCTAACGCAC**  
**CAGGCACTCGCCACGCCGGCGGTC 609**  
 AAHIVFNE SWNVTMVGLDLTHQALATPAV  
**CAGAAGCGAGTGAAGGAGGTGGGCACGAAGCCGGCTGCCTTCATGCTGCAGATTTTGGACTTTT**  
**ACACGAAGGTGTACGAAAAGGAG 696**  
 QKRVK**EVGTKPAAFMLQILDFYTKVYEKE**  
**CGAACACGTACGCGACGGTGCACGATCCCTGCGCTGTGGCGTACGTGATTGACCCACCGTGA**  
**TGACGACGGAGCAAGTGCCAGTG 783**  
 RNTYATVHDP CAVAYVIDPTVMTTEQVPV  
**GACATCGAGCTCAATGGGGCACTGACGACTGGGATGACGGTCGCGGACTTCCGCTACCCACGGC**  
**CAAAGCACTGCCACACGCAGGTG 870**  
 DIELNALTTGMTVADFRYPRPKHCHTQV  
**GCTGTGAAGCTGGACTTCGACAAGTTTTGGTGCCTCGTGATTGACGCACTCAAGCGCATCGGCG**  
**ATCCTCAATGA 945**  
 AVKLDLDFDKFWCLVIDALKRIGDPQ

Un segundo componente antigénico de FML es una glicoproteína de 55 kDa, reconocida por 7 anticuerpos monoclonales tipo IgM y solo uno del tipo IgG es mencionado en Acta Tropica.

Descripción de la invención

- 5 La presente invención describe el desarrollo de una vacuna profiláctica contra la leishmaniasis visceral canina basada en la saponina de *L. donovani* y en el antígeno FML (Ligando fucosa-manosa). La vacuna FML desarrolla un 92-95% de protección específica (76-80% de efectividad de vacuna) en ensayos de fase III contra la leishmaniasis visceral brasileña, de acuerdo a estudios descritos en Vaccine 19:1082-1092, 2001, y en Vaccine 20:3277-3284, 2002. Estos estudios muestran que la vacunación reduce la mortalidad e incidencia de la enfermedad canina. La
- 10 investigación publicada en Vaccine 22 (17-18):2234-2243, 2004 menciona el efecto inmunoterapéutico de la vacuna.

El termino Vacuna Bloqueante de la Transmisión (TBV) es usado para vacunas anti-malaria que estimulan la producción de anticuerpos en humanos contra las formas sexuales (gametas) de parásitos presentes en el intestino medio del vector insecto Anopheles. Los mosquitos adquieren dichos anticuerpos al alimentarse de sangre,

bloqueando el proceso de fertilización y el subsecuente desarrollo de los parásitos en el intestino medio del vector, impidiendo la transmisión de la enfermedad por parte del insecto.

5 Así que las vacunas TBV son desarrolladas para incrementar los anticuerpos contra las gametas del parásito de la malaria presentes en el intestino del mosquito y a pesar de no eliminar la enfermedad en el humano infectado, previene la propagación de la malaria en la comunidad.

10 El mosquito adquiere los anticuerpos cuando se alimenta de sangre y estos pueden bloquear el desarrollo parasitario volviendo al vector en un vector no infeccioso. En el caso de la malaria, los antígenos que son candidatos para TBV son antígenos de la superficie celular presentes en las fases de gametas del microorganismo. Un test funcional es aplicado a los ensayos y análisis de Fase I de una vacuna de este tipo. Los mosquitos experimentalmente creados en laboratorio y previamente infectados son alimentados con suero hiperinmune contra el antígeno elegido. Luego el intestino de los mosquitos puede ser disectado para determinar el número de gametocitos infecciosos.

15 En el ciclo epidémico de los agentes de la leishmaniasis visceral, *Leishmania chagasi* y *Leishmania infantum*, pertenecientes a Phlebotominae, al ingerir sangre para alimentarse adquieren macrófagos y monocitos que contienen amastigotes de perros infectados. Estos amastigotes que llegan al intestino medio del vector difieren de los flagelados y procíclicos promastigotes asociados al epitelio del intestino medio. Los promastigotes procíclicos se dividen mediante metaciclogenesis adquiriendo virulencia y se vuelven promastigotes metacíclicos que no se dividen y se separan del epitelio del intestino medio para migrar a la cavidad bucal e infectar nuevos vertebrados durante la próxima ingesta de sangre.

20 El antígeno FML es un antígeno de superficie de promastigotes y amastigotes de *L.donovani*, altamente inmunogénico y protector en la vacunación canina así que también puede ser reconocido por receptores específicos en el intestino medio de vectores como *Lutzomyia longipalpis*, actuando como un ligando parasitario para la membrana del intestino medio del mismo.

25 En la presente invención, los ensayos fueron realizados relativos a la presencia de FML para receptores específicos y para la capacidad de aumento de anticuerpos en perros luego de la vacunación con Leishmune® (una vacuna basada en FML bajo licencia de industrialización) para bloquear la adhesión de los promastigotes procíclicos de *Leishmania donovani* y *Leishmania chagasi* a la membrana del intestino medio del vector, el flebótomo *Lutzomyia longipalpis*, haciendo posible la caracterización del potencial efecto bloqueante de la vacuna FML.

30 Las ilustraciones A, B, C Y D son parte de la presente aplicación y muestran el porcentaje de inhibición de unión, en porcentaje frente a concentración de FML en µg/ml o anticuerpos Fab anti-FML en µg/ml para *L.donovani* y *L.chagasi*.

La presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende fracciones de promastigotes o amastigotes de *Leishmania* llamadas "Ligando fucosa-manosa" (FML) y saponina.

35 Ventajosamente, la invención comprende una composición farmacéutica para la preparación de una vacuna que bloquee la transmisión de la leishmaniasis en humanos y animales y que comprende fracciones de promastigotes y amastigotes llamadas FML.

40 Mas ventajosamente, la invención se refiere a una composición farmacéutica que posee fracciones de promastigotes o amastigotes de *Leishmania* llamadas "Ligando fucosa-manosa" (FML) que comprende compuestos nativos que contiene desde un 10 a un 20% de ácido glutámico, alanina, ácido aspártico y glicina, entre un 5 a un 10 % de serina, histidina, lisina, treonina, prolina, y valina y entre un 2 y un 5% de arginina, metionina, isoleucina, tirosina y fenilalanina.

La invención comprende preferentemente el uso de la composición farmacéutica para la preparación de una vacuna bloqueante para impedir la transmisión de la leishmaniasis en humanos y animales.

45 Más preferentemente, la invención comprende el uso de la composición farmacéutica en la preparación de una vacuna bloqueante para impedir la transmisión de la leishmaniasis que consiste en la administración de fracciones de promastigotes o amastigotes de *leishmania* denominada saponina-(FML).

La invención podrá ser mejor comprendida a partir del siguiente ensayo que es no mas que una ayuda y que de ninguna manera limita el alcance de la misma.

50 Cuatro perros saludables de ninguna raza definida fueron vacunados con Leishmune (vacuna con licencia industrial). Los animales recibieron tres dosis de la vacuna en forma subcutánea, con un intervalo de 20 días entre cada una. Los sueros fueron colectados 20 días luego de la aplicación de la tercera dosis. Los títulos de

5 anticuerpos anti-FML del tipo IgG fueron determinados por medio de un FML-ELISA. La absorbancia de la IgG a 492 nm en una dilución 1/100 del suero fue: 0,818, 0,761, 0,887, y 0,776. Todos los sueros presentaron altos niveles de absorbancia para el subtipo IgG2 que para el subtipo IgG1. Para purificar las muestras de IgG, todas las muestras fueron diluidas, precipitadas e incubadas por agitación. El precipitado fue separado por centrifugación, resuspensión y diálisis. La fracción aislada fue colocada en una columna de Sepharosa de unión a proteína. La fracción no unida fue eluída, mientras que la fracción de IgG purificada fue recuperada, neutralizada y nuevamente dializada en tampón.

10 La concentración de proteínas fue determinada y la IgG purificada fue concentrada contra polietilenglicol. Los fragmentos Fab y Fc de la IgG fueron obtenidos el kit Inmune Pure Fab y por una subsiguiente cromatografía en una columna de Sepharosa de unión a proteína. Los fragmentos Fab fueron eluídos en los primeros dos volúmenes de la columna mientras que la regio Fc fue removida por medio de un solución tamponadora específica.

15 Inicialmente, la unión de los promastigotes al intestino medio de los vectores se inhibió en presencia de FML. En dichos casos, las membranas intestinales de *Lutzomyia longipalpis* fueron disectadas mediante un corte longitudinal, pre-incubadas con FML (40, 100, 200 y 400 ug/ml) y luego fueron incubadas con  $10^6$  promastigotes procíclicos.

20 Los ensayos demostraron la presencia de receptores para FML en las membranas superficiales del intestino medio de los insectos Phlebotominae. Dichos receptores reconocen al compuesto de FML en la superficie de promastigotes de *L.donovani* y *L.chagasi* actuando como un ligando parasitario para la membrana del intestino medio. La preincubación de las membranas del intestino medio con crecientes concentraciones de FML pudo inhibir luego la unión de los promastigotes. Los resultados se muestran en las figuras A y B. Las concentraciones crecientes de FML determinan aumento de la inhibición de la unión para *L.donovani* y *L.chagasi*.

25 Todas las concentraciones de FML ensayadas inducen inhibiciones superiores respecto al control con solución salina. Similarmente, fueron observadas diferencias en la inhibición entre distintas concentraciones de FML, con excepción de 100 y 200  $\mu\text{g/ml}$  para *L.donovani*.

Aunque el antígeno FML de *L.donovani* aislado inhibió la unión de ambos parásitos, como se ve en las figuras A y B, se observo que la inhibición fue mas pronunciada para el caso de promastigotes de *L.donovani* que para *L.chagasi* indicando el carácter especie-especifico de los antígenos de reconocimiento homólogo.

30 Los ensayos de inhibición fueron realizados mediante pre-incubación de la fracción Fab de la IgG purificada de los perros vacunados con Leishmune® (4, 40 y 400  $\mu\text{g/ml}$ ) con  $10^6$  promastigotes procíclicos. Varios minutos luego de la interacción, los intestinos fueron agregados y co-incubados. Luego los sistemas fueron individualmente lavados y homogeneizados. Los promastigotes de Leishmania agregados fueron contados en una cámara de Neubauer. Los resultados representan el promedio y el error estándar de dos series de experimentos con 7-10 membranas por cada concentración de las fracciones de Fab.

35 El potencial bloqueante de la transmisión de la leishmaniasis visceral canina de la vacuna Leishmune en los ensayos anteriormente mencionados se muestra en las figuras C y D. Los tests analíticos demostraron diferencias significativas entre las concentraciones crecientes de FML, excepto entre 4 y 40  $\mu\text{g/ml}$ . No se encontraron diferencias entre *L.donovani* y *L.chagasi* respecto a la inhibición de la unión, indicando que los anticuerpos producidos en perros vacunados impiden la unión al intestino medio del vector de los promastigotes de ambos parásitos, bloqueando e impidiendo la transmisión de la enfermedad.

40

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Una composición que comprende ligando de Fucosa-Manosa (FML) y saponina, para su uso como vacuna bloqueante contra la transmisión de la leishmaniasis visceral canina, donde la administración de la composición a un sujeto canino produce un anticuerpo en dicho sujeto en respuesta a FML que inhibe la unión de promastigotes procíclicos de *Leishmaniasis donovani* y *chagasi* a la membrana del intestino medio de Phlebotominae, impidiendo de este modo la transmisión de la leishmaniasis por Phlebotominae a humanos y animales.
2. La composición de la reivindicación 1, en la que dicha composición comprende además vehículos farmacológicos adecuados.
- 10 3. La composición de la reivindicación 1, en la que el FML comprende un complejo de glucoproteína que contiene un 29 % de azúcares neutros, un 44 % de proteínas, un 11 % de fosfato y trazas de hexoaminas compuestas por bandas de proteína con un peso molecular en el intervalo de 9 a 95 kDa, conteniendo algunas bandas de proteína carbohidratos: 36 y 54 a 68 kDa, presentando la porción glucídica de FML un 10 % de fucosa y un 47 % de manosa, un 30 % de flucosa, un 12 % de galacosa y trazas de xilosa, aminoácidos que contienen entre un 10 a 20 % de ácido glutámico, alanina, ácido aspártico y glicina, del 5 al 10 % de serina, histidina, lisina, leucina, treonina, prolina y valina y del 2 al 5 % de arginina, metionina, isoleucina, tirosina y fenilalanina.
- 15

Figuras A, B, C y D

