

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 595 207**

51 Int. Cl.:

A61K 39/008 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.05.2010 PCT/FR2010/000356**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.11.2011 WO11138513**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.05.2010 E 10723638 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.07.2016 EP 2566506**

54 Título: **Composición de vacuna para prevenir o tratar la leishmaniosis**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
28.12.2016

73 Titular/es:

**VIRBAC (100.0%)
1ère Avenue - 2065 M - L.I.D.
06516 Carros, FR**

72 Inventor/es:

**RICHIER, ERIC;
LEBREUX, BERNARD y
BLOND, DENIS**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 595 207 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 de vacuna para prevenir o tratar la leishmaniosis

La presente invención se refiere a una composición de vacuna, a base de proteínas de excreción-secreción procedentes de promastigotes y/o amastigotes de *Leishmania* sp., para la prevención o el tratamiento de leishmaniosis en cánidos.

Las leishmaniosis son infecciones parasitarias endémicas causadas por un protozoo flagelado de la familia Trypanosomidae y del género *Leishmania*, transmitido por un flebotomo (para una revisión, véase Chang, *Leishmaniasis*, Encyclopedia of Life Sciences, 2005, John Wiley & Sons, Ltd.; Bates, *Leishmania*, Encyclopedia of Life Sciences, 2006, John Wiley & Sons, Ltd.). Una gran variedad de especies de mamíferos, incluyendo el ser humano y el perro, se infectan con este parásito. Los flebotomos hembra transmiten al hospedador mamífero, en el momento de la picadura, el parásito en su forma flagelada infecciosa, el promastigote metacíclico. Los promastigotes metacíclicos son fagocitados a continuación por los macrófagos presentes en la dermis y se transforman en una forma no flagelada llamada amastigote.

Once especies de *Leishmania*, divididas en dos subgéneros, *Leishmania Leishmania* y *Leishmania Viannia* tienen importancia médica en los seres humanos. Cada especie de *Leishmania* es responsable de una manifestación clínica bien definida: visceral, cutánea, cutánea difusa y mucocutánea, según el parásito infecte fagocitos mononucleares de las vísceras, de la dermis o de las mucosas.

La leishmaniosis es endémica en 88 países (entre ellos India, Bangladesh, Nepal, Sudán y Brasil), poniendo en peligro a 350 millones de personas. La leishmaniosis visceral, causada por *Leishmania (L) donovani* y *Leishmania (L) infantum* (o *L. chagasi*) afecta a 500.000 personas cada año en todo el mundo. Representa la forma más grave de leishmaniosis.

En las zonas afectadas por la leishmaniosis visceral debida a *L. infantum*, sobre todo en la región mediterránea, los perros, fuertemente infectados, representan un reservorio de parásitos para el ser humano.

En los seres humanos, las leishmaniosis se tratan principalmente con derivados de antimonio: antimoniato de meglumina (Glucantime®) y estibogluconato de sodio (*Pentostam*®). Sin embargo, en algunas regiones del mundo, el parásito se ha vuelto resistente al antimonio. Por lo que ahora se emplea la anfotericina B (*AmBisome*®) para el tratamiento de la leishmaniosis visceral o mucocutánea.

Sin embargo, actualmente no existe ninguna vacuna o medicamento profiláctico para prevenir las leishmaniosis en el ser humano. De hecho, la puesta a punto de una composición de vacuna sigue siendo problemática en la actualidad.

Se han propuesto varias composiciones de vacuna para proteger al ser humano y/o los perros de la leishmaniosis:

- una composición de vacuna a base de una fracción de membrana antigénica de *Leishmania donovani* (denominada antígeno FML, «fucose mannose ligand») y un adyuvante tal como el alumbre (adyuvante a base de aluminio), FIA (adyuvante incompleto Freund), BCG (Bacillus Calmette Guerin), interleucina 12, mezclas de saponinas tales como saponina Riedel-de Haën R (Sigma-Aldrich) o Quil A (Brenntag) y la saponina purificada QS21 (para una revisión, véase: Palatnik-de-Sousa et al., Expert. Rev. Vaccines, 2008. 7:833-851). La fracción de membrana antigénica FML comprende una glicoproteína GP36 glicosilada, así como varias proteínas que no se han caracterizado todas.

- una composición de vacuna a base de proteínas de excreción-secreción procedentes de promastigotes y/o amastigotes de *Leishmania* sp. (ESPs) y de MDP (muramil dipéptido) como adyuvante que induce una respuesta inmune de tipo Th1 (Bourdoiseau et al., Vet. Immunol. Immunopathol., 2009, 128:71-78; Lemesre et al., Vaccine, 2007, 25:4223-4234; Lemesre et al., Vaccine, 2005, 23:2825-2840; documentos de solicitudes internacionales n° WO 94/26899 y WO 2002/100430;

- una composición de vacuna que comprende dos péptidos (A16E y A16G) procedentes de *Leishmania* y/o derivados de los mismos y un adyuvante tal como MDP (documento de solicitud internacional WO 03/025012) o QS21. Esta composición, sin embargo, tiene la desventaja de inducir inmunidad dirigida contra un número limitado de antígenos;

- una composición de vacuna a base de promastigotes de *Leishmania braziliensis* inactivados mediante ultrasonidos y la mezcla de saponinas de Riedel-de Haën R como adyuvante (Giunchetti et al., Vaccine, 2007, 25:7674-7686 y Giunchetti et al., Vaccine, 2008, 26:623-638; documento de solicitud de patente brasileña PI 0601225-6). Esta composición presenta sin embargo el inconveniente de que contiene una mezcla de antígenos no caracterizados que podrían plantear problemas de inocuidad y que algunos pueden inducir respuestas inmunes de tipo Th1 y otras de tipo Th2;

- una composición de vacuna que comprende la proteína A2 recombinante que proviene de la forma amastigote de *Leishmania donovani* y un adyuvante tal como la mezcla de saponinas de Riedel-de Haën R (Fernandes et al., Vaccine, 2008, 26:5888-5895, documento de solicitud internacional WO 2008/009088).

En el perro, existen en la actualidad dos vacunas comercializadas en Brasil: una composición de vacuna denominada Leishmune[®], constituida por el antígeno FML, la mezcla de saponinas de Riedel-de Haen R y NaCl (documento de solicitud internacional n° WO 2006/122382; Palatnik de Sousa et al., 2008, antes citado), y una composición de vacuna denominada LeishTec[®], constituida por el antígeno A2 y una mezcla de saponinas.

5 Está claro a partir de numerosos estudios sobre la respuesta inmune de los hospedadores (especialmente en el perro) durante la infección con *Leishmania*, que la eficacia de un candidato potencial de vacuna se debe traducir en la activación en el hospedador de una respuesta inmune de tipo Th1 con producción de interferón gamma (Barbieri, Parasite Immunol., 2006, 28:329-337, revisión; Alvar et al., Adv. Parasitol., 2004, 57:1-88; Ravindran et Ali, Curr. Mol. Med., 2004, 4:697-709 y Gradoni, Vet. Parasitol., 2001, 100:87-103). Muchos adyuvantes, tales como la
10 saponina purificada QS21, son capaces de estimular una respuesta inmune de tipo Th1.

Las saponinas de tipo Quillaja son una mezcla de glicósidos de triterpenos extraídos de la corteza del árbol Quillaja saponaria. Estos son productos naturales que se caracterizan por una serie de propiedades comunes, incluyendo la capacidad de producir espuma en solución acuosa. Otras características complementarias son la actividad hemolítica, la toxicidad para los peces, la formación de complejos con el colesterol y, en algunos casos, una
15 actividad antibiótica. (Kofier, Die Saponine (Springer verlag), Berlin, 1927; Tschesche et al., Chemie und Biologie der Saponine. Fortscher. 30 Chem. Org. Naturst. XXX'Abl (1972)).

Las mezclas de saponinas de Quillaja disponibles en el mercado son mezclas en bruto que, debido a su variabilidad y a su falta de caracterización completa, no son deseables para un uso en la práctica veterinaria o en composiciones farmacéuticas para el hombre. Las impurezas presentes en los productos disponibles en el mercado pueden causar
20 reacciones adversas. Además, el contenido en sustancia activa de un lote a otro de mezclas de saponinas puede variar, disminuyendo de ese modo la reproducibilidad.

Se han identificado adyuvantes de saponina y se han purificado por cromatografía líquida de alta presión (HPLC). El método de producción de estas fracciones purificadas se describe en el documento de patente US 5.057.540.

Entre ellas, la saponina QA21 (o QA-21) sustancialmente pura, se caracteriza por las siguientes propiedades:

- 25 - actividad adyuvante inmune,
- contiene aproximadamente 22% de hidratos de carbono (analizado por antrona) en peso seco,
- tiene un máximo de absorción UV a 205-210 nm,
- tiene un tiempo de retención de aproximadamente 51 minutos por RP-HPLC en una columna Vydac C₄ que tiene partículas de 5 µm, poros de 330 Å, un diámetro interno de 4,6 mm y una longitud de 25 cm en un disolvente de
30 ácido acético 40 mM en metanol:agua (58:42; v:v) con un caudal de 1 ml por minuto,
- se eluye con metanol al 69-70% de una columna Vydac C₄ que tiene partículas de 5 µm, poros de 330 Å, un diámetro interno de 10 mm y una longitud de 25 cm en un disolvente de ácido acético 40 mM con un gradiente de elución de 50 a 80% de metanol,
- 35 - tiene una concentración micelar crítica de 0,03% (p:v) en agua y de 0,02% (p:v) en solución salina tamponada con fosfato,
- causa hemólisis de los glóbulos rojos de oveja a concentraciones de 25 µg por ml o superiores, y
- contiene los monosacáridos ramnosa terminal, arabinosa terminal, apiosa terminal, xilosa terminal, 4-ramnosa, glucosa terminal, galactosa terminal, 2-fucosa, 3-xilosa, 3,4-ramnosa y ácido 2,3-glucurónico.

40 La expresión "sustancialmente puro" significa sustancialmente exento de compuestos asociados normalmente a la saponina en su estado natural y que provocan una respuesta cromatográfica, perfiles de elución y una actividad biológica constantes y reproducibles.

La saponina QA21 sustancialmente pura, descrita anteriormente también se denomina QS21 (o QS-21) (para una revisión, véase, Kensil et al., Pharm. Biotechnol., 1995, 6:525-541; Kensil y Kammer, Expert Opin. Investig. Drugs., 1998, 7:1475-1482 y Soltysik et al., Vaccine, 1995, 13:1403-10). QS21 es una molécula anfipática (soluble en agua),
45 que tiene una masa molar de 1988 g/mol. Su fórmula desarrollada se muestra en la Figura 1. Un procedimiento para la obtención de QS21 se describe en el documento de patente US 5.057.540. Sin embargo, QS21 también se puede purificar a partir de mezclas de saponinas tales como saponina de Riedel-de Haen R o Quil A. Se ha evaluado la eficacia de QS21 en inmunología humana y veterinaria, en su forma pura, para el tratamiento de cánceres, SIDA o la malaria o la leucemia felina (vacuna Leucogen[®] - Virbac). En las mezclas de saponinas de Riedel-de Haen R y Quil
50 A, QS21 representaría la fracción de saponina mayoritaria, respectivamente, en torno al 18% y 40-50% (Palatnik-de-Sousa et al., 2008, citado anteriormente y Parra et al., Vaccine, 2007, 25:2180-2186). La proporción en QS21 en las mezclas de saponinas de Riedel-de Haen R y Quil A varía, sin embargo, en función de las publicaciones: por ejemplo, en la mezcla Quil A, de acuerdo con Kensil et al. (J. Immunol., 1991, 146:431-437), QS21 no representa la fracción de saponina mayoritaria mientras que según otras publicaciones de los mismos autores, representaría el

- 40% (Parra et al., 2007, citado anteriormente) o el 49% (Santos et al., 2002, Vaccine, 21, 30-43) de la mezcla. Esta variabilidad en cantidad de QS21 puede enfatizar una baja reproducibilidad de la producción de estas mezclas de saponinas. QS21 induce una buena respuesta inmune de tipo Th1, pero tiene sin embargo varios efectos secundarios, entre los que se pueden citar: edemas a nivel del sitio de inyección debido a una fuerte respuesta inflamatoria local, dolor local, anorexia, apatía, vómitos y diarrea. Por tanto estos efectos secundarios limitan su uso. Una solución propuesta para remediar estos inconvenientes consiste en asociar QS21 con compuestos que reducen sus efectos secundarios, tales como, por ejemplo, un esteroide (documento de solicitud Internacional WO 96/33739).
- Los inventores tienen como objeto proporcionar una nueva composición de vacuna para la prevención o el tratamiento de la leishmaniosis que proteja de forma duradera a los mamíferos contra estas enfermedades, que responda mejor a las necesidades de la puesta en práctica que las composiciones de vacuna previamente propuestas y que no cause apenas o ningún efecto secundario.
- La presente invención tiene como objeto en consecuencia una composición de vacuna para la prevención o el tratamiento de la leishmaniosis, tal como se define en las reivindicaciones.
- Se entiende por «prevención de la leishmaniosis», la inducción de una protección o de una respuesta inmune contra las infecciones por *Leishmania*.
- Se entiende por «tratamiento de la leishmaniosis», la disminución de los síntomas de la leishmaniosis o la disminución o la supresión de las *Leishmania* en el mamífero infectado.
- Dichas proteínas de excreción-secreción (ESPs) son susceptibles de ser obtenidas poniendo en práctica los procedimientos descritos en los documentos de solicitudes internacionales WO 94/26899 y WO 2002/100430.
- De acuerdo con una realización preferida de la presente invención, dichas proteínas de excreción-secreción proceden de promastigotes y/o amastigotes, preferentemente solamente promastigotes, de *Leishmania (L) infantum*.
- La cantidad de saponina QA21 sustancialmente pura en dicha composición de vacuna es de 60 µg/dosis de vacuna.
- Se entiende por "dosis de vacuna", el volumen de la composición de vacuna de acuerdo con la presente invención administrado a un mamífero. La dosis de la vacuna varía dependiendo del tamaño del mamífero al que se administra la composición de vacuna. Esta dosis es generalmente de 0,1 a 5 mL. Preferiblemente, la dosis de vacuna es de 1 mL.
- Sorprendentemente, los inventores han mostrado que una dosis de QA21 de 60 µg por dosis de vacuna tenía la mejor relación eficacia/inocuidad para los perros tratados. De hecho, las reacciones (efectos secundarios) generales de los animales vacunados con esta dosis eran inexistentes y las reacciones locales débiles. Además, a esta dosis, se conservaba la respuesta humoral (cinética y título) en comparación con las dosis más elevadas. Además, no es necesario asociar QA21 a compuestos tales como esteroides como se recomienda en la técnica anterior, para reducir sus efectos secundarios, o utilizarlos en mezclas de saponinas tales como saponina de Riedel de Haen R o Quil A, por lo que la fabricación de una composición de vacuna es más simple y contiene un adyuvante caracterizado, definido y reproducible, por lo que se puede controlar mejor, e induce una relación actividad/inocuidad constante en el tiempo.
- De acuerdo con una realización ventajosa de la invención, la cantidad de ESPs en dicha composición de vacuna es de 80 a 140 µg por dosis de vacuna, especialmente de 90 a 130 µg por dosis de vacuna y más preferiblemente de 110 µg por dosis de vacuna.
- De acuerdo con otra realización de la invención, la saponina QA21 sustancialmente pura es el único adyuvante saponina de la composición.
- De acuerdo con una realización aún más ventajosa, la saponina QA21 sustancialmente pura es el único adyuvante de la composición. (Ningún otro elemento de la composición puede potenciar los antígenos).
- El excipiente farmacéuticamente aceptable puede ser cualquier excipiente conocido por el experto en la materia. Preferiblemente, comprende o consiste en uno o varios de los compuestos seleccionados entre el grupo que consiste en cloruro de sodio (NaCl), agentes de liofilización tales como manitol y sacarosa, tampones tales como Tris (trihidroximetilaminometano), conservantes o estabilizantes.
- De acuerdo con la invención, la composición de vacuna está destinada a la prevención o al tratamiento de la leishmaniosis en un mamífero de la especie *Canis lupus* (el perro).
- De acuerdo con otra realización ventajosa de la invención, dicha composición de vacuna está destinada a la prevención o al tratamiento de la leishmaniosis visceral, especialmente la causada por *Leishmania (L) infantum*, *Leishmania (L) chagasi* y *Leishmania (L) donovani*.
- De acuerdo con esta realización, dicha composición de vacuna puede estar en forma liofilizada.

La presente invención también tiene por objeto un método para preparar una composición de vacuna para la prevención o el tratamiento de la leishmaniosis en un mamífero, tal como se define en las reivindicaciones.

De acuerdo con el procedimiento de la invención, la cantidad de saponina QA21 sustancialmente pura en dicha composición es de 60 µg/dosis de vacuna, y la cantidad de ESPs es de 80 hasta 140 µg/dosis de vacuna, más preferiblemente aún de 90 a 130 µg/dosis de vacuna y lo más preferiblemente de 110 µg/dosis de vacuna.

También se describe un kit que comprende al menos una dosis inyectable de una composición de vacuna de acuerdo con la presente invención.

También se describe un método para tratar o prevenir la leishmaniosis en un mamífero, que comprende administrar a dicho mamífero una composición de vacuna tal y como se ha definido anteriormente. Preferiblemente, la administración de la composición de vacuna se efectúa mediante inyección subcutánea.

Además de las disposiciones anteriores, la invención comprende también otras disposiciones que surgirán de la siguiente descripción que se refiere a ejemplos de aplicación de la composición de vacuna objeto de la presente invención, así como a los dibujos que se acompañan, en los cuales:

- La Figura 1 muestra la fórmula desarrollada de QS21;

- La Figura 2 es un gráfico que muestra los títulos medios (en log10) de IgG1 anti-ESPs en función del tiempo para cada grupo de perros vacunados con 110 µg/dosis de proteínas de excreción-secreción procedentes de promastigotes de *L. infantum* (ESPs) y como adyuvante un cantidad de QA21 respectivamente de 500 µg/dosis, (composición de vacuna LSH303), 250 µg/dosis (composición de vacuna LSH304), 125 µg/dosis (composición de vacuna LSH305) y 60 µg/dosis (composición de vacuna LSH306);

- La Figura 3 es un gráfico que representa los títulos medios (en log10) de IgG2 anti-ESPs en función del tiempo para cada grupo de perros vacunados con la composición de vacuna LSH303, LSH304, LSH305 o LSH306;

- La Figura 4 es un gráfico que representa los títulos (en log10) de IgG1 anti-ESPs en función del tiempo en los dos perros vacunados con la composición de vacuna LSH304 (Figura 4A) y en los dos perros vacunados con la composición de vacuna LSH306 (Figura 4B);

- La Figura 5 es un gráfico que representa los títulos (en log10) de IgG2 anti-ESPs en función del tiempo en los dos perros vacunados con la composición de vacuna LSH304 (Figura 5A) y en los dos perros vacunados con la composición de vacuna LSH306 (Figura 5B);

- La Figura 6 es un gráfico que representa, en función del tiempo, la actividad leishmanicida (porcentaje de amastigotes de *L. infantum* destruidos) de macrófagos de los dos perros vacunados con la composición de vacuna LSH304 (Figura 6A) y los dos perros vacunados con la composición de vacuna LSH306 (Figura 6B);

- La Figura 7 es un gráfico que representa la producción de NO (nmol/10⁵ células/72 h) en función del tiempo en los dos perros vacunados con la composición de vacuna LSH304 (Figura 7A) y en los dos perros vacunados con la composición de vacuna LSH306 (Figura 7B);

- La Figura 8 es un gráfico que representa la cantidad (en porcentaje) de la enzima NO-sintasa inducible en el material sobrenadante de cocultivos de macrófagos y linfocitos autólogos procedentes de los dos perros vacunados con la composición de vacuna LSH304 (Figura 8A) o los dos perros vacunados con la composición de vacuna LSH306 (Figura 8B).

EJEMPLO 1: Estudio de la inocuidad y la eficacia en el perro, de 3 inyecciones de una composición de vacuna que comprende las ESPs de *L. infantum* y QA21.

El objeto de este estudio era someter a ensayo diferentes concentraciones de QA21 en una composición de vacuna que comprendía ESPs de promastigotes de *L. infantum* y QA21 como único adyuvante para determinar la mejor relación eficacia/inocuidad.

1.1. Materiales y Métodos

Obtención de las ESPs

Las proteínas de excreción-secreción (ESPs) procedentes de promastigotes de *Leishmania infantum* producidas en un medio axénico y exento de suero se obtuvieron de acuerdo con el método descrito en los documentos de solicitudes internacionales WO 2002/100430 y WO 94/26899, empleando medios y parámetros de cultivo adaptados a una producción industrial.

Composiciones de vacuna

Se prepararon las composiciones de vacuna constituidas por 110 µg/dosis de proteínas de excreción-secreción

(ESPs) procedentes de promastigotes de *Leishmania infantum*, producidas en un medio axénico y exento de suero, por cantidades decrecientes de QA21: 500 µg/dosis (composición de vacuna LSH303), 250 µg/dosis (composición de vacuna LSH304), 125 µg/dosis (composición de vacuna LSH305) y 60 µg/dosis (composición de vacuna LSH306), y por un excipiente farmacéuticamente aceptable (excipiente TRIS manitol sacarosa y NaCl).

- 5 Perros: 9 perros de raza beagle con una edad mínima de 6 meses, vacunados convencionalmente y desparasitados una semana antes de la primera vacunación con la composición de vacuna a base de ESPs y QA21.

Protocolo de vacunación

2 perros recibieron cada uno 3 inyecciones de la composición de vacuna LSH303 con 4 semanas de intervalo, el D0, 27 y 55;

- 10 2 perros recibieron cada uno 3 inyecciones de la composición de vacuna LSH304 con 4 semanas de intervalo, el D0, 27 y 55;

2 perros recibieron cada uno 3 inyecciones de la composición de vacuna LSH305 con 4 semanas de intervalo, el D0, 27 y 55;

- 15 3 perros recibieron cada uno 3 inyecciones de la composición de vacuna LSH306 con 4 semanas de intervalo, el D0, 27 y 55.

Las vacunaciones se realizaron por vía subcutánea.

Criterios de evaluación de la respuesta inmune

- 20 (i) *Seguimiento clínico local y general*: un seguimiento clínico local y general (incluyendo la medición de la temperatura rectal y el peso) se realizó cada día de vacunación, y 1 y 3 días después de cada vacunación. En caso de que los signos clínicos persistieran 3 días después de la vacunación, este seguimiento se llevó a cabo 2 veces a la semana hasta la desaparición completa de los síntomas. Un examen clínico completo, que consistía en verificar el estado general de los perros, y que incluía, entre otros, la medición de la temperatura rectal y el peso, se llevó a cabo una vez por semana.

(ii) *Análisis serológico*:

- 25 Las muestras de sangre se tomaron periódicamente para medir la respuesta serológica de los perros. La dosificación de los anticuerpos IgG1 e IgG2 anti-ESPs en el suero de los perros vacunados, se realizó utilizando el método ELISA ("Enzyme Link Immunosorbent Assay"), con los anticuerpos de cabra anti-IgG1 de perro marcados con peroxidasa (Ref. del laboratorio Bethyl A40-120P) y los anticuerpos de oveja anti-IgG2 de perro marcados con peroxidasa (Ref. del laboratorio Bethyl A40-121P). La evaluación de la respuesta de IgG1 e IgG2 contra las ESPs se realizó utilizando una transferencia Western.

1.2. Resultados

Examen clínico general

- 35 - Para el grupo de perros que había recibido la composición de vacuna LSH303: se observó un pico de hipertermia después de la 2ª vacunación (39,7°C y 40,8°C), y para uno entre ellos también después de la 3ª inmunización (39,7°C). Estos perros no mostraron ningún síntoma de orden general. Las pérdidas de peso observadas en este grupo nunca excedieron el 3% y son compatibles con los valores observados en los otros 3 grupos.

- 40 - Para los grupos de perros que habían recibido la composición de vacuna LSH304, LSH305 o LSH306: no se observó ningún signo general después de la vacunación. Las variaciones transitorias y puntuales de ganancia de peso observadas en estos grupos son compatibles con la curva de crecimiento de los perros a esa edad y no estaban relacionadas con la vacunación. Se observaron a veces pequeños incrementos en la temperatura rectal, 24 horas después de la inyección de la vacuna en los grupos que habían recibido la composición LSH304 o LSH306, pero no eran significativos.

Examen clínico local

- 45 - Para el grupo de perros que había recibido la composición de vacuna LSH303: se observaron reacciones locales graves 24 horas después de la vacunación, en donde había tumefacciones de más de 2 cm de diámetro, dolor regular en el punto de la inyección (simple sensibilidad después de una palpación o dolor persistente) y casos de edema de gran superficie. Estos signos para el dolor desaparecieron en un máximo de 7 días después de la inyección de la composición de vacuna, un máximo de 6 días para el edema y un máximo de 17 días para la inflamación.

- 50 - Para el grupo de perros que había recibido la composición de vacuna LSH304: las reacciones locales que se observaron 24 horas después de la vacunación eran tumefacciones entre 1 y 2 cm de diámetro, y sensibilidad en el

punto de la inyección de la 2ª vacunación (2 perros) y de la 3ª vacunación (1 perro). Se observó un ligero prurito (menos de 1 minuto) inmediatamente después de la 3ª inmunización (1 perro). Se observaron edemas de moderados (localizados) a graves (grandes superficies), respectivamente, a nivel de la 2ª y la 3ª inyección. Estos signos para el dolor desaparecieron en un máximo de 3 días después de las inyecciones, en un máximo de 6 días para el edema y en un máximo de 17 días para la inflamación.

- Para el grupo de perros que había recibido la composición de vacuna LSH305: las reacciones locales observadas 24 horas después de la vacunación eran similares en intensidad a las observadas para el grupo de perros que había recibido la composición de vacuna LSH304, con tumefacciones entre 1 y 2 cm de diámetro, y sensibilidad a nivel del sitio de la inyección de la 2ª vacunación (1 perro). Se observaron también edemas de moderados (localizados) a graves (grandes superficies), a nivel del punto de la 3ª inyección. Estos signos para el dolor desaparecieron en un máximo de 3 días después de las inyecciones, en un máximo de 6 días para el edema y en un máximo de 17 días para la inflamación.

- Para el grupo de perros que había recibido la composición de vacuna LSH306: los signos clínicos permanecieron leves y estaban limitados a 2 casos de prurito leve (menos de 1 minuto) observado inmediatamente después de la 3ª inyección. Se observó una tumefacción de hasta 1-2 cm de diámetro, 24 horas después de la 1ª y la 2ª vacunación en todos los perros. Esta tumefacción desapareció en un máximo de 13 días después de la inyección. Solamente un perro mostraba también una tumefacción 24 horas después de la 3ª vacunación, que desapareció 6 días después de la inyección.

Seguimiento serológico

El resultado de la dosificación de los anticuerpos IgG1 e IgG2 anti-ESPs se presenta en las Figuras 2 y 3 respectivamente.

La evolución de los títulos medios de IgG1 e IgG2 anti-ESPs era similar para los grupos de perros que habían recibido la composición de vacuna LSH303 o LSH304:

- las IgG1 lograron un título medio de $10^{3.13}$ y $10^{2.89}$ (título en log10) dos semanas después de la última inyección, respectivamente en el grupo que había recibido la composición de vacuna LSH303 y en el grupo que había recibido la composición de vacuna LSH304;

- las IgG2 lograron un título medio de $10^{3.13}$ (título en log10) dos semanas después de la última inyección en ambos grupos.

La evolución de los títulos medios de IgG1 e IgG2 anti-ESPs era menor para los grupos de perros que habían recibido la composición de vacuna LSH305 o LSH306:

- las IgG1 lograron un título medio de $10^{2.42}$ y $10^{1.04}$ (título en log10) dos semanas después de la última inyección, respectivamente en el grupo que había recibido la composición de vacuna LSH305 y en el grupo que había recibido la composición de vacuna LSH306;

- las IgG2 lograron un título medio de $10^{3.13}$ y $10^{2.65}$ (título en log10) dos semanas después de la última inyección, respectivamente en el grupo que había recibido la composición de vacuna LSH305 y en el grupo que había recibido la composición de vacuna LSH306.

La disminución de la respuesta serológica observada con las concentraciones más bajas de adyuvante, es más importante con el isotipo IgG1.

Por último, no se observó ningún aumento significativo de la respuesta serológica después de la segunda inyección, independientemente de la composición de vacuna que se utilizara.

La respuesta específica de IgG1 e IgG2 contra las ESPs analizada por transferencia Western, reveló una seroconversión del 100% en los 4 grupos de perros.

Conclusión

La inocuidad general de una composición de vacuna de acuerdo con la presente invención formulada con 60 µg/dosis de QA21, es buena. En cambio, se observó edema y dolor con las composiciones de vacuna formuladas con 500, 250 y 125 µg/dosis de QA21.

Los datos sobre la inocuidad local están a favor de una cantidad de 60 µg/dosis de QA21; cantidad para la que solo se observa una ligera tumefacción que dura menos de 13 días.

El seguimiento serológico muestra una conservación de los anticuerpos IgG2 anti-ESPs y una disminución de los anticuerpos IgG1 anti-ESPs para las concentraciones más bajas de QA21: 60 y 125 µg/dosis.

Una dosis de 60 µg de QA21 induce por tanto reacciones locales muy moderadas, mientras que se conserva una

respuesta humoral elevada y por consiguiente tiene la mejor relación eficacia/inocuidad para los perros tratados.

EJEMPLO 2: Estudio de la inocuidad y la eficacia en el perro de dos inyecciones de una vacuna compuesta por ESPs de *L. infantum* y QA21 como adyuvante; análisis de la respuesta inmune

5 El propósito de este estudio era comparar la eficacia y la inocuidad de dos formulaciones de vacuna basadas en ESPs de promastigotes de *L. infantum* y que contenían diferentes cantidades de QA21 (60 µg/dosis o 250 µg/dosis). La eficacia se estudió mediante el análisis de la respuesta inmune humoral y celular. La inocuidad se estudió mediante una evaluación de las reacciones locales y generales.

2.1. Materiales y Métodos

Composiciones de vacuna: LSH304 y LSH306 (véase el Ejemplo 4.1).

10 Perros: 6 perros SPF de más de 21 semanas de edad.

Protocolo de vacunación:

2 perros recibieron cada uno 2 inyecciones de la composición de vacuna LSH304 con intervalos de 4 semanas, el D0 y el D28;

15 2 perros recibieron cada uno 2 inyecciones de la composición de vacuna LSH306 con intervalos de 4 semanas, el D0 y el D28;

2 perros no estaban vacunados.

Las vacunaciones se llevaron a cabo por vía subcutánea.

Preparación de leishmanina

20 Una cepa de *Leishmania infantum* se descongeló el D0 y se cultivó. Después de 5 a 6 días de cultivo, se realizó una amplificación mediante el aumento del volumen de cultivo. Los parásitos se mantuvieron en cultivo hasta alcanzar la fase estacionaria de crecimiento. Los parásitos se recogieron a continuación, la suspensión se lavó tres veces con PBS. Los parásitos se lisaron mediante 3 ciclos de congelación/descongelación. La leishmanina obtenida de este modo, se almacenó a <-70°C.

Prueba de DTH

25 La prueba de DTH cutánea (*Delayed Type Hypersensitivity*), bien conocida por el experto en la materia, permite determinar si una respuesta mediada por células es de tipo Th1 o Th2 (Black C.A., Dermatol. Online J., 1999, 5:7. [Http://dermatology.cdlib.org/DOJvol5num1/reviews/black.html](http://dermatology.cdlib.org/DOJvol5num1/reviews/black.html); Kid P., Alternative Medicine Review, 2003; 8:223-246).

30 Cuatro semanas después de la última inyección (D56), cada perro recibió por vía intradérmica 0,1 ml de leishmanina en el lado derecho del hocico y 0,1 ml de solución de control (0,9% de NaCl y 0,4% de fenol) en el lado izquierdo del hocico.

Evaluación de la actividad leishmanicida:

35 Se obtuvieron células mononucleares de sangre periférica o PBMC por centrifugación en un gradiente de Ficoll y después los monocitos se separaron de la población de linfocitos mediante adherencia a plástico, y cada población se incubó a 37°C para permitir que los monocitos se convirtieran en macrófagos maduros. Los macrófagos obtenidos de este modo se infectaron después con parásitos de Leishmania. Después de la incubación, el exceso de parásitos se eliminó y después los macrófagos se incubaron durante 24 h en medio completo. Los linfocitos autólogos se añadieron después a la mitad de los pocillos para evaluar la capacidad de los macrófagos para destruir los parásitos después de la activación por los linfocitos. Los pocillos sin células servían de control de la multiplicación del parásito. Después de 72 horas, se recuperó el material sobrenadante de los cultivos y se conservó, los linfocitos se eliminaron y los macrófagos se fijaron en los pocillos con metanol. Una parte de los macrófagos se tiñó con Giemsa y se evaluó el porcentaje de inhibición del índice parasitario. La otra parte de los macrófagos se utilizó para la detección de la NO sintasa inducible (iNOS), utilizando anticuerpos específicos y/o mediante inmunotinción con la técnica de complejo avidina-biotina/peroxidasa. La producción de NO₂ (implicada en la cascada de NO) se evaluó en el material sobrenadante de los cultivos, con ayuda de la técnica de referencia de Griess modificada

45

Criterios para la evaluación de la respuesta inmune:

50 Durante la «fase de vacunación»: se evaluaron las reacciones generales y locales a partir de D0 a D4 y de D28 a D32, como se describe en el Ejemplo 4.1; el análisis serológico se llevó a cabo como se describe en el Ejemplo 4.1; la actividad leishmanicida de los macrófagos se midió; se hizo un recuento de los linfocitos T CD4⁺CD5⁺ y CD8⁺CD5⁺ y de los linfocitos B por un método de citometría de flujo.

Durante la «fase DTH» (después de la inyección de leishmanina): la reacción general fue evaluada todos los días desde el D56 al D63; las reacciones locales se midieron todos los días con un calibrador pie de rey; el análisis serológico se llevó a cabo por el método ELISA y transferencia Western como se describe en el Ejemplo 4.1; la actividad leishmanicida de los macrófagos se midió; se hizo un recuento de los linfocitos T CD4⁺CD5⁺ y CD8⁺CD5⁺ y de los linfocitos B.

2.2. Resultados

2.2.1 Resultados durante la «fase de vacunación»

Examen clínico general,

Uno de los dos perros vacunados con la composición de vacuna LSH304 (que contenía una dosis de 250 µg de QA21) padeció hipertermia durante un día, asociada con una depresión durante 2 días después de la 1^a vacunación. Los dos perros mostraron una hipertrofia de los ganglios linfáticos poplíteos y subcapsulares después de la 2^a vacunación; esta hipertrofia desapareció en 4 días. Los dos perros vacunados con la composición de vacuna LSH306 (que contenía una dosis de 60 µg de QA21) solamente mostraron una ligera hipertrofia de los ganglios linfáticos poplíteos y subcapsulares después de la 2^a vacunación, que desapareció en 4 días. Todos los animales mostraron una ganancia de peso de 15% y 37% entre el D0 y el D156.

Examen clínico local

Se observaron reacciones locales de diferentes intensidades en los dos grupos de perros vacunados:

- en el grupo de perros vacunados con la composición de vacuna LSH304: Observación de un edema de 3 a 4 cm de diámetro asociado con dolor después de la 1^a vacunación. Para uno de los dos perros, el edema evolucionó a un nódulo (1 cm) que desapareció en 16 días. Observación de un edema cardiogénico grave de 5 a 10 cm de diámetro después de la 2^a vacunación, que desapareció en 4 días.

- en el grupo de perros vacunados con la composición de vacuna LSH306: Observación de una tumefacción de menos de 1,5 cm de diámetro después de la 1^a vacunación, que desapareció después de un día. Para uno de los dos perros, observación de un edema cardiogénico de 3 a 5 cm de diámetro después de 2^a vacunación, que desaparecieron en 3 días.

Análisis serológico

Todos los perros eran seronegativos para los anticuerpos anti-ESPs antes de la 1^a vacunación.

Los perros vacunados con la composición de vacuna LSH304 presentaban títulos elevados de anticuerpo IgG1 e IgG2 anti-ESPs (véanse las Figuras 4A y 4B). La seroconversión de IgG1 e IgG2 se produjo a partir de la 1^a vacunación.

Los perros vacunados con la composición de vacuna LSH306 tenían títulos más bajos de anticuerpos IgG1 e IgG2 anti-ESPs (véase la Figura 5A y 5B). Para uno de los dos perros, la seroconversión en IgG2 se produjo a partir de la 1^a vacunación, mientras que la seroconversión en IgG1 apareció después de la 2^a vacunación. Para el otro perro, la seroconversión para los dos serotipos se produjo después de la 1^a vacunación.

Las Figuras 4 y 5 también muestran que los títulos de los anticuerpos IgG1 e IgG2 se correlacionan con la dosis del adyuvante en la composición de vacuna.

Para los dos grupos de perros, los anticuerpos IgG2 dirigidos contra las ESPs, reveladas por el método de transferencia Western, aparecieron a partir de la 1^a vacunación, mientras que los anticuerpos IgG1 aparecieron a partir de la 2^a vacunación.

Actividad leishmanicida de los macrófagos

Todos los perros eran negativos para la actividad leishmanicida de los macrófagos antes de la 1^a vacunación. Los macrófagos de los perros de los dos grupos vacunados eran capaces de destruir los amastigotes de *L. infantum* después de la 2^a vacunación, cuando se cocultivaron con linfocitos autólogos. El nivel de actividad leishmanicida de los macrófagos era similar en los dos grupos vacunados (Figuras 6A y 6B). Sin embargo, no se midió ninguna actividad leishmanicida en los macrófagos de los perros en el grupo de control durante el estudio.

Para determinar si el óxido de nitrógeno (NO) desempeñaba un papel en la muerte de la forma amastigote de *L. infantum* después de haber sido puesto en contacto con los macrófagos de los perros vacunados, la producción de NO y la presencia de la enzima NO sintasa inducible (iNOS) se midieron en el material sobrenadante de las células (macrófagos y linfocitos) cocultivadas.

Los resultados se muestran en las Figuras 7 y 8. Solamente los cocultivos de las células de los perros vacunados mostraron una mejora en la producción de NO. Este aumento se correlaciona con un aumento de la concentración

de la enzima NO sintasa inducible (iNOS).

Recuento de los linfocitos T CD4⁺CD5⁺ y CD8⁺CD5⁺, y de linfocitos B

5 El número de linfocitos T auxiliares (CD4⁺CD5⁺), de linfocitos T citotóxicos (CD8⁺CD5⁺) y de linfocitos B (células CD21) se evaluó antes y después de la vacunación mediante citometría. El número de células sanguíneas, células citotóxicas y linfocitos B se mantuvo estable para todos los animales (vacunados y no vacunados) durante el estudio. Uno de los dos perros vacunados con la composición de vacuna LSH304 y los dos perros vacunados con la composición de vacuna LSH306, mostraron un ligero aumento, pero no significativo en el número de linfocitos T auxiliares después de la 2^a vacunación.

2.2.2 Resultados durante la «fase DTH»

10 Examen clínico general

No se observó ninguna reacción general después de la inyección de leishmanina en los perros vacunados con la composición de vacuna LSH304 o LSH306. Todos los animales continuaron ganando peso (entre + 4% y + 7% del peso corporal) entre el D56 y el D63.

Examen clínico local

15 Los dos perros vacunados con la composición de vacuna LSH304 presentaban, en el punto de la inyección de leishmanina, una induración asociada con dolor y prurito, que desapareció en 4 días.

Los dos perros vacunados con la composición de vacuna LSH306 presentaban, en el punto de la inyección de leishmanina, una induración sin dolor y prurito, que desapareció en 4 días.

20 En contraste, ninguno de los perros vacunados mostró una reacción local a nivel del punto de la inyección de la solución de control. Además, los 2 perros del grupo de control solo mostraron un eritema a nivel del punto de inyección de la leishmanina.

25 Las reacciones leves observadas en el grupo de control son la consecuencia normal de una inyección intradérmica de 100 µl de una solución de antígenos, mientras que las reacciones graves en el grupo vacunado son indicativas de una respuesta inmune con mediación celular específica de un antígeno que está dirigido contra la leishmanina inyectada.

Análisis serológico

30 Los resultados se representan en las Figuras 4 y 5. La inyección de leishmanina no modifica el título de anticuerpos IgG1 o IgG2 anti-ESPs en los perros vacunados con la composición de vacuna LSH304. En contraste, la inyección de leishmanina provocó un ligero incremento del nivel de anticuerpos IgG1 o IgG2 anti-ESPs en los perros vacunados con la composición de vacuna LSH306.

Actividad leishmanicida de los macrófagos

35 La capacidad de los macrófagos para destruir las formas de amastigotes de *L. infantum* se ha incrementado después de la inyección de leishmanina (véase la Figura 6). Este resultado contrasta con la ausencia de actividad leishmanicida de los macrófagos del grupo de control durante todo el estudio. Este aumento de la actividad leishmanicida de los macrófagos se correlaciona con un aumento de la producción de NO así como la presencia de NO sintasa inducible (iNOS) (véanse las Figuras 7 y 8).

2.2.3 Conclusión

40 Según se desprende de este estudio, la mejor relación entre la eficacia y la inocuidad se observa con la composición de vacuna LSH306 (que contiene 60 µg de QA21). De hecho, se observó una reacción local solo para un perro después de la 2^a vacunación. Además, no se observó ninguna hipertermia o depresión. La respuesta humoral anti-ESPs estaba bien desarrollada. Los macrófagos de los perros vacunados con esta composición de vacuna eran capaces de destruir amastigotes de *L. infantum* gracias a la activación de la enzima iNOS (que produce NO). Además, los dos perros vacunados desarrollaron una reacción intradérmica, 48 horas después de la inyección de leishmanina, lo que es indicativo de una respuesta inmune con mediación celular.

45

REIVINDICACIONES

1. Composición de vacuna para la prevención o el tratamiento de la leishmaniosis en un mamífero de la especie *Canis lupus*, caracterizada porque consiste en:
- 5 - una cantidad de proteínas de excreción-secreción (ESPs) procedentes de promastigotes y/o amastigotes de *Leishmania* sp, producidas en un medio axénico y exento de suero, que comprende entre 80 y 140 µg por dosis de vacuna;
- una cantidad de saponina QA21 purificada de 60 µg por dosis de vacuna; y
- opcionalmente, un excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 10 2. Composición según la reivindicación 1, caracterizada porque la saponina QA21 purificada es el único adyuvante a base de saponina.
3. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2, caracterizada porque la saponina QA21 purificada es el único adyuvante.
4. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizada porque la cantidad de ESPs es de 110 µg/dosis de vacuna.
- 15 5. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizada porque dicho excipiente comprende o consiste en uno o varios de los compuestos seleccionados entre el grupo que consiste en cloruro de sodio, agentes de liofilización, tampones, conservantes y estabilizantes.
6. Composición según la reivindicación 5, caracterizada porque dicho excipiente comprende Tris (trishidroximetilaminometano), manitol y sacarosa.
- 20 7. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizada porque dichas proteínas de excreción-secreción proceden de promastigotes de *Leishmania* sp.
8. Procedimiento de preparación de una composición de vacuna para la prevención o el tratamiento de la leishmaniosis en un mamífero de la especie *Canis lupus*, caracterizado porque comprende la mezcla de:
- 25 - proteínas de excreción-secreción (ESPs) procedentes de promastigotes y/o amastigotes de *Leishmania* sp, producidas en un medio axénico y exento de suero, que comprenden entre 80 y 140 µg por dosis de vacuna y
- una cantidad de saponina QA21 purificada de 60 µg por dosis de vacuna; y
- opcionalmente, un excipiente farmacéuticamente aceptable.
9. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, para uso en el tratamiento o la prevención de la leishmaniosis en un mamífero de la especie *Canis lupus*.

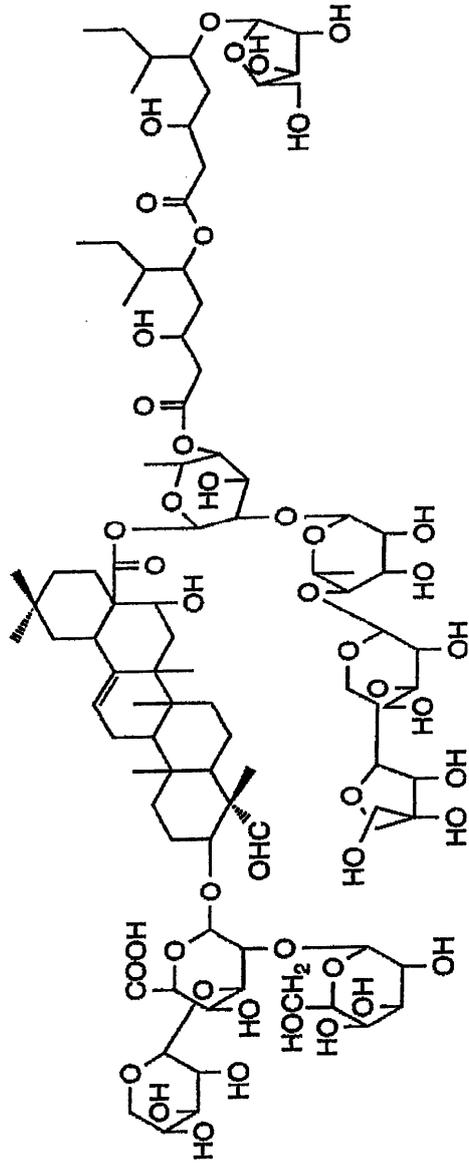


FIGURA 1

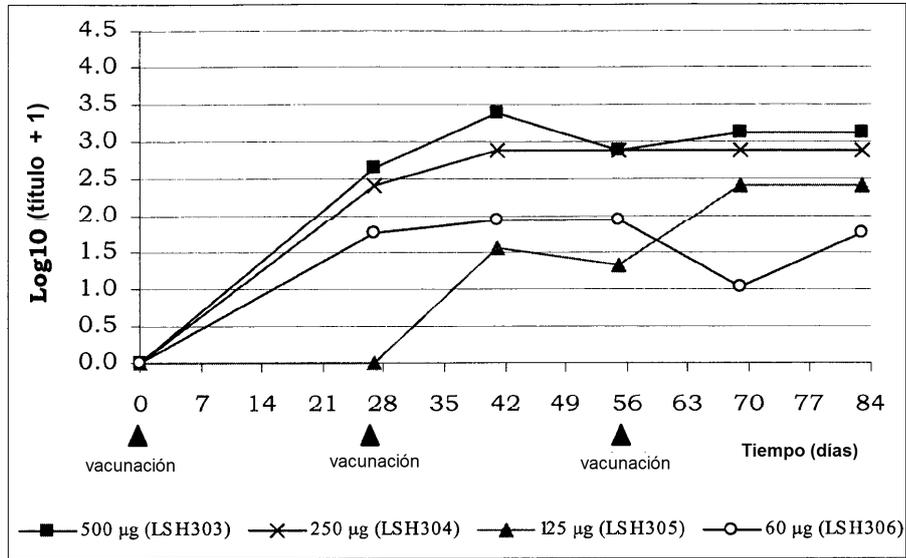


FIGURA 2

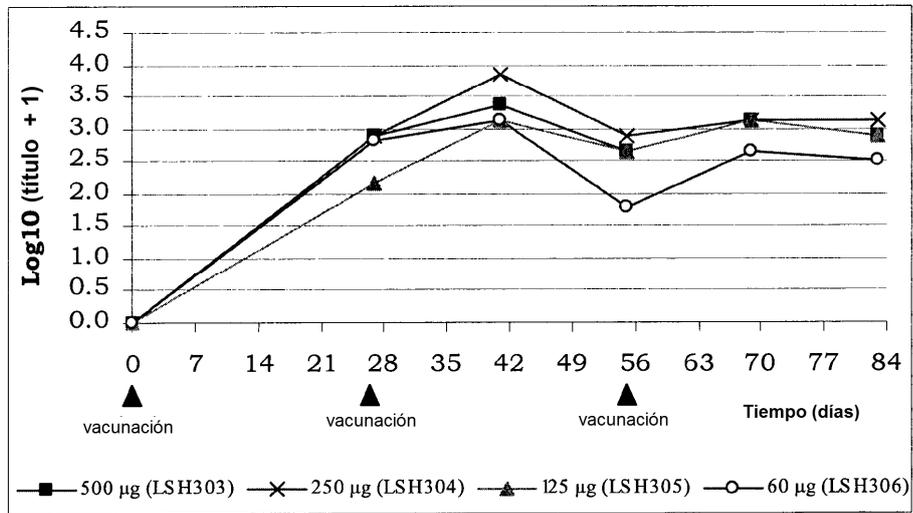


FIGURA 3

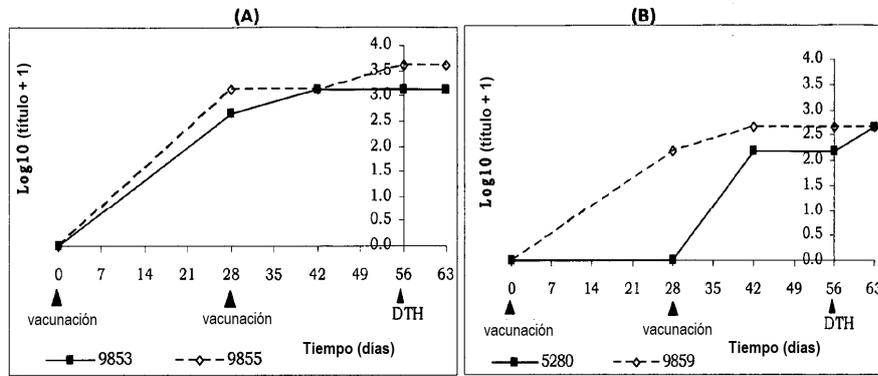


FIGURA 4

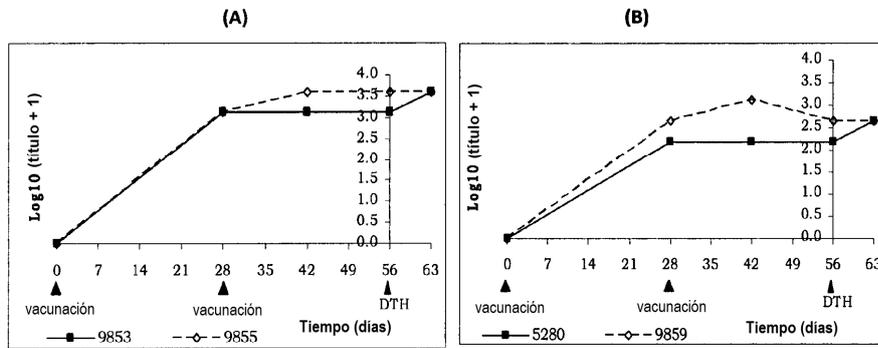


FIGURA 5

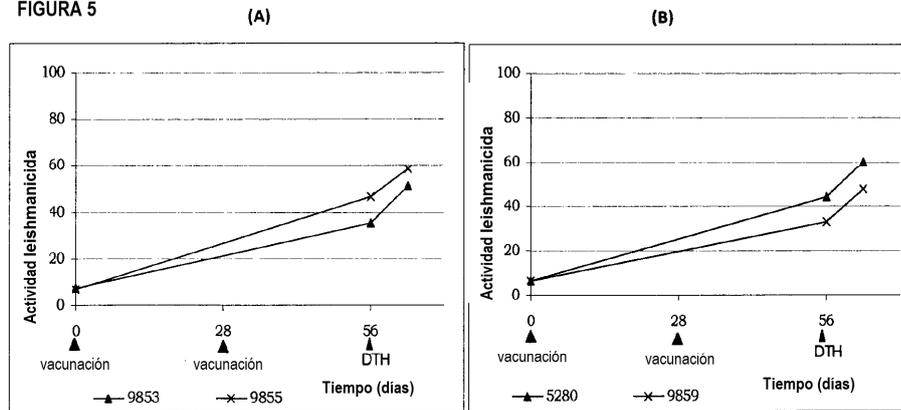


FIGURA 6

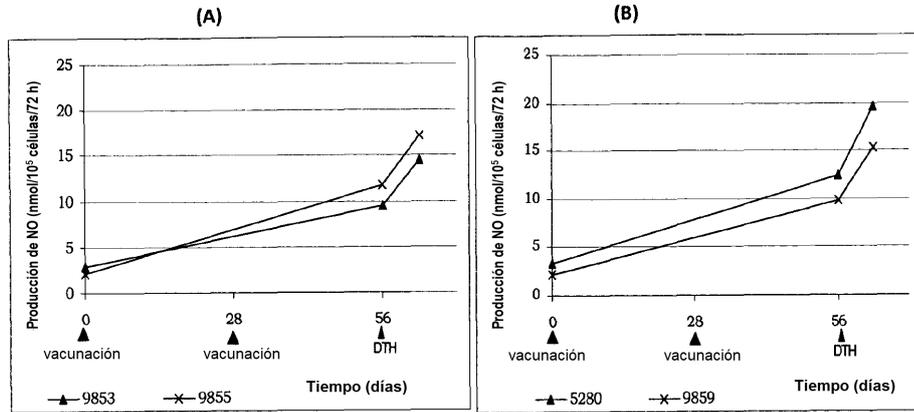


FIGURA 7

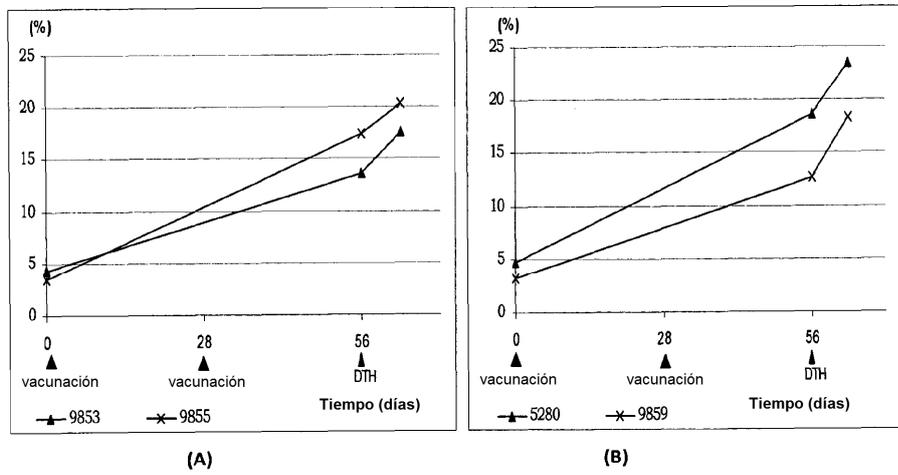


FIGURA 8