

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 675 241**

51 Int. Cl.:

A61K 39/008 (2006.01)
A61K 31/496 (2006.01)
A61K 31/519 (2006.01)
A61K 31/545 (2006.01)
A61K 31/7048 (2006.01)
A61K 39/39 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)
A61K 31/706 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.02.2010 PCT/BR2010/000037**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **20.01.2011 WO11006219**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.02.2010 E 10799300 (8)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.04.2018 EP 2453912**

54 Título: **Composición para el tratamiento de la leishmaniasis canina y humana**

30 Prioridad:

13.07.2009 BR PI0902443

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
09.07.2018

73 Titular/es:

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO (100.0%)
Av. Brigadeiro Trompowsky, s/n, Cidade Universitária, Ilha do Governador
Rio de Janeiro - RJ, BR

72 Inventor/es:

PALATNIK DE SOUSA, CLARISA, B.

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 675 241 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 para el tratamiento de la leishmaniasis canina y humana

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a composiciones para el tratamiento de la leishmaniasis visceral canina y humana que comprende agentes inmunoterapéuticos usados en combinación con agentes quimioterapéuticos convencionales. Estos agentes inmuoquimioterapéuticos incluyen fracciones de amastigotes de *Leishmania* llamados "Ligando de Fucosa-Manosa" (FML) adyuvados por saponina, en combinación con quimioterapia. Los agentes quimioterapéuticos incluyen antibióticos antibacterianos, antiparasitarios y/o antifúngicos y/o antivíricos y/o análogos de nucleótidos o nucleósidos.

Dichos procesos y composiciones se pueden emplear en la preparación de formulaciones usadas para tratar la leishmaniasis tanto en animales como en seres humanos.

Antecedentes de la invención

La leishmaniasis visceral humana o "kala-azar" en América y en el Mediterráneo es una zoonosis canina conocida. Los insectos succionadores de sangre adquieren el agente etiológico alimentándose ellos mismos de cánidos salvajes y posteriormente transmitiéndolo a perros domésticos. La transmisión a los seres humanos mediante flebótomos provoca la leishmaniasis visceral humana, una enfermedad grave que puede ser mortal si no se trata adecuadamente.

Cada año, se diagnostican aproximadamente 500.000 nuevos casos humanos de kala-azar en todo el mundo. Todavía no está disponible una vacuna protectora profiláctica contra la enfermedad humana. El mejor rendimiento hasta la fecha se ha logrado con una vacuna experimental de primera generación que indujo una protección del 12 % entre personas que se convirtieron en positivos en una prueba intradérmica para el lisato de *Leishmania* (IDR) después de que finalizara la vacunación. Hasta ahora, la quimioterapia contra kala-azar ha demostrado ser altamente tóxica y no siempre eficaz.

La *Leishmania (L.) chagasi* y *Leishmania (L.) infantum* son agentes etiológicos de la leishmaniasis visceral humana (HVL) en América, en el Mediterráneo, Oriente Medio y Asia. Se trata de una enfermedad grave y a menudo letal si no se trata poco después de la aparición de los síntomas. En estas regiones, la enfermedad es una zoonosis canina. Los parásitos se exponen sobre la piel de los perros, zorros y perros salvajes y se transmiten a los seres humanos por medio de un ciclo de transmisión que implica insectos y flebótomos.

La Leishmaniasis visceral zoonótica (ZVL) es una zoonosis canina reemergente, cuyo control epidemiológico implica el sacrificio de los perros seropositivos infectados, el tratamiento de los entornos domésticos y peridomésticos con insecticida, y sistematizar el tratamiento de casos humanos. Brasil es uno de los cuatro países en donde ocurre el 90 % de los casos humanos. Como método de control, el sacrificio de los perros seropositivos se practica en Brasil y China; sin embargo, no se acepta en Europa. Los programas de control caninos son extremadamente difíciles, costosos y requieren métodos de vigilancia permanente y de diagnóstico serológico sensibles que sean eficaces. Además, como muchos perros seropositivos son asintomáticos, la campaña es complicada, aunque se ha demostrado la infecciosidad de los perros asintomáticos para insectos vectores.

El tratamiento de hogares con insecticidas y la vacunación preventiva de seres humanos y perros contra la leishmaniasis visceral se consideran actualmente como las mejores herramientas provistas para el control y erradicación de la enfermedad y para reducir los casos tanto humanos como caninos. Aunque se han probado varias vacunas en condiciones experimentales, solo algunas mostraron eficacia en pruebas prácticas contra la exposición a la infección natural y solo la vacuna Leishmune® está autorizada actualmente en Brasil, como una vacuna profiláctica contra la leishmaniasis visceral canina.

Bianciardi *et al* (PARASITOLOGY RESEARCH, SPRINGER VERLAG, BERLIN, DE, vol. 93, n.º 6. 1 Agosto de 2004, páginas 486-492) demuestran que el tratamiento de perros que padecen leishmaniasis visceral solo con enrofloxacin no es eficaz en sí. Sin embargo, el uso de enrofloxacin en combinación con metronidazol, determinó la mejora clínica de los perros infectados, particularmente aquellos con lesiones cutáneas y se puede proponer para un protocolo terapéutico de leishmaniasis canina.

Guadalupe Miró y coautores (TRENDS IN PARASITOLOGY, ELSEVIER CURRENT TRENDS, GB, vol. 24, n.º 8, 1 Agosto de 2008, páginas 371-377) revisan el estado de la técnica de tratamientos contra la leishmaniasis visceral canina hasta 2008 y da un importante resumen del potencial de la vacuna Leishmune® con FML y saponina en inmunogenicidad (da Silva *et al.*, 2001, Borja Cabrera *et al.*, 2002) e inmunoterapia de leishmaniasis visceral canina (Borja Cabrera *et al.*, 2004; Santos *et al.*, 2007). Palatnik de Souza, en el documento WO2006/122382A2, se refieren a la capacidad de la vacuna de FML y saponina para inducir la generación de anticuerpos anti-FML en perros que, cuando se ingieren por los insectos, bloquean la fijación de cualquier parásito ingerido eventualmente al intestino

medio del insecto. Después, el insecto no se infectaría y no transmitiría la enfermedad adicionalmente a perros o seres humanos.

5 Knapp, en el documento WO2008/134643A2, enseña experimentos en ratones y ganado bovino usando la vacuna para la prevención de la enfermedad y no para la cura o terapia. Knapp enseña a vacunar a los animales e infectarlos después de la vacunación. La vacuna de Knapp está compuesta de α y β tubulina y las proteínas definidas MAP15 y MAP52. Bianciardi (PARASITOL RES, vol. 93, 2004, páginas 486-492) describe el uso beneficioso de enrofloxacin en quimioterapia en perros contra la leishmaniasis.

10 Breve descripción de los dibujos

15 La Figura 1 es un análisis comparativo del impacto de las vacunas Leishmune® enriquecidas fabricadas en laboratorio y comerciales en las proporciones de casos sintomáticos (sin), óbitos, parásitos (par) y evidencia de PCR en ganglios linfáticos e IDR a antígeno de Leishmania, cuando se usa sea en inmunoterapia o inmunoquimioterapia contra CVL. Los números 3 y 8, después de los nombres de las variables sobre el eje horizontal indican meses después de la vacunación. El grupo de tratamiento con inmunoterapia estuvo compuesto por 15 perros que recibieron la vacuna comercial y 16 perros que recibieron la vacuna fabricada en laboratorio mientras que el tratamiento con inmunoterapia se administró a 21 perros tratados con la vacuna comercial y 14 perros tratados con la vacuna Leishmune® enriquecida fabricada en laboratorio. No se encontraron diferencias significativas entre las formulaciones fabricadas en laboratorio o comerciales en la proporción de resultados positivos de cualquier variable ni en el tratamiento con IT ni en el tratamiento con ICT. La comparación de las proporciones se realizó usando la prueba exacta de Fisher (Software Graphpad).

20 La Figura 2 es una señal clínica, parasitológica e inmunológica en perros con CVL, después del tratamiento con la vacuna Leishmune® enriquecida con saponina con o sin quimioterapia adicional. Treinta y un perros con CVL adquirida de manera natural recibieron tres dosis de Leishmune® enriquecida con saponina solo (IT), 35 se trataron con la vacuna y quimioterapia adicional (ICT) mientras que 25 permanecieron como controles sin tratar. Las señales características de CVL se evaluaron en los meses 0, 3 y 8 después de las primeras dosis de vacunación. La proporción de óbitos, hallazgos positivos de amastigotes de *Leishmania* o ADN de *Leishmania* amplificado por PCR en ganglios linfáticos, y la proporción de respuestas positivas para IDR al antígeno de promastigotes contra la leishmaniasis se registraron en los meses 3 y 8. Las barras representan la proporción de resultados positivos en cada grupo de tratamientos. La comparación de las proporciones se realizó usando la prueba exacta de Fisher (Software Graphpad).

25 La Figura 3 es el desarrollo del tamaño de las patas infectadas de ratones BABL/c (n=7/grupo) tratados con solución salina o vacuna con FML-saponina y expuestos a promastigotes infecciosos de amazonensis de Leishmania (L.).

30 La figura 4 muestra la cuantificación de carga parasitaria en las patas de ratones vacunados con FML-saponina; izquierda, log 10 de dilución máxima en la que se evaluaron los parásitos (concentración); derecha, log 10 número de promastigotes en la dilución equivalente a la concentración.

40 Descripción detallada de la invención

La vacuna Leishmune® está formada por el antígeno FML (ligando de fucosa-manosa) de *Leishmania donovani* formulado en 0,5 mg de saponina. El aislamiento del antígeno de FML de promastigotes de *L. donovani* (CB Palatnik *et al.*, Infection and Immunity 1989; 57:754-763) y su formulación como una vacuna con saponina de *Quillaja saponaria* Molina se describe en la patente brasileña P11100173-9.

45 La vacuna compuesta por antígeno FML y saponina protegió el 92-95 % de perros produciendo un 76-80 % de eficacia de la vacuna en ensayos realizados en Rio Grande do Norte (da Silva V *et al.*, Vaccine 2001; 19:1082-1092; 2001, y Borja Cabrera GP *et al.*, Vaccine 2002; 20: 3277-3284, 2002). Leishmune® ha demostrado ya el 99 % de protección de perros vacunados en Sao Paulo y Minas Gerais, mientras que el 15,6 % de los controles sin tratar fueron seropositivos (Borja Cabrera GP *et al.*, Vaccine 2008 26:4991-4997). En un ensayo práctico de dos años, hasta el 1,2 % de los perros vacunados mostraron síntomas mientras que el 20,6 % de perros expuestos a controles fueron sintomáticos. Finalmente, mientras que el 1 % de las muertes se debió a leishmaniasis visceral se detectó entre los vacunados, que un total del 39 % de animales de control murieron por CVL durante el ensayo. Todas las diferencias entre los vacunados y los controles fueron significativas. Estos resultados demuestran una protección del 99 % en animales vacunados con Leishmune®.

50 Los perros vacunados con Leishmune® mostraron parásitos en la piel, tuvieron una ausencia de pruebas de PCR positivas en la sangre y ganglios linfáticos y la inmunohistoquímica de la piel, y por lo tanto dieron como resultado una disminución de la infección de insectos vectores (Nogueira FS *et al.*, Vaccine 2005; 23(40):4805-4810). Además, los anticuerpos en cuerpos vacunados dificultan la propagación de la enfermedad impidiendo que los parásitos potenciales presentes en la sangre succionada interactúen con la membrana intestinal del insecto evitando de esta manera el desarrollo normal de su ciclo y la futura infección de nuevos seres humanos o perros (Saraiva E *et al.*, Vaccine 2006; 24: 2423-31). Por lo tanto, los flebotomos alimentados con sueros de perros infectados (anticuerpos IgG 1 anti-FML predominantes) mostraron un aumento distinto de la infección (230,7 %), mientras que los insectos alimentados con suero de perros vacunados con Leishmune® (anticuerpos IgG2 predominantes anti-FML) mostraron

74,3 % de reducción de la infección. Estos resultados indican que Leishmune® es una vacuna bloqueadora de la transmisión (TBV), y que los anticuerpos presentes en el suero de perros vacunados, incluso 12 meses después de la vacunación, ayudan a detener la propagación continuada de la enfermedad.

5 Aunque la cobertura de la vacuna actual en Brasil es aún baja, se observó un claro descenso en la cantidad de casos humanos y caninos en las localidades donde se produjeron las vacunaciones mientras que se detectó un aumento de casos en las regiones donde no se estaba realizando la vacunación (Palatnik de Sousa CB *et al.*, 2009; Vaccine 27:3505-3512).

10 Se investigó el posible efecto aditivo de la vacunación canina con Leishmune® unido con la destrucción de perros infectados en la reducción de la epidemia. En Belo Horizonte (BH), se notaron curvas ascendentes de incidencia canina y humana en las provincias de Barreiro, Venda Nova y Noroeste, mientras que la incidencia humana y canina de Centro Sul, Leste, Nordeste, Norte, Pampulha y Oeste, mostraron un descenso o permanecieron estables después de la vacunación con Leishmune®. Como se muestra en la Tabla #1, entre las provincias que mostraron un
 15 descenso en el porcentaje de incidencia humana (-36,5 %), Centro Sul y Pampulha mostraron los porcentajes más altos de vacunación de perros (63,27 % y 27,27 % respectivamente) y las incidencias caninas más bajas (-3,36 %, 1,89 %, respectivamente). Oeste les siguió, con un 25,30 % de los animales vacunados y experimentaron un aumento del 12,86 % de la incidencia canina y en Leste y Noroeste con proporciones inferiores de vacunas (11,72 y 10,76 %, respectivamente) y probablemente por esta razón, incidencias caninas ligeramente superiores (42,77 y
 20 35,73 %). La única excepción se encontró en el distrito Norte, donde la caída de incidencia humana y canina no está correlacionada con la vacunación con Leishmune® (Palatnik de Sousa CB *et al.*, 2009; Vaccine 27:3505-3512).

Se vacunaron proporciones muy inferiores de perros en los distritos Venda Nova (4,35 %), Noroeste (10,27 %) y Barreiro (0,09 %) los cuales, de acuerdo con ello, mostraron incidencias caninas muy aumentadas (24,48, 21,85 y
 25 328,57 %, respectivamente), y aumentos pronunciados en incidencia humana (14,4 y 17 % respectivamente). La disminución de incidencias caninas ($p=-0,008$) y humanas ($p=-0,048$) está correlacionada directamente con el aumento del número de perros vacunados, confirmando el efecto de control aditivo de la vacunación con Leishmune® sobre el sacrificio de perros, reduciendo la reserva de parásitos, protegiendo a los perros y, de esta forma, reduciendo el riesgo de transmisión de VL a humanos y convirtiéndose en una herramienta eficaz para
 30 controlar la VL. Se mostró también que la vacunación con Leishmune® no interfiere en la campaña de control serológico (110.000 perros). Únicamente el 1,3 % de los casos positivos (76 de 5.860) detectados entre los perros vacunados con Leishmune® (Palatnik de Sousa CB *et al.*, 2009; Vaccine 27:3505-3512).

Tabla 1. Distribución de incidencia canina y humana de leishmaniasis visceral y cantidad de perros vacunados con Leishmune® en Belo Horizonte en el periodo 2004-2006.

Distritos	Año	Perros totales	Perros positivos	incidencia en perros (%)	Δ incidencia en perros	Vacunados con L® acumulativos	% acumulativo de perros vacunados	Casos humanos	Δ casos humanos (%)
Centro Sul	2004	5190	201	3,87		1900		5	
	2005	10298	274	2,66		3686		6	
	2006	6823	255	3,74	-3,36	4317	63,27	3	-40
Leste	2004	12337	811	6,57		389		16	
	2005	16925	1039	6,14		768		12	
	2006	8103	760	9,38	42,77	950	11,72	6	-63
Nordeste	2004	12151	1044	8,59		374		24	
	2005	18684	1544	8,26		851		14	
	2006	10792	1258	11,66	35,73	1161	10,76	18	-25
Norte	2004	11551	1014	8,78		27		22	
	2005	20817	2295	11,02		46		20	
	2006	12190	1203	9,87	12,41	49	0,40	13	-41
Pampulha	2004	3899	372	9,54		824		6	
	2005	11998	1082	9,02		1741		10	
	2006	7993	777	9,72	1,89	2180	27,27	3	-50
Oeste	2004	6116	456	7,46		652		10	
	2005	11799	850	7,20		1338		11	
	2006	6484	546	8,42	12,86	1641	25,30	10	0
Promedio/año		11027,89	882,83	7,88	17,05	1271,89	23,12	11,94	-36,5
Barreiro	2004	8783	197	2,24		2		6	
	2005	7609	375	4,93		4		6	
	2006	6434	617	9,6	328,57	6	0,09	7	17
Venda Nova	2004	11434	1177	10,29		134		21	
	2005	19378	2263	11,68		259		14	
	2006	12072	1547	12,81	24,48	525	4,35	24	14

Districtos	Año	Perros totales	Perros positivos	incidencia en perros (%)	Δ incidencia en perros	Vacunados con L® acumulativos	% acumulativo de perros vacunados	Casos humanos	Δ casos humanos (%)
Noroeste	2004	9021	760	8,42		375		24	
	2005	17127	1516	8,85		1000		17	
	2006	11572	1187	10,26	21,85	1188	10,27	25	4
Promedio/año		11926,33	1113,56	8,94	124,97	388,11	4,90	16	11,67
CI95%		5698,73-18153,93	215,74-2011,37	6,55-11,33	-119,45-369,39	82,35-693,87	-2,18-11,98	4,82-27,18	2,23-21,11

Leyenda para Tabla 1: incidencia en perros (%): porcentaje de perros seropositivos entre los perros totales; Δ incidencia en perros: variación sobre el porcentaje de incidencia en perros en 2006 con respecto a 2004; vacunados con L® acumulativos= cantidad acumulativa de perros vacunados con Leishmune® que reciben vacunación completa (3 dosis en el primer año y un refuerzo anual en los años siguientes) distribuida a los veterinarios; % acumulativo de perros vacunados: variación porcentual de la cantidad de perros vacunados en 2006 con respecto a 2004; Δ casos humanos: variación porcentual de la cantidad de casos humanos en 2006 con respecto a 2004. IC95%= 95 % de intervalo de confianza.

Considerando que los perros infectados son sacrificados y que la vacuna es profiláctica y bloquea la transmisión de la enfermedad, el aumento en la concentración de adyuvante de saponina convierte la vacuna en una composición terapéutica, ofreciendo una alternativa de futuro al sacrificio de perros. Se descubrió de hecho que la vacuna Leishmune® formulada con una concentración doble de saponina (1 mg/dosis) tuvo un efecto terapéutico tanto
 5 contra la leishmaniasis visceral canina experimental (Santos FN *et al.*, Vaccine 2007; 25: 6176-6190) como contra la infección adquirida de manera natural en el área endémica (Borja Cabrera GP *et al.*, Vaccine 2004; 22: 2234-2243). La inmunoterapia con la vacuna Leishmune® enriquecida con saponina aumentó los niveles de anticuerpos IgG2 correlacionados con la respuesta protectora, los niveles de linfocitos CD8+ productores de interferón gamma, y produjeron del 79 al 95 % de respuestas IDR positivas, dando como resultado la supervivencia de perros tratados
 10 durante hasta 5 años (hasta la fecha) que no mostraron ningún síntoma y que estuvieron libres de parásitos en el mes 22º del experimento. En la misma fecha, Se registró un 37 % (17/46 perros) de muertes por CVL en el grupo de control sin tratar (Borja Cabrera GP *et al.*, Vaccine 2004; 22: 2234-2243).

La inmunoterapia con Leishmune® representa un beneficio en el tratamiento de los perros, en los que el tratamiento con quimioterapia no está recomendado o está prohibido, tal como en Brasil. La preocupación es que el uso de unos pocos fármacos para humanos disponibles pueden seleccionar parásitos resistentes. También se encontraron resultados de eficacia controvertida después de la quimioterapia en perros contra la CVL. De hecho, a pesar de generar una remisión temporal de los síntomas, suele tener lugar una recaída semanas o meses después de la finalización del tratamiento. La VL en seres humanos es a menudo tratada con antimonio de meglumina (Glucantime®) alopurinol, Anfotericina B o la combinación de Glucantima y alopurinol.
 15
 20

La presente invención divulga sorprendentemente que la quimioterapia combinada con inmunoterapia con la vacuna Leishmune® enriquecida de saponina permite la erradicación de la enfermedad en perros con leishmaniasis visceral canina, no solo por su aumento en supervivencia sino también por la ausencia de parásitos y ADN parásito en ellos.
 25

Como una ilustración, aunque sin limitación, los siguientes agentes de quimioterapia se pueden utilizar eficazmente en combinación con una vacuna en las composiciones y métodos de la presente divulgación: análogos de inosina, formicina y análogos de nucleósidos; antibióticos antibacterianos: aminoglicósidos, anfenicoles, ansamicinas, betalactamas tales como penicilina y cefalexinas lincosamidas, macrólidos, polipéptidos, tetraciclinas, cicloserina, mupirocina, tuberinas, diaminopirimidinas, nitrofuranos, quinolonas, sulfonamidas, sulfonas, enrofloxacina, paromomicina y otros aminoglicósidos, fármacos antiparasitarios: alopurinol, antimoniales pentavalentes (N-metil-meglumina, estibogluconato de Na), anfotericina B, anfotericina B liposomal, aminosidina, pentamidina, alquifosfocolinas, metronidazol, buparvaquone, sitamaquina u 8 aminoquinolina y temporinas, fármacos antifúngicos tales como: ketoconazol, fluconazol, itraconazol, terbinafina, y fármacos anticancerígenos tales como la miltefosina y estimaquina entre otros.
 30
 35

En la presente invención, tanto en la Composición como en el kit, la saponina, preferentemente, está enriquecida. La invención se entenderá mejor a partir del siguiente ensayo ilustrativo:

40 Un total de 104 perros con leishmaniasis visceral canina del estado de Sao Paulo, Brasil se evaluaron en este ensayo. Todas las ciudades mostraron episodios epidémicos recientes de VL canina y humana. Estos animales fueron seropositivos al antígeno FML de *Leishmania (L.) donovani* en el ensayo FML-ELISA y asintomáticos al principio del ensayo. Todos los perros se controlaron por dos Clínicas Veterinarias.

45 Para evitar cualquier interferencia en el ensayo y sabiendo que el aumento de anticuerpos de suero anti-FML de perros infectados está relacionado con el aumento en la cantidad de síntomas y con los resultados positivos de PCR de ADN de *Leishmania*, la distribución de perros en el grupo tratado siguió una aleatorización estratificada de acuerdo con los valores de absorbancia de suero en los ensayos ELISA de FML. En este experimento, los grupos tratados con IT y con ICT mostraron composición similar de razas (Tabla #2), y por lo tanto cada grupo no tuvo diferencias relevantes en las proporciones de razas de perros con mayor susceptibilidad a CVL. Se inyectaron tres dosis de vacuna por medio de la vía subcutánea en la parte posterior de los animales, con un intervalo de 20 a 30 días.
 50

Tabla 2. Composición de razas después de la aleatorización de grupos con IT y con ICT.

Inmunoterapia	Cantidad de perros	Quimioterapia inmunitaria	Cantidad de perros
Pastor alemán*	1	Pastor alemán	1
Doberman*	1	Doberman*	1
Boxer*	4	Boxer*	3
Schnauzer*	1	Cocker Spaniel*	1
Pastor australiano	2	Rottweiler *	4
Pit Bull	2	Caniche	4

Inmunoterapia	Cantidad de perros	Quimioterapia inmunitaria	Cantidad de perros
Caniche	2	Labrador	2
Labrador	4	Pit Bull	1
Pinscher	1	Pinscher	2
Daschund	1	Terrier brasileño	3
Lhasa Apso	1	Daschund	4
Basset hound	1	Dogo	1
SRD	10	SRD	8
Total	31		35

Las razas indicadas con * se consideran susceptibles a la CVL según criterios clínicos, parasitológicos o genéticos.

Inicialmente, los perros tratados con la vacuna Leishmune® enriquecida con saponina (1 mg) se compararon con los perros tratados con la misma vacuna desarrollada en el laboratorio cuyos resultados mostraban que no había diferencias significativas entre el porcentaje de perros sintomáticos o perros con reacciones IDR o PCR positivas o parásitos en ganglios linfáticos y muertes por CVL, indicando que la formulación de Leishmune® comercial tiene las mismas propiedades inmunoterapéuticas que la formulación de laboratorio (Figura 1).

Considerando los resultados anteriores, los perros vacunados con la vacuna Leishmune® comercial o con la vacuna de laboratorio se evaluaron en conjunto. Posteriormente, el efecto de la inmunoterapia (IT) de la vacuna Leishmune® (n=31) se comparó al efecto inmunoquimioterapéutico (ICT) (n=35), usando la vacuna Leishmune® enriquecida con saponina junto con alopurinol (10-20mg/kg, preferencialmente 10 mg/kg cada 12 horas durante 15 meses en 23 perros) o alopurinol en combinación con anfotericina B, (0,5 mg/kg, cada tres días, 16 dosis en 9 perros) en el tratamiento contra CVL y enrofloxacin (5 mg/kg una vez al día, durante 10 días en 1 perro) o cefalexina (30 mg/kg cada 12 horas, durante 7 días en 1 perro) contra infecciones secundarias.

No se encontró ninguna diferencia relevante en la proporción de perros sintomáticos entre los controles sin tratar, perros tratados con IT o con ICT antes del tratamiento (mes 0) (Imagen #2) confirmando la homogeneidad de los grupos.

En el tercer mes después de la vacunación (Figura 2), se encontró una eficacia similar y ninguna diferencia considerable entre los dos tratamientos en la mayoría de variables. Al compararse con los controles sin tratar, ambos tratamientos con IT y con ICT tienen relación de respuesta a IDR positiva aumentada (de 8 a 67-76 %) y redujeron la relación de casos sintomáticos (de 100 a 33-18 %) la relación de casos con evidencia de parásitos (de 54 a 12-15 %), y la relación de muertes atribuible a CVL (del 48 al 19-12 %) revelando el control de enfermedad clínica y parasitológica que da como resultado que la mayoría de perros se vuelven asintomáticos. Hasta el mes 3 sin embargo, ni los tratamientos con IT ni con ICT fueron capaces de eliminar la evidencia de ADN de leishmania en los ganglios linfáticos e incluso se vio un aumento significativo en la positividad de PCR en los controles sin tratar (38 %; p=0,0075) y en el grupo con IT (58 %; p=0,0487), en perros del grupo con ICT (85 %), indicando su afeción de infección latente por *Leishmania* importante (Figura 2). El resultado señala que ambos tratamientos - IT e ICT -, justo después de la vacunación, aumentaron y mantuvieron la respuesta inmunitaria celular protectora contra la infección por *Leishmania*, eludiendo la propagación de la enfermedad, reduciendo la relación de muertes y volviendo a los perros asintomáticos. Sin embargo, la infección latente por *Leishmania* se revela por la presencia de ADN residual de *Leishmania* detectado por herramientas de diagnóstico molecular. Por lo tanto, la recuperación de la respuesta inmunitaria celular se debe al tratamiento con IT con Leishmune® puesto que no se observa ninguna contribución adicional significativa del tratamiento con quimioterapia observado en esta variable.

Como los efectos terapéuticos potenciales de la vacuna de Leishmune® enriquecida a través de IT e ICT fueron evidentes en el tercer mes, los síntomas y muerte aumentaron significativamente en controles sin tratar, por razones éticas, los veterinarios, en este ensayo, decidieron tratar a los perros de control con quimioterapia contra CVL y se suprimieron del estudio después del tratamiento.

La Figura 2 también presenta los resultados obtenidos en el mes 8 después de que se completara la vacunación. Los perros tanto de los grupos con IT como con ICT mostraron aumentos adicionales en las proporciones de resultados positivos de IDR, presentes en solo el 8 % de los controles sin tratar en el mes 3, y detectados en el 100 % de los animales en el mes 8. Estos resultados representan del 33 al 24 % de aumento respectivo relevante en las puntuaciones registradas en el mes 3, mostrando que todos los perros infectados recuperaron su respuesta inmunitaria celular activa contra la *Leishmania* posterior a la vacunación. No se observó ningún cambio significativo en los casos sintomáticos, muertes o evidencia de parásito, indicando que ambos tratamientos dan como resultado

una afección asintomática en el mes 3. La única diferencia importante observada entre los dos tratamientos en el mes 8 fue un fuerte descenso en la relación de perros que muestran resultados de PCR positivos (del 85 al 20 %; $p = 0,0001$), observado solo en el grupo con ICT, mientras que el grupo con IT permaneció sin cambios (del 58 al 67%, $p = 0,7288$), sugiriendo que el tratamiento con quimioterapia añadido a la vacunación con Leishmune enriquecida con saponina limpió la infección latente, por lo tanto curando a los perros. Una diferencia muy relevante entre la positividad en PCR del grupo con ICT (20 %) y del grupo con IT (67 %) en el mes 8 ($p = 0,0253$) (Figura #2) señalan que el 70 % del aumento en el índice de curación se logró por el tratamiento con ICT.

La información obtenida 4,5 años después de la aparición de los ensayos no mostraron una diferencia significativa en el índice de supervivencia del grupo con IT o ICT, con solo el 13 % de los perros en el grupo con IT (3/23) y el 7 % del grupo con ICT (2/30) que murieron por CVL entre el mes 8 y 4,5 años (Figura #2). La relación de muertes acumulativa por CVL dentro de 4,5 años de experimento fue 32 % para el grupo con IT (10/31) y 20 % del grupo con ICT (7/35) ($p = 0,2780$). Esta diferencia no significativa sugiere un índice de curación similar por los dos tratamientos. Sin embargo, y de la manera más sorprendente, cuando se comparó con el grupo de control sin tratar en el mes 3 (12/25 perros, 48 %), una reducción en el índice de muertes por CVL se experimenta solo después del tratamiento con ICT (7/35 perros, 20 %, $0,0273$), pero no después del tratamiento con IT (32 %, $p = 0,278$) (Figura #2). Considerados en conjunto con los resultados negativos de la PCR de los ganglios linfáticos, los resultados indican la ventaja del tratamiento con ICT para el control y cura de CVL.

Para los propietarios de perros y los veterinarios, el éxito de la quimioterapia significa la remisión de las señales clínicas, pero en áreas endémicas esto es inaceptable porque los vectores todavía están presentes y la posibilidad de que estos perros sigan siendo infecciosos y de que la enfermedad pueda ser transmitida a los seres humanos no puede descartarse. Para los parasitólogos, una cura significa la expulsión de parásitos, mientras que las agencias de salud pública, epidemiólogos y entomólogos, la falta de infectividad para flebotomos que se alimentan de sangre y el bloqueo de la transmisión de cepas resistentes, es suficiente. Sin embargo, la cura clínica y parasitológica es suficiente para considerar al animal como "curado" puesto que una cura estéril significaría que no hay evidencia de parásitos o ADN de Leishmania en el animal y que ya no es capaz de transmitir la enfermedad.

El tratamiento de perros infectados con Leishmune® enriquecida es capaz de aumentar la respuesta inmunitaria celular, reducir los síntomas, incluyendo la presencia de parásitos en los ganglios linfáticos y las muertes. Es decir, el tratamiento de IT con Leishmune® enriquecida es capaz de controlar la enfermedad, inducir la remisión y promover una cura clínica y parasitológica rápida de los animales. En el tratamiento con ICT, el uso adicional de quimioterapia puede lograr, 8 meses después del comienzo de la vacunación, la curación de los animales, incluyendo la eliminación del ADN de Leishmania de los ganglios linfáticos, como se muestra por métodos de diagnóstico molecular de alta sensibilidad, dejando los perros no infecciosos. De hecho, estos animales ya no presentan un riesgo de transmisión de la enfermedad a humanos en las áreas endémicas. El hallazgo de un índice acumulativo inferior de muertes en el grupo tratado con ICT, 4,5 años posteriormente al inicio del experimento, indica la superioridad de este tratamiento.

Los resultados de esta invención, investigados en grupos de 31 a 35 perros, es muy significativo cuando se compara con otros estudios de la bibliografía que utilizan solo 5 a 17 perros.

Usando solo quimioterapia con antimonio pentavalente, alopurinol, anfotericina B, anfotericina B liposomal, aminosidina, pentamidina o una mezcla de fármacos antimicrobianos y antifúngicos tales como metronidazol, ketoconazol y fluconazol induce alguna mejora clínica, pero la cura parasitológica se encuentra raramente y la evidencia del ADN normalmente persiste.

De hecho, después del tratamiento con antimonio, los parásitos se recuperaron del 79 % de los 15 perros tratados y 5/6 perros fueron PCR positivos. Incluso 9/10 de los perros tratados con alopurinol mostraron una recuperación clínica pero 8 de ellos fueron positivos para parásitos en cultivo de parásitos o PCR eliminados de los ganglios linfáticos. Además, 5 de 6 perros tratados con meglumina y alopurinol permanecieron positivos en el aspecto parasitológico y 2 de ellos fueron infecciosos para flebotomía. Trece perros que se trataron con anfotericina B liposomal mostraron una mejora clínica rápida, aunque permanecieron positivos en el aspecto parasitológico, y se detectó recurrencia en 12 de ellos. Once de 12 perros, tratados con aminosidina mejoraron clínicamente, pero 4/4 mostraron parásitos en muestras de cultivo de los ganglios linfáticos. Con dosis mayores de aminosidina 3/12 perros mostraron ausencia de síntomas y parásitos durante 4 años ocurriendo la recaída en otros 9. Los perros tratados con pentamidina también mejoraron clínicamente, pero muestran recurrencia de la enfermedad.

La inmunoterapia con la vacuna Leishmune® enriquecida con saponina logró mejores resultados que aquellos previamente indicados para la quimioterapia sola, y que la inmunoquimioterapia con Leishmune® fue mejor que el tratamiento con inmunoterapia sola.

La inmunoquimioterapia con Leishmune® enriquecida es mejor que la quimioterapia normal con alopurinol, con la condición de que reduce el tiempo asignado y la toxicidad intrínseca. Mientras que los perros tratados con alopurinol solo se recuperan entre 2 y 6 meses, sin cura parasitológica o resultados negativos para la PCR incluso con 20 meses de tratamiento y recaída en 3/4 perros, el tratamiento con ICT con Leishmune® y 15 meses de alopurinol

mostraron un 89 % de cura clínica, 100 % de cura parasitológica y recuperación de la respuesta inmunitaria celular y el 76 % de la PCR negativa en el mes 8.

5 El efecto de ICT se ha estudiado para una vacuna de lisato de *Leishmania (L.) infantum* y Glucantime® en 5 perros controlados durante seis (6) meses. Los animales tratados mostraron mejora clínica, pero recurrencia en 3/5 meses y ganglios linfáticos positivos. Por lo tanto, la inmunoterapia con Leishmune® enriquecida fue mejor que la inmunoquimioterapia con la vacuna de *L. infantum*.

10 Se observó recientemente que la inmunoterapia con Leishmune®, (que contenía 0,5 mg de saponina) usando dos dosis simultáneas, dejaron los perros infectados asintomáticos y negativos para inmunohistoquímica durante 2 años.

15 Teniendo en cuenta las deficiencias de la quimioterapia en CVL y su impacto negativo en el control epidemiológico de la enfermedad, el uso de una vacuna protectora en inmunoterapia de perros ya infectados es muy alentador y tendría una aceptación mayor en la comunidad que el control basado en el sacrificio de los perros infectados. La presente invención demuestra el valor terapéutico de la vacuna Leishmune® enriquecida con saponina junto con quimioterapia, cuando se usa en el tratamiento inmunoquimioterapéutico de la leishmaniasis visceral canina, dando como resultado un control eficaz de la enfermedad en áreas endémicas.

20 El efecto beneficioso de la terapia o inmunoquimioterapia con la vacuna de FML-saponina o Leishmune®, mostrado en la prevención y tratamiento de la leishmaniasis visceral canina y en la reducción consiguiente de la leishmaniasis visceral humana causada por *Leishmania chagasi* en Brasil también se puede utilizar para prevenir, tratar y curar la leishmaniasis visceral en el mundo entero. De hecho, el antígeno de FML aislado de *Leishmania (L.) donovani (Sudan)*, el agente subyacente de la enfermedad humana en India y en muchas regiones de África, se reconoce por sueros de seres humanos y perros infectados con *L. infantum* en España (Europa) y por *Leishmania chagasi* en América (Brasil).

30 Mundialmente, la incidencia de leishmaniasis visceral excede la leishmaniasis tegumentaria, una enfermedad más común aunque menos letal, pero mutilante en su progresión. La vacuna de FML-saponina o Leishmune® se puede usar por lo tanto como una herramienta en la prevención, control, inmunoterapia o inmunoquimioterapia de la leishmaniasis tanto visceral como tegumentaria. De 2.000.000 nuevos casos anuales de leishmaniasis en el mundo, 1.500.000 son leishmaniasis tegumentaria, que es una forma de tres síndromes clínicos de expresión variable, conocidos como: leishmaniasis cutánea (CL), leishmaniasis mucocutánea (MCL) y leishmaniasis difusa (DL). Las especies de parásitos del género *Leishmania* están separados en dos subgéneros: *Leishmania (L.)* y *Viannia (V.)*; hay casi 30 especies que causan morbilidad y mortalidad en áreas endémicas. Mientras que la *Leishmania* del complejo donovani (*L. (L.) donovani*, *L. infantum-L. (L.) chagasi*) son agentes causantes de kala-azar o leishmaniasis visceral, la *Leishmania mexicana (L. (L.) mexicana*, *L. (L.) pifanoi*, *L. (L.) amazonensis*, *L. enrietti*, *L. (L.) venezuelensis*) y complejos de *Leishmania braziliensis L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) panamensis*, *L. (V.) peruviana*, *L. (V.) Lainson*, *L. (V.) Shaw*, *L. (V.) Naiffi*) causan la Leishmaniasis cutánea, mucocutánea y difusa en el Nuevo Mundo mientras que la *L. (L.) tropica*, *L. (L.) major*, *L. (L.) aethiopica* son agentes de leishmaniasis tegumentaria en el Viejo Continente.

Más del 90 % de los casos de leishmaniasis cutánea ocurren en Afganistán, Irán, Arabia Saudí, Siria, Brasil y Perú.

45 Los experimentos demuestran que la vacuna de FML-saponina indujeron una protección del 65 % en ratones expuestos a *L. (L.) mexicana*. Además, se ha mostrado que los ratones Balb/c vacunados con 3 dosis de FML en conjunto con IL-12, saponina Quil-A, Riedel de Haën o QS-21 indujeron respuestas significativamente aumentadas de anticuerpos y de IDR contra el lisato de *L. (L.) amazonensis*. Las respuestas fueron incluso superiores a aquellas generadas en ratones vacunados con la fracción análoga de FML aislada de *L. (L.) amazonensis*, confirmando el potencial profiláctico inmunitario del FML de *L. (L.) donovani* contra ambas leishmaniasis. El FML contiene como su principal fracción antigénica la glicoproteína GP36, identificada después de la clonación como una enzima Nucleósido hidrolasa (NH36). Esta enzima es vital para el parásito, porque escinde nucleósidos importados liberando las bases usadas por el parásito para la síntesis de su propio ADN. una vacuna de ADN que contiene el gen de Nucleósido hidrolasa NH36, el VR1012NH36, fue profiláctico e inmunoterapéutico contra la leishmaniasis visceral murina por *L. (L.) chagasi* y cutánea murina por *L. (L.) mexicana*, sugiriendo que su principal antígeno de FML induce una protección cruzada contra la leishmaniasis tegumentaria. Recientemente, identificamos mediante la clonación, la Nucleósido hidrolasa de *L. (L.) amazonensis* con homología extremadamente alta con aquella identificada en *L. (L.) donovani*, que también explica la posible base molecular de la protección cruzada. También examinamos la respuesta inmunitaria y la protección inducida en ratones Balb/c mediante la vacunación con 3 dosis subcutáneas de FML (150µg) + saponina (100µg) contra la infección con 10⁶ promastigotes de *L.(L.) amazonensis* de amastigotes en hámster.

65 En la semana 26, después de la infección, se encontraron diferencias considerables entre los grupos, en el tamaño aumentado de las patas (p = 0,004). La vacuna de FML + saponina indujo una reducción del 49 % en el desarrollo del tamaño de las lesiones (Figura 3). Actualmente, el aumento en tamaño de las patas se detectó en 5 de 7 animales tratados con solución salina y solo 1 tratado con FML-saponina (Figura 3). El análisis de la carga parasitaria limitando la dilución de tejidos dañados de aquellos que sobrevivieron indicó que no hubo una protección

significativa en animales vacunados con FML + saponina (Figura 4). De hecho, se detectó una reducción del 81,8 % en los títulos de parásitos y una reducción del 77,8 % de los recuentos de parásitos de animales vacunados con FML-saponina.

- 5 Los resultados sugirieron que la vacuna de FML-saponina induce una protección cruzada significativa contra la leishmaniasis tegumentaria por *L. (L.) amazonensis* y *L. (L.) mexicana* confirmando el potencial de esta vacuna como una herramienta de control de la leishmaniasis tanto visceral como tegumentaria. La detección previa del efecto inmunoterapéutico y profiláctico de la vacuna de ADN que contiene el gen NH36 del complejo de FML, contra la leishmaniasis visceral canina y tegumentaria murina y la leishmaniasis visceral, confirma la relevancia del
- 10 complejo de FML en la protección contra ambas enfermedades y sugiere su efecto curativo potencial en inmunoterapia de la leishmaniasis visceral y tegumentaria humana.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición quimioterapéutica/farmacéutica inmunitaria, para su uso en el tratamiento de la leishmaniasis canina, en la que
- a) la composición comprende 1,5 mg de antígeno de FML (Ligando de Fucosa-Manosa);
 - b) la composición contiene 1 mg de adyuvante de saponina; y
 - c) la composición se usa en asociación con uno o más agentes quimioterapéuticos, en la que el uno o más agentes quimioterapéuticos comprenden alopurinol o alopurinol en combinación con anfotericina B.
- 10 2. La composición para los usos de la reivindicación 1, en la que dicha composición es para el tratamiento de la leishmaniasis visceral canina.
- 15 3. La composición para el uso de la reivindicación 1, en la que la composición incluye fracciones de promastigotes o amastigotes de Leishmania y su subfracción de nucleósido hidrolasa (NH36).
- 20 4. La composición para el uso de la reivindicación 1, en la que dicho uno o más agentes quimioterapéuticos comprenden alopurinol.
- 25 5. Un kit que comprende:
- a) 1,5 mg de antígeno de FML (Ligando de Fucosa-Manosa)
 - b) adyuvante de saponina para la preparación de una composición que contiene 1 mg de adyuvante de saponina, en la que dicha composición es para su uso en el tratamiento de la leishmaniasis canina y humana; y
 - c) agentes quimioterapéuticos que comprenden alopurinol o alopurinol en combinación con anfotericina B, en la que dicha composición se usa en asociación con dicho uno o varios agentes quimioterapéuticos.
- 30 6. Composición para su uso en la prevención de la leishmaniosis visceral canina y humana que comprende administrar dicha composición a perros, en la que
- a) la composición comprende 1,5 mg de antígeno de FML (Ligando de Fucosa-Manosa);
 - b) la composición contiene 0,5 o 1 mg de adyuvante de saponina; y
 - c) la composición se usa en asociación con uno o más agentes quimioterapéuticos, en la que el uno o más agentes quimioterapéuticos comprenden alopurinol o alopurinol en combinación con anfotericina B.
- 35 7. La composición para el uso de la reivindicación 6, en la que dicha inmunización es la inmunización de la leishmaniasis visceral canina.
- 40 8. La composición para el uso de la reivindicación 6, en la que dichos agentes quimioterapéuticos comprenden alopurinol.
- 45 9. La composición para el uso de la reivindicación 8, en la que la dosificación de alopurinol es 10-20 mg/kg, preferencialmente 10 mg/kg, cada 12 horas durante 15 meses.
10. La composición para el uso de la reivindicación 6, en la que la dosificación de anfotericina B es 0,5 mg/kg, cada tres días, 16 dosis.

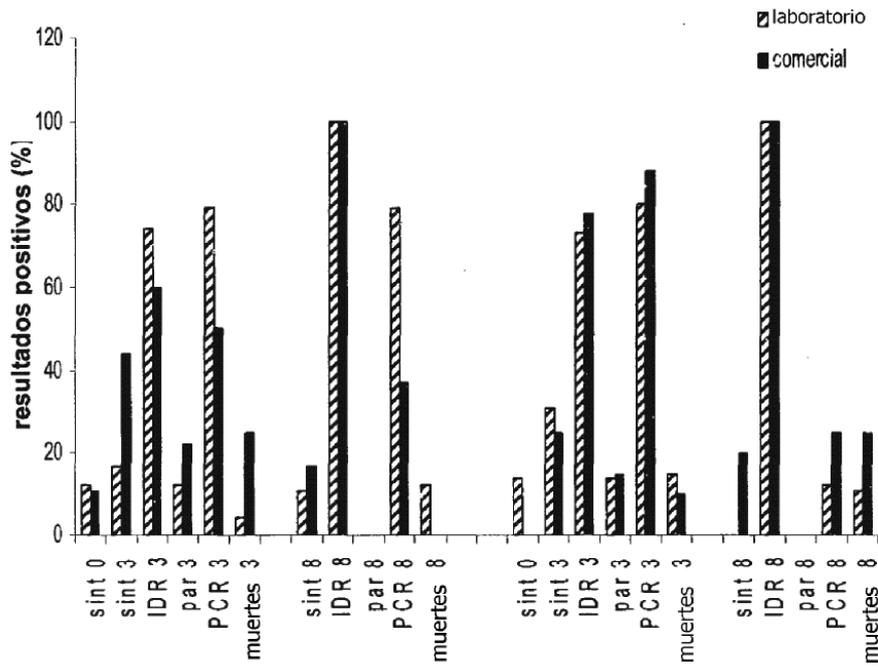


Figura 1: Análisis comparativo del impacto de la vacuna Leishmune® enriquecida con saponina (1,5 mg de antígeno de FML y 1 mg de saponina/dosis) y la misma formulación desarrollada en el laboratorio, como la proporción de casos sintomáticos (sint), mortalidad, parásito (par) en ganglios linfáticos, evidencia de ADN por PCR en ganglios linfáticos e IDR para antígeno de Leishmania, y las vacunas usadas en inmunoterapia o quimioterapia inmunitaria contra CVL. El grupo de tratamiento de inmunoterapia estuvo compuesto por 15 perros que recibieron la vacuna comercial y 16 perros que recibieron la vacuna desarrollada en el laboratorio, mientras que el tratamiento de quimioterapia inmunitaria se administró a 21 perros tratados con la vacuna comercial y 14 perros tratados con la vacuna desarrollada en el laboratorio con Leishmune® enriquecida. No hubo diferencias relevantes entre la formulación producida en el laboratorio o la comercial con respecto a la proporción de resultados positivos de cualquier variable ni el tratamiento con IT ni en el tratamiento con ICT. La comparación de proporciones se realizó usando la prueba exacta de Fisher (Software GraphPad).

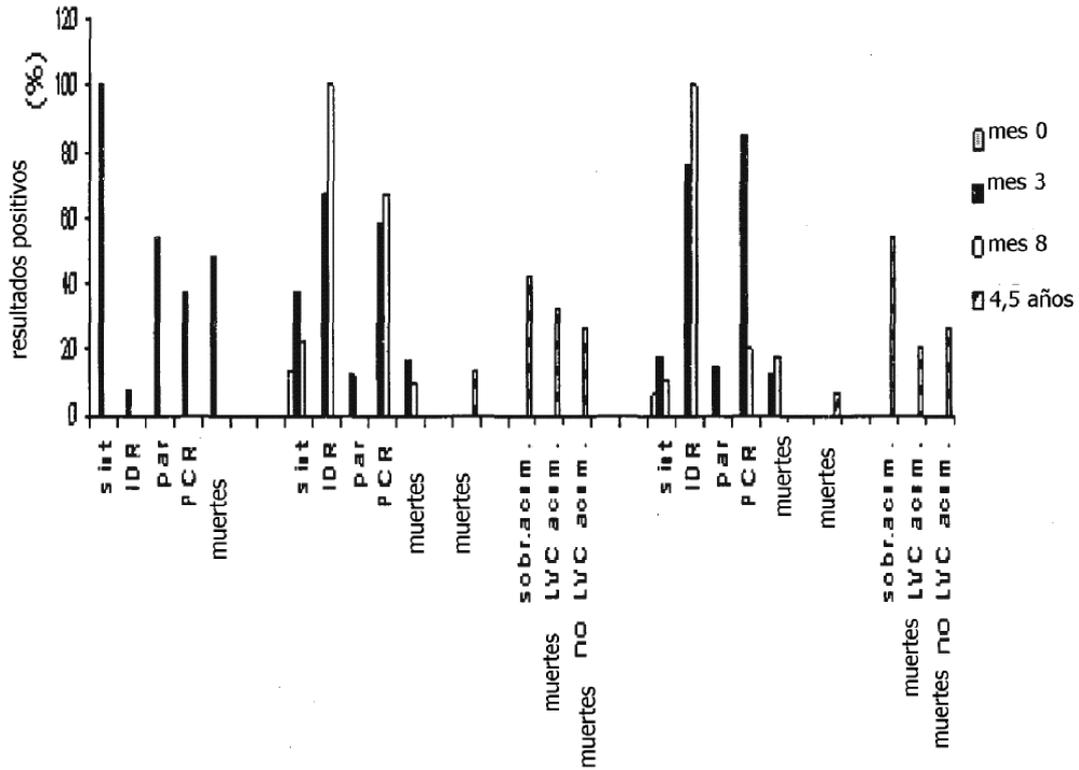


Figura 2: Señales clínicas, parasitológicas e inmunológicas en perros con CVL, después del tratamiento con la vacuna Leishmune® enriquecida con o sin quimioterapia adicional. Treinta y un perros con CVL adquirida de manera natural recibieron tres dosis de Leishmune® enriquecida solo con saponina (IT), 35 se trataron con vacuna y quimioterapia adicional (ICT), mientras que 25 permanecieron como controles sin tratar. La relación de muertes, hallazgos de amastigotes de ADN de Leishmania por PCR en ganglios linfáticos y la relación de respuestas de IDR positiva a antígeno de Leishmania se registraron también durante el mes 3 y 8. Las barras corresponden a la proporción de resultados positivos en cada grupo de tratamientos. Las relaciones de muertes acumuladas por CVL, muertes por otras causas y supervivencia de 4,5 años después del comienzo del experimento están también representadas. La comparación de las proporciones se realizó usando la prueba exacta de Fisher (Software GraphPad)

3 Desarrollo en el tamaño de las patas infectadas de ratones BALB/c (n=7/grupo) tratados con solución salina o vacuna de FML-saponina y expuestos a promastigotes infecciosos de *Leishmania (L.) amazonensis*

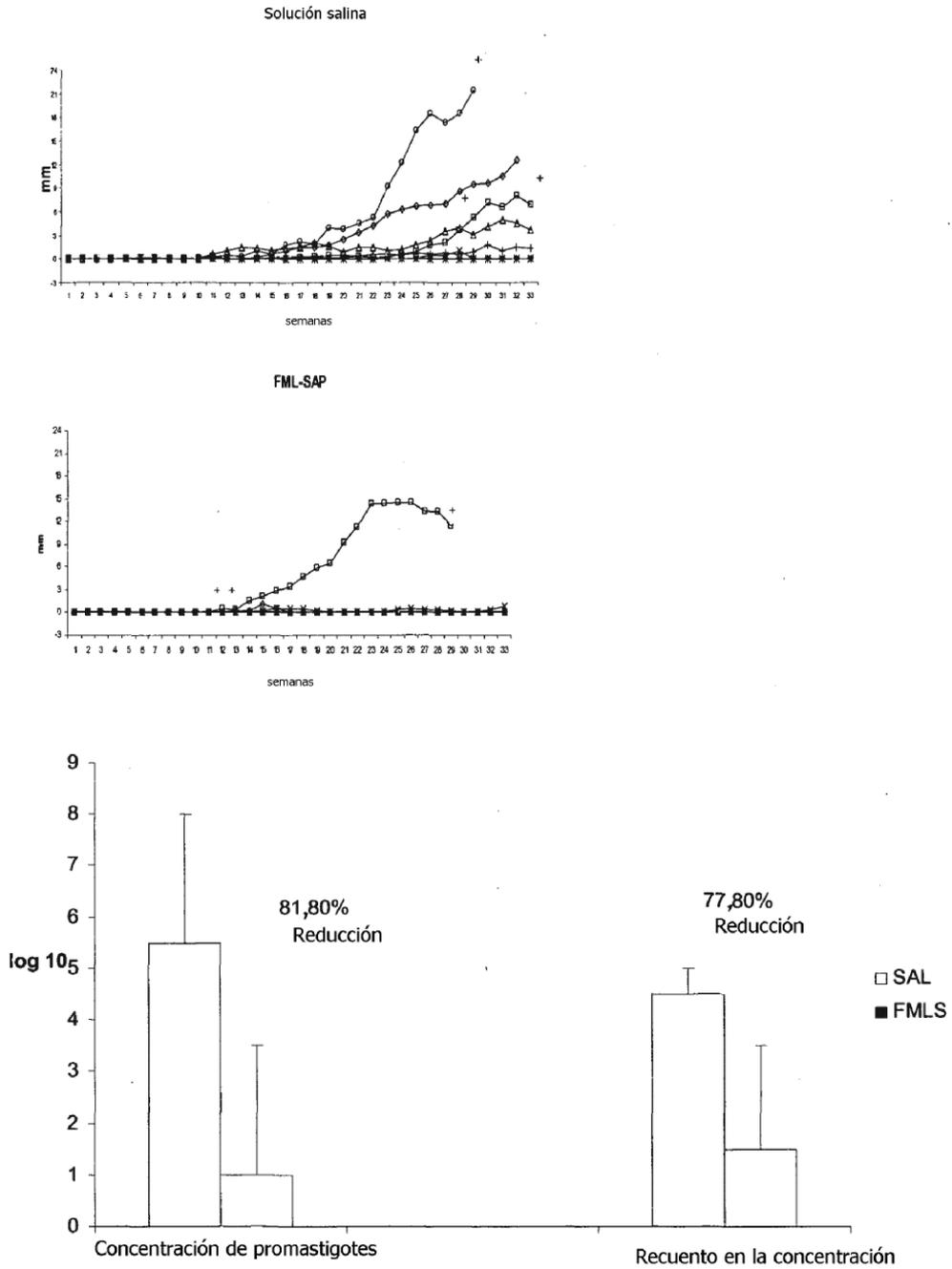


Figura 4: Cuantificación de carga parasitaria en las patas de ratones vacunados con FML-saponina; izquierda, log₁₀ de dilución máxima en la que se evalúan los parásitos (concentración); derecha, log₁₀ número de promastigotes en la dilución equivalente a la concentración.