

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 546 301**

51 Int. Cl.:

C07K 14/44 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

A61K 39/008 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.04.2001 E 01971447 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.07.2015 EP 1279679**

54 Título: **Composición que contiene Leishmania Lip2a**

30 Prioridad:

17.04.2000 ES 200000999

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

22.09.2015

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**SOTO ÁLVAREZ, MANUEL;
ALONSO BEDATE, CARLOS y
REQUENA ROLANIA, JOSÉ MARÍA**

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

ES 2 546 301 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

Composición que contiene Leishmania Lip2a

5 [0001] Esta invención hace referencia en general a polipéptidos, proteínas o ácidos nucleicos que contienen al menos una parte de una proteína ribosómica ácida de Leishmania infantum llamada Lip2a o una variante de la misma, útil para modificar la respuesta inmune en individuos inmunizados o en grupos celulares. La invención se refiere específicamente a composiciones basadas en compuestos de Leishmania infantum homólogos a las proteínas ribosómicas ácidas, a las que se hace referencia como Lip2a de ahora en adelante, para estimular respuestas inmunes y para ser usadas como vacunas o como productos terapéuticos.

10 [0002] Las composiciones de la invención son útiles para promover una respuesta humoral o celular en el individuo inoculado con dichas composiciones. Así, las composiciones de la invención se pueden usar para el tratamiento o la profilaxis de enfermedades. En concreto, entre otras aplicaciones, las composiciones de la invención que utilizan la proteína Lip2a se pueden usar como adyuvante o como una subunidad en una vacuna para la prevención de la Leishmaniasis o el tratamiento de otras enfermedades.

Antecedentes de la invención

20 [0003] Las vacunas pueden inducir inmunidad protectora contra una infección o enfermedad mediante la generación de una respuesta inmune apropiada en un individuo o paciente que padece tal enfermedad. Actualmente, se hacen avances en el desarrollo de vacunas contra agentes infecciosos e incluso contra determinadas enfermedades, dado que existen muchas técnicas apropiadas para la identificación de antígenos que tienen el potencial de ser usados como agentes capaces de inducir respuestas específicas para combatir las infecciones y enfermedades más comunes tales como infecciones víricas, bacterianas y protozoarias, o incluso cáncer.

25 [0004] En la mayoría de los casos, la respuesta inmune inducida por el inmunógeno es débil y por consiguiente la respuesta inmune generada, aunque dirigida contra el antígeno presente en el patógeno, no es lo suficientemente grande como para proporcionar protección. En tales casos, es necesario usar un agente capaz de actuar como adyuvante.

30 [0005] Los adyuvantes son sustancias que aumentan la respuesta específica contra una sustancia cuando son inyectados A- antes que dicha sustancia B- en relación con esa sustancia C- en el mismo sitio que esa sustancia o en sitios diferentes. En general, se puede decir que los adyuvantes contribuyen a un aumento de la respuesta inmune de diversas formas: 1- ayudando a que el antígeno sea liberado lentamente por/a el sistema inmunológico; 2- mediante la estimulación y migración de células que presentan el antígeno al lugar de inyección; 3- mediante la estimulación y proliferación de linfocitos; y 4- mejorando la dispersión del antígeno por todo el cuerpo del paciente.

35 [0006] Esta invención hace referencia a una composición para estimular una respuesta inmune en individuos inmunizados o en grupos celulares, caracterizados por el hecho de que dicha composición consiste en una solución salina que comprende la proteína de Leishmania Lip2a representada por SEQ ID NO:2 o un polipéptido que difiere sólo en sustituciones conservadas de los aminoácidos de la SEQ ID NO:2 de los cuales los grupos de aminoácidos que representan cambios conservados son (1) ala, pro, gly, glu, asp, gin, asn, ser, thr; (2) cys, ser, tyr, thr; (3) val, ile, leu, met, ala, phe; (4) lys, arg, his; y (5) phe, tyr, trp, his, o comprende un ácido nucleico que codifica la proteína de Leishmania Lip2a como se identifica anteriormente, o es representada por la SEQ ID NO:1. Preferiblemente dicha composición es para su uso como vacunas o como productos terapéuticos.

40 [0007] Las composiciones de la invención son útiles para promover una respuesta humoral o celular en el individuo inoculado con dichas composiciones. Así, las composiciones de la invención se pueden usar para el tratamiento o la profilaxis de enfermedades. En concreto, entre otras aplicaciones, las composiciones de la invención que utilizan la proteína Lip2a se pueden usar como adyuvante o como una subunidad en una vacuna para la prevención de la Leishmaniasis o el tratamiento de otras enfermedades.

Antecedentes de la invención

55 [0008] Las vacunas pueden inducir inmunidad protectora contra una infección o enfermedad mediante la generación de una respuesta inmune apropiada en un individuo o paciente que padece tal enfermedad. Actualmente, se hacen avances en el desarrollo de vacunas contra agentes infecciosos e incluso contra determinadas enfermedades, dado que existen muchas técnicas apropiadas para la identificación de antígenos que tienen el potencial de ser usados como agentes capaces de inducir respuestas específicas para combatir las infecciones y enfermedades más comunes tales como, infecciones víricas, bacterianas y protozoarias, o incluso cáncer.

60 [0009] En la mayoría de los casos, la respuesta inmune inducida por el inmunógeno es débil y por consiguiente la respuesta inmune generada, aunque dirigida contra el antígeno presente en el patógeno, no es lo suficientemente grande como para proporcionar protección. En tales casos, es necesario usar un agente capaz de actuar como adyuvante.

[0010] Los adyuvantes son sustancias que aumentan la respuesta específica contra una sustancia cuando son inyectados A- antes que dicha sustancia B- en relación con esa sustancia C- en el mismo sitio que esa sustancia o en sitios diferentes. En general, se puede decir que los adyuvantes contribuyen a un aumento de la respuesta inmune de diversas formas: 1- ayudando a que el antígeno sea liberado lentamente por/a el sistema inmunológico; 2- mediante la estimulación y migración de células que presentan antígenos al lugar de inyección; 3- mediante la estimulación y proliferación de linfocitos; y 4- mejorando la dispersión del antígeno por todo el cuerpo del paciente.

[0011] Los aceites, los polímeros, las sales minerales y las bacterias se han usado y son actualmente usados como adyuvantes. Los inmunoestimulantes son sustancias que inducen una respuesta inmune general o temporal cuando se administran junto con el antígeno o de forma independiente. Inmunoestimulantes típicos son, por ejemplo, el adyuvante Freund (AC/IF), BCG (una especie atenuada de *Mycobacterium tuberculosis*) o una forma inviable de *Corynebacterium parvum*, entre otros. Los adyuvantes o los inmunoestimulantes sirven para aumentar la respuesta inmune específica por un camino no específico.

[0012] Un serio inconveniente con la mayoría de los adyuvantes más potentes en el uso hasta el presente es su alta toxicidad. Dado que el mecanismo de acción de los adyuvantes puede ser muy variado y es un requisito para que la respuesta inmune contra la proteína asociada se dirija contra una parte u otra del sistema inmunológico, es de máxima importancia identificar los compuestos capaces de actuar: A- con carácter adyuvante (aumento de la respuesta inmune tanto del tipo humoral a nivel de inmunoglobinas, como de las citocinas de tipo celular específico, preferiblemente CD4+ o CD8+ o CTLs). B- que tengan baja o ninguna toxicidad. C- que estén formados de una sustancia tan pura como sea posible, preferiblemente una proteína que aunque tenga carácter inmunogénico no genere problemas de autoinmunidad y un potencial efecto sombra en el inmunógeno con el que se administra.

[0013] La patente ES 2133236 hace referencia a un gen quimérico que comprende Lip2a. La proteína quimérica resultante se usa para la detección de leishmaniasis. Además, la proteína Lip2a ha sido investigada como comprobador antigénico (Manuel Soto et al., *The Journal of Biological Chemistry*, Vol 268; No. 29, p. 21835-21843, 1993), pero no se describe ninguna actividad inmunogénica de la proteína con o sin adyuvante.

[0014] La presente invención describe por primera vez la actividad inmunogénica de la proteína Lip2a sin el uso de adyuvantes.

Resumen de la invención

[0015] La presente invención hace referencia a composiciones para estimular una respuesta inmune en individuos inmunizados o en grupos celulares, caracterizados por el hecho de que dicha composición consiste en una solución salina que comprende proteína de *Leishmania* Lip2a representada por la SEQ ID NO:2 o un polipéptido que difiere de ella sólo en sustituciones conservadas de los aminoácidos de la SEQ ID NO:2 de los cuales los grupos de aminoácidos que representan cambios conservados son (1) ala, pro, gly, glu, asp, gin, asn, ser, thr; (2) cys, ser, tyr, thr; (3) val, ile, leu, met, ala, phe; (4) lys, arg, his; y (5) phe, tyr, trp, his, o comprende un ácido nucleico que codifica la proteína de *Leishmania* Lip2a como se identifica anteriormente, o es representada por la SEQ ID NO:1. La presente invención también hace referencia a la capacidad de la proteína Lip2a para inducir una respuesta inmune específica de tipo Th1 cuando se administra a un individuo y para estimular una respuesta de tipo Th1 *in vivo* y/o en células mononucleares de individuos inmunizados con dicha proteína.

[0016] La presente invención también proporciona un método para producir respuestas inmunes específicas en muestras de células mononucleares mediante la incubación de células con la proteína llamada Lip2a de individuos no inmunizados.

[0017] Una alternativa según la invención para el uso de la proteína Lip2a para producir una respuesta de tipo Th1 es el uso de vectores víricos o ácidos nucleicos que contienen el gen Lip2a y son capaces de dirigir la expresión de la proteína Lip2a en individuos o células transfectadas con la composición de ácidos nucleicos procedentes de la SEQ ID NO 1.

Descripción de la invención

[0018] La presente invención hace referencia en términos generales a un aumento de la respuesta inmune que puede ser de tipo humoral o mediada por células en un individuo inmunizado con Lip2a tal y como se define en la reivindicación 1 o en un cultivo celular con la misma proteína, tanto en células del individuo inmunizado como en células mononucleares de individuos sanos.

[0019] En el contexto de la invención, se declara que Lip2a tal y como se define en la reivindicación 1 es un compuesto inmunoestimulante (un inmunógeno contra el cual se induce una respuesta inmune) y cuya acción puede iniciarse de por sí sin necesidad de adyuvantes. Generalmente, la respuesta inmune contra un antígeno se puede iniciar o aumentar mediante la administración a la persona inmunizada de una proteína o adyuvante. Los antígenos y agentes inmunoestimulantes son generalmente moléculas de proteínas que proceden de virus, bacterias, parásitos y

tumores. Los inmunoestimulantes son moléculas que dirigen la respuesta del sistema inmunológico en una dirección u otra respecto a las citocinas de tipo Th1 o Th2 o que son mediados por células CD4+ o CD8+.

5 [0020] En este sentido, en el contexto de esta invención, también se puede incluir la capacidad de usar Lip2a como tratamiento en aquellas enfermedades que requieren un aumento sistemático de interferón- γ . Dentro del contexto de esta invención, se entiende también la iniciación de o inmunoestimulación contra un antígeno a partir de un virus, bacteria, agente infeccioso o antígeno tumoral, mediante la administración de dicho antígeno con la proteína Lip2a o derivados de la misma.

10 [0021] La proteína Lip2a pertenece a un grupo de moléculas de bajo peso molecular de carácter ácido que interactúan con el ribosoma durante la traducción. Éste es un proceso común a organismos de tres reinos: eubacterias, arqueobacterias y eucariotas. La función de estas proteínas es facilitar la interacción entre el ribosoma y algunos factores de traducción solubles (Sánchez-Madrid y colaboradores, 1979; Möller y colaboradores, 1983).
 15 Las proteínas ácidas enlazan con la subunidad mayor del ribosoma formando complejos de dos dímeros mediante la interacción con otra proteína que comparte ciertas características con estos dímeros. Esta proteína se denomina proteína ribosómica P0 en eucariotas y L10 en bacterias y arqueobacterias. En los organismos de los dos últimos de estos reinos, los dímeros de proteínas ácidas están formados por el mismo polipéptido, aunque en las bacterias una de las copias sufre modificaciones postraduccionales de acetilación (Terhorst y colaboradores, 1972). En eucariotas, las proteínas ácidas, también denominadas proteínas P ya que se fosforilan en su forma activa (Wool, 1979; Hasler y
 20 colaboradores, 1991) se dividen en dos grupos, P1 y P2, dependiendo del grado de similitud de las secuencias y de la presencia de características dominantes de cada una de ellas. Así en eucariotas, el complejo formado de la unión al ribosoma está compuesto por dos dímeros a su vez compuestos por un polipéptido de cada grupo. En la mayoría de eucariotas, hay sólo una copia de los genes codificantes para las proteínas ácidas de cada grupo, aunque en *Saccharomyces cerevisiae* (Newton y colaboradores, 1990) y *Schizosaccharomyces pombe* (Beltrame y Bianchi,
 25 1990), se han descrito dos proteínas ácidas diferentes dentro de cada grupo, cada una de ellas codificada por genes diferentes.

[0022] La proteína Lip2a de *Leishmania infantum* está compuesta por 106 aminoácidos con un peso molecular de 10,57 kDa (véase SEQ ID NO 2). El análisis de la secuencia de aminoácidos deducido de la secuencia de ADNc L22
 30 indica que la proteína Lip2a posee características comunes a aquellas de las proteínas ribosómicas ácidas del grupo P2 de eucariotas, tales como las secuencias carboxi-terminales altamente conservadas, un área muy central rica en pralinas y alaninas, y un amino-terminal con una secuencia más variable (Soto y colaboradores, 1993).

[0023] Las composiciones conforme a esta invención comprenden un polipéptido que estimula una respuesta humoral fuerte en animales inmunizados con el mismo, incluso en ausencia de adyuvantes y una respuesta inmune de tipo Th1 en esplenocitos de individuos que han sido o no inmunizados con Lip2a. Este polipéptido inductor puede comprender toda o parte de la proteína completa de la *Leishmania infantum* llamada Lip2a o una proteína ribosómica homóloga total o parcial de otro organismo que tenga una actividad estimulante similar.

40 [0024] Los polipéptidos según la presente invención incluyen variantes de Lip2a tal y como se define en la reivindicación 1 capaces de producir una respuesta Th1 en individuos inmunizados o en células mononucleares en cultivo dada la similitud entre las proteínas de este grupo. Tales variantes incluyen diferentes formas estructurales de la proteína nativa tanto en forma de sal como en forma ácida o inducida por la modificación de aminoácidos, por ejemplo, a través de glicosilación. Los polipéptidos Lip2a expresados en *E. coli* no se glicosilan mientras que los
 45 mismos producidos en levaduras o en células de mamífero son idénticos a aquellos producidos en *E. coli*, pero pueden diferir estructuralmente y en su capacidad inmunológica debido a la glicosilación. Los sitios de glicosilación son Asn-N-Pro(o Ser). N puede ser cualquier aminoácido excepto Pro.

[0025] Los polipéptidos según esta divulgación comprenden secuencias de aminoácidos que no difieren sustancialmente de Lip2a, donde se entiende por tal concepto modificaciones de aminoácidos que sean codificados por secuencias de ADN capaces de formar híbridos con las secuencias de ADN del gen nativo de Lip2a en condiciones no muy rigurosas. Se puede mostrar fácilmente si estas variaciones en la secuencia de aminoácidos no difieren de Lip2a por su capacidad de estimular esplenocitos de una forma similar o como hace una Lip2a nativa. En general, estas secuencias, que no difieren sustancialmente de la Lip2a nativa, se forman de sustituciones conservadas de aminoácidos o formadas por pequeñas sustituciones o modificaciones, naturales o conseguidas a través de mutagénesis dirigida. En general, los grupos de aminoácidos que representan cambios conservados son
 55 (1) ala, pro, gly, glu, asp, gln, asn, ser, thr; (2) cys, ser, tyr, thr, (3) val, ile, leu, met, ala, phe; (4) lys, arg, his; y (5) phe, tyr, trp, his. Dentro del ámbito de esta divulgación hay variantes polipeptidos de Lip2a generados por una unión covalente o a través de la construcción de proteínas de fusión con otros grupos químicos o biológicos tales como
 60 proteínas que usan procesos químicos o biológicos entre los que se incluyen los métodos de ADN recombinante, por ejemplo, para una purificación mejor o más fácil, mayor estabilidad, o formación de compuestos que contienen varias proteínas Lip2a totales o parciales.

[0026] La proteína Lip2a se puede expresar en *E. coli* u otras células procarióticas o eucarióticas después de la transformación de estas células con la secuencia genómica del gen Lip2a o un clon total o parcial de ADNc de Lip2a. La secuencia de nucleótidos del ADN del gen Lip2a y de aminoácidos de la proteína codificada se muestra en SEQ

ID NO 1 y NO 2 adjuntas. El gen Lip2a se puede aislar del ADN de *Leishmania infantum* u otras especies de *Leishmania* u otro organismo mediante la identificación de clones del ADNc de una genoteca de expresión que expresa proteínas del organismo mediante sueros animales altamente reactivos infectados de forma natural con *Leishmania infantum* o mediante técnicas PCR usando oligonucleótidos específicos.

5 [0027] Para obtener el gen Lip2a, se rastreó una genoteca de expresión de ADNc de *Leishmania infantum* con el suero de un perro infectado de forma natural con *Leishmania*. El análisis de la secuencia de tres de los clones aislados indicó la existencia de homología en la secuencia con genes codificantes para las proteínas ribosómicas P2 de tipo ácido. Mientras que los genes mostraron una homología total de la secuencia en la región codificante, las regiones 3' no traducidas eran completamente divergentes. Existen al menos dos genes Lip2a en el genoma de la *Leishmania infantum*. Estos genes se pueden encontrar agrupados en el genoma del cromosoma XIX. Variantes de la proteína Lip2a pueden aislarse rastreando otras genotecas de expresión de ADNc de otras especies de *Leishmania*.

15 [0028] La proteína Lip2a se puede purificar de cultivos de células bacterianas que expresen el gen Lip2a. La proteína se puede purificar de los extractos o de los sobrenadantes dependiendo del vector de expresión utilizado tanto como una proteína en sí o como una proteína de fusión con otra proteína. Los métodos varían aunque la cromatografía de afinidad, ya sea con anticuerpos específicos contra Lip2a o resinas de partículas adaptadas a la proteína sintetizada, mediante la presencia de una diana determinada que permite su unión a la resina, es el método preferido. Específicamente, el gen Lip2a ha sido subclonado en una variante de los vectores de expresión pMAL y de los vectores de expresión pQE31 y la proteína sintetizada Up2a ha sido purificada unida a la proteína MBP en columnas de maltosa, o unida a una cadena de aminoácidos de histidina con el objetivo de identificar su producción y purificación en columnas de NT Ni. De forma similar, se pueden utilizar anticuerpos monodonaes o policlonales mono-específicos para su purificación. Los polipéptidos parciales que forman la proteína Lip2a y que forman parte de esta invención pueden sintetizarse a partir de la construcción de clones parciales de Lip2a, conocidos por todos aquellos bien versados en las técnicas de biología molecular.

20 [0029] Un método alternativo a la presentación de la proteína Lip2a tal y como se define en la reivindicación 1 para individuos por inmunizar o a células de cultivo es la administración de la proteína en forma de ácidos nucleicos que codifican por Lip2a o una parte de la proteína en forma de plásmidos, virus, incluida en liposomas o ligada a polímeros, u otra forma de introducción de la proteína en células diana. Los vectores más usados para la administración del gen como inmunógeno en forma de ADN son los denominados pcADN3 y pRc/CMV bajo el control de promotores específicos en su mayoría de tipo eucariota. Está extensivamente documentado en la literatura que este tipo de inmunización induce preferiblemente una respuesta del tipo Th1.

35 [0030] La proteína Lip2a tal y como se define en la reivindicación 1 se puede administrar conjuntamente con el antígeno o de forma independiente, al mismo tiempo o en momentos diferentes (por ejemplo, un día o dos antes de la administración del antígeno apropiado), en el mismo sitio o en diferentes sitios del animal. En este sentido, la Lip2a tal y como se define en la reivindicación 1 se podría usar para inducir una respuesta humoral o como un adyuvante en las preparaciones de la vacuna con antígenos heterólogos a los de *Leishmania*.

40 [0031] Dado que la respuesta a la proteína Lip2a puede variar de individuo a individuo dependiendo de si el individuo está infectado o no con *Leishmania* y por lo tanto haya estado expuesto o no a la proteína Lip2a la administración de la proteína podría tener un efecto inmunológico diferente. En términos generales, la proteína Lip2a o los polipéptidos derivados tal y como se define en la reivindicación 1 se administran en formulaciones farmacológicas como una única sustancia en una solución salina o en combinación con portadores fisiológicos apropiados, incluyendo liposomas aniónicos y catiónicos u otros agentes tales como BCG, Bordetella pertussis, o ADN y oligonucleótidos 3'purina - 5'pirimidina. Los portadores deben ser sustancias no tóxicas. La literatura sobre el uso de adyuvantes o portadores es extensa y debe elegirse el más apropiado para la vía de administración deseada. Por ejemplo, para la administración oral, se debe elegir un compuesto sólido tal como celulosa o glucosa. La inmunización se puede realizar con una preparación de Lip2a como moléculas separadas o ligadas y en combinación con uno o varios antígenos e incluso citocinas que pueden actuar como inmunostimulantes. Las vías y frecuencia de administración pueden variar extensamente. Las vías más usadas son intramusculares o subcutáneas, intranasal u oral, con una frecuencia de 3 dosis cada 15 días. La dosis también puede variar mucho dependiendo del estado del individuo y de su tamaño. La dosis de la proteína Lip2a tal y como se define en la reivindicación 1 como de cualquier otro inmunógeno, tiene que ser ajustada de modo que se introduzca una cantidad significativa de interferón gamma u otras citocinas. Normalmente, la dosis puede oscilar entre 10 microgramos y 100 microgramos por 100 gramos de peso del hospedador.

55 [0032] Otro método alternativo de administración de Lip2a e inducción de una respuesta inmune puede ser la extracción de células (preferiblemente células mononucleares periféricas) de un individuo, estimularlas *in vitro* con la proteína Lip2a en presencia o no de un antígeno (específico de una enfermedad o infección) para posteriormente reintroducirlas en el paciente con el objetivo de interferir con el proceso patológico. En este contexto la proteína Lip2a tal y como se define en la reivindicación 1 o sus variantes polipeptídicas podrían utilizarse como adyuvante o inmunostimulante de una respuesta. Estas características de la proteína Lip2a sugieren que esta puede tener un papel para generar una respuesta inmune protectora o terapéutica en pacientes con enfermedades dependientes de

la presencia de interferón- γ o parásitos, por ejemplo, leishmaniasis. En este sentido, la presente invención describe sistemas para aumentar o inmunoestimular la respuesta humoral o celular en individuos o células aisladas (macrófagos, monocitos, células B o células dendríticas) procedentes de individuos que han sido inmunizados o no con la proteína Lip2a. La capacidad para estimular la producción de interferón gamma muestra el potencial que tiene Lip2a para ser muy usada en terapias en una amplia gama de aplicaciones que requieren la inducción de una respuesta no específica de esta citocina (no necesariamente leishmaniasis).

[0033] Como se mostrará en las figuras, citadas más adelante a modo de ejemplo, la proteína Lip2a es capaz de inducir una respuesta humoral fuerte en ratones Balb/c inmunizados con 5 microgramos de la proteína rLip2a en tampón salino por vía intraperitoneal y una pauta de administración de dos dosis con una separación de tres semanas entre ellas (21 días). Los datos mostraron que se producen valores altos de inmunoglobulinas G y M. Tras la primera dosis, la respuesta fue principalmente de tipo IgM conduciendo a una maduración hacia IgG tras la segunda inoculación. Se observó que el isotipo de IgG más abundante en ratas inmunizadas con la proteína rLip2a correspondía a la inmunoglobulina IgG2a aunque IgG1 también se produjo. Se concluye de estos datos que la inmunización con el antígeno de Lip2a genera una respuesta mixta Th1/Th2, aunque predomina Th1.

[0034] Dado que la naturaleza de esta proteína se conserva con otras de otros organismos, se analizó la especificidad de la respuesta humoral generada tras la inmunización. Se analizó el reconocimiento de los sueros de ratas inmunizadas frente a un grupo de proteínas sintéticas que comprenden la Lip2a. Se observó que los péptidos A4, A5 y A6 fueron reconocidos por los sueros. La región de la proteína contenida en dichos péptidos es específica para las proteínas ácidas de los tripanosomátidos, sin que se detectara ninguna actividad frente al péptido A7, el cual contiene el terminal carboxilo conservado de la proteína. Esta especificidad de respuesta se confirmó cuando se realizó un análisis "Western Blot" sobre la reactividad de los sueros frente a proteínas ácidas de Leishmania, MBP-Lip2a y MBP-Lip2b, MBP-P2 humana y MBP-P2 de *T. cruzi*. Hubo solo reconocimiento hacia las proteínas ácidas de parásitos, con una reactividad superior contra MBP-Lip2A, y en ningún caso se generaron anticuerpos contra las proteínas ácidas de los organismos eucariotas superiores testados (conservados con la P2 humana usada en el ensayo). Así, se confirmó que la proteína inmunogénica o el inmunoestimulante no han inducido problemas de autoinmunidad en el hospedador. Además, uno de los péptidos reconocidos por los sueros de animales inmunizados coincidió con el péptido reconocido por los sueros de perros infectados con leishmaniasis viscerocutánea. Esto significa que también en perros, esta región de la proteína es inmunogénica en la infección de forma natural con Leishmania.

[0035] La proteína Lip2a también induce la proliferación de esplenocitos obtenidos de ratones inmunizados. Los resultados obtenidos mostraron que había una relación directa entre la concentración de antígenos y el nivel de proliferación celular inducido. Sorprendentemente, se obtuvieron los mismos resultados cuando se analizó la proliferación de esplenocitos obtenidos de ratones no inmunizados. Con el fin de implicar directamente a la proteína en la proliferación, eliminando la posibilidad de que bacterias contaminantes puedan provocar dicho fenómeno, se analizó la capacidad inhibitoria de un anticuerpo anti-Lip2a generado en un conejo a diluciones diferentes en la proliferación celular. Se observó que mientras que una dilución del suero de 1/100 indujo una reducción en la proliferación tanto para cultivos con Concanavalina A como para los cultivos con el antígeno Lip2a, aunque era siempre superior en el caso de los cultivos inducidos para proliferar con Lip2a, en diluciones más altas (1/500 y 1/1000), la inhibición solo se indujo en cultivos con este antígeno. Este hecho mostró que la inducción proliferativa fue dictada por la proteína Lip2a y no por un contaminante de la misma. El estudio de la cinética de proliferación y los niveles de la proteína en ratones inmunizados con la proteína Lip2a y en ratones no inmunizados indicó que la proteína Lip2a es capaz de inducir la misma cinética de proliferación y alcanzar los mismos niveles independientemente de si los animales han sido inmunizados o no. Esto indica que debería haber células capaces de responder a Lip2a incluso en animales no estimulados sugiriendo que durante su vida los animales han estado expuestos a proteínas que tienen características estructurales o una secuencia similares a la Lip2a. En general, se puede afirmar por los datos obtenidos que la proteína rLip2a posee características inmunogénicas y mitogénicas muy potentes.

[0036] Para caracterizar el tipo de respuesta generada durante las proliferaciones, se analizaron las linfoquinas gamma INF e IL-4 que se producen en los ensayos de proliferación, tanto de esplenocitos de ratas control que no han sido inmunizadas y de ratas inmunizadas. Los resultados mostraron que la proliferación provocada por el antígeno genera un aumento significativo en la secreción de gamma INF en esplenocitos de ratas inmunizadas. De forma similar, se detectó un ligero aumento en los niveles de IL-4 en los cultivos de esplenocitos que proliferaron en presencia del antígeno con respecto a aquellos que proliferan en el medio sin estímulos adicionados. Estos resultados indican que la respuesta generada por el antígeno provoca una proliferación celular que genera un patrón de producción de linfocitos predominantemente de tipo Th1.

[0037] Con el objetivo de determinar el carácter potencial de protección de la Lip2a, se administró la proteína y posteriormente se infectaron los ratones Balb/c con el parásito. Se observó que hubo un retraso en la aparición de la enfermedad y una reducción en las lesiones del tipo cutáneo generadas por infecciones con Leishmania mayor. un clon total o parcial de ADNc de Lip2a. La secuencia de nucleótidos del ADN del gen Lip2a y de aminoácidos de la proteína codificada se muestra en las SEQ ID NO 1 y NO 2 anexas. El gen Lip2a se puede aislar del ADN de Leishmania infantum u otras especies de Leishmania u otro organismo mediante la identificación de clones del ADNc

de una genoteca de expresión que expresa proteínas del organismo mediante sueros altamente reactivos de animales infectados de forma natural con *Leishmania infantum* o mediante técnicas PCR usando oligonucleótidos específicos.

5 [0038] Para obtener el gen Lip2a, se rastreó una genoteca de expresión de ADNc de *Leishmania infantum* con suero de un perro infectado de forma natural con *Leishmania*. El análisis de la secuencia de tres de los clones aislados indicó la existencia de homología en la secuencia con genes codificantes para las proteínas ribosómicas P2 de tipo ácido. Mientras que los genes mostraron una homología total de la secuencia en la región codificante, las regiones 3' no traducidas eran completamente divergentes. Existen al menos dos genes Lip2a en el genoma de la *Leishmania infantum*. Estos genes se pueden encontrar agrupados en el genoma del cromosoma XIX. Variantes de la proteína Lip2a pueden aislarse rastreando otras genotecas de expresión de ADNc de otras especies de *Leishmania*.

15 [0039] La proteína Lip2a se puede purificar a partir de cultivos de células bacterianas que expresen el gen de Lip2a. La proteína se puede purificar a partir de los extractos o de los sobrenadantes dependiendo del vector de expresión utilizado tanto como una proteína en sí o como una proteína de fusión con otra proteína. Los métodos varían aunque la cromatografía de afinidad, ya sea con anticuerpos específicos contra Lip2a o resinas de partículas adaptadas a la proteína sintetizada, mediante la presencia de una determinada diana que permite su unión a la resina, es el método preferido. Específicamente, el gen Lip2a ha sido subclonado en una variante de los vectores de expresión pMAL y de los vectores de expresión pQE31 y la proteína Lip2a sintetizada ha sido purificada unida a la proteína MBP en columnas de maltosa, o unida a una cadena de aminoácidos de histidina con el objetivo de identificar su producción y purificación en columnas de NT Ni. De forma similar, se pueden utilizar anticuerpos monoclonales o policlonales monoespecíficos para su purificación. Los polipéptidos parciales que forman la proteína Lip2a y que forman parte de esta invención pueden sintetizarse de la construcción de clones parciales de la Lip2a, conocidos por todos aquellos bien versados en las técnicas de biología molecular.

25 [0040] Un método alternativo a la presentación de la proteína Lip2a a individuos por inmunizar o a células de cultivo es la administración de la proteína en forma de ácidos nucleicos que codifican para Lip2a o una parte de la proteína en forma de plásmidos, virus, incluyendo en liposomas o unida a polímeros, u otra vía de introducción de la proteína en células diana. Los vectores más usados para la administración del gen como inmunógeno en forma de ADN son los denominados pcADN3 y pRc/CMV bajo el control de promotores específicos en su mayoría de tipo eucariota. Está extensivamente documentado en la literatura que este tipo de inmunización induce preferiblemente una respuesta del tipo Th1.

35 [0041] La proteína Lip2a se puede administrar conjuntamente junto con el antígeno o de forma independiente, al mismo tiempo o en momentos diferentes (por ejemplo, un día o dos antes de la administración del antígeno apropiado), en el mismo o en diferentes sitios del animal. En este sentido, la Lip2a podría ser usada para inducir una respuesta humoral o como adyuvante en las preparaciones de la vacuna con antígenos heterólogos a los de *leishmania*.

40 [0042] Dado que la respuesta a la proteína Lip2a puede variar de individuo a individuo dependiendo de si el individuo está infectado o no con *Leishmania* y por lo tanto haya estado expuesto o no a la proteína Lip2a, la administración de la proteína podría tener un efecto inmunológico diferente. En términos generales, la proteína Lip2a o los polipéptidos derivados se administran en formulaciones farmacológicas como una única sustancia en una solución salina o en combinación con portadores fisiológicos apropiados, incluyendo liposomas aniónicos y catiónicos u otros agentes tales como BCG, Bordetella pertussis, o ADN y oligonucleótidos 3'purina - 5'pirimidina. Los portadores deben ser sustancias no tóxicas. La literatura sobre el uso de adyuvantes o portadores es extensa y debe elegirse el más apropiado para la vía de administración deseada. Por ejemplo, para la administración oral, se debe elegir un compuesto sólido tal como celulosa o glucosa. La inmunización se puede realizar con una preparación de Lip2a como moléculas independientes o unidas y en combinación con uno o varios antígenos e incluso citocinas que pueden actuar como inmunostimulantes. Las vías y frecuencia de administración pueden variar extensamente. Las vías más usadas son intramusculares o subcutáneas, intranasal u oral, con una frecuencia de 3 dosis cada 15 días. La dosis también puede variar mucho dependiendo del estado del individuo y de su tamaño. La dosis de la proteína Lip2a, como de cualquier otro inmunógeno, tiene que ser ajustada de modo que se introduzca una cantidad significativa de interferón gamma u otras citocinas son inducidas potencialmente. Normalmente, la dosis puede variar entre 10 microgramos y 100 microgramos por cada 100 gramos de peso del hospedador.

50 [0043] Otro método alternativo de administración de la Lip2a e inducción de una respuesta inmune puede ser la extracción de células (preferiblemente células mononucleares periféricas) de un individuo, estimularlas *in vitro* con la proteína Lip2a en presencia o no de un antígeno (específico de una enfermedad o infección) para posteriormente reintroducirlas en el paciente con el objetivo de interferir en el proceso patológico. En este contexto la proteína Lip2a o sus variantes polipeptídicas podrían utilizarse como adyuvante o inmunostimulante de una respuesta. Estas características de la proteína Lip2a sugieren que ésta puede tener un papel en la generación de una respuesta inmunológica protectora o terapéutica en pacientes con enfermedades dependiendo de la presencia de interferón- γ y parásitos, por ejemplo, leishmaniasis. En este sentido, la presente invención describe sistemas para aumentar o inmunostimular la respuesta humoral o celular en individuos o células aisladas (macrófagos, monocitos, células B o células dendríticas) procedentes de individuos que han sido inmunizados o no con la proteína Lip2a. La capacidad

para estimular la producción de interferón gamma muestra el potencial que tiene la Lip2a para ser muy usada en terapias en una amplia gama de aplicaciones que requieren la inducción de una respuesta no específica para esta citocina (no necesariamente leishmaniasis).

5 [0044] Como se mostrará en las figuras, citadas más adelante a modo de ejemplo, la proteína Lip2a es capaz de inducir una respuesta humoral fuerte en ratones Balb/c inmunizados con 5 microgramos de la proteína rLip2a en tampón salino por vía intraperitoneal y una pauta de administración de dos dosis con una separación de tres semanas entre ellas (21 días). Los datos mostraron que se producen valores altos de inmunoglobulinas G y M. Tras la primera dosis, la respuesta fue principalmente de tipo IgM conduciendo a una maduración hacia IgG tras la
10 segunda inoculación. Se observó que el isotipo de IgG más abundante en ratas inmunizadas con la proteína rLip2a correspondía a la inmunoglobulina IgG2a aunque IgG1 también se produjo. Se concluye de estos datos que la inmunización con el antígeno Lip2a genera una respuesta mixta Th1/Th2, aunque predomina Th1.

15 [0045] Dado que la naturaleza de esta proteína se conserva con otras de otros organismos, se analizó la especificidad de la respuesta humoral generada tras la inmunización. Se analizó el reconocimiento de los sueros de ratas inmunizadas frente a un grupo de proteínas sintéticas que comprenden Lip2a. Se observó que los péptidos A4, A5 y A6 fueron reconocidos por los sueros. La región de la proteína contenida en dichos péptidos es específica para las proteínas ácidas de los tripanosomatidos, sin ninguna actividad detectada frente al péptido A7, el cual contiene el terminal carboxilo conservado de la proteína. Esta especificidad de respuesta se confirmó cuando se realizó un
20 análisis "Western Blot" sobre la reactividad de los sueros frente a proteínas ácidas de Leishmania, MBP-Lip2a y MBP-Lip2b, MBP-P2 humana y MBP-P2 de T. cruzi. Hubo sólo reconocimiento hacia las proteínas ácidas de parásitos, con una reactividad superior contra MBP-Lip2A, y en ningún caso se generaron anticuerpos contra las proteínas ácidas de los organismos eucariotas superiores analizados (conservados con la P2 humana usada en el ensayo). Así, se confirmó que la proteína inmunogénica o el inmunoestimulante no han inducido problemas de
25 autoinmunidad en el hospedador. Además, uno de los péptidos reconocidos por los sueros de animales inmunizados coincidió con el péptido reconocido por los sueros de perros infectados con leishmaniasis viscerocutánea. Esto significa que también en perros, esta región de la proteína es inmunogénica en la infección natural con Leishmania.

30 [0046] La proteína Lip2a también induce la proliferación de esplenocitos obtenidos de ratones inmunizados. Los resultados obtenidos mostraron que había una relación directa entre la concentración de antígenos y el nivel de proliferación celular inducido. Sorprendentemente, se obtuvieron los mismos resultados cuando se analizó la proliferación de esplenocitos obtenidos de ratones no inmunizados. Con el fin de implicar directamente a la proteína en la proliferación, eliminando la posibilidad de que bacterias contaminantes puedan provocar dicho fenómeno, se analizó la capacidad inhibitoria de un anticuerpo anti-Lip2a generado en un conejo a diluciones diferentes en la
35 proliferación celular. Se observó que mientras una dilución serosa de 1/100 indujo una reducción en la proliferación tanto para cultivos con Concanavalina A como para cultivos con el antígeno Lip2a, aunque era siempre superior en el caso de cultivos inducidos para proliferar con Lip2a, en diluciones más altas (1/500 y 1/1000), la inhibición sólo se indujo en cultivos con este antígeno. Este hecho mostró que la inducción proliferativa fue dictada por la proteína Lip2a y no por un contaminante de la misma. El estudio de la cinética de proliferación y los niveles de la proteína en ratones inmunizados con la proteína Lip2a y en ratones no inmunizados indicó que la proteína Lip2a es capaz de
40 inducir la misma cinética de proliferación y alcanzar los mismos niveles independientemente de si los animales han sido inmunizados o no. Éste indica que debería haber células capaces de responder a Lip2a incluso en 25 animales no estimulados sugiriendo que durante su vida los animales han estado expuestos a proteínas que tienen características estructurales o una secuencia similares a Lip2a. En general, se puede afirmar por los datos obtenidos
45 que la proteína rLip2a tiene características inmunogénicas y mitogénicas muy potentes.

[0047] Para caracterizar el tipo de respuesta generado durante las proliferaciones, se analizaron las linfoquinas gamma INF e IL-4 que se producen en los ensayos de proliferación, tanto de esplenocitos de ratas control que no han sido inmunizadas como de ratas inmunizadas. Los resultados mostraron que la proliferación provocada por el
50 antígeno genera un aumento significativo en la secreción de gamma INF en esplenocitos de ratas inmunizadas. De forma similar, se detectó un ligero aumento en los niveles de IL-4 en los cultivos de esplenocitos que proliferaron en presencia del antígeno con respecto a aquéllos que proliferan en el medio sin estímulos adicionales. Estos resultados indican que la respuesta generada por el antígeno provoca una proliferación celular que genera un modelo de producción de linfocitos predominantemente de tipo Th1.
55

[0048] Con el objetivo de determinar el carácter potencial de protección de la Lip2a, se administró la proteína y posteriormente se infectaron los ratones Balb/C con el parásito. Se comprobó que hubo un retraso en la aparición de la enfermedad y una reducción en las lesiones del tipo cutáneo generadas por infecciones con Leishmania mayor.
60

Descripción de las figuras

[0049] A continuación se describe la invención con referencia a las figuras adjuntas, donde:

La Figura 1 describe el sistema usado para el aislamiento del gen Lip2a de Leishmania infantum y en cuyo genoma
65 hay dos copias de este gen.

La Figura 2 muestra la expresión (ARN) del gen de la proteína Lip2a en Leishmania infantum.

La Figura 3 muestra la expresión de la proteína Lip2a en cultivos bacterianos de *E. coli* transformados con el vector de expresión pMal que contiene la proteína de fusión MBP-Lip2a y su purificación y reconocimiento de la proteína Lip2a por sueros de animales infectados de forma natural con *Leishmania*.

5 La Figura 4 muestra la especificidad de la respuesta inmune a Lip2a de sueros de animales infectados de forma natural por *Leishmania*.

La Figura 5 muestra la localización dentro de la proteína de los antígenos determinantes reconocidos por los sueros de los animales infectados de forma natural por *Leishmania infantum*.

La Figura 6 muestra que la proteína Lip2a es homóloga de las proteínas ribosómicas ácidas P2 de otros organismos eucariotas.

10 La Figura 7 muestra que la proteína Lip2a es capaz de inducir una respuesta humoral después de la inoculación de los ratones.

La Figura 8 muestra la especificidad de la respuesta frente a péptidos de la Lip2a de sueros de animales Balb/c inoculados con Lip2a y la especificidad de los sueros de ratones inmunizados frente a las proteínas de la familia P2.

15 La Figura 9 muestra que la proteína es capaz de inducir una respuesta proliferativa en esplenocitos de animales inmunizados y no inmunizados.

La Figura 10 muestra que la proteína Lip2a confiere un cierto grado de protección y retrasa la aparición de síntomas de infección por *Leishmania* mayor.

20 [0050] Con referencia a la figura 1, se rastreó una genoteca de expresión de ADNc de *Leishmania infantum* con el suero de un perro infectado de forma natural con *Leishmania*. Para caracterizar las secuencias de ADN contenidas en los fagos aislados, los insertos de ADNc contenidos en ellos fueron clonados y ordenados en el plásmido pUC18. El análisis de la secuencia de tres de los clones aislados (L 21, L 22 y L 23) indicó la existencia de homología de la secuencia con los genes codificantes para las proteínas ribosómicas ácidas eucariotas del tipo P2. Los ADNcs L21 y L22 tenían una secuencia idéntica a lo largo de su longitud, siendo L22 (454 nt) el mayor en ambos casos. Cuando la secuencia del clon L22 se comparó con aquella del don L31, se observaron diferencias significativas: mientras la homología de la secuencia de los clones L22 y L31 era completa en la región codificante, las regiones 3' no traducidas fueron absolutamente divergentes. La proteína se denominó Lip2a.

30 [0051] Con el fin de estudiar la organización de los genes Lip2a, se realizaron análisis Southern Blot. En la sección A de la figura 1 se muestra el resultado de la hibridación del inserto del don L22 frente a los filtros que contenían ADN de *L. infantum* digerido con diversas enzimas de restricción (B = Bam H I; H = Hind III; P = Pst I). El patrón obtenido del uso de L 22 como una sonda indica que hay al menos dos genes Lip2a, ya que aparecen dos bandas de hibridación en el carril Pst I, una enzima que no presenta una secuencia de corte en el ADNc L 22. Estos genes se encuentran agrupados en el genoma, ya que sólo se obtuvo una banda de hibridación en los carriles de ADN digeridos con el resto de enzimas de restricción usadas. De hecho, y como se puede deducir del patrón de hibridación obtenido tras hibridar el inserto del clon L 22 para filtros que contenían cromosomas de *Leishmania* independientes en campo pulsado, los genes Lip2a se localizan en un único cromosoma (banda cromosómica XIX) (secciones B-C).

40 [0052] Con el fin de definir en detalle la secuencia y organización de los genes codificantes para la proteína ácida Lip2a de *Leishmania*, se usó el inserto de clon L22 para rastrear una genoteca genómica de este parásito, construido en el vector de reemplazamiento EMBL-3. Se aisló un fago positivo, denominado L22g. El mapa de restricción del fago (D), al igual que los datos para la secuencia que se detallan después, mostraron que había dos genes codificantes para la proteína Lip2a, formados por dos unidades organizadas en tándem. La secuencia del fragmento Sal I de 2,8 Kb del fago L22g que contenía los genes responsables del ADNc L22 se muestra en la SEQ ID NO 1 adjunta. La zona de codificación de los dos genes no mostraron diferencias excepto dos transiciones que no conllevan cambios en la secuencia de aminoácidos de la proteína codificada; al contrario, las zonas 5' y 3' que no son traducidas son completamente diferentes.

50 [0053] Los estudios de hibridación sobre el ARN de *Leishmania* en filtros, que utilizan el inserto del clon L22 como sonda, mostraron que el tamaño de las transcripciones de los genes Lip2a era 0,6 Kb (véase figura 2-A). Estos ARN mensajeros están polidenilados. Como se muestra en la figura 2 (panel A, carriles 1 y 2), se produjeron cambios en la intensidad de las bandas de hibridación obtenidas, según si el ARN se obtuvo de cultivos de promastigotes creciendo en la fase estacionaria o logarítmica. De esto se deduce que la expresión de los genes de la proteína ácida Lip2a de *Leishmania* es mayor en la fase logarítmica. Este tipo de regulación en la expresión de genes de las proteínas ácidas también ha sido descrito en levaduras (Newton y colaboradores, 1990, Saenz-Robles, 1990). El tratamiento de choque térmico, inducido por la incubación de cultivos de promastigotes en la fase logarítmica durante 2 horas a 42° C también condujo a una reducción en los niveles de las transcripciones de las proteínas ácidas del parásito (panel A, carril 4). Por otro lado, y como se muestra en el carril 2 (panel A), la hibridación obtenida en el carril de amastigotes axénicos fue hasta 6 veces inferior que en el carril de ARN extraído de promastigotes. Los datos parecen indicar que el modo de expresión de los genes Lip2a de *Leishmania* está unido al estado metabólico celular (Soto y colaboradores, 1993).

65 [0054] Según la figura 3, en el panel A (línea 1), la expresión de la proteína Lip2a se muestra en un cultivo bacteriano de *E. coli* transformado con el vector de expresión pMAL-cRI que contiene el gen Lip2a y su purificación (línea 2). El peso molecular de la proteína purificada corresponde a una proteína de fusión MBP-Lip2a. MBP significa

la proteína de unión a maltosa de *E. coli* que se utiliza para formar la proteína de fusión con Lip2a. El panel B muestra el reconocimiento de la proteína Lip2a por una colección de sueros de animales con leishmania infectados de forma natural.

5 [0055] Conforme a la figura 4, se analizó la especificidad de la respuesta humoral generada contra Lip2a mediante la medida de la reactividad de los sueros obtenidos a partir de perros infectados con *Leishmania* frente a las proteínas homólogas de otras especies. En el caso de la proteína ácida Lip2a, se analizó la respuesta de sueros caninos positivos contra otra proteína ácida de *Leishmania*, Lip2b, las proteínas ácidas humanas P1 y P2 y la P2 de *T. cruzi*, expresadas todas como proteínas de fusión después de su clonación en el vector pMAL-cRI. En el panel A de la figura, se muestra el resultado de la incubación de un conjunto de sueros obtenidos a partir de perros infectados con *Leishmania* contra las proteínas ácidas descritas previamente. Solo las proteínas de fusión MBP-Lip2a y MBP-Lip2b (líneas 2 y 3) fueron reconocidas, indicando que los anticuerpos producidos contra las proteínas ácidas durante el proceso de leishmaniasis se dirigen específicamente contra las proteínas ácidas de *Leishmania*. En el panel B de la figura, se muestra que el suero de un paciente con lupus eritematoso sistémico reaccionó a las proteínas expresadas de las tres especies. Este resultado indicó que las proteínas ácidas de *Leishmania* contienen el determinante antigénico contra el que se origina la respuesta humoral durante la enfermedad de Chagas y en procesos humanos autoinmunes, localizado en el extremo carboxilo de la proteína. Sin embargo, la falta de reactividad contra las proteínas ácidas humanas o aquellas de *T. cruzi* en los sueros de perros infectados con *Leishmania* muestra que no hay anticuerpos dirigidos contra el extremo C-terminal de estas proteínas en sueros de animales con leishmaniasis.

[0056] Con el fin de localizar los determinantes antigénicos de Lip2a, se sintetizaron péptidos que solapan 5 aminoácidos de la secuencia de aminoácidos de la proteína Lip2a. La Figura 5 muestra la secuencia de péptidos y los valores de densidad óptica obtenidos cuando estos péptidos se analizan en ensayos de FAST-ELISA frente a sueros de perros infectados. Solo se obtuvieron valores positivos frente al péptido A6. La falta de reactividad obtenida después de probar los sueros de animales infectados con *Leishmania* frente al péptido A-7, que contiene la secuencia C-terminal conservada en proteínas ácidas de eucariotas, confirmó que esta zona no genera ninguna respuesta humoral durante la infección con el parásito.

[0057] Con el fin de ser capaz de analizar el potencial inmunogénico o inmunoestimulante de la Lip2a de *Leishmania*, se clonó el inserto del clon L22 en el vector de expresión eucariota PQE-31. La inducción de cultivos bacterianos transformados con el plasma recombinante pQE-Lip2a produjo la sobreexpresión de una proteína que correspondía a Lip2a expresada en la forma recombinante, denominada rLip2a. La Figura 6 muestra el resultado de la expresión y posterior purificación de la proteína a partir de 500 ml de cultivo, inducido por IPTG, mediante cromatografía de afinidad en columnas de NT-Ni. Las bacterias fueron solubilizadas en 8 M urea y sonicadas. Las proteínas marcadoras de peso molecular (carril M). Las proteínas de *E. coli* sin transformación por el vector de expresión pQE-31 (carril 1). Las proteínas de *E. coli* transformadas con el vector de expresión pQE-31 (carril 2). La proteína se purificó a partir de la fracción soluble (carril 3).

[0058] La proteína expresada en el vector pQE-31 incluye la proteína Lip2a y aquellos aminoácidos que se incluyeron durante el proceso de clonación. La proteína Lip2a está compuesta por 106 aminoácidos y está comprendida entre los aminoácidos 39 y 144 (SEQ ID NO 3) y tiene un peso molecular de 10.57 kDa. (véase SEQ ID NO 3 de ahora en adelante).

[0059] El análisis de la secuencia de aminoácidos deducido de la secuencia ADNc L22 indicó que la proteína Lip2a tiene características comunes con proteínas ribosómicas ácidas del grupo P2 de eucariotas. La comparación de la proteína Lip2a de *Leishmania* deducida de la secuencia de nucleótidos muestra una identidad de 89.62% con su homóloga de *Leishmania donovani* (RLA2 LEIDO), una identidad de 81.13% con su homóloga de *Leishmania brasiliensis* (RLA2 LEIBRE), de 61.46% con su homóloga de *Trypanosoma cruzi* (RLA2 TRiCR), de 43.47% con su homóloga de seres humanos (RLA2 humano) y 51.87% con Lip2b de *Leishmania infantum* (RLA2 LEiIN). La mayor homología se muestra en el amino y el carboxilo terminales. La proteína tiene una zona central muy flexible rica en prolina y anilinas. En la figura de secuencia (véase más adelante) se muestran con una barra vertical los aminoácidos que son idénticos en las cuatro proteínas Lip2a, Lip2b de *Leishmania*, la TcP2 homóloga de *Trypanosoma cruzi* (RLA2 TRiCR) y la HuP2 homóloga humana (RLA2 HUMAN).

[0060] Un total de 12 ratones BALB/C fueron inoculados con 5 microgramos de la proteína rLip2a soluble en una tampón salino. La vía de inoculación fue intraperitoneal, y la pauta de inmunización fue de dos dosis separadas entre sí por tres semanas (21 días). Se sacó sangre a los ratones los días 0, 7 y 28 y se analizaron los respectivos sueros. La Figura 7 (panel A) muestra los títulos de las inmunoglobulinas G y M presente en el suero de ratones en los días 7 y 28, lo que indica que después de la primera dosis la respuesta fue principalmente IgM, con una maduración hacia IgG después de la segunda inoculación. Dado que las citocinas relacionadas con una respuesta de tipo Th1 producen una respuesta principalmente IgG2a y las citocinas secretadas por la sobrepopulación de linfocitos ayudantes Th estimulan una respuesta IgG1, se analizaron los títulos de los subtipos más abundantes de IgG generados después de las dos dosis de antígenos. La Figura 7B muestra que el isotipo de IgG más abundante en ratones inmunizados con la proteína rLip2a correspondía a la inmunoglobulina IgG2 tras la primera dosis y que la Th2 aumenta después de la segunda dosis. Se concluye que la inmunización de este antígeno genera una

respuesta de tipo mixta Th1/Th2, aunque la respuesta es principalmente Th1 en las primeras semanas de inmunización. Las proteínas usadas en este estudio fueron purificadas de endotoxinas mediante columnas de polimixina.

5 [0061] Teniendo en cuenta la naturaleza conservada de esta proteína, se necesitaba un estudio sobre la especificidad de la respuesta humoral generada tras la inmunización. Con este objetivo, se analizó el reconocimiento de los sueros de ratones inmunizados (sueros obtenidos el día 28) frente a los péptidos sintéticos. La figura 8-A ilustra los resultados obtenidos, mostrando el reconocimiento de los sueros de ratones inmunizados hacia tres de los péptidos, A4-A6. La región de proteína contenida en dichos péptidos es específica para las proteínas ácidas de las trypanosmatidas, sin haberse detectado reactividad contra el péptido A7, que contiene el carboxilo terminal conservado de la proteína. Esta especificidad de respuesta fue confirmada cuando se llevó a cabo el análisis "Western Blot" para analizar la reactividad de los sueros contra las proteínas ácidas de Leishmania, MBP-Lip2a y MBP-Lip2b, MBP-P2 humana y MBP-P" de T. cruzi. Solo se obtuvo reconocimiento hacia las proteínas ácidas de parásitos, siendo la reactividad más elevada cuando se genera contra MBP-Lipsa (panel B, línea 2) y en ningún caso se generaron anticuerpos contra las proteínas ácidas de eucariotas superiores (conservadas con la P2 humana usada en el ensayo). Finalmente, se puede señalar que uno de los péptidos reconocidos coincidió con el péptido reconocido por el suero de los perros afectados por leishmaniasis viscerocutánea.

20 [0062] Se extrajeron los bazos de los ratones que habían sido inmunizados dos semanas después de la última inmunización y se analizó su proliferación contra las diversas concentraciones de antígenos. Los resultados tabulados en la figura 9-A muestran los valores (en cpm) de timidina tritiada incorporados en los esplenocitos de ratones inmunizados después de 96 horas. Los valores obtenidos mostraron que había una relación directa entre la concentración de antígeno y la proliferación celular. Sorprendentemente, se obtuvieron los mismos resultados cuando se analizó la proliferación de esplenocitos obtenidos de ratones no inmunizados. Este resultado indica que la proteína Lip2a posee características inmunogénicas muy potentes.

30 [0063] con el fin de implicar directamente a la proteína de proliferación, eliminando la posibilidad de que contaminantes bacterianos pudieran estar provocando dicho fenómeno, se analizó el efecto de la presencia de un anticuerpo anti-Lip2a generado en un conejo. Los paneles B y C de la figura 9 muestran el efecto sobre la proliferación de diferentes diluciones del anticuerpo. Así, mientras que la dilución 1/100 provocó una reducción en la proliferación inducida por un mitógeno (Concanavalin A, -ConA) y por el antígeno, aunque era siempre mayor en este último caso, diluciones más altas (1/500 y 1/1000) solo condujeron a una reducción en la proliferación inducida por el antígeno.

35 [0064] Para caracterizar el tipo de respuesta generada, se analizaron las linfoquinas gamma INF e IL-4 producidas en los ensayos de proliferación, tanto de los esplenocitos de ratones control como de ratones inmunizados. En la tabla indicada a continuación se muestran los resultados obtenidos. Estos indican que la proliferación provocada por el antígeno genera un aumento significativo en la secreción de gamma INF, especialmente en los esplenocitos de ratones inmunizados. De forma similar, se detectó un ligero aumento en los niveles de IL-4 en los cultivos de esplenocitos que proliferaron en presencia del antígeno con respecto a aquellos que proliferaron en el medio sin estímulos añadidos. Estos resultados indican que la respuesta generada por el antígeno provoca una proliferación celular que conlleva la producción de un patrón de linfoquinas donde predomina el tipo Th1. Estos resultados sugieren que la proteína Lip2a puede ser usada como un adyuvante o como una subunidad en una vacuna y por tanto puede ser relevante para el tratamiento y/o prevención de enfermedades presente en animales y seres humanos.

		IL-4 (pg/ml)	gamma INF (ng/ml)
Inmunizados	ConA	99	8.4
	Lip2a	80	5.8
	Promedio	40	0.5
Controles	ConA	98	6.1
	Lip2a	61	1.2
	Promedio	13	0.4

50 [0065] Se administraron tres dosis de 5 microgramos de Lip2a en PBS en intervalos de 15 días a un grupo de cuatro ratones BALB/C (5 microgramos por ratón). Una semana después de la última dosis, fueron infectados con 5×10^4 promastigotos de una cepa infecciosa de L. major en la almohadilla plantar de la pata derecha tanto de ratones inmunizados como de aquellos controles (que únicamente recibieron PBS). El tamaño de la lesión en la pata se medía semanalmente, obteniéndose los resultados que se muestran en la Figura 10. Los resultados obtenidos indicaron que la inmunización de la proteína Lip2a provocaba un retraso en la aparición de lesiones de dos semanas, sin aumentar el tamaño de la lesión hasta la semana 5 en los ratones inmunizados, mientras que en los controles no inmunizados, las lesiones aparecían a partir de la tercera semana. Además, la inflamación provocada por la infección en ratones inmunizados es menor que en los controles, hasta igualarse a partir de la semana 8.

SEQ ID NO:1 del fragmento Sal 1 - Sal 1 L22g. La secuencia nucleotídica de los clones de ADNc L22 y L31 se

ES 2 546 301 T3

muestra en negrita.

SEQ ID NO 1

1 70
 gtcgacggcg acatggctag agcagtttgt gcagctcccc ctgagcgaca agaaacacga tctgcccgct

71 140
 cgccacggag gtgtttctcc atgcctttgt ccagtgcac c aatgagtcgc ggatctttgt cgcaccacca

141 210
 gcaaaagagg agcagtgcc actcgcggcc ttaggaacgg caatgcgacc ttttgacag taccocgagg

211 280
 agacgatgc ccaggcaaat gcgtttctgc atcaaggagg gcttcgcac gtcccgttcg cagctgaggc

281 350
 ggtggagcag caggttatga atctccagcg gctgcattaa tcgccgctg ccagacaccg gggaggctct

351 420
 ctgtttctgt ttttgcggtg tgcgtctttc tctttatggt tgctccttg tgtctgtcgg ttaagagctc

421 490
 ctcccttgcc cagaaaacag gagtaaccga gtacgcgcga gcgctgcgc cacacgttgt ccatggaacc

491 560
 cctcccctcc tcgctcctcc cttctccact cctccttct gggtgctgca tgtgtgtgtg catgtgtgtg

561 630
 taactttgcc tcgggtgtggc tggcacgctg cgcctcctcc ccccccccc ccaaaaaaaaa aaacagcat

631 700
 catcagtggg ctgacctgga tacatctct cctctccttg tgttccccat cccctcttcg ctcttctct

701 770
 atgcacctcg cccactgcgc gcatcacgca cgcacatcg cggctacgga acacgcgacc cccacccac

771 840
 ataggttttt tcaacgagaa atgcagtacc ttgcccgcta cgcctcctg gcgctgtctg gcaagacgcc

841 910
 gtcgaaggcg gacgttcagg ctgtctgaa ggccgcccgc gttgccgtgg atgctcccc cgtggatgcc

911 980
 gtcttccagg aggtggaggg caagagcttc gatgcgctgg tggccgaggg ccgcacgaag ctgggtggct

981 1050
 ctggctctgc cgcctcctgt ggcgctgtct ccaactgctg tgcccgcgct ggcgcggtgg ccgaggcgaa

1051 1120
 gaaggaggag cccgaggagg aggaggccga tgatgacatg ggcttcggtc tctttgacta agcagccccg

1121 1190
 cactgcgctg caggegcctc tgccgaagat tctcacgcgg gcctgctctc attgttgtga tgcacgttt

ES 2 546 301 T3

1191 1260
 ctttctttgc ttgtgacttc ggttegtctt ttgatttcga gtggaaagac tctgcaaadc gaacaaccgc
L22]

1261 1330
 tgcgagatga gctgggagcg taggcgaggt ggctgctcgc gaggtctgtaa cgaaaaaaaa aagacagcag

1331 1400
 cggcgccttc ggcacaaaca cagcgagccc tcccctcccc cgcttcgtcc ctctcgcaga agagagagac

1401 1470
 aaagaatctc cacagacgct gtacgagagg caccggcctc gtcctcgcaga gaagcaaccg cgctttcgtg

1471 1540
 ccgtgaccgc ctgaccttcg ataaccgaga gaggggtgtct tctctttctca aagtgggttc attgcgaagt

1541 1610
 gctgctctac tgtccctcct gctogtcttc ccccagttct cgtttcgtct cttttttggt cgttccatgc

1611 1680
 actttctctc atactgtttt tgctctttgt cgtacaagag gtgtatcaaa catgcagtac ctgcgccgct

1681 1750
 acgccctcgt ggcgctgtct ggcaagacgc cgtcgaaggc ggacgttcag gctgtcctga aggcgcgccg

1751 1820
 cgttgcccgtg gatgcctccc gcgtggatgc cgtcttcag gaggtggagg gcaagagctt cgatgcgctg
L31]

1821 1890
 gtggccgagg gtcgcacgaa gctgggtgggc tctggctctg ccgctcctgc tggcgcctgc tocactgctg

1891 1960
 gtgccggcgc tggcgcggtg gccgaggcga agaaggagga gcccgaggag gaggaggccg atgatgacat

1961 2030
 gggcttcggt ctctttgact aagcagcctc cgtgagtggt ctactgtcgt tactttttga cttgtttcat

2031 2100
 ttgacttggt ttcttccgct aagcaaagaa cagagtaagc aagcatccat gcacgtcga gcgatgctac
L31]

2101 2170
 gaaccggctc cctgctgcc catatcccct cagcgaaggc gacctcct ctttccacg tgctgacctc

2171 2240
 atctcctcca atctttcacc ttctctctg tctctctctc tgggttcct cttgaccgat cctgcacga

2241 2310
 ccatgaccag gtaattgcta tggctcttca agagaatagg gactcctaca aggtcaaagc tttttccttg

2311 2380
 tccgagtttg tgcggcagtg ttccgactgc caccagctgt gctcgcgaaa gacggcccgc gttgtggaaa

2381 2450
 acagcagtcg tgccccgcgg ggatgggaag cctattcaa ctccgttgcg gaggagcggc ggtctgagga

ES 2 546 301 T3

2451 2520
 cttggacctc tgcgagtcgc gatgccggta catgcaggcc acctgcccgt cacaggagaa ggtccagcag

2521 2590
 tacgagcagg ctctcgccgc cgcgttactc aagccgaaaa agagcacgcc cccaaacccg tctgtcttgc

2591 2660
 aagacgcttc ccggtgcggc acgcggtcga ggttttctcg aacgtcctgt tgcccgtggc gcacaaaccc

2661 2730
 agaaggtatc cttccaacc aaagacctga aacgggagggc acaccgacgc cggteccacg ccggacggcc

2731 2800
 gacggagggc accgaaggtg ctcgagggga ccaagacatg gacaacgata tttcgcgccg ctggagcaag

2801 2850
 çttcgccaag agcgcttcgg ctcaaaggca gagcacgttg ctccgtcgac

SEQ ID NO:2. Secuencia de nucleótidos del gen Lip2a que codifica la proteína Lip2a y la secuencia de aminoácidos de la proteína Lip2a.

5

SEQ.ID. NO.2

1	ATG CAG TAC CTT GCC GCG TAC GCC CTC GTG GCG CTG TCT GGC AAG ACG CCG TCG AAG GCG	60
	Met Gln Tyr Leu Ala Ala Tyr Ala Leu Val Ala Leu Ser Gly Lys Thr Pro Ser Lys Ala	
	5 10 15 20	
61	GAC GTT CAG GCT GTC CTG AAG GCC GCC GGC GTT GCC GTG GAT GCC TCC CGC GTG GAT GCC	120
	Asp Val Gln Ala Val Lys Lys Ala Ala Gly Val Ala Val Asp Ala Ser Arg Val Asp Ala	
	25 30 35 40	
121	GTC TTC CAG GAG GTG GAG GGC AAG AGC TTC GAT GCG CTG GTG GCC GAG GGC CGC ACG AAG	180
	Val Phe Gln Glu Val Glu Gly Lys Ser Phe Asp Ala Leu Val Ala Glu Gly Arg Thr Lys	
	45 50 55 60	
181	CTG GTG GGC TCT GGC TCT GCC GCT CCT GCT GGC GCT GTC TCC ACT GCT GGT GCC GGC GCT	240
	Leu Val Gly Ser Gly Ser Ala Ala Pro Ala Gly Ala Val Ser Thr Ala Gly Ala Gly Ala	
	65 70 75 80	
241	GGC GCG GTG GCC GAG GCG AAG AAG GAG GAG CCC GAG GAG GAG GAG GCC GAT GAT GAC ATG	300
	Gly Ala Val Ala Glu Ala Lys Lys Glu Glu Pro Glu Glu Glu Glu Ala Asp Asp Asp Met	
	85 90 95 100	
301	GGC TTC GGT CTC TTT GAC TAA	321
	Gly Phe Gly Leu Phe Asp *	
	106	

SEQ ID N° 3

```

1                                     50
MRGSHHHHHH TDPHASSVPS SLVIEGRISE FAAAFQREMQ YLAAYALVAL

51                                     100
SGKTPSKADV QAVLKAAGVA VDASRVDAVF QEVEGKSFDA LVAEGRTKLV

101                                     144
GSGSAAPAGA VSTAGAGAGA VAEAKKEEPE EEEADDDMGF GLFD
    
```

Secuencia de aminoácidos de la proteína Lip2a (SEQ ID NO 2) expresada en el vector PQE-31 (SEC. ID. NO. 3)

```

Lip2a      MQYLAAYALVALSGKT.PSKADVQAVLKAAGVAVDASRVDAVFQEVEGK 48
           | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
Lip2b      MSTKYLAAYALASLSKAS.PSQADVEAICKAVHIDVDQATLAFVMESVTGR 50
           | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
HuP2       MRYVASYLLAALGGNSSPSAKDIKKILDSVGI EADDDRLNKVISELNGK 49
           | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
TcP2       MKYLAAYALVGLSGGT.PSKSAVEAVLKAAGVPVDPRSDALFAEFAGK 48

Lip2a      SFDALVAEGRTKL....VSGSAAPAGAVSTAGAGAGAVAEAKK....E 89
           | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
Lip2b      DVATLIAEGAAKMSAMPAASSGAAAGVTASAAGDAAPAAAAAKK....D 95
           | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
HuP2       NIEDVIAQGIGKLASVPAGGAVAVSAAPGSAAPAAGSAPAAAEKKDEK 98
           | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
TcP2       DFDTVCTEGKSKLVGGVTRPNAATASAPTA AAAASSGAAAPAAA..... 92

Lip2a      EPEEEEEADDDMGFGLFD 106
           | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
Lip2b      EP.EEEADDDMGFGLFD 111
           | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
HuP2       KEESEESDDDMGFGLFD 115
           | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
TcP2       ..AEEEEDDDMGFGLFD 107
    
```

REVINDICACIONES

- 5 1. Composición para estimular una respuesta inmune en individuos inmunizados o en grupos celulares, **caracterizada porque** que dicha composición consiste en una solución salina que comprende
- 10 - la proteína de Leishmania Lip2a representada por la SEQ ID NO:2 o por un polipéptido que difiere solo por sustituciones conservadas de los aminoácidos de la SEQ ID NO:2 de los cuales los grupos de aminoácidos que representan cambios conservados son (1) ala, pro, gly, glu, asp, gln, asn, ser, thr; (2) cys, ser, tyr, thr; (3) val, ile, leu, met, ala, phe; (4) lys, arg, his; y (5) phe, tyr, trp, his, o
- 15 - un ácido nucleico que codifica la proteína de Leishmania Lip2a como se ha identificado anteriormente, o representado por la SEQ ID NO:1.
- 15 2. Composición según la reivindicación 1, **caracterizada porque** esta comprende además un adyuvante tal como perlas biodegradables, ISS (es decir secuencias de inmunoestimulantes), BCG, o liposomas.
- 20 3. Composición según la reivindicación 1 o 2, **caracterizada porque** comprende además al menos un antígeno.
- 20 4. Método para estimular in vitro una respuesta inmune en células mononucleares inmunizadas o no con la proteína Lip2a representada por la SEQ ID NO:2, **caracterizado porque** comprende la incubación de dichas células mononucleares con la composición según la reivindicación 1.
- 25 5. Método según la reivindicación 4, **caracterizado porque** dicha incubación comprende además al menos un antígeno.
- 25 6. Método según la reivindicación 4 o 5, **caracterizado porque** dichas células mononucleares son células mononucleares periféricas.
- 30 7. Uso de la composición tal y como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, para la producción de un medicamento para estimular una respuesta inmune in vivo frente a un antígeno.
- 35 8. Uso según la reivindicación 7, **caracterizado porque** dicha composición se administra a un individuo en presencia de al menos un antígeno.
- 35 9. Uso de la composición tal y como se define en la reivindicación 1, para la producción de un adyuvante en una vacuna para la prevención de Leishmaniasis.
- 40 10. Uso de la composición tal y como se define en la reivindicación 1, para la producción de una vacuna para la prevención de Leishmaniasis, **caracterizada porque** dicha composición se usa como una subunidad de dicha vacuna.

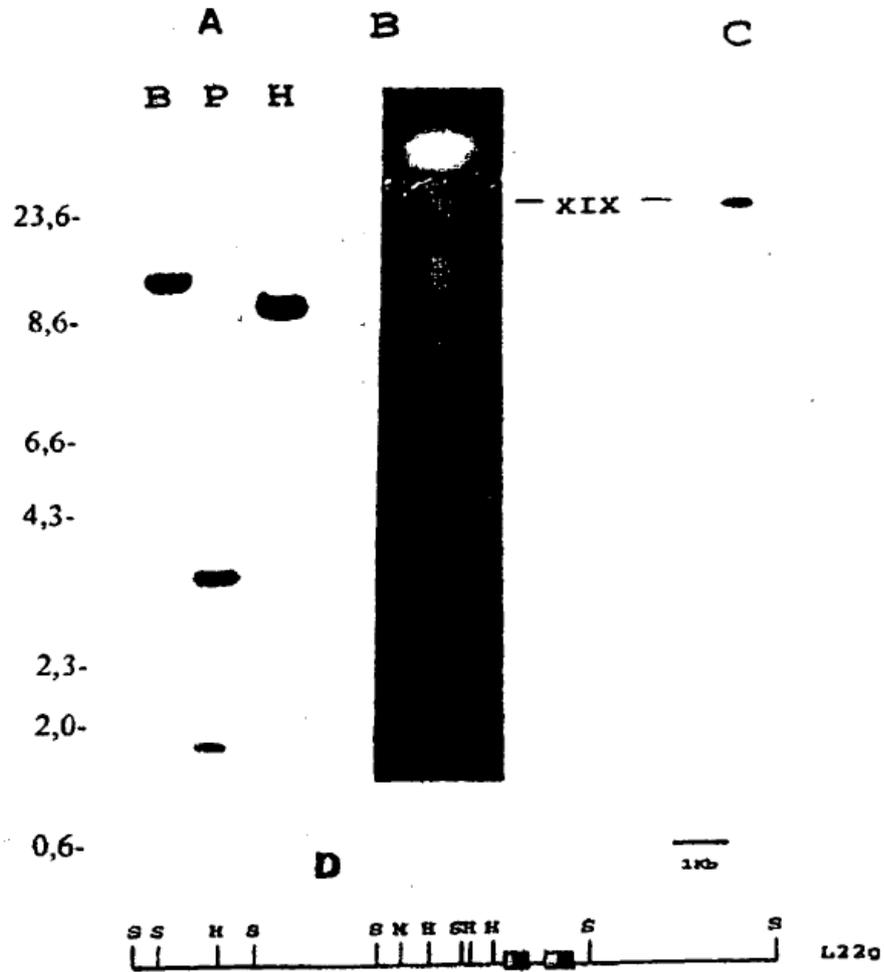
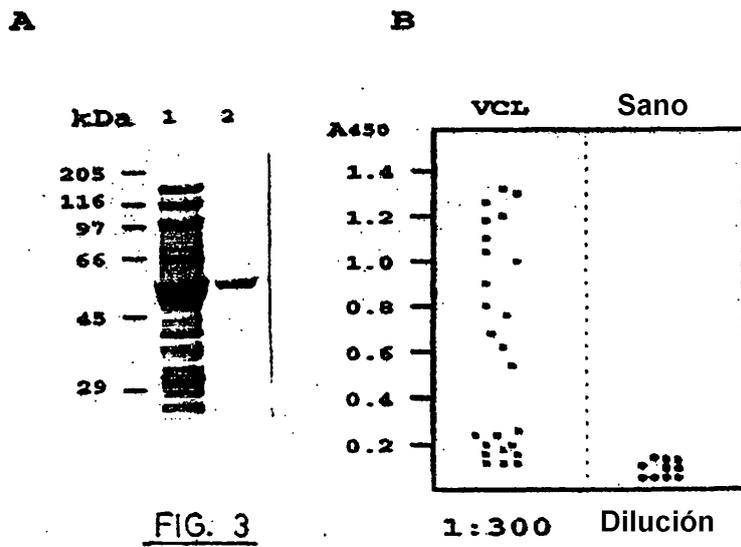
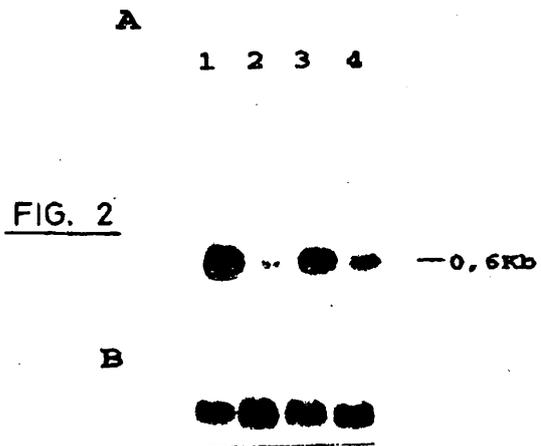


FIG. 1



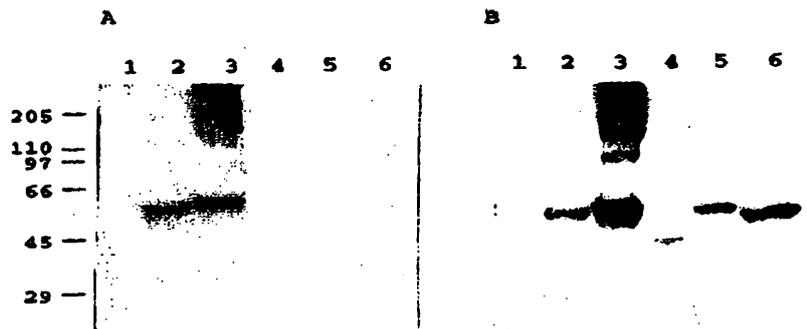


FIG. 4

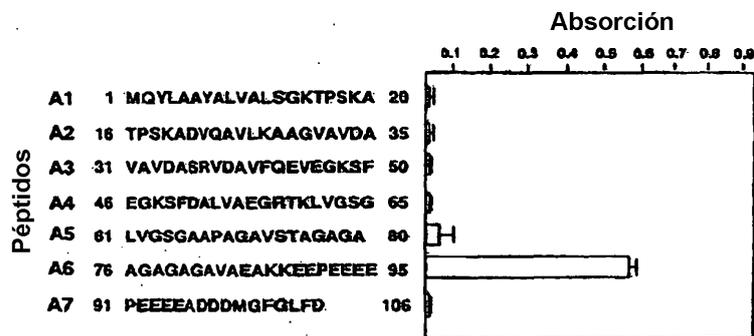


FIG. 5

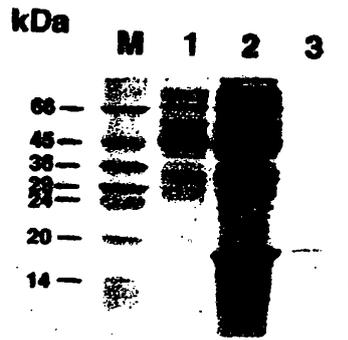


FIG. 6

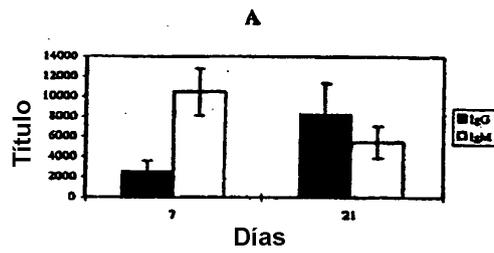
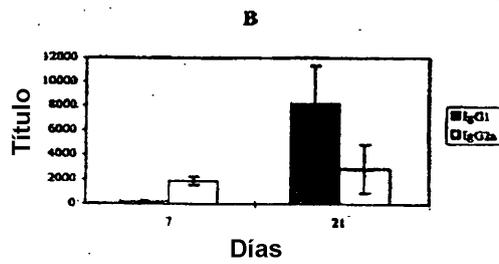


FIG. 7



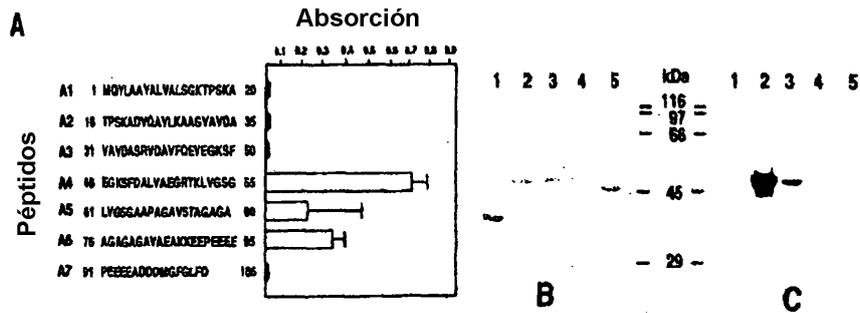


FIG. 8

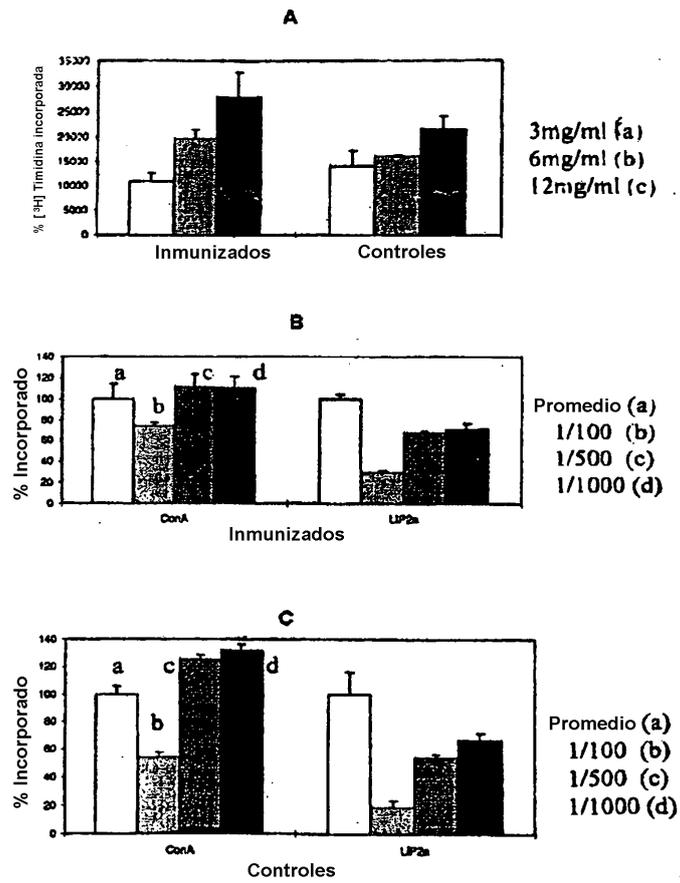


FIG. 9

FIG. 10

