



Organizacion CSA Ltda

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
INVENTARIO02
167

DELEGATURA PROPIEDAD INDUSTRIAL

División de Nuevas Creaciones

SOLICITUD

PCT**PATENTE DE INVENCION**

ENTRADA EN FASE NACIONAL

07-9647821. **EXPEDIENTE No.**54. **TÍTULO** COMPOSICIÓN QUE COMPRENDE LA REGIÓN N-TERMINAL DE LA HISTONA

H2B DE LEISHMANIA - USO PARA INDUCIR UNA RESPUESTA INMUNITARIA

51. **CLASIFICACION INTERNACIONAL**71. **SOLICITANTE** INSTITUT PASTEUR y INSTITUT PASTEUR DE TUNIS**DOMICILIO** PARIS, FRANCIA; BEL-VEDERE, TÚNEZ.74. **APODERADO** JUAN PABLO CADENA SARMIENTO22. **SANTAFE DE BOGOTA, D.C.**

PETITORIO

AS: 105.147



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 07-096478- -00000-0000

Fecha: 2007-09-18 16:30:17 Dep. 2020 NUECREACIONE
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act 411 PRESENTACION Folios: 101

FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE PCT ENTRADA EN FASE NACIONAL

18/10

1

SOLICITUD DE:



Patente de Invención.



Patente de Modelo de Utilidad.



Capítulo I.



Capítulo II.

2

**SOLICITANTE
(71)**

Nombre: INSTITUT PASTEUR y INSTITUT PASTEUR DE TUNIS

Dirección: 26-28, Rue Du Docteur Roux, F-75724 Paris Cedex 15, Francia; 13, place Pasteur, 1002 Tunis Belvedere, Túnez (Respectivamente).

Nacionalidad o Domicilio: Francia y Túnez (Respectivamente).

Lugar de Constitución: Francia y Túnez (Respectivamente).

Teléfono:

Fax:

E-mail

IDENTIFICACIÓN

C.C.



NIT



C.E.



Otro



Cual

Número

3

**REPRESENTANTE
O APODERADO**

Nombre: JUAN PABLO CADENA SARMIENTO

Dirección: Cra. 7 No. 71-21 Torre B – Piso 4, Bogotá, Colombia.

Teléfono: 744-2200

Fax: 742-2200

E-mail:

IDENTIFICACIÓN

C.C.



NIT



C.E.



Otro



Cual

Número 80.410.337 TP 57492

4

**INVENTOR (ES)
(72)**

Nombre: Mehdi CHENIK, Hechmi LOUZIR, Koussay DELLAGI.

Dirección: 31 avenue de la République, 2070 La Marsa, TN; 12 avenue Taieb Méhiri, 2070 La Marsa, TN; 6, rue Florian, Tunis-Babsaadoun, TN (Respectivamente).

Nacionalidad o Domicilio: Túnez (Respectivamente).

5 PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/FR2006/000597

Fecha 17-03-2006

Publicación Internacional No. WO 2006/097642 A2

Fecha 21-09-2006

6 Título (54): COMPOSICIÓN QUE COMPRENDE LA REGIÓN N-TERMINAL DE LA HISTONA H2B DE LEISHMANIA - USO PARA INDUCIR UNA RESPUESTA INMUNITARIA

7 Clasificación Internacional (51): A61K39/008; C07K14/44

8 Prioridad

SI ☒

NO ☐

(33) País de Origen

FR

(32) Fecha

18-03-2005

(31) Número de Solicitud

5002725

9 Comprobante de pago No. 07-62.567

Fecha 18-09-2007

Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario, ver reverso de esta página.

10

ANEXOS

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud. \$482000
- ☐ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☐ Poderes, si fuere el caso.
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- ☐ Declaraciones
- ☒ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☐ Copia del examen preliminar efectuado por la IPEA.
- ☐ Traducción del examen preliminar efectuado por la IPEA.
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☒ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.
- ☐ Arte final 12x12.
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☒ Otros Tarjeta de Propietarios

Listado de Secuencias
Documentos PCT

11 FIGURA CARACTERÍSTICA:

12 Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: JUAN PABLO CADENA SARMIENTO

FIRMA:

C.C. 80.410.337 de Usaquén TP 57492 del C.S.J.

Instrucciones para la presentación de los anexos, ver reverso de esta página.

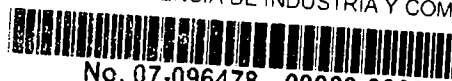
3

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 07 - 62,567
FECHA : AGOSTO 3 DE 2007

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 07-096478- -00000-0000

Fecha: 2007-09-18 16:30:17 Dep. 2020 NUECREACION
Tra 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act 411 PRESENTACION Folios: 101

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
BRIGARD & CASTRO LTDA	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	51181691	03/08/2007	45,240,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	482,000.00
TOTAL :			\$ 482,000.00

/: CUATROCIENTOS OCHENTA Y DOS MIL PESOS

RESPONSABLE :

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
21 septembre 2006 (21.09.2006)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2006/097642 A2

(51) Classification internationale des brevets :
A61K 39/008 (2006.01) C07K 14/44 (2006.01)

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR2006/000597

(22) Date de dépôt international : 17 mars 2006 (17.03.2006)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
0502725 18 mars 2005 (18.03.2005) FR

(71) Déposants (pour tous les États désignés sauf US) : INSTITUT PASTEUR [FR/FR]; 26-28, Rue Du Docteur Roux, F-75724 Paris Cedex 15 (FR). INSTITUT PASTEUR DE TUNIS [TN/TN]; 13, place Pasteur, 1002 TUNIS BELVEDERE (TN).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : CHENIK, Mehdi [TN/TN]; 31, avenue de la République, 2070 La Marsa (TN). LOUZIR, Hechmi [TN/TN]; 12, avenue Taïeb Méhiri, 2070 La Marsa (TN). DELLAGI, Koussay [TN/TN]; 6, rue Florian, Tunis-Babsaadoun (TN).

(74) Mandataire : ERNEST GUTMANN-YVES PLASSER-AUD SAS; 3, rue Auber, F-75009 Paris (FR).

(81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de protection nationale disponible) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de protection régionale disponible) : ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée :

- sans rapport de recherche internationale, sera republiée dès réception de ce rapport
- avec une (des) indication(s) relative(s) à du matériel biologique déposé, fournie(s) selon la règle 13bis, séparément, et non avec la description

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.

(54) Title: COMPOSITION COMPRISING THE N-TERMINAL REGION OF LEISHMANIA HISTONE H2B, USE THEREOF FOR INDUCING AN IMMUNE RESPONSE

(54) Titre : COMPOSITION COMPRENANT LA REGION N-TERMINALE D'HISTONE H2B DE LEISHMANIA - UTILISATION POUR INDUIRE UNE REPONSE IMMUNITAIRE

(57) Abstract: The invention concerns an immunogenic composition comprising: i) an antigenic polypeptide consisting of a fragment of the protein histone H2B of Leishmania, said fragment including the N-terminal region of said protein histone H2B, and ii) an adjuvant stimulating the immune response.

(57) Abrégé : La présente invention concerne une composition immunogène comprenant : i) un polypeptide antigénique consistant en un fragment de la protéine histone H2B de Leishmania, ledit fragment comprenant la région N-terminale de ladite protéine histone H2B, et ii) un adjuvant stimulant la réponse immunitaire.

WO 2006/097642 A2

**Composition comprenant la région N-terminale d'histone H2B de
Leishmania – Utilisation pour induire une réponse immunitaire**

La présente invention concerne une composition immunogène
5 comprenant : i) un polypeptide antigénique consistant en un fragment de la
protéine histone H2B de *Leishmania*, ledit fragment comprenant tout ou
partie de la région N-terminale de ladite protéine histone H2B, et ii) un
adjuvant stimulant la réponse immunitaire.

10 La présente invention concerne également un polypeptide consistant
en un fragment de la protéine histone H2B de *Leishmania*, ledit fragment
comprenant tout ou partie de la région N-terminale de ladite protéine
histone H2B, un polypeptide variant conservant au moins 50% d'identité, de
préférence au moins 80% d'identité avec ledit polypeptide, et une molécule
15 d'acide nucléique codant le polypeptide ou le polypeptide variant.

L'invention concerne aussi un vaccin permettant d'obtenir une
protection contre une infection par *Leishmania*, dont le principe actif
comprend le polypeptide, le polypeptide variant ou la molécule d'acide
20 nucléique selon la présente demande, et un vecteur d'expression capable
d'exprimer le polypeptide ou le polypeptide variant, comprenant la molécule
d'acide nucléique.

Les leishmanioses constituent un groupe hétérogène de pathologies
25 qui affectent plusieurs millions d'individus et sont dues à l'infection de l'hôte
animal ou humain par un parasite protozoaire du genre *Leishmania*
(Desjeux et coll, 1996). L'expression clinique de l'infection est caractérisée
par un grand polymorphisme incluant l'infection asymptomatique, les
formes cutanées simples ou récidivantes, les formes cutanées diffuses ou
30 anergiques, les formes cutanéomuqueuses et les formes viscérales
mortelles en l'absence de traitement spécifique (WHO Expert Committee,

1990). Durant son cycle, le parasite alterne entre deux stades : le stade promastigote flagellé qui se trouve dans le tube digestif de l'insecte vecteur et le stade amastigote dans le macrophage de l'hôte mammifère.

5 La mise au point d'un vaccin anti-leishmanien est envisageable car il a été clairement démontré chez l'homme, que l'infection par *Leishmania* confère une immunité protectrice à la réinfection (Guirges et coll, 1971 ; Davies et coll, 1995). Cette protection est associée au développement d'une réponse immune cellulaire spécifique du parasite.

10

Plusieurs candidats vaccins ont été évalués contre l'infection par le parasite *Leishmania*, aussi bien dans le modèle murin que chez l'homme.

15 A l'heure actuelle, aucun vaccin à usage humain ou vétérinaire n'a montré une efficacité significative dans la protection contre les leishmanioses (Sharifi et coll, 1998 ; Khalil et coll, 2000; De Luca et coll, 2001; Armijos et coll, 2004).

20 Ces vaccins peuvent être distingués en trois groupes : les vaccins de première génération sont constitués de promastigotes tués par la chaleur ou par irradiation ; malgré leur innocuité, l'efficacité de ces vaccins n'a pas encore été prouvée (Sharifi et coll, 1998 ; Khalil et coll, 2000; De Luca et coll, 2001; Armijos et coll, 2004).

25 Les vaccins de deuxième génération, sont constitués de protéines natives obtenues par purification biochimique, de protéines recombinantes et de peptides synthétiques obtenus par génie génétique. Plusieurs protéines ont été décrites dans la littérature comme induisant une protection significative dans le modèle expérimental murin. Les plus
30 importantes sont représentées par la polyprotéine Leish-111f composée de 3 protéines fortement immunogènes placées en tandem, le LeIF

(*Leishmania* elongation initiation factor) , la protéine LmSTI1(*L. major* stress-inducible protein) et la protéine TSA (thiol-specific antioxidant). Plusieurs travaux, ont permis de montrer que chacune de ces protéines testées individuellement ou associée à l'IL-12 est capable d'induire un
5 ralentissement très significatif de l'évolution de la maladie chez les souris BALB/c infectées par *L. major* (Skeiky et coll, 1998 ; Coler et coll, 2002; Skeiky et coll, 2002; Campos-Neto et coll, 2002). La protéine LACK (leishmanial homolog of receptor for activated c kinase) en présence de l'IL-12 est également capable de conférer une protection des souris BALB/c
10 contre un challenge virulent par *L. major* (Gurunathan et coll, 1997). Enfin, l'antigène PSA-2 purifié à partir de *Leishmania* confère aux souris une bonne protection (Handman, 1995).

Les vaccins de troisième génération comprennent les vaccins à base
15 d'ADN contenant un ou plusieurs gènes codant pour des antigènes leishmaniens (Iborra et coll, 2003; Campbell et coll, 2003; Ramiro et coll, 2003 ; Dumonteil et coll, 2003).

Les vaccins de troisième génération comprennent également les
20 leishmanies dont le pouvoir pathogène a été atténué génétiquement par la délétion de gènes de virulence. On citera le cas des leishmanies délétées du gène codant pour la dihydrofolate reductase thymidilate synthétase (dhfr-ts^r). Plusieurs études ont montré dans le modèle murin que la vaccination des souris par ces parasites dhfr-ts^r pouvait induire une
25 protection partielle contre l'infection par *Leishmania* (Brodskyn et coll, 2000; Streit et coll, 2001). Il est également possible d'inclure dans les vaccins de troisième génération, les vaccins à base de peptides synthétiques. Plusieurs essais de vaccination ont été réalisés avec différents peptides incluant généralement des épitopes T. L'exemple le plus connu est celui du
30 peptide PT3 qui correspond à « l'histidine zinc binding region » de la gp63. Ainsi, ce peptide en présence d'un adjuvant « poloxamer 407 » est capable

de conférer une protection durable des souris sensibles BALB/c, suite à un challenge par *L. major* (Spitzer et al, 1999).

Certains auteurs se sont intéressés aux protéines histones : le premier travail remonte à 1999, dans lequel Soto et coll (1999) ont montré que la protéine H2B pouvait constituer une cible de la réponse anticorps au cours de la leishmaniose canine. Plus tard Maalej et coll ont évalué la protéine H2B, en comparaison avec d'autres protéines parasitaires, la proposant comme antigène pour le diagnostic sérologique de la leishmaniose viscérale humaine et ont montré qu'elle pourrait constituer une cible intéressante (Maalej et coll, 2003).

Concernant la réponse cellulaire, Probst et coll (2001) ont montré que la protéine H2B, sous sa forme recombinante, était capable d'induire une forte prolifération de cellules mononuclées de sang périphérique (PBMC) chez des patients ayant guéri d'une leishmaniose cutanée causée par *L. major*. Cette prolifération était accompagnée d'une importante production IFN- γ avec absence d'IL-4 (Probst et coll 2001).

Dans le modèle murin de la leishmaniose viscérale (LV) causée par *L. donovani*, Melby et coll (2000), ont montré que la vaccination de souris sensibles BALB/c, par une fraction de DNA vaccins obtenus à partir d'une banque cDNA, contenant notamment H2B, était capable de protéger partiellement ces souris après un challenge virulent par *L. donovani*.

Très récemment, dans le modèle de la leishmaniose expérimentale d'infection des souris BALB/c par *L. major*, Iborra et coll, (2004) ont montré que la vaccination des souris par un cocktail d'ADN vaccin codant pour les protéines histones (H2A, H2B, H3 et H4) induisait une importante réponse immune de type Th1 avec sécrétion d'INF γ associée à une protection partielle des souris vaccinées suite à un challenge par *L. major*.

Par ailleurs, il a été démontré que le parasite *Leishmania* est capable d'induire l'activation des cellules T régulatrices (Belkaid et coll, 2002), qui vont supprimer les réponses immunes effectrices et permettre la multiplication et la persistance du parasite.

Des données concordantes suggèrent que les cellules T régulatrices sont sélectionnées positivement après une forte interaction avec les peptides du soi (TCR-CMH-peptide) (Gavin et Rudensky, 2003).

10

Les inventeurs se sont intéressés à la protéine histone H2B comme candidat vaccin. Plus précisément, ils ont tout d'abord émis l'hypothèse que certaines régions conservées des protéines parasitaires pourraient activer préférentiellement les cellules régulatrices alors que les séquences divergentes activeraient les cellules effectrices, et également, qu'une même protéine parasitaire pourrait contenir des peptides inducteurs de réponses régulatrices et d'autres inducteurs de réponses effectrices.

15

Les inventeurs ont analysé comparativement l'immunogénicité et le rôle protecteur des deux régions amino-terminale, divergente, et carboxy-terminale, conservée, de la protéine recombinante H2B de *L.major* ainsi que de la protéine entière.

20

Ils se sont aperçus que, de façon surprenante, la partie amino-terminale (divergente) de H2B, adjuvée au CpG, confère la meilleure protection des souris sensibles BALB/c contre un challenge virulent par *L. major*. Cette protéine tronquée pourrait constituer un bon candidat vaccin contre les leishmanioses.

25

L'invention porte sur une composition immunogène caractérisée en ce qu'elle comprend : i) un polypeptide antigénique consistant en un

30

fragment de la protéine histone H2B de *Leishmania*, ledit fragment comprenant tout ou partie de la région N-terminale de ladite protéine histone H2B, et ii) un adjuvant stimulant la réponse immunitaire.

5 Dans un mode de réalisation particulier de l'invention, le principe actif immunogène de ladite composition immunogène consiste en ledit polypeptide antigénique consistant en un fragment dérivé de la seule partie N-terminale de la protéine histone H2B de *Leishmania*.

10 Le terme « fragment » appliqué à un polypeptide ou plus particulièrement à un antigène, vise une partie de la protéine native considérée, excluant la totalité de ladite protéine.

15 La partie N-terminale d'un polypeptide natif, par exemple de la protéine histone H2B de *Leishmania* représente de façon générale moins de la moitié de la séquence d'acides aminés totale de ce polypeptide, la séquence retenue étant celle de l'extrémité N-terminale.

20 Dans un exemple spécifique, le polypeptide selon l'invention a une séquence polypeptidique de moins de 65 acides aminés, de préférence moins de 50 acides aminés. Le polypeptide a dans ce cadre une séquence comprenant au moins 6 acides aminés consécutifs de la partie N-terminale de l'antigène H2B considéré.

25 Dans un exemple spécifique, la longueur de la séquence dudit polypeptide représente 10 à 45% de la longueur de la protéine histone.

La séquence d'acides aminés d'un polypeptide selon l'invention est par exemple la suivante : M A S S R S A S R K A S N P H
30 K S H R K P K R S W N V Y V G R S L K A I N A
Q M S M S H R T.

Dans un exemple spécifique, le polypeptide est caractéristique de l'histone H2B de *Leishmania major*.

- 5 Le polypeptide peut être également caractéristique de la protéine histone H2B de *L. Infantum*, *L. Donovanii*, *L. Tropica*, *L. Enrietti*.

Les séquences des protéines histone H2B de ces parasites ont été décrites : H2B de *L. Infantum* a été décrite dans Soto M. et al, 1999 ;
10 Antigenicity of the *Leishmania infantum* histones H2B and H4 during canine viscerocutaneous leishmaniasis ; Journal Clin. Exp. Immunol. 115(2), 342-349 (1999) ; H2B *L. Enrietti* a été décrite dans Genske J. E. et al ; 1991 ; Structure and regulation of histone H2B mRNAs from *Leishmania enrietti* ; Mol. Cell. Biol. 11(1), 240-249 (1991).

15

Les séquences protéiques H2B de *L. Donovanii* et *L. Tropica* n'ont pas encore été décrites. Cependant, la conservation attendue au niveau des protéines histones H2B de *Leishmania* devrait être supérieure à 80%.

- 20 De manière générale, le polypeptide peut être caractéristique d'une espèce choisie dans l'ensemble du genre *Leishmania*.

Dans un exemple spécifique, le polypeptide compris dans la composition immunogène selon l'invention est un polypeptide purifié ou
25 isolé de son environnement de production.

Dans un exemple spécifique, ladite composition immunogène comprend un ADN sous forme d'une séquence polynucléotidique codant pour le polypeptide selon l'invention. Par exemple, le polynucléotide est
30 inséré dans un plasmide d'expression eucaryote.

Un ou plusieurs acides aminés du polypeptide déterminé à partir d'une protéine histone H2B d'une espèce de *Leishmania*, tel qu'illustré ci-dessus et désigné par l'expression "polypeptide de référence", peuvent être substitués, délétés ou ajoutés pour former un polypeptide variant conservant au moins 50% d'identité, de préférence au moins 80% d'identité avec le polypeptide de référence, ledit polypeptide variant conservant les propriétés immunogènes du polypeptide de référence.

Le pourcentage d'identité entre le polypeptide de référence et le polypeptide variant est déterminé après avoir réalisé un alignement global optimal. Cet alignement peut être notamment obtenu en utilisant l'algorithme « Needleman-Wunsch » (Needleman and Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48 :443-453) ou ClustalW (Higgins & Sharp, a package for performing multiple sequence alignment on a microcomputer, 1988, Dec 15;73(1):237-44).

La notion d'identité signifie qu'un acide aminé à une position déterminée dans le polypeptide de référence est identique à un acide aminé correspondant dans le polypeptide variant ayant fait l'objet d'un alignement par rapport au polypeptide de référence.

Le fait que la séquence du polypeptide de référence soit n% identique à la séquence du polypeptide variant signifie que n% des positions de l'alignement global optimal entre les deux séquences consistent en des acides aminés identiques.

L'expression « propriétés immunogènes d'un polypeptide » signifie que le polypeptide est capable de provoquer, seul ou en association avec un adjuvant de l'immunité ou une molécule porteuse si besoin, une réaction immunitaire, notamment une réponse immunitaire de type cellulaire, par exemple une réponse des cellules T CD4+.

Par exemple, le polypeptide variant a une séquence polypeptidique de moins de 75 acides aminés, de préférence moins de 60 acides aminés.

- 5 A titre illustratif, les polypeptides variants peuvent comporter des substitutions conservatives d'acides aminés dans la séquence de l'histone H2B de *Leishmania* illustrée ci-dessus.

- 10 Un ou plusieurs acides aminés du polypeptide de référence, peuvent être substitués, délétés ou ajoutés pour former un polypeptide variant conservant au moins 50% de similarité, de préférence au moins 80% de similarité avec le polypeptide de référence, ledit polypeptide variant conservant les propriétés immunogènes du polypeptide de référence.

- 15 Par opposition à la notion d'identité, la notion de similarité concerne des acides aminés identiques, et des acides aminés différents mais donnant lieu à un polypeptide qui conserve les propriétés immunogènes du polypeptide de référence ; ou seulement de tels acides aminés différents.

- 20 Le fait que la séquence du polypeptide de référence soit n% similaire à la séquence du polypeptide variant signifie que n% des positions de l'alignement global optimal entre les deux séquences consistent en des acides aminés identiques, et des acides aminés différents dont la présence dans le polypeptide ne modifie pas sensiblement ses propriétés
25 immunogènes ; ou seulement de tels acides aminés différents.

En particulier, les substitutions dans le polypeptide sont des substitutions conservatives.

- 30 Une substitution conservative est toute substitution ayant un score positif dans la matrice de substitution Blosum62, « blosum62 substitution matrix »,

(Henikoff and Henikoff, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 : 10915-10919).

Un autre mode de réalisation des variants polypeptidiques fait appel
5 à la préparation de peptides de la protéine histone H2B considérée, lesdits peptides ayant par exemple des séquences peptidiques comportant de 6 à 30, par exemple de 6 à 20 ou de 6 à 15 acides aminés, choisies à partir de la séquence N-terminale de la protéine histone.

10 Les peptides peuvent être utilisés en mélanges, y compris sous la forme de mixotopes. Les mélanges peptidiques comprennent par exemple au moins 2 ou au moins 5 séquences peptidiques différentes les unes des autres ou au contraire ayant des acides aminés consécutifs en commun.

15 Les polypeptides (y compris les peptides) de l'invention sont préparés par toutes méthodes connues de l'homme du métier, par exemple par synthèse chimique, ou expression dans un système cellulaire, notamment bactérien, ou *in vitro* dans un système "cell free".

20 Le terme « adjuvant » signifie toute substance ou composé capable de promouvoir ou d'augmenter la réponse immunitaire contre un principe actif déterminé dans un mammifère, par comparaison avec la réponse immunitaire obtenue dans les mêmes conditions en administrant le principe actif seul.

25 Dans un exemple spécifique de réalisation de l'invention, l'adjuvant favorise une réponse immunitaire de type cellulaire. L'adjuvant est par exemple le CpG ou tout autre adjuvant autorisé dans un usage vaccinal chez l'homme ou l'animal. La concentration du CpG utilisée pour la
30 vaccination des souris est de 1 µg/µl et la quantité injectée est de 50 µg.

Dans un exemple spécifique, la composition immunogène selon l'invention, comprend en outre au moins un autre antigène de *Leishmania* ayant des propriétés immunogènes pour déclencher et/ou favoriser une réponse immunitaire, de type B et/ou T chez un hôte humain ou animal.

5

La composition immunogène selon l'invention peut comprendre en outre au moins un polypeptide consistant en un fragment d'au moins une protéine histone supplémentaire de *Leishmania*.

10

Ledit fragment d'une protéine histone est choisi notamment parmi les protéines histones H2A, H3 et H4. La protéine histone est par exemple caractéristique de *L. Major*, *L. Infantum*, *L. Donovanii*, *L. Tropica*, *L. Enrietti*. De manière générale, la protéine Histone peut être caractéristique d'une espèce choisie dans l'ensemble du genre *Leishmania*.

15

Ledit fragment peut par exemple comprendre tout ou une partie de la région N-terminale de ladite protéine histone. Ledit fragment a par exemple, une séquence polypeptidique de moins de 65 acides aminés, de préférence moins de 50 acides aminés.

20

Dans un exemple spécifique, la longueur de la séquence dudit fragment représente 10 à 45% de la longueur de la protéine histone.

25

La composition immunogène selon l'invention peut comprendre alternativement au moins une protéine histone entière de *Leishmania*, en association avec le polypeptide antigénique de l'histone H2B décrit plus haut.

30

Ladite au moins une protéine histone entière est choisie notamment parmi H2A, H3 et H4. Elle peut être caractéristique de *L. Major*, *L. Infantum*, *L. Donovanii*, *L. Tropica*, *L. Enrietti*. De manière générale, ladite

au moins une protéine histone entière peut être caractéristique d'une espèce choisie dans l'ensemble du genre *leishmania*.

Ladite composition immunogène peut être injectée comme telle, ou
5 avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable. La composition immunogène selon l'invention peut donc comprendre en outre un véhicule pharmaceutiquement acceptable pouvant être administré à un hôte humain ou animal. Un véhicule pharmaceutiquement acceptable pourra être
10 facilement choisi par l'homme du métier parmi l'eau, des substances polaires telles que l'éthylène glycol, le polyéthylène glycol, ou le propylène glycol, ainsi que des substances non polaires.

Selon un mode de réalisation particulier de l'invention, la composition immunogène est capable d'induire une réponse immunitaire de
15 type cellulaire des cellules T effectrices, par exemple les cellules CD4+ lorsqu'elle est administrée à un humain ou à un animal.

Les cellules T comportent des cellules effectrices de l'immunité à médiation cellulaire (par exemple les cellules T CD4+ ou CD8+) ainsi que
20 des cellules régulatrices (« helper » et suppressives) des réponses immunitaires. Le polypeptide selon l'invention active préférentiellement les cellules effectrices de l'immunité à médiation cellulaire.

Dans la présente invention, la réponse immunitaire de type cellulaire
25 peut être notamment une réponse immunitaire de type Th1.

Le polypeptide ou le polypeptide variant est présent, dans la composition immunogène selon l'invention, dans une concentration comprise entre 0,01 µg/µl et 5 µg/µl, par exemple entre 0,01 µg/µl et 2
30 µg/µl, ou entre 0,4 µg/µl et 1 µg/µl.

L'invention porte également sur un polypeptide consistant en un fragment de la protéine histone H2B de *Leishmania*, ledit fragment comprenant tout ou une partie de la région N-terminale de ladite protéine histone H2B.

5

Dans un exemple spécifique, le polypeptide est caractéristique de l'histone H2B de *Leishmania major*.

Le polypeptide peut être caractéristique de la protéine histone H2B de *L. Infantum*, *L. Donovanii*, *L. Tropica*, *L. Enrietti*. De manière générale, le polypeptide peut être caractéristique d'une espèce choisie parmi l'ensemble du genre *Leishmania*.

Dans un exemple spécifique, le polypeptide selon l'invention a une séquence polypeptidique de moins de 65 acides aminés, de préférence moins de 50 acides aminés.

Dans un exemple spécifique, le polypeptide selon l'invention a une séquence polypeptidique de moins de 65 acides aminés, de préférence moins de 50 acides aminés. Le polypeptide a dans ce cadre une séquence comprenant au moins 6 acides aminés consécutifs de la partie N-terminale de l'antigène H2B considéré.

La longueur de la séquence dudit polypeptide représente par exemple 10 à 45 % de la longueur de la protéine histone.

Dans un exemple spécifique, le polypeptide selon l'invention comprend les 50 premiers acides aminés de la protéine histone H2B, plus particulièrement les 46 premiers acides aminés de la protéine histone H2B, comme représenté figure 1.

La séquence d'acides aminés d'un polypeptide selon l'invention est par exemple la suivante : M A S S R S A S R K A S N P H K S H R K P K R S W N V Y V G R S L K A I N A Q M S M S H R T.

5

Dans un exemple spécifique, le polypeptide selon l'invention est un polypeptide purifié ou isolé de son environnement de production.

L'invention a également pour objet un polypeptide variant conservant au moins 50% d'identité, de préférence au moins 80% d'identité avec le polypeptide selon l'invention. Ledit polypeptide variant présente une substitution, une délétion ou une addition, d'au moins un acide aminé, par rapport à la séquence dudit polypeptide et conserve les propriétés immunogènes dudit polypeptide.

15

Le polypeptide variant a une séquence polypeptidique de moins de 75 acides aminés, de préférence moins de 60 acides aminés.

A titre illustratif, les polypeptides variants peuvent comporter des substitutions conservatives d'acides aminés dans la séquence de l'histone H2B de *Leishmania* illustrée ci-dessus.

Un autre mode de réalisation des variants polypeptidiques fait appel à la préparation de peptides de la protéine histone H2B considérée, lesdits peptides ayant par exemple des séquences peptidiques comportant de 6 à 30, par exemple de 6 à 20 ou de 6 à 15 acides aminés, choisies à partir de la séquence N-terminale de la protéine histone.

Les peptides peuvent être utilisés en mélanges, y compris sous la forme de mixotopes. Les mélanges peptidiques comprennent par exemple

au moins 2 ou au moins 5 séquences peptidiques différentes les unes des autres ou au contraire ayant des acides aminés consécutifs en commun.

Les polypeptides (y compris les peptides) de l'invention sont
5 préparés par toutes méthodes connues de l'homme du métier, par exemple par synthèse chimique, ou expression dans un système cellulaire, notamment bactérien, ou *in vitro* dans un système "cell free".

L'invention porte également sur une molécule d'acide nucléique
10 codant le polypeptide ou le polypeptide variant selon l'invention.

La séquence nucléotidique de ladite molécule d'acide nucléique peut être la suivante ou une partie de cette séquence : ATG GCC TCT TCT
CGC TCT GCT TCC CGC AAG GCT TCC AAC CCG CAC AAG TCG CAC
15 CGC AAG CCG AAG CGC TCG TGG AAC GTG TAC GTG GGC CGC
TCG CTG AAG GCG ATC AAC GCC CAG ATG TCG ATG TCG CAC CGC
ACG.

L'invention concerne également un vaccin permettant d'obtenir une
20 protection contre une infection par *Leishmania*.

Le principe actif dudit vaccin comprend le polypeptide, le polypeptide variant, ou la molécule d'acide nucléique selon l'invention. Dans un exemple spécifique, le vaccin comprend en outre un adjuvant stimulant la
25 réponse immunitaire lorsqu'il est administré à un hôte humain ou animal, et de façon générale, ledit vaccin est préparé à partir d'une composition immunogène selon l'invention, décrite ci-dessus.

Le terme « vaccin » signifie une préparation antigénique permettant
30 de réaliser la prévention d'infections microbiennes par vaccination d'un

hôte. Le vaccin selon l'invention peut alternativement être préparé pour conduire à une activité thérapeutique contre l'infection.

L'adjuvant favorise par exemple une réponse immunitaire de type
5 cellulaire et dans le cas de la présente invention peut être le CpG.

Ledit vaccin peut être administré, par exemple injecté comme tel, ou avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable. Un véhicule pharmaceutiquement acceptable pourra être choisi facilement par l'homme
10 du métier parmi l'eau, des substances polaires telles que l'éthylène glycol, le polyéthylène glycol, ou le propylène glycol, ainsi que des substances non polaires.

Dans un exemple spécifique, le vaccin comprend au moins un autre
15 antigène de *Leishmania* ajouté en tant que principe actif, ledit antigène ayant des propriétés immunogènes pour déclencher et/ou favoriser une réponse immunitaire, de type B et/ou T chez un hôte humain ou animal.

Le vaccin peut comprendre en outre au moins un polypeptide
20 consistant en un fragment d'au moins une protéine histone différente de H2B de *Leishmania* ou une molécule d'acide nucléique codant pour ledit ou lesdits polypeptide(s), ou peut comprendre en outre au moins une protéine histone entière de *Leishmania*, en association avec le polypeptide antigénique de l'histone H2B décrit plus haut, ou une molécule d'acide
25 nucléique codant pour ladite ou lesdites protéine(s) histone(s) entière(s).

Ledit fragment d'une protéine histone est choisi notamment parmi les protéines histones H2A, H3 et H4. De manière générale, ladite au moins une protéine histone peut être caractéristique d'une espèce choisie dans
30 l'ensemble du genre *leishmania*. Ladite au moins une protéine histone est

par exemple caractéristique de *L. Major*, *L. Infantum*, *L. Donovanii*, *L. Tropica*, *L. Enrietti*.

5 Ledit fragment peut par exemple comprendre tout ou une partie de la région N-terminale de ladite protéine histone. Ledit fragment a par exemple, une séquence polypeptidique de moins de 65 acides aminés, de préférence moins de 50 acides aminés.

10 Dans un exemple spécifique, la longueur de la séquence dudit fragment représente 10 à 45% de la longueur de la protéine histone.

Le vaccin selon l'invention peut être utilisé pour prévenir ou traiter une infection par *Leishmania major* lorsqu'il est administré à un humain ou à un animal.

15

Le vaccin selon l'invention est capable d'induire une réponse immunitaire de type cellulaire des cellules T effectrices, par exemple les cellules CD4+ lorsqu'elle est administrée à un humain ou à un animal.

20 Les cellules T comportent des cellules effectrices de l'immunité à médiation cellulaire (par exemple les cellules T CD4+ ou CD8+) ainsi que des cellules régulatrices (« helper » et suppressives) des réponses immunitaires. Le polypeptide selon l'invention active préférentiellement les cellules effectrices de l'immunité à médiation cellulaire.

25

Cette réponse immunitaire de type cellulaire peut être notamment une réponse immunitaire de type Th1.

30 Il est connu que le CpG est capable d'activer les monocytes, les macrophages et les cellules dendritiques. Ainsi, le CpG injecté en même

temps qu'un antigène peut orienter la réponse immune spécifique vers le type Th1.

Les voies d'administration du vaccin selon l'invention sont diverses et comprennent les voies intraveineuse, orale, transdermale et nasale ; cependant les voies intramusculaire et sous-cutanée sont les plus courantes.

Le principe actif du vaccin selon l'invention est présent en quantité suffisante. L'expression « quantité suffisante » signifie une quantité ou une concentration en principe actif capable d'engendrer une protection immunitaire contre les Leishmanioses. Eventuellement, les directives pour la vaccination peuvent prescrire l'administration répétée de doses de vaccin.

15

Le polypeptide, ou le polypeptide variant ou la molécule d'acide nucléique, est présent dans le vaccin, selon l'invention, dans une concentration comprise entre 0,01 µg/µl et 5 µg/µl, par exemple entre 0,01 µg/µl et 2 µg/µl, ou entre 0,4 µg/µl et 1 µg/µl.

20

L'invention concerne enfin un vecteur d'expression capable d'exprimer le polypeptide ou le polypeptide variant selon l'invention, comprenant une molécule d'acide nucléique selon l'invention.

25

Le terme « vecteur d'expression » signifie le moyen par lequel des acides nucléiques, notamment de l'ADN, de l'ADN complémentaire, de l'ARN ou leur variant, sont introduits dans une cellule, particulièrement une cellule procaryote, pour exprimer ou produire une protéine déterminée.

30

Dans le but d'exprimer une certaine protéine ou un certain polypeptide, le vecteur d'expression peut contenir au moins un promoteur,

au moins un opérateur, au moins un codon de terminaison, ainsi que toutes séquences nécessaires à une transcription efficace et à une traduction des acides nucléiques à partir du vecteur. L'ensemble de ces éléments est connu de l'homme du métier.

5

L'invention a aussi pour objet des cellules hôtes, par exemple procaryotes, notamment bactériennes, transformées ou transfectées par un vecteur d'expression comprenant un polynucléotide codant pour le polypeptide selon l'invention, dans des conditions permettant son

10

L'invention a aussi pour objet un plasmide pET-CH2B contenant la séquence de la partie carboxy-terminale de la protéine H2B, déposé à la Collection Nationale de Cultures de Micro-organismes (CNCM) sous le n° I-3362, le 24 février 2005.

15

L'invention a aussi pour objet un plasmide pET-NH2B contenant la séquence de la partie amino-terminale divergente de la protéine H2B, déposé à la Collection Nationale de Cultures de Micro-organismes (CNCM) sous le n° I-3363, le 24 février 2005.

20

L'invention a aussi pour objet un plasmide pET-H2B contenant la séquence de la protéine H2B, déposé à la Collection Nationale de Cultures de Micro-organismes (CNCM) sous le n° I-3361, le 24 février 2005.

25

30

LEGENDE DES FIGURES

Figure 1: La séquence nucléotidique et protéique de l'histone H2B de *L. major*. Les séquences repérées par les notations H2B1 P-ND up, H2B2 X-S rev, H3B P-Nd up et H3B P-Xh rev correspondent aux amorces d'amplification des deux parties h2bΔC65(1-138pb) (N-terminale) et h2bΔN46(139-333pb) (C-terminale) de la protéine.

Figure 2 : Analyse de l'expression et de la purification des protéines histones recombinantes H2BΔC65 (A), H2BΔN46 (B) et H2B (C) de *L. major* sur gel de polyacrylamide à 18% après coloration au bleu de Commassie.

Puits 1 : extraits brut de bactéries BL21 transformées par les plasmides recombinants respectifs et non induites à l'IPTG.

Puits 2 : extrait brut de bactéries BL21 transformées par les plasmides recombinants respectifs et induites à l'IPTG.

Puits 3 : protéines histones recombinantes purifiées sur colonne de Nickel (H2B, H2BΔC65 et H2BΔN46 de *L. major*).

Puits PM : marqueurs de poids moléculaires.

Figure 3: Analyse par immunoblot de la réactivité des anticorps polyclonaux anti-H2B de lapin vis-à-vis des protéines histones recombinantes H2B, H2BΔC65 et H2BΔN46 de *L. major* après purification sur colonne de Nickel.

Puits 1: Extrait brut de bactéries BL21 transformées par les plasmides recombinants respectifs et non induites à l'IPTG.

Puits 2, 3, 4: Protéines histones recombinantes purifiées sur colonne de Nickel (H2B, H2BΔC65 et H2BΔN46 de *L. major*).

Figure 4: Représentation graphique de l'évolution du diamètre des lésions chez les souris BALB/c contrôle (PBS) ou immunisées par H2B (H2B-CpG)

ou juste la partie amino terminale de H2B (H2BDC65-CpG) en présence de 25 ug de CpG/Injection, utilisé comme adjuvant. Les souris ont été infectées, 30 jours après le rappel, par 10^5 promastigotes de *L. major*. Les valeurs représentent la moyenne des lésion exprimées en mm +/- l'écart type.

Figure 5: Détermination de la moyenne du nombre de parasites par ganglion par la technique de dilutions limites chez les différents lots des souris immunisés deux fois en sous cutané, au niveau du coussinet plantaire par H2B+CpG, H2BAC65+CpG et H2BΔN46+CpG. La quantification a été réalisée 8 semaines après le challenge par 10^6 promastigotes de *L. major*. Les résultats sont exprimés par la moyenne du nombre de parasites par ganglion de la dilution la plus forte dans laquelle au moins un promastigote de *L. major* est viable.

Figure 6: Représentation graphique de l'évolution des moyennes des diamètres des lésions (mm) chez les souris BALB/c vaccinées ou non et après un challenge par *L. major* à raison de 10^5 (A) ou 10^6 (B) promastigotes métacycliques.

T+5 ou 6 : groupe contrôle (PBS) après un challenge avec 10^5 (5) ou 10^6 (6) parasites.

N+5 ou 6 : Souris ayant reçu la région amino terminale de H2B

C+5 ou 6 : Souris ayant reçu la région carboxy terminale de H2B

CpG+5 ou 6 : Souris ayant reçu seulement l'adjuvant (CpG)

Les valeurs représentent la moyenne des lésions exprimées en mm +/- l'écart type.

Figure 7: Détermination de la charge parasitaire par la technique de dilutions limites chez les différents lots des souris immunisés trois fois en sou cutané, au niveau du coussinet plantaire par H2BΔN46+CpG, H2BAC65+CpG ainsi que les contrôles CpG. La quantification a été

réalisée 10 semaines après le challenge par 10^5 ou 10^8 promastigotes de *L. major*. Les résultats sont exprimés comme dans la figure 5.

5

EXEMPLES

Matériel et Méthodes

10 Parasites et conditions de culture

La souche parasitaire MHOM/TN/94/GLC94 (GLC94) isolée d'une lésion humaine de leishmaniose cutanée zoonotique (LCZ) et a été utilisée dans le présent travail (Louzir et coll, 1998). Cet isolat appartient à l'espèce *L. major*, zymodème MON25 (Kebaier et coll, 2001). Les parasites ont été cultivés sur milieu NNN à 26°C et progressivement transférés dans du RPMI (SIGMA, St Louis, MO) contenant 2mM de L-Glutamine, 100U/ml de pénicilline, 100µg/ml de streptomycine et 10% de Sérum de Veau Fœtal inactivé (milieu complet). Les promastigotes, pris en phase logarithmique de croissance, sont ajustés à 10^6 parasites/ml dans un volume constant de milieu complet puis incubés à 26°C. La phase stationnaire de croissance est atteinte après 4 à 6 jours de culture avec des densités de parasites allant de 3.10^7 à 8.10^7 parasites/ml. Les promastigotes metacycliques sont ensuite purifiés sur un gradient de Ficoll 5%-20%, lavés, comptés puis injectés aux souris.

Expression et purification des différentes protéines recombinantes dans les bactéries *E. coli* BL21

30 Les séquences codantes pour la protéine histone H2B entière (339pb), la partie amino-terminale (1-46aa) divergente H2BΔC65 (138pb) et la partie

carboxy-terminale (47-111aa) conservée H2bΔN46 (198pb) ont été clonées dans le vecteur d'expression bactérien pET-22b (Novagen) (figure 1). Les bactéries *E. coli* BL21 contenant les plasmides recombinants (pET-22b-H2B, pET-H2BΔC65 et pET-H2BΔN46) ont été cultivées dans du milieu LB puis la synthèse de la protéine recombinante a été induite en présence de 1mM d'isopropyl-1-thio-β-D-galactopyranoside (IPTG) pendant 4 heures. Les protéines recombinantes ont été purifiées par chromatographie d'affinité sur une colonne de nickel (Ni²⁺) (Amersham-Pharmacia). La pureté des protéines produites a été vérifiée par SDS-PAGE (figure 2).

- 10
- Le plasmide pET-CH2B contenant la séquence de la partie carboxy-terminale de la protéine H2B a été déposé à la Collection Nationale de Cultures de Micro-organismes (CNCM) le 24 février 2005 sous le n° I-3362.
- 15
- Description du pET-CH2B : Le plasmide pET-CH2B a été obtenu par clonage dans le plasmide pET-22b+ (Novagen), de la séquence d'ADN complémentaire codant pour la protéine histone H2B tronquée des 46 premiers acides aminés (H2BΔN46) de *Leishmania major*. Le gène H2BΔN46 a été cloné au niveau des sites de restriction NdeI et XhoI de
- 20
- pET-22b+. Des bactéries recombinantes *E. coli* XL1-blue ont été transformées avec pET-CH2B. Elles sont résistantes à la tétracycline et à l'ampiciline. Les gènes de résistance à la tétracycline et à l'ampiciline sont portés par les bactéries XL1-blue et le plasmide pET-22b+ recombinant.
- 25
- Le plasmide pET-NH2B contenant la séquence de la partie amino-terminale divergente de la protéine H2B a été déposé à la Collection Nationale de Cultures de Micro-organismes (CNCM) le 24 février 2005 sous le n° I-3363.

Description du pET-NH2B : Le plasmide pET-NH2B a été obtenu par

30

clonage dans le plasmide pET-22b+ (Novagen), de la séquence d'ADN

29

complémentaire codant pour la protéine histone H2B tronquée des 65 derniers acides aminés (H2B Δ C65) de *Leishmania major*.

Le gène H2B Δ C65 a été cloné au niveau des sites de restriction NdeI et XhoI. Des bactéries recombinantes *E. coli* XL1-blue ont été transformées
5 avec pET-NH2B. Elles sont résistantes à la tétracycline et à l'ampicilline. Les gènes de résistance à la tétracycline et à l'ampicilline sont portés par les bactéries XL1-blue et le plasmide pET-22b+ recombinant.

Le plasmide pET-H2B contenant la séquence de la protéine H2B a été
10 déposé à la Collection Nationale de Cultures de Micro-organismes (CNCM) le 24 février 2005 sous le n° I-3361.

Description du pET-H2B : Le plasmide pET-H2B a été obtenu par clonage dans le plasmide pET-22b+ (Novagen), de la séquence d'ADN
15 complémentaire codant pour la protéine histone H2B entière de *Leishmania major*. Le gène H2B a été cloné au niveau des sites de restriction NdeI et XhoI.

Des bactéries recombinantes *E. coli* XL1-blue ont été transformées avec pET-H2B. Elles sont résistantes à la tétracycline et à l'ampicilline. Les
20 gènes de résistance à la tétracycline et à l'ampicilline sont portés par les bactéries XL1-blue et le plasmide pET-22b+ recombinant.

Le plasmide pET-H2B est encore désigné pET-22b-H2B dans ce qui suit.

Le plasmide pET-CH2B est encore désigné pET-H2B Δ N46 dans ce qui
25 suit.

Le plasmide pET-NH2B est encore désigné pET-H2B Δ C65 dans ce qui suit.

30 Les conditions de culture des bactéries transformées sont les suivantes :

Milieu de culture préconisé

Les bactéries recombinantes sont cultivées soit en milieu de culture liquide soit en milieu de culture solide.

5

Le milieu de culture liquide, Luria Broth (LB) est composé de : 1% (poids/volume) de Bactotryptone, 0,5% (p/v) d'extraits de levure et de 1 % (p/v) de NaCl. Le pH du milieu doit être réglé à 7. Ce milieu est préconisé pour la multiplication des plasmides pET-22b+ contenant le gène H2BΔC65 (ou contenant le gène H2BΔN46 ou le gène H2B).

10

Le milieu de culture solide, Luria Broth Agar (LB-Agar) est constitué de 1% (poids/volume) de Bactotryptone, 0,5% (p/v) d'extraits de levure, de 1% (p/v) de NaCl et de 1,5% (p/v) d'agar. Ce milieu est essentiellement préconisé lors des cultures réalisées à partir de bactéries recombinantes congelées à -0,80°C.

15

Ces deux milieux de culture sont stérilisés à 120 °c pendant 20 minutes juste après leur préparation.

20

Conditions d'ensemencement

Les bactéries recombinantes congelées à -80 °c sont tout d'abord étalées sur une boîte contenant du milieu de culture solide LB-Agar supplémenté de 15µg/ml de tétracycline et de 50µg/ml d'ampiciline pendant 18 heures à 37°C puis une colonie isolée est prélevée et incubée dans 5ml de LB additionné des même antibiotiques. La culture est réalisée pendant 18 heures à 37°C.

25

30 Incubation (température, atmosphère agitation illumination)

31

La température de culture est toujours réalisée à 37°C sous une agitation de 200tr/min (appareil SANYO Orbital Incubator). La culture est réalisée sous une atmosphère ambiante et une illumination naturelle.

5 Protocole de vaccination et challenge des souris

Deux protocoles expérimentaux ont été réalisés, dans le premier protocole, les souris ont été injectées deux fois à 15 jours d'intervalle par des différentes préparations vaccinales (tableau 1). Le deuxième protocole a
10 été utilisé pour la confirmation et l'optimisation de certains résultats (voir le détail dans le tableau 2).

Toutes les injections ont été réalisées par voie sous-cutanée, au niveau du coussinet plantaire de la patte arrière droite dans un volume final de 50µl par injection. Quatre semaines après le dernier rappel, les souris ont reçu
15 une injection des parasites *L. major* (promastigotes métacycliques) au niveau de coussinet plantaire de la patte arrière droite. Deux quantités de parasites ont été utilisées soit, 10^5 et 10^6 parasites/injection. Le suivi de l'évolution de la maladie expérimentale a été fait par la mesure hebdomadaire du diamètre de la lésion.

20

Tableau 1:

Expérience 1, protocole expérimental d'immunisation et de challenge des
25 souris.

32

N° groupe (nb souris)	Préparation vaccinales	Doses	Voie d'injection	Challenge
1 (4 souris)	PBS	50 µl	Sous- cutanée	10 ⁵ parasites
2 (4 souris)	H2B+CpG	25µg/20µg	Sous- cutanée	10 ⁵ parasites
3 (4 souris)	H2B+nCpG	25µg/20µg	Sous- cutanée	10 ⁵ parasites
4 (4 souris)	H2BΔC65+CpG	25µg/20µg	Sous- cutanée	10 ⁵ parasites
5 (4 souris)	H2BΔC65+ nCpG	25µg/20µg	Sous- cutanée	10 ⁵ parasites
6 (4 souris)	H2BΔN46+CpG	25µg/20µg	Sous- cutanée	10 ⁵ parasites
7 (4 souris)	H2BΔN46+ nCpG	25µg/20µg	Sous- cutanée	10 ⁵ parasites
8 (4 souris)	CpG	20µg	Sous- cutanée	10 ⁵ parasites
9 (4 souris)	nCpG	20µg	Sous- cutanée	10 ⁵ parasites
10 (4 souris)	H2B	25µg	Sous- cutanée	10 ⁵ parasites
11 (4 souris)	H2BΔC65	25µg	Sous- cutanée	10 ⁵ parasites
12 (4 souris)	H2BΔN46	25µg	Sous- cutanée	10 ⁵ parasites

5

Tableau 2:

Expérience 2, protocole expérimental d'immunisation et de challenge des
10 souris.

3

N° groupe (nb souris)	Préparations vaccinales	Doses/volumes	Voie d'injection	Challenge
1 (6 souris)	CpG	50µg	Sous-cutanée	10 ⁵ parasites
2 (6 souris)	CpG	50µg	Sous-cutanée	10 ⁶ parasites
3 (6 souris)	H2BΔC65+CpG	20µg/50µg	Sous-cutanée	10 ⁵ parasites
4 (6 souris)	H2BΔC65+CpG	20µg/50µg	Sous-cutanée	10 ⁶ parasites
5 (6 souris)	H2BΔN46+CpG	20µg/50µg	Sous-cutanée	10 ⁵ parasites
6 (6 souris)	H2BΔN46+CpG	20µg/50µg	Sous-cutanée	10 ⁶ parasites
7 (6 souris)	PBS	50 µl	Sous-cutanée	10 ⁵ parasites
8 (6 souris)	PBS	50 µl	Sous-cutanée	10 ⁶ parasites

Charge parasitaire

5

La quantification des parasites a été estimée au niveau des sites lésionnels en utilisant une variante de la technique des dilutions limites (Titus RG, Marchand M, Boon T, Louis JA. A limiting dilution assay for quantifying *Leishmania major* in tissues of infected mice. *Parasite Immunol* 1985;

10 7:545–55). Brièvement, la patte infectée a été coupée, homogénéisée dans un volume de 5ml de milieu RPMI additionné d'antibiotiques puis une série de dilutions de 1 :10 jusqu'à 1 :10¹¹ ont été faites en quatre exemplaires chacune dans une plaque de microtitration (96 puits, Nunc, Roskilde, Denmark) contenant du milieu RPMI additionné de 100 U/ml de pénicilline,

15 100 µg/ml streptomycine, 2mM L-glutamine et 10% de sérum de veau décomplémenté. Les plaques ont été incubées à 26°C pendant au moins 15 jours. La recherche des parasites vivants se fait sous microscope inversé. La charge parasitaire est exprimée par la moyenne du négatif du log de la dernière dilution dans laquelle des parasites mobiles ont été

20 détectés.

34

Résultats

Production et purification des différentes protéines recombinantes

5

La protéine H2B entière (111aa), la partie divergente de H2B située au niveau des 46 premiers aa et la partie conservée de H2B localisée entre les acides aminés 47 à 111 ont d'abord été exprimées en utilisant le système d'expression procaryote pET puis purifiées par chromatographie d'affinité sur une colonne de nickel (figure 2). L'anticorps polyclonal anti-H2B obtenu après immunisation de souris BALB/c par la protéine recombinante H2B entière reconnaît spécifiquement, par immunoblot, les protéines recombinantes H2B, H2B Δ C65 et H2B Δ N46 (figure 3).

15 Evaluation clinique et parasitologique de l'effet de la vaccination des souris BALB/c par la protéine H2B entière ou mutée suite à un challenge virulent par *L. major*

Des expériences préliminaires faites chez des souris BALB/c vaccinées par la protéine H2B seule ou en présence d'adjuvant (deux injections de 20 mg de protéine +/- 25 μ g de CpG à 15 jours d'intervalle) ont montré que ces souris étaient capables, un mois après la dernière immunisation, de produire de grandes quantités d'IFN- γ quand leurs cellules ganglionnaires (drainant les sites d'injection) sont re-stimulées *in vitro* avec la protéine H2B. Les quantités d'IL-10 ou IL-4 sont très faibles ou non détectables. Ces résultats suggèrent que la protéine H2B a la capacité d'induire, chez les souris BALB/c, une réponse Th1 spécifique.

37

La capacité des différentes préparations vaccinales à induire une protection dans le modèle murin de la leishmaniose expérimentale a été évaluée chez les souris sensibles BALB/c en utilisant deux expériences différentes et complémentaires.

5

Expérience 1

Des groupes de souris BALB/c (4 souris par groupe), femelles âgées de 6 à 8 semaines, ont été injectés deux fois à 15 jours d'intervalle par différentes préparations vaccinales (tableau 1). Les protéines recombinantes testées ont été soit adjuvées au CpG soit avec un contrôle négatif du CpG, le non CpG (nCpG). Le CpG est un oligodexoynucléotide d'ADN non méthylé qui possède un motif particulier de CpG. Il a été clairement démontré dans la littérature que l'adjuvant CpG est capable d'activer les monocytes, les macrophages et les cellules dendritiques. Ainsi, le CpG injecté en même temps qu'un antigène peut orienter la réponse immune spécifique vers le type Th1 (Pour revue, Klinman et coll, 2004).

Deux immunisations ont donc été réalisées par voie sous cutanée au niveau du coussinet plantaire de la patte arrière droite. Un mois plus tard, les différents groupes de souris BALB/c ont été infectés par 2×10^5 promastigotes métacycliques de la souche parasitaire virulente de *L. major* (GLC94) au niveau du coussinet plantaire de la patte arrière gauche.

Le résultat de l'évolution de la lésion dans chaque lot de souris immunisées et infectées a été exprimé par la moyenne de la taille des lésions obtenues chez les souris du même groupe. Après un suivi clinique de huit semaines, seuls deux lots de souris montraient un ralentissement très significatif des lésions expérimentales : il s'agit des souris immunisées par la protéine H2B entière en présence de CpG (H2B+CpG) et des souris immunisées par la partie amino-terminale de H2B en présence de CpG (H2BAC65+CpG). Les différences étaient très significatives avec tous les autres groupes, incluant le groupe de souris contrôle ($p < 0,001$ à partir de la semaine 5) (figure 4). Il est très intéressant de souligner que les souris immunisées par la partie

46

amino-terminale de H2B en présence de CpG étaient plus résistantes que celles immunisées, dans les mêmes conditions, par la protéine entière ($p < 0,05$, à partir de la semaine 5) quand elles étaient ensuite infectées par *L. major*. Par ailleurs tous les autres groupes développaient une maladie expérimentale similaire à celle observée avec les souris contrôles (injectées par le PBS).

En conclusion, les résultats obtenus montrent que la partie NH₂-terminale de la protéine H2B et la protéine H2B entière en présence de l'adjuvant CpG sont capables d'induire un effet protecteur chez des souris BALB/c après un challenge virulent par *L. major*. De plus, la comparaison des courbes d'évolution de lésions entre ces deux lots de souris montre une meilleure résistance (statistiquement significative) des souris vaccinées par H2BΔC65+CpG par rapport aux souris vaccinées par H2B+CpG.

15 Evaluation de la charge parasitaire

La détermination de la charge parasitaire dans le ganglion poplité drainant la lésion représente un facteur déterminant dans l'évaluation de vaccin anti-leishmanien (Kébaier et al ; 2001, « Heterogeneity of wild *Leishmania major* isolates in experimental murine pathogenicity and specific immune response, Infect. Immun. 2001, Aug, 69(8) : 4906-15). La charge parasitaire a été évaluée (8 semaines après infection expérimentale) uniquement chez les groupes de souris ci-dessous :

- 25 - Souris contrôle (PBS)
- Souris vaccinées par H2B+CpG
- Souris vaccinées par H2BΔC65+CpG
- Souris vaccinées par H2BΔN46+CpG

30 Dans la figure 5 sont représentés les résultats de la charge parasitaire analysée dans le ganglion drainant le site d'injection des parasites. Il existe

une très bonne corrélation entre la charge parasitaire et la sévérité des lésions expérimentales induites chez les différents groupes de souris. Les souris vaccinées par H2BΔN46, non protégées, avaient une charge parasitaire similaire à celle retrouvée chez les souris contrôle. En revanche, les deux groupes de souris ayant reçu H2B ou la partie amino-terminale (H2BΔC65) présentaient une charge parasitaire très nettement inférieure à celle des groupes contrôles (100 à 1000 fois inférieure). Il est intéressant de souligner que les souris immunisées par la partie amino-terminale de H2B avaient une charge parasitaire moyenne au moins 10 fois inférieure à celle retrouvée chez les souris immunisées par la protéine entière (H2B). Ces résultats confirment la supériorité de la partie divergente (amino-terminale) par rapport à la protéine H2B entière dans sa capacité à conférer une protection des souris sensibles BALB/c contre un challenge virulent par *L. major*.

Expérience 2

Dans le but de confirmer les résultats en utilisant notamment 10 fois plus de parasites pour le challenge, les inventeurs se sont intéressés aux protéines tronquées de H2B (H2BΔC65 et H2BΔN46) en utilisant une concentration plus élevée de CpG (50μg/injection) et trois immunisations à 21 jours d'intervalle. De plus deux groupes contrôles ont été utilisés (un groupe ayant reçu seulement le CpG et l'autre seulement le tampon PBS). Un mois après la dernière dose de vaccin, les souris ont été infectées par deux doses de parasites (soit 10^5 ou 10^6 parasites (promastigotes métacycliques)/injection). Le protocole expérimental est détaillé dans le tableau 2.

Les figures 6 et 7 montrent clairement que seules les souris immunisées par la partie divergente de la protéine H2B (H2BΔC65) résistaient à l'infection expérimentale par *L. major* même après utilisation de 10^6

promastigotes métacycliques pour le challenge. Il existe une parfaite corrélation entre la résistance clinique et la charge parasitaire réalisée à la fin du protocole (10 semaines après infection).

Ces résultats confirment ceux obtenus avec la première expérience et suggèrent que le deuxième protocole d'immunisation confère une meilleure protection des souris BALB/c contre l'infection par *L. major*.

Discussion

10

Selon les chiffres de l'Organisation Mondiale de la santé (OMS), les leishmanioses menacent dans 88 pays, 350 millions de personnes sont exposées aux risques de piqûres de phlébotomes, insectes vecteurs, et on estime à 12 millions le nombre d'individus atteints. Dans sa forme la plus grave, cette maladie tue. Le fait que la majorité des individus ayant développé une leishmaniose, ou tout simplement une infection asymptomatique, résistent à la réinfection, justifie les recherches pour le développement de vaccins. Cependant, deux problèmes majeurs restent posés : la meilleure connaissance de la nature précise des mécanismes effecteurs de la résistance ainsi que la nature des antigènes parasitaires et l'adjuvant à utiliser. Il n'existe pas actuellement de vaccin à usage humain. Les vaccins de première génération, les seuls à avoir été testé chez l'homme, ont montré leur inefficacité (Sharifi et coll, 1998 ; Khalil et coll, 2000; De Luca et coll, 2001; Armijos et coll, 2004).

25

Les expériences rapportées ici permettent d'identifier et d'évaluer de nouveaux candidats vaccins contre les leishmanioses.

La protéine histone H2B *L. infantum* a été initialement sélectionnée dans le laboratoire comme protéine parasitaire de faible poids moléculaire capable d'induire une réponse Th1 chez l'homme. Des données plus récentes ont

30

39

suggéré le rôle de cette protéine comme candidat vaccin (Melby, 2000 ; Probst et coll 2001 ; Iborra et coll, 2004).

Les travaux décrits ici reposent sur l'analyse comparée de l'immunogénicité et du rôle protecteur des deux régions (divergente et conservée) de la protéine recombinante H2B de *Leishmania* ainsi que de la protéine entière. Les résultats montrent clairement que la partie amino-terminale (divergente) de H2B adjuvée au CpG a conféré une très bonne protection des souris sensibles BALB/c contre un challenge virulent par *L. major*. A l'inverse, la partie conservée (carboxy-terminale), injectée dans les mêmes conditions n'a eu aucun effet protecteur. Il est extrêmement intéressant de souligner que la protéine H2B entière conférait une protection intermédiaire. L'ensemble des résultats suggère que la partie amino-terminale (divergente) de H2B puisse constituer un bon candidat vaccin contre les leishmanioses.

20 Références

Allmohammadian MH, Khamesipour A, Darabi H, et al. The role of BCG in human immune responses induced by multiple injections of autoclaved *Leishmania major* as a candidate vaccine against leishmaniasis. Vaccine 2002; 21:174-80.

Armijos RX, Weigel MM, Calvopina M, Hidalgo A, Cevallos W, Correa J. Safety, immunogenicity, and efficacy of an autoclaved *Leishmania amazonensis* vaccine plus BCG adjuvant against New World cutaneous leishmaniasis. Vaccine. 2004 Mar 12;22(9-10):1320-6.

11b

Belkaid Y, Piccirillo CA, Mendez S, Shevach EM, Sacks DL: CD4+CD25+ regulatory T cells control *Leishmania major* persistence and immunity. *Nature* **2002**; 420:502-507.

- 5 Brodskyn C, Beverley SM, Titus RG. Virulent or avirulent (dhfr-ts-) *Leishmania major* elicit predominantly a type-1 cytokine response by human cells in vitro. *Clin Exp Immunol*. **2000**;119(2):299-304.
- 10 Campbell K, Diao H, Ji J, Soong L. DNA immunization with the gene encoding P4 nuclease of *Leishmania amazonensis* protects mice against cutaneous leishmaniasis. *Infect Immun*. **2003**;71(11):6270-8.
- 15 Campos-Neto A, Webb JR, Greeson K, Coler RN, Skeiky YA, Reed SG. Vaccination with plasmid DNA encoding TSA/LmST11 leishmanial fusion proteins confers protection against *Leishmania major* infection in susceptible BALB/c mice. *Infect Immun*. **2002**;70(6):2828-36.
- 20 Coler RN, Skeiky YA, Bernards K, Greeson K, Carter D, Cornellison CD, Modabber F, Campos-Neto A, Reed SG. Immunization with a polyprotein vaccine consisting of the T-Cell antigens thiol-specific antioxidant, *Leishmania major* stress-inducible protein 1, and *Leishmania* elongation Initiation factor protects against leishmaniasis. *Infect Immun*. **2002**; 70(8):4215-25.
- 25 Davies CR, Lianos-Cuentas EA, Pyke SDM et al. Cutaneous leishmaniasis in the Peruvian Andes: an epidemiological study of infection and immunity. *Epidemiol Infect* **1995**; 114: 297-318.
- 30 De Luca PM, Mayrink W, Pinto JA, et al. A randomized double-blind placebo-controlled trial to evaluate the immunogenicity of a candidate

C11

vaccine against American tegumentary leishmaniasis. *Acta Trop* **2001**; 80:251-60.

Desjeux P. Leishmaniasis. Public health aspects and control. *Clin Dermatol*
5 **1996**; 14:417-23.

Dumonteil E, Maria Jesus RS, Javier EO, Maria del Rosario GM. DNA vaccines induce partial protection against *Leishmania mexicana*. *Vaccine*.
2003;21(17-18):2161-8.

10

Gavin, M. and Rudensky, A. Control of immune homeostasis by naturally arising regulatory CD4+ T cells. *Curr. Opin. Immunol* **2003**; 15(6):690-6.

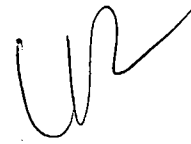
Guirges SY. Natural and experimental re-infection of man with oriental score. *Ann Trop Med Parasitol* **1971**; 65 :197-205.

15

Gurunathan S, Sacks DL, Brown DR, Reiner SL, Charest H, Glaichenhaus N, Seder RA. Vaccination with DNA encoding the immunodominant LACK parasite antigen confers protective immunity to mice infected with
20 *Leishmania major*. *J Exp Med*. **1997**;186(7):1137-47.

Handman E, Symons FM, Baldwin TM, Curtis JM, Scheerlinck JP. Protective vaccination with promastigote surface antigen 2 from *Leishmania major* is mediated by a TH1 type of immune response. *Infect Immun*.
25 **1995**;63(11):4261-7.

Iborra S, Soto M, Carrion J, Nieto A, Fernandez E, Alonso C, Requena JM. The *Leishmania infantum* acidic ribosomal protein P0 administered as a DNA vaccine confers protective immunity to *Leishmania major* infection in
30 BALB/c mice. *Infect Immun*. **2003**;71(11):6562-72.



Iborra S, Soto M, Carrion J, Alonso C, Requena JM. Vaccination with a plasmid DNA cocktail encoding the nucleosomal histones of *Leishmania* confers protection against murine cutaneous leishmaniasis. *Vaccine*. 2004;22(29-30):3865-76.

5

Kébaïer C, Louzir H, Chenik M, Ben Salah A, Dellagi K. Heterogeneity of wild *Leishmania major* isolates in experimental murine pathogenicity and specific immune response. *Infection and Immunity*. 2001. 69(8), 4906-4915.

10

Khalil, EA, El Hassan AM, Zijlstra EE, et al. Autoclaved *Leishmania major* vaccine for prevention of visceral leishmaniasis: a randomised, double-blind, BCG-controlled trial in Sudan. *Lancet* 2000; 356:1565-9.

15 Klinman DM. Use of CpG oligodeoxynucleotides as immunoprotective agents. *Expert Opin Biol Ther*. 2004;4(6):937-46.

WHO Expert Committee. Control of the Leishmaniasis. WHO Tech Rep Ser 1990; 793: 0-158.

20 Louzir H, Melby PC, Ben Salah A, Marrakchi H, Aoun K, Ben Ismail R, Dellagi

K. Immunologic determinants of disease evolution in localized cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania major*. *Journal of Infectious Diseases*. 1998. 177(6), 1687-1695.

25

Maalej IA, Chenik M, Louzir H, Ben Salah A, Bahloul C, Amri F, Dellagi K. Comparative evaluation of ELISAs based on ten recombinant or purified *Leishmania* antigens for the serodiagnosis of Mediterranean visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg*. 2003;68(3):312-20.

30

- Melby PC, Ogden GB, Flores HA, Zhao W, Geldmacher C, Biediger NM, Ahuja SK, Uranga J, Melendez M. Identification of vaccine candidates for experimental visceral leishmaniasis by immunization with sequential fractions of a cDNA expression library. *Infect Immun.* **2000**;68(10):5595-602.
- Probst P, Stromberg E, Ghalib HW, Mozel M, Badaro R, Reed SG, Webb JR. Identification and characterization of T cell-stimulating antigens from *Leishmania* by CD4 T cell expression cloning. *J Immunol.* **2001**;166(1):498-505.
- Ramiro MJ, Zarate JJ, Hanke T, Rodriguez D, Rodriguez JR, Esteban M, Lucientes J, Castillo JA, Larraga V. Protection in dogs against visceral leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* is achieved by immunization with a heterologous prime-boost regime using DNA and vaccinia recombinant vectors expressing LACK. *Vaccine.* **2003**;21(19-20):2474-84.
- Sharifi I, Reza A, Aflatonian MR, et al. Randomised vaccine trial of single dose of killed *Leishmania major* plus BCG against anthroponotic cutaneous leishmaniasis in Bam, Iran. *Lancet* **1998**; 351:1540-3.
- Skeiky YA, Coler RN, Brannon M, Stromberg E, Greeson K, Crane RT, Webb JR, Campos-Neto A, Reed SG. Protective efficacy of a tandemly linked, multi-subunit recombinant leishmanial vaccine (Leish-111f) formulated in MPL adjuvant. *Vaccine.* **2002**; 10;20(27-28):3292-303.
- Skeiky YA, Kennedy M, Kaufman D, Borges MM, Guderian JA, Scholler JK, Ovendale PJ, Picha KS, Morrissey PJ, Grabstein KH, Campos-Neto A, Reed SG. LeIF: a recombinant *Leishmania* protein that induces an IL-12-mediated Th1 cytokine profile. *J Immunol.* **1998**; 161(11):6171-9.

44

Soto M, Requena JM, Quijada L, Perez MJ, Nieto CG, Guzman F, Patarroyo ME, Alonso C. Antigenicity of the *Leishmania infantum* histones H2B and H4 during canine viscerocutaneous leishmaniasis. *Clin Exp Immunol*. 1999;115(2):342-9.

5

Spitzer N, Jardim A, Lippert D, Olafson RW.

Long-term protection of mice against *Leishmania major* with a synthetic peptide

vaccine. *Vaccine*. 1999 Mar 17;17(11-12):1298-300.

10

Streit JA, Recker TJ, Filho FG, Beverley SM, Wilson ME. Protective immunity against the protozoan *Leishmania chagasi* is induced by subclinical cutaneous infection with virulent but not avirulent organisms. *J Immunol*. 2001;166(3):1921-9.

15

Wolffe AP. Transcriptional regulation in the context of chromatin structure. *Essays Biochem*. 2001;37:45-57.

20



REVENDICATIONS

5

1-Composition immunogène caractérisée en ce qu'elle comprend : i) un polypeptide antigénique consistant en un fragment de la protéine histone H2B de *Leishmania*, ledit fragment comprenant tout ou partie de la région N-terminale de ladite protéine histone H2B, et ii) un adjuvant stimulant la
10 réponse immunitaire.

15

2-Composition immunogène selon la revendication 1, dans laquelle le polypeptide a une séquence polypeptidique de moins de 65 acides aminés, de préférence moins de 50 acides aminés.

20

3-Composition immunogène selon la revendication 1 ou 2, dans laquelle le polypeptide est caractéristique de l'histone H2B de *Leishmania major*.

25

4-Composition immunogène selon l'une des revendications 1 ou 2, dans laquelle un ou plusieurs acides aminés du polypeptide, dit polypeptide de référence, sont substitués, délétés ou ajoutés pour former un polypeptide variant conservant au moins 50% d'identité, de préférence au moins 80% d'identité avec le polypeptide de référence, ledit polypeptide variant conservant les propriétés immunogènes du polypeptide de référence.

5-Composition immunogène selon la revendication 4, dans laquelle le polypeptide variant a une séquence polypeptidique de moins de 75 acides aminés, de préférence moins de 60 acides aminés.

- 6-Composition immunogène selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, dans laquelle l'adjuvant favorise une réponse immunitaire de type cellulaire.
- 5 7-Composition immunogène selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, dans laquelle l'adjuvant est le CpG.
- 10 8-Composition immunogène selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, comprenant en outre au moins un autre antigène de *Leishmania* ayant des propriétés immunogènes pour déclencher et/ou favoriser une réponse immunitaire, de type B et/ou T chez un hôte humain ou animal.
- 15 9-Composition immunogène selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, comprenant en outre au moins un polypeptide consistant en un fragment d'au moins une protéine histone supplémentaire de *Leishmania*.
- 20 10-Composition immunogène selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, comprenant en outre au moins une protéine histone entière de *Leishmania*.
- 11- Composition immunogène selon la revendication 9 ou 10 dans laquelle ladite au moins une protéine histone est choisie notamment parmi H2A, H3 et H4.
- 25 12- Composition immunogène selon les revendications 9, 10 ou 11 dans laquelle ladite au moins une protéine histone est caractéristique de *L. Major*, *L. Infantum*, *L. Donovan*i, *L. Tropica*, *T. Ennietti*.
- 30 13-Composition immunogène selon l'une quelconque des revendications 1 à 12 comprenant en outre un véhicule pharmaceutiquement acceptable pour être administré à un hôte humain ou animal.

42

- 14-Composition immunogène selon l'une quelconque des revendications 1 à 13, caractérisée en ce qu'elle est capable d'induire une réponse immunitaire de type cellulaire des cellules T effectrices de l'immunité lorsqu'elle est administrée à un humain ou à un animal.
- 15 15-Composition immunogène selon la revendication 14, caractérisée en ce qu'elle est capable d'induire une réponse immunitaire de type Th1.
- 10 16-Composition immunogène selon l'une quelconque des revendications 1 à 15, dans laquelle le polypeptide ou le polypeptide variant est présent dans une concentration comprise entre 0,01 µg/µl et 5 µg/µl.
- 15 17-Polypeptide consistant en un fragment de la protéine histone H2B de *Leishmania*, ledit fragment comprenant tout ou partie de la région N-terminale de ladite protéine histone H2B.
- 18-Polypeptide selon la revendication 17, caractéristique de *Leishmania Major*.
- 20 19-Polypeptide selon la revendication 17 ou 18 ayant une séquence polypeptidique de moins de 65 acides aminés, de préférence moins de 50 acides aminés.
- 25 20-Polypeptide selon l'une quelconque des revendications 17 à 19 possédant la séquence d'acides aminés suivante : M A S S R S A S R K A S N P H K S H R K P K R S W N V Y. V G R S L K A I N A Q M S M S H R T.
- 30 21-Polypeptide variant conservant au moins 50% d'identité ou de similarité, de préférence au moins 80% d'identité ou de similarité avec le polypeptide

selon l'une quelconque des revendications 17 à 20, ledit polypeptide variant présentant une substitution, une délétion ou une addition d'au moins un acide aminé, par rapport à la séquence dudit polypeptide et conservant les propriétés immunogènes dudit polypeptide.

5

22- Polypeptide variant selon la revendication 21 possédant moins de 75 acides aminés, de préférence moins de 60 acides aminés.

10

23-Molécule d'acide nucléique codant le polypeptide ou le polypeptide variant selon l'une quelconque des revendications 17 à 22.

15

24-Molécule d'acide nucléique selon la revendication 23, possédant la séquence nucléotidique suivante ou une partie de cette séquence : ATG GCC TCT TCT CGC TCT GCT TCC CGC AAG GCT TCC AAC CCG CAC AAG TCG CAC CGC AAG CCG AAG CGC TCG TGG AAC GTG TAC GTG GGC CGC TCG CTG AAG GCG ATC AAC GCC CAG ATG TCG ATG TCG CAC CGC ACG.

20

25-Vaccin permettant d'obtenir une protection contre une infection par *Leishmania*, caractérisé en ce que son principe actif comprend le polypeptide selon l'une quelconque des revendications 17 à 20, le polypeptide variant selon la revendication 21 ou 22, ou la molécule d'acide nucléique selon la revendication 23 ou 24.

25

26- Vaccin selon la revendication 25, comprenant en outre un adjuvant stimulant la réponse immunitaire lorsqu'il est administré à un hôte humain ou animal.

30

27- Vaccin selon la revendication 26, dans lequel l'adjuvant favorise une réponse immunitaire de type cellulaire.

- 28- Vaccin selon la revendication 26 ou 27, dans lequel l'adjuvant est le CpG.
- 29- Vaccin selon l'une quelconque des revendications 25 à 28 comprenant
5 au moins un autre antigène de *Leishmania* ajouté en tant que principe actif, ledit antigène ayant des propriétés immunogènes pour déclencher et/ou favoriser une réponse immunitaire, de type B et/ou T chez un hôte humain ou animal.
- 10 30- Vaccin selon l'une quelconque des revendications 25 à 28 comprenant en outre au moins un polypeptide consistant en un fragment d'au moins une protéine histone différente de H2B de *Leishmania* ou une molécule d'acide nucléique codant pour ledit ou lesdits polypeptide(s).
- 15 31- Vaccin selon l'une quelconque des revendications 25 à 28 comprenant en outre au moins une protéine histone entière de *Leishmania* ou une molécule d'acide nucléique codant pour ladite ou lesdites protéine(s) histone(s) entière(s).
- 20 32- Vaccin selon la revendication 30 ou 31, dans laquelle ladite au moins une protéine histone est choisie notamment parmi H2A, H3 et H4.
- 33- Vaccin selon les revendications 30, 31 ou 32, dans laquelle ladite au moins une protéine histone est caractéristique de *L. Major*, *L. Infantum*, *L.*
25 *Donovani*, *L. Tropica*, *L. Enrietti*.
- 34- Vaccin selon l'une quelconque des revendications 25 à 33, pour prévenir ou traiter une infection par *Leishmania major*.
- 30 35- Vaccin selon l'une quelconque des revendications 25 à 34, caractérisé en ce qu'il est capable d'induire une réponse immunitaire de type cellulaire

des cellules T effectrice de l'immunité lorsqu'il est administré à un humain ou à un animal.

5 36- Vaccin selon la revendication 35, caractérisé en ce qu'il est capable d'induire une réponse immunitaire de type Th1 lorsqu'il est administré à un humain ou à un animal.

10 37-Vecteur d'expression capable d'exprimer le polypeptide ou le polypeptide variant selon l'une quelconque des revendications 17 à 22, comprenant une molécule d'acide nucléique selon la revendication 23 ou 24.

15 38-Plasmide pET-CH2B contenant la séquence de la partie carboxy-terminale de la protéine H2B déposé à la Collection Nationale de Cultures de Micro-organismes (CNCM) sous le n° I-3362.

20 39-Plasmide pET-NH2B contenant la séquence de la partie amino-terminale divergente de la protéine H2B déposé à la Collection Nationale de Cultures de Micro-organismes (CNCM) sous le n° I-3363.

40-Plasmide pET-H2B contenant la séquence de la protéine H2B déposé à la Collection Nationale de Cultures de Micro-organismes (CNCM) sous le n° I-3361.



M	A	S	S	R	S	A	S	R	K	A	S	N	P	H	K	S	H	18
ATG	GCC	TCT	TCT	CGC	TCT	GCT	TCC	CGC	AAG	GCT	TCC	AAC	CCG	CAC	AAG	TCG	CAC	54
H ₂ B, P-Nd																		
R	K	P	K	R	S	W	N	V	Y	V	G	R	S	L	K	A	I	36
CGC	AAG	CCG	AAG	CGC	TCG	TGG	AAC	GTG	TAC	GTG	GGC	CGC	TCG	CTG	AAG	GCG	ATC	108
N	A	Q	M	S	M	S	H	R	T	M	K	I	V	N	S	Y	V	54
AAC	GCC	CAG	ATG	TCG	ATG	TCG	CAC	CGC	ACG	ATG	AAG	ATC	GTG	AAC	TCG	TAC	GTG	162
H ₂ H ₂ X-S									H ₃ R P-Nd									
N	D	V	M	E	R	I	C	T	E	A	A	S	I	V	R	A	N	72
AAC	GAC	GTG	ATG	GAG	CGC	ATC	TGC	ACC	GAG	GCC	GCG	TCG	ATT	GTT	CGC	GCG	AAC	216
K	K	R	T	L	G	A	R	E	V	Q	T	A	V	R	I	V	L	90
AAG	AAG	CGC	ACG	TTG	GGT	GCG	CGC	GAG	GTG	CAG	ACG	GCG	GTG	CGC	ATT	GTG	CTG	270
P	A	E	L	A	K	H	A	M	A	E	G	T	K	A	V	S	S	108
CCG	GCG	GAG	CTC	GCG	AAG	CAC	GCC	ATG	GCT	GAG	GCG	ACG	AAG	GCC	GTG	TCG	AGC	324
A	S	A	*															112
CGC	TCG	GCT	TGA															336
H ₃ B P-Xh																		

FIGURE 1

Handwritten signature

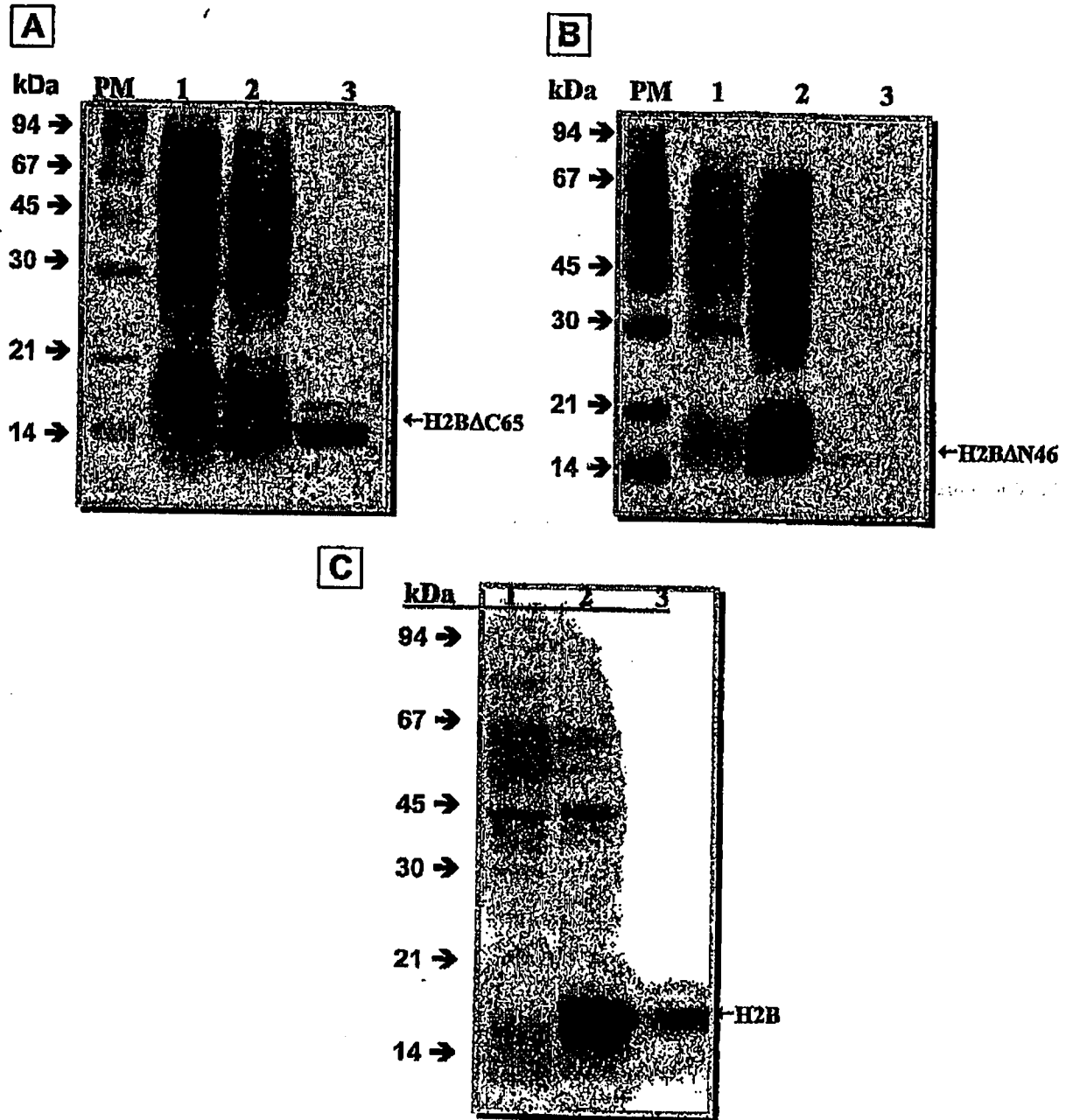


FIGURE 2

53

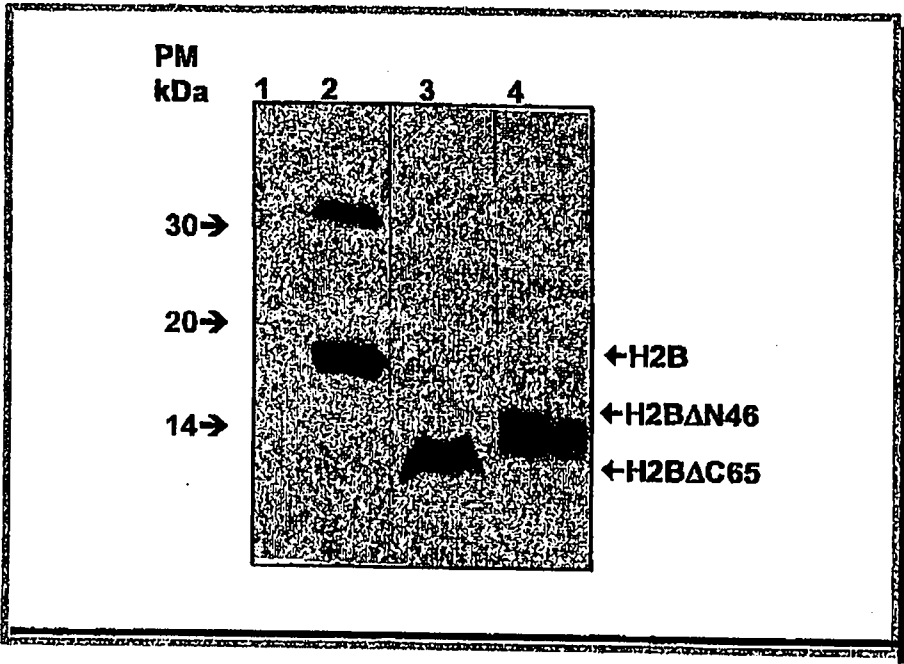


FIGURE 3

74

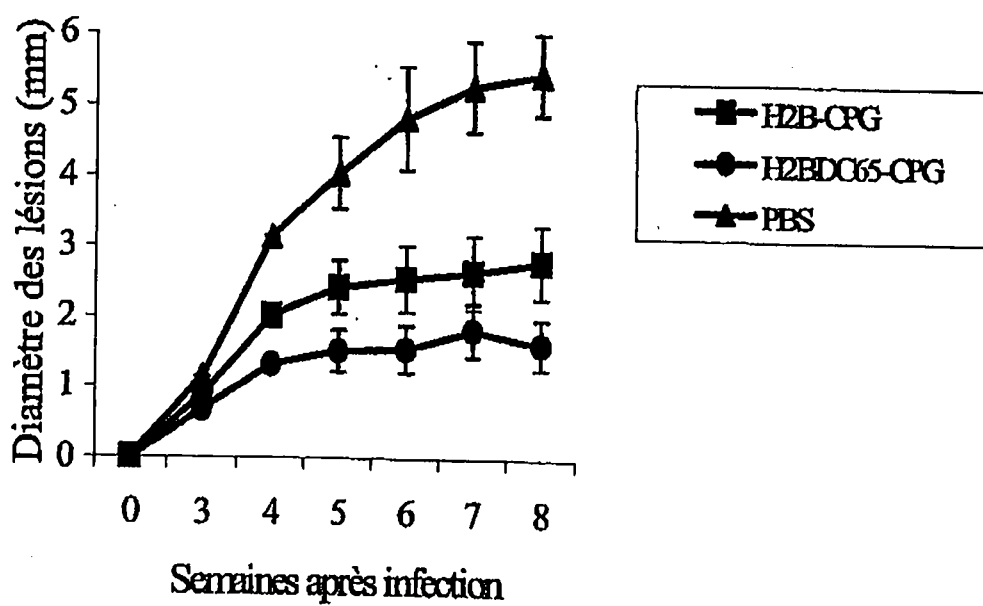


FIGURE 4

))

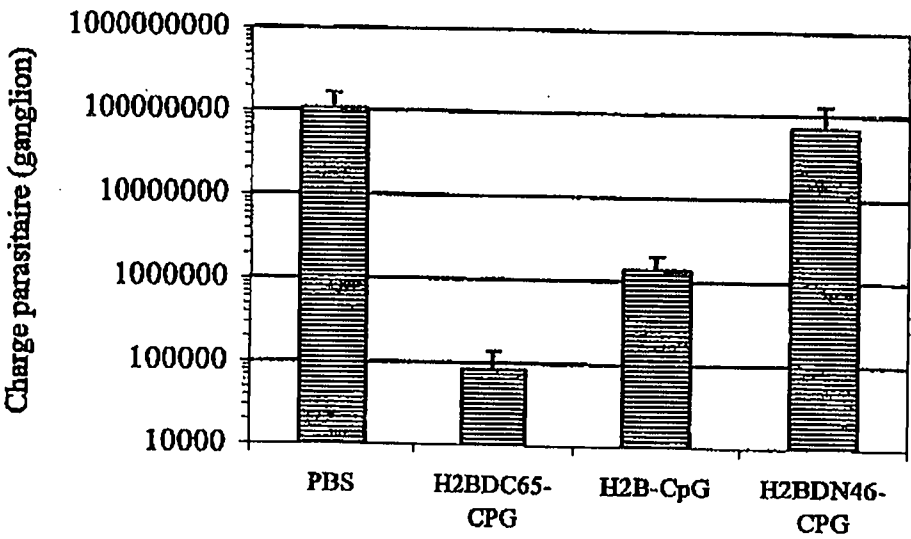
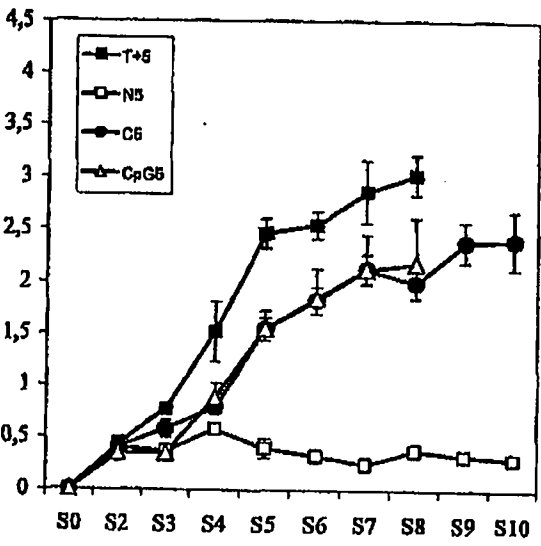


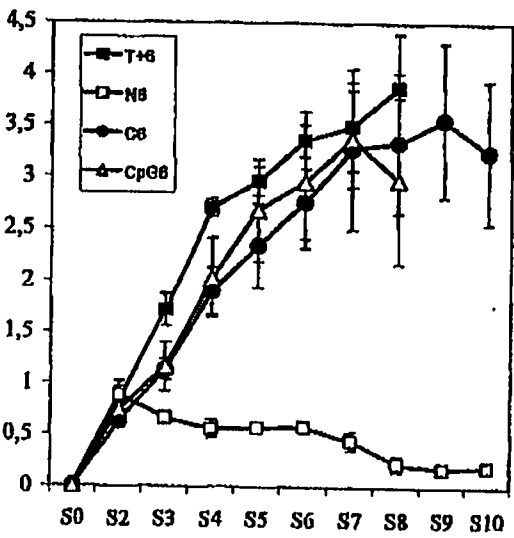
FIGURE 5

32

A



B



Semaines après infection

FIGURE 6

Handwritten signature or mark.

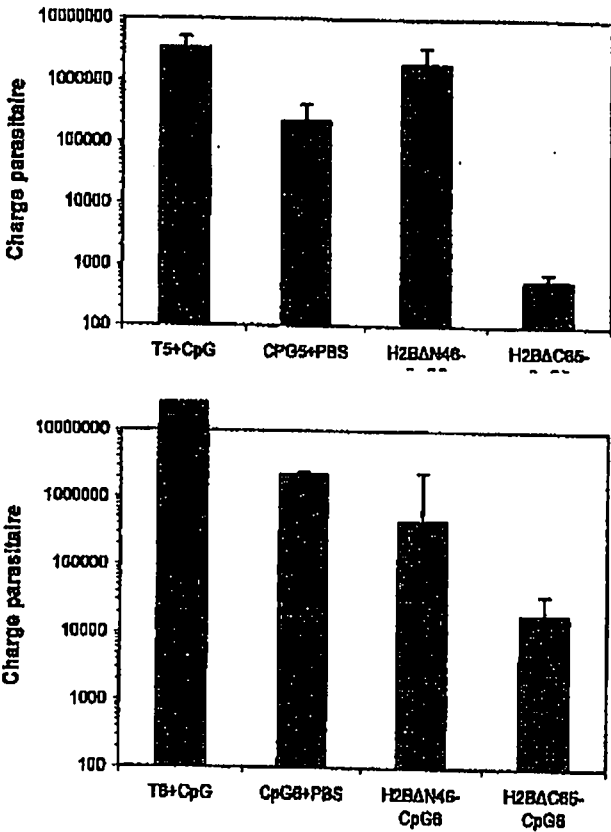


FIGURE 7

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA BAJO EL TRATADO DE COOPERACIÓN DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de Propiedad
Intelectual
Oficina Internacional



(43) Fecha de Publicación Internacional
21 de Septiembre de 2006 (21.09.2006)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 2006/097642 A2

(51) Clasificación Internacional de Patentes:
A61K 39/008 (2006.01) C07K 14/44 (2006.01)

(74) Agente: ERNEST GUTMANN-YVES PLASSER-AUD
SAS; 3, rue Auber, F-75009 Paris (FR).

(21) Numero de Solicitud Internacional:
PCT/FR2006/000597

(81) Estados Designados (a menos que se indique lo contrario, para todo tipo de protección nacional disponible): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(22) Fecha de Presentación Internacional:
17 de Marzo de 2006 (17.03.2006)

(25) Lenguaje de entrega: Inglés

(26) Lenguaje de Publicación: Inglés

(30) Datos de la Prioridad:
0502725 18 de Marzo de 2005 (18.03.2005) FR

(84) Estados Designados (a menos que se indique lo contrario, para todo tipo de protección regional disponible): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), Europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) Solicitante (para todos los Estados designados menos los Estados Unidos): INSTITUT PASTEUR [FR/FR]; 26-28, Rue Du Docteur Roux, F-75724 Paris Cedex 15 (FR). INSTITUT PASTEUR DE TUNIS [TN/TN]; 13, place Pasteur, 1002 TUNIS BELVEDERE (TN).

Publicado:

(72) Inventores; e

— sin el informe de búsqueda internacional y a ser publicado nuevamente al recibir dicho informe

(75) Inventores/Solicitantes (solo para los Estados Unidos): CHENIK, Mehdi [TN/TN]; 31, avenue de la République, 2070 La Marsa (TN). LOUZIR, Hechmi [TN/TN]; 12, avenue Taieb Méhiri, 2070 La Marsa (TN). DELLAGI, Koussay [TN/TN]; 6, rue Florian, Tunis-Babsaadoun (TN).

— con una indicación(es) relativa(s) al material biológico depositado, su cantidad según la regla 13bis, separadamente, y no con la descripción.

Para códigos de dos letras y otras abreviaciones, referirse a las "Notas de guía sobre Códigos y Abreviaturas" que aparecen al comienzo de cada edición de la Gaceta del PCT.

(54) Título: COMPOSICIÓN QUE COMPRENDE LA REGIÓN N-TERMINAL DE LA HISTONA H2B DE LEISHMANIA – USO PARA INDUCIR UNA RESPUESTA INMUTARIA

(57) Resumen: La presente invención se refiere a una composición inmunogénica que comprende: i) un polipéptido antigénico que consiste de un fragmento de la proteína histona H2B de Leishmania, en donde dicho fragmento comprende la región N-terminal de dicha proteína histona H2B, y ii) un adyuvante estimulante de la respuesta inmunitaria.

COMPOSICIÓN QUE COMPRENDE LA REGIÓN N-TERMINAL DE LA
HISTONA H2B DE LEISHMANIA - USO PARA INDUCIR UNA
RESPUESTA INMUNITARIA

5 La presente invención se refiere a una invención
inmunogénica que comprende: i) un polipéptido antigénico que
consiste de un fragmento de la proteína histona H2B de *Leishmania*,
en donde el fragmento comprende la totalidad o una parte de la
región N-terminal de dicha proteína histona H2B, y ii) un adyuvante
10 estimulante de la respuesta inmunitaria.

La presente invención también se refiere a un polipéptido
que consiste de un fragmento de la proteína histona H2B de
Leishmania, en donde el fragmento comprende la totalidad o parte de
la región N-terminal de la histona H2B, un polipéptido variante que
15 conserva cuando menos el 50% de identidad, de preferencia cuando
menos el 80% de identidad con dicho polipéptido, y una molécula de
ácido nucleico que codifica para el polipéptido o el polipéptido
variante.

La invención también se refiere a una vacuna que permite
20 obtener una protección contra una infección por *Leishmania*, cuyo
principio activo comprende el polipéptido, el polipéptido variante o la
molécula de ácido nucleico de conformidad con la presente invención,
y un vector de expresión capaz de expresar el polipéptido o el
polipéptido variante, que comprende la molécula de ácido nucleico.

25 La leishmaniasis constituye un grupo heterogéneo de

patologías que afectan a varios millones de individuos y se deben a la infección del animal huésped o ser humano por un parásito protozoario del género *Leishmania* (Desjeux et al, 1996). La expresión clínica de la infección está caracterizada por un gran polimorfismo, incluyendo infecciones asintomáticas, formas cutáneas simples o recurrentes, formas cutáneas difusas o alérgicas, formas cutaneo-mucosas y formas viscerales mortales en ausencia de tratamiento específico. (WHO Expert Committee, 1990). Durante su ciclo, el parásito alterna entre dos estados: el estado promastigote flagelado, que se encuentra en el tubo digestivo del insecto vector, y el estado amastigote dentro de los macrófagos del mamífero huésped.

La preparación de una vacuna contra leishmaniasis se puede considerar ya que se ha demostrado claramente, en seres humanos, que la infección por *Leishmania* confiere una inmunidad protectora a la reinfección (Guirges et al, 1971; Davies et al, 1995). Esta protección está asociada con el desarrollo de una respuesta inmune celular específica para el parásito.

Varios candidatos de vacuna se han evaluado contra la infección por *Leishmania*, tanto en modelos murinos, como en seres humanos.

En la actualidad, ninguna vacuna de uso humano o veterinario ha demostrado una eficacia significativa en la protección contra la leishmaniasis (Sharifi et al, 1998; Khalil et al, 2000; De Luca et al, 2001; Armijos et al, 2004).

Estas vacunas se pueden dividir en tres grupos: las vacunas de primera generación, están constituidas por promastigotes inactivados por calor o irradiación, a pesar de su inocuidad, la eficacia de estas vacunas no se ha comprobado (Sharifi et al, 1998; 5 Khalil et al, 2000; De Luca et al, 2001; Armijos et al, 2004).

Las vacunas de segunda generación están constituidas por proteínas nativas obtenidas por la purificación bioquímica de proteínas recombinantes y péptidos sintéticos obtenidos por ingeniería genética. Se han descrito varias proteínas en la literatura 10 científica, las cuales inducen una protección significativa en modelos experimentales murinos. Las más importantes están representadas por la poliproteína Leish-111f, compuesta de 3 proteínas fuertemente inmunogénicas colocadas en tándem, que son la LelF (factor de inicio de alargamiento de *Leishmania*), la proteína LmSTI1 (proteína 15 inducible por estrés de *L. major*) y la proteína TSA (antioxidante tiol-específicas). Varias investigaciones han permitido demostrar que cada una de estas proteínas probadas individualmente o en asociación con IL-12 es capaz de inducir un enlentecimiento muy significativo de la evolución de la enfermedad en ratones BALB/c 20 infectados por *L. major* (Skeiky et al, 1998; Coler et al, 2002; Seiky et al, 2002; Campos-Neto et al, 2002). La proteína LACK (homólogo de *Leishmania* del receptor de c-cinasa activada) en presencia de IL-12, es igualmente capaz de conferir una protección en ratones BALB/c contra un desafío con *L. major* (Gurunathan et al, 1997) virulenta. 25 Finalmente, el antígeno PSA-2 purificado a partir de *Leishmania*, le

confiere a ratones una buena protección (Handman, 1995).

Las vacunas de tercera generación comprenden las vacunas basadas en ADN que contiene uno o una pluralidad de genes que codifican para los antígenos de *Leishmania* (Iborra et al, 2003; 5 Campbell et al, 2003; Ramiro et al, 2003; Dumonteil et al, 2003).

Las vacunas de tercera generación también comprenden leishmanias cuyo poder patogénico ha sido atenuado genéticamente, mediante la delección de genes de virulencia. Se puede mencionar el caso de leishmanias a las que se les eliminó el gen que codifica para 10 la enzima dihidrofolato reductasa-timidilato sintetasa (dhfr-ts⁻). Varios estudios han demostrado, en modelos murinos, que la vacunación de ratones con estos parásitos dhfr-ts⁻ puede inducir una protección parcial contra la infección por *Leishmania* (Brodskyn et al, 2000; Streit et al, 2001). Es igualmente posible incluir en las 15 vacunas de tercera generación, a las vacunas basadas en péptidos sintéticos. Se han realizado varios ensayos de vacunación con diferentes péptidos, incluyendo generalmente los epítomos T. El ejemplo más conocido es del péptido PT3, que corresponde a la "región de unión de histidina-zinc" de la gp63. Asimismo, este 20 péptido en presencia de un adyuvante "poloxámero 407", es capaz de conferir una protección duradera en ratones sensibles BALB/c, después de un desafío con *L. major* (Spitzer et al, 1999).

Ciertas otras proteínas que son de interés, son las histonas: el primer trabajo se remonta a 1999, en el cual Soto et al 25 (1999) demostraron que la proteína H2B puede constituir un blanco

69

de la respuesta de anticuerpos en la leishmaniasis canina. Posteriormente, Maalej et al evaluaron la proteína H2B, en comparación con otras proteínas parasitarias, proponiéndola como antígeno para el diagnóstico serológico de la leishmaniasis visceral humana, y demostraron que ésta puede constituir un blanco interesante (Maalej et al, 2003).

Con respecto a la respuesta celular, Probst et al (2001) demostraron que la proteína H2B, en su forma recombinante, era capaz de inducir una fuerte proliferación de células mononucleares de sangre periférica (CMSP) en pacientes que sanaron de una leishmaniasis cutánea causada por *L. major*. Esta proliferación estuvo acompañada por una importante producción de IFN- γ , con ausencia de IL-4 (Probst et al, 2001).

En el modelo murino de la leishmaniasis visceral (LV) causada por *L. donovani*, Melby et al (2000), demostraron que la vacunación de ratones sensibles BALB/c, con una fracción de vacunas de ADN obtenidas a partir de un banco de ADNc, conteniendo principalmente H2B, era capaz de proteger parcialmente a los ratones después de un desafío con *L. donovani* virulenta.

Muy recientemente, en el modelo de la leishmaniasis experimental en ratones BALB/c infectados por *L. major*, Iborra et al (2004) demostraron que la vacunación de estos ratones con una combinación de vacuna de ADN que codifica para las proteínas histonas (H2A, H2B, H3 y H4), inducía una importante respuesta inmunitaria de tipo Th1, con la secreción de IFN- γ , asociada a la

protección parcial de los ratones vacunados después de un desafío con *L. major*.

Además, se ha demostrado que el parásito *Leishmania* es capaz de inducir la activación de células T reguladoras (Belkaid et al, 2002), que suprimen las respuestas inmunes efectoras y permiten la multiplicación y la persistencia del parásito.

Resultados concordantes sugieren que las células T reguladoras son seleccionadas positivamente después de una fuerte interacción con los péptidos de sí mismas (TCR-CMH-péptido) (Gavin y Rudensky, 2003).

Los inventores están interesados en la proteína histona H2B como candidato para vacuna. Más precisamente, en primer lugar sugieren la hipótesis que ciertas regiones conservadas de las proteínas parasitarias podrían activar preferentemente las células reguladoras, además de las secuencias divergentes que activarían las células efectoras, igualmente, que una misma proteína parasitaria podría contener los péptidos inductores de respuestas reguladoras y otros inductores de respuestas efectoras.

Los inventores analizaron comparativamente la inmunogenicidad y el papel protector de dos regiones amino-terminales, divergentes y carboxilo-terminales, conservadas, de la proteína recombinante H2B de *L. major*, así como de la proteína completa.

Se observó que, de manera sorprendente, la porción amino-terminal, (divergente) de la H2B, ayudada por CpG, confiere la

mejor protección en ratones sensibles BALB/c contra un desafío con *L. major* virulenta. Esta proteína truncada, podría constituir un buen candidato para vacuna contra la leishmaniasis.

La invención se basa en una composición inmunogénica
5 caracterizada porque comprende: i) un polipéptido antigénico que consiste de un fragmento de la proteína histona H2B de *Leishmania*, en donde el fragmento comprende la totalidad o una porción de la región N-terminal de la proteína histona H2B y ii) un adyuvante estimulante de la respuesta inmunitaria.

10 En una modalidad particular de la investigación, el principio activo inmunogénico de dicha composición inmunogénica, consiste en el polipéptido antigénico que consiste de un fragmento derivado únicamente de la porción N-terminal de la proteína histona H2B de *Leishmania*.

15 El término "fragmento" aplicado a un polipéptido o más particularmente a un antígeno, significa una parte de la proteína nativa considerada, excluyendo la totalidad de dicha proteína.

La porción N-terminal de un polipéptido nativo, por ejemplo, de la proteína histona H2B de *Leishmania*, representa, de
20 manera general, menos de la mitad de la secuencia de aminoácidos totales de ese polipéptido, en donde la secuencia restante es el extremo N-terminal.

En un ejemplo específico, el polipéptido de conformidad con la invención tiene una secuencia polipeptídica menor de 65
25 aminoácidos, de preferencia menor de 50 aminoácidos. El

polipéptido en su marco tiene una secuencia que comprende cuando menos 6 aminoácidos consecutivos de la porción N-terminal del antígeno H2B considerado.

En un ejemplo específico, la longitud de la secuencia de
5 dicho polipéptido se presenta del 10 al 45% de la longitud de la proteína histona.

La secuencia de aminoácidos de un polipéptido de conformidad con la invención, por ejemplo, es la siguiente: M A S S R
S A S R K A S N P H K S H R K P K R S W N V Y V G R S L K A I N A
10 Q M S M S H R T.

En un ejemplo específico, el polipéptido es característico de la histona H2B de *Leishmania major*.

El polipéptido, de la misma manera, puede ser característico de la proteína histona H2B de *L. infantum*, *L. donovani*,
15 *L. tropica* y *L. enrietti*.

Las secuencias de las proteínas histonas H2B de estos parásitos, ya se han descrito: la H2B de *L. infantum*, fue descrita en Soto M et al, 1999; Antigenicity of the *Leishmania infantum* histones H2B and H4 during canine viscerocutaneous leishmaniasis; Journal
20 Clin. Exp. Immuno. 115(2), 342-349 (1999); la H2B de *L. enrietti* fue descrita en Genske J. E. et al; 1991; Structure and regulating of histone H2B mRNAs from *Leishmania enrietti*; Mol. Cell. Biol. 11(1), 240-249 (1991).

Las secuencias proteicas de H2B de *L. donovani* y *L.*
25 *tropica* todavía no se han descrito. No obstante, la conservación

68

esperada a nivel de las proteínas histonas H2B de *Leishmania*, debe ser superior al 80%.

De manera general, el polipéptido puede ser característico de una especie seleccionada del conjunto del género *Leishmania*.

5 En un ejemplo específico, el polipéptido comprendido en la composición inmunogénica de conformidad con la invención, es un polipéptido purificado o aislado de su ambiente de producción.

En un ejemplo específico, dicha composición inmunogénica comprende un ADN en forma de una secuencia polinucleotídica que
10 codifica para el polipéptido de conformidad con la invención. Por ejemplo, el polinucleótido está insertado en un plásmido de expresión en eucariotes.

Uno o una pluralidad de aminoácidos del polipéptido determinado a partir de una proteína histona H2B de una especie de
15 *Leishmania*, tal como se ilustra más adelante y se designa con la expresión "polipéptido de referencia", puede ser sustituido, eliminado o agregado, para formar un polipéptido variante que conserva cuando menos el 50% de identidad, de preferencia, cuando menos el 80% de identidad con el polipéptido de referencia, en donde dicho polipéptido
20 variante conserva las propiedades inmunogénicas del polipéptido de referencia.

El porcentaje de identidad entre el polipéptido de referencia y el polipéptido variante se determina después de haber realizado una alineación global óptima. Esta alineación se puede
25 obtener, principalmente, utilizando el algoritmo "Needleman-Wunsch"

68

(Needleman y Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48:443-453) o Clustal W (Higgins & Sharp, a package for performing multiple sequence alignment on a microcomputer, 1988, Dec 15;73(1):237-44).

La noción de identidad significa que un aminoácido tiene una posición determinada en el polipéptido que es idéntica a un aminoácido correspondiente en el polipéptido variante, después de haber sido sometido a una alineación con respecto al polipéptido de referencia.

El hecho de que la secuencia del polipéptido de referencia tenga n% de identidad con la secuencia del polipéptido variante, significa que n% de las posiciones de alineación global óptima entre las dos secuencias, consisten en aminoácidos idénticos.

La expresión "propiedad inmunogénicas de un polipéptido" significa que el polipéptido es capaz de provocar, por sí solo o en asociación con un adyuvante de inmunidad o una molécula proteica, una reacción inmunitaria, principalmente una respuesta inmunitaria de tipo celular, por ejemplo, una respuestas de células T CD4+.

Por ejemplo, el polipéptido variante tiene una secuencia polipeptídica menor de 75 aminoácidos, de preferencia menor de 60 aminoácidos.

De manera ilustrativa, los polipéptidos variantes pueden comprender sustituciones conservadoras de aminoácidos en la secuencia de la histona H2B de *Leishmania* anteriormente ilustrada.

Uno o una pluralidad de aminoácidos del polipéptido de referencia, se pueden sustituir, eliminar o agregar, para formar un

polipéptido variante que conserve cuando menos el 50% de similitud, de preferencia cuando menos el 80% de similitud con el polipéptido de referencia, en donde el polipéptido variante conserva las propiedad inmunogénicas del polipéptido de referencia.

5 Por el contrario a la noción de identidad, la noción de similitud se refiere a aminoácidos idénticos, y aminoácidos diferentes pero que producen un polipéptido que conserva las propiedades inmunogénicas del polipéptido de referencia; o solamente tales aminoácidos diferentes.

10 El hecho de que la secuencia del polipéptido de referencia tenga n% de similitud con la secuencia del polipéptido variante, significa que n% de las posiciones de alineación global óptima entre las dos secuencias, consisten en aminoácidos idénticos, y aminoácidos diferentes cuya presencia en el polipéptido no modifica
15 sensiblemente sus propiedades inmunogénicas; o solamente tales aminoácidos diferentes.

 En particular, las sustituciones en el polipéptido son sustituciones conservadoras.

 Una sustitución conservadora siempre es una sustitución
20 que tiene una calificación positiva en la matriz de sustituciones Blosum62, "blosum62 substitution matrix" (Henikoff y Henikoff, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 10915-10919).

 Otra modalidad de variantes polipeptídicas se refiere a la preparación de péptidos de la proteína histona H2B considerada, en
25 donde los péptidos tiene, por ejemplo, secuencias peptídicas que

comprenden de 6 a 30, por ejemplo de 6 a 20 o de 6 a 15 aminoácidos, seleccionados a partir de la secuencia N-terminal de la proteína histona.

Los péptidos se pueden utilizar en mezclas, y comprender
5 solamente la forma de mixótopos. Las mezclas peptídicas comprenden, por ejemplo, cuando menos 2 o cuando menos 5 secuencias peptídicas diferentes unas de las otras, o, por el contrario, que contengan aminoácidos consecutivos en común.

Los polipéptidos (y comprendidos los péptidos) de la
10 invención, se preparan por métodos conocidos para los técnicos en la materia, por ejemplo, por síntesis química, o por expresión en un sistema celular, principalmente bacteriano, o *in vitro* en un sistema "libre de células".

El término "adyuvante" significa cualquier sustancia o
15 compuesto capaz de promover o aumentar la respuesta inmunitaria contra un principio activo determinado, en un mamífero, en comparación con la respuesta inmunitaria obtenida, en las mismas condiciones, pero administrando el principio activo por sí solo.

En un ejemplo específico de modalidad de la invención, el
20 adyuvante favorece una respuesta inmunitaria de tipo celular. El adyuvante, por ejemplo, el CpG o cualquier otro adyuvante autorizado para uso en vacunas en seres humanos o animales. La concentración de CpG utilizada para la vacunación de ratones es de 1 µg/µl y la cantidad inyectada es de 50 µg.

25 En un ejemplo específico, la composición inmunogénica de

H

conformidad con la invención, comprende además, cuando menos otro antígeno de *Leishmania* que tenga propiedad inmunogénicas para desencadenar y/o favorecer una respuesta inmunitaria, de tipo B y/o T, en huéspedes humanos o animales.

- 5 La composición inmunogénica de conformidad con la invención, puede comprender además, cuando menos un polipéptido que consiste de un fragmento de cuando menos una proteína histona suplementaria de *Leishmania*.

Dicho fragmento de una proteína de histona, se selecciona
10 principalmente de entre las proteínas histonas H2A, H3 y H4. La proteína histona es, por ejemplo, característica de *L. major*, *L. infantum*, *L. donovani*, *L. tropica* y *L. enriettii*. De manera general, la proteína histona puede ser característica de una especie que se selecciona dentro del género *Leishmania*.

- 15 Dicho fragmento, por ejemplo, puede comprender la totalidad o una porción de la región N-terminal de dicha proteína histona. El fragmento, por ejemplo, tiene una secuencia polipeptídica menor de 65 aminoácidos, de preferencia menor de 50 aminoácidos.

En un ejemplo específico, la longitud de la secuencia de
20 dicho fragmento representa de 10 al 45% de la longitud de la proteína histona.

La composición inmunogénica de conformidad con la invención, puede comprender alternativamente cuando menos una proteína histona completa de *Leishmania*, en asociación con el
25 polipéptido antigénico de la histona H2B que se describió



anteriormente.

La mencionada cuando menos una proteína histona completa, se selecciona principalmente de entre H2A, H3 y H4. Ésta puede ser característica de *L. major*, *L. infantum*, *L. donovani*, *L.*
5 *tropica* y *L. enriettii*. De manera general, dicha cuando menos una proteína histona completa, puede ser característica de una especie que se seleccione dentro del género *Leishmania*.

La composición inmunogénica se puede inyectar como tal, o con un vehículo farmacéuticamente aceptable. La composición
10 inmunogénica de conformidad con la invención, también puede comprender además un vehículo farmacéuticamente aceptable que pueda ser administrado a un huésped humano o animal. Un vehículo farmacéuticamente aceptable puede ser seleccionado fácilmente por un técnico en la materia, entre agua, sustancias polares, tales como
15 etilénglicol, polietilénglicol o propilénglicol, así como sustancias no polares.

De conformidad con una modalidad particular de la invención, la composición inmunogénica es capaz de inducir una respuesta inmunitaria de tipo celular, de células T efectoras, por
20 ejemplo, células CD4+, cuando dicha composición es administrada a un ser humano o un animal.

Las células T comprenden células efectoras de inmunidad mediada por células (por ejemplo, las células T CD4+ ó CD8+), así como células reguladoras ("cooperadoras" y supresoras) de la
25 respuesta inmunitaria. El polipéptido de conformidad con la



invención, activa de preferencia las células efectoras de inmunidad mediada por células.

En la presente invención, la respuesta inmunitaria de tipo celular, principalmente puede ser una respuesta inmunitaria de tipo
5 Th1.

El polipéptido o polipéptido variante, está presente en la composición inmunogénica de conformidad con la invención en una concentración comprendida entre 0.01 y 5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, por ejemplo entre 0.01 y 2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, o entre 0.4 y 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.

10 Igualmente, la invención se refiere a un polipéptido que consiste de un fragmento de la proteína histona H2B de *Leishmania*, en donde el fragmento comprende la totalidad o una porción de la región N-terminal de dicha proteína histona H2B.

En un ejemplo específico, el polipéptido es característico
15 de la histona H2B de *Leishmania major*.

El polipéptido puede ser característico de la proteína histona H2B de *L. infantum*, *L. donovani*, *L. tropica* y *L. enriettl*. De manera general, el polipéptido puede ser característico de una especie que se selecciona del género *Leishmania*.

20 En un ejemplo específico, el polipéptido de conformidad con la invención tiene una secuencia polipeptídica menor de 65 aminoácidos, de preferencia menor de 50 aminoácidos.

En un ejemplo específico, el polipéptido de conformidad con la invención tiene una secuencia polipeptídica menor de 65
25 aminoácidos, de preferencia menor de 50 aminoácidos. El

polipéptido en su marco de secuencia, comprende cuando menos 6 aminoácidos consecutivos de la porción N-terminal del antígeno H2B considerado.

La longitud de la secuencia de dicho polipéptido, 5 representa por ejemplo, del 10 al 45% de la longitud de la proteína histona.

En un ejemplo específico, el polipéptido de conformidad con la invención comprende los 50 primeros aminoácidos de la proteína histona H2B, más particularmente los primeros 46 10 aminoácidos de la proteína histona H2B, tal como se representa en la figura 1.

La secuencia de aminoácidos de un polipéptido de conformidad con la invención, por ejemplo, es la siguiente: M A S S R S A S R K A S N P H K S H R K P K R S W N V Y V G R S L K A I N A 15 Q M S M S H R T.

En un ejemplo específico, el polipéptido de conformidad con la invención es un polipéptido purificado o aislado de su ambiente de producción.

La invención también tiene como objetivo un polipéptido 20 variante que conserva cuando menos 50% de identidad, de preferencia cuando menos 80% de identidad con el polipéptido de conformidad con la invención. Dicho polipéptido variante presente una sustitución, una delección o una adición, de cuando menos un aminoácido, con respecto a la secuencia del polipéptido y conserva 25 las propiedad inmunogénicas de dicho polipéptido.

El polipéptido variante tiene una secuencia polipeptídica menor de 75 aminoácidos, de preferencia menor de 60 aminoácidos.

De manera ilustrativa, los polipéptidos variantes pueden comprender sustituciones conservadoras de aminoácidos en la
5 secuencia de la histona H2B de *Leishmania* que se ilustró anteriormente.

Otra modalidad de variantes polipeptídicas recurre a la preparación de péptidos de la proteína histona H2B considerada, en donde los péptidos tienen, por ejemplo, secuencias peptídicas que
10 comprenden de 6 a 30, por ejemplo de 6 a 20 ó de 6 a 15 aminoácidos, seleccionados a partir de la secuencia N-terminal de la proteína histona.

Los péptidos se pueden utilizar en mezclas, y estar en forma de mixótopos. Las mezclas peptídicas comprenden, por
15 ejemplo, cuando menos 2 ó cuando menos 5 secuencias peptídicas diferentes unas de las otras o por el contrario, tienen aminoácidos consecutivos en común.

Los polipéptidos (comprendidos los péptidos) de la invención, se preparan por métodos conocidos para los técnicos en la
20 materia, por ejemplo, por síntesis química, o por expresión en un sistema celular, principalmente bacteriano, o *in vitro* en un sistema "libre de células".

Igualmente, la invención se refiere a una molécula de ácido nucleico que codifica para el polipéptido o el polipéptido variante de
25 conformidad con la invención.



La secuencia nucleotídica de dicha molécula de ácido nucleico, puede ser la siguiente o una porción de esta secuencia:

ATG GCC TCT TCT CGC TCT GCT TCC CGC AAG GCT TCC AAC
CCG CAC AAG TCG CAC CGC AAG CCG AAG CGC TCG TGG AAC
5 GTG TAC GTG GGC CGC TCG CTG AAG GCG ATC AAC GCC CAG
ATG TCG ATG TCG CAC CGC ACG.

De la misma manera, la invención se refiere a una vacuna que permite obtener una protección contra una infección por *Leishmania*.

10 El principio activo de dicha vacuna comprende el polipéptido, el polipéptido variante o la molécula de ácido nucleico de conformidad con la invención. En un ejemplo específico, la vacuna comprende además un adyuvante que estimula la respuesta inmunitaria cuando es administrado a un huésped humano o animal, y
15 de manera general, dicha vacuna se prepara a partir de una composición inmunogénica de conformidad con la invención, tal como se describió anteriormente.

El término "vacuna" significa una preparación antigénica que permite obtener la prevención de infecciones microbianas,
20 mediante la vacunación de un huésped. La vacuna de conformidad con la invención, alternativamente se puede preparar para conducir una actividad terapéutica contra la infección.

El adyuvante favorece, por ejemplo, una respuesta inmunitaria de tipo celular y, en el caso de la presente invención,
25 puede ser el CpG.



Dicha vacuna se puede administrar, por ejemplo, inyectada como tal, o con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Un vehículo farmacéuticamente aceptable puede ser seleccionado fácilmente por un técnico en la materia, entre agua, sustancia
5 polares, tales como etilénglicol, polietilénglicol o propilénglicol, así como sustancias no polares.

En un ejemplo específico, la vacuna comprende cuando menos otro antígeno de *Leishmania* agregado como principio activo, en donde dicho antígeno tiene propiedad inmunogénicas para
10 desencadenar y/o favorecer una respuesta inmunitaria, de tipo B y/o T, en un huésped humano o animal.

La vacuna además puede comprender cuando un polipéptido que consiste de un fragmento de cuando menos una proteína histona diferente de la H2B de *Leishmania*, o una molécula
15 de ácido nucleico que codifica para dicho o dichos polipéptidos, o puede comprender además cuando menos una proteína histona completa de *Leishmania*, en asociación con el polipéptido antigénico de la histona H2B anteriormente descrito, o una molécula de ácido nucleico que codifica para dicha o dichas proteínas histonas
20 completas.

Dicho fragmento de una proteína histona, se selecciona principalmente entre las proteínas histonas H2A, H3 y H4. De manera general, la cuando menos una proteína histona puede ser característica de una especie que se selecciona dentro del género
25 *Leishmania*. Dicha cuando menos una proteína histona, es por



ejemplo característica de *L. major*, *L. infantum*, *L. donovani*, *L. tropica* y *L. enriettii*.

Este fragmento, por ejemplo, puede comprender la totalidad o una parte de la región N-terminal de la proteína histona.

- 5 El fragmento, por ejemplo, tiene una secuencia polipeptídica menor de 65 aminoácidos, de preferencia menor de 50 aminoácidos.

En un ejemplo específico, la longitud de la secuencia de dicho fragmento, representa del 10 al 45% de la longitud de la proteína histona.

- 10 La vacuna de conformidad con la invención, se puede utilizar para prevenir o tratar una infección por *Leishmania major*, cuando es administrada a un ser humano o a un animal.

- La vacuna de conformidad con la invención es capaz de inducir una respuesta inmunitaria de tipo celular, de células T efectoras, por ejemplo células CD4+, cuando es administrada a un ser humano o a un animal.
- 15

- Las células T comprenden células efectoras de inmunidad mediada por células (por ejemplo, las células T CD4+ ó CD8+), así como células reguladoras ("cooperadoras" y supresoras) de la respuesta inmunitaria. El polipéptido de conformidad con la invención, activa de preferencia las células efectoras de inmunidad mediada por células.
- 20

Esta respuesta inmunitaria de tipo celular, principalmente puede ser una respuesta inmunitaria de tipo Th1.

- 25 Se sabe que el CpG es capaz de activar monocitos,

macrófagos y células dendríticas. Así pues, el CpG inyectado al mismo tiempo que un antígeno, puede orientar la respuesta inmune específica hacia una de tipo Th1.

Las vías de administración de la vacuna de conformidad con la invención, son diversas y comprenden la vía intravenosa, oral, transdérmica y nasal; no obstante, las vías intramuscular y subcutánea son las más comunes.

El principio activo de la vacuna de conformidad con la invención, está presente en una cantidad suficiente. La expresión "cantidad suficiente" significa una cantidad o una concentración del principio activo, capaz de inducir una protección inmunitaria contra la Leishmaniasis. Eventualmente, las indicaciones para la vacunación pueden prescribir la administración repetida de dosis de la vacuna.

El polipéptido o el polipéptido variante o la molécula de ácido nucleico, están presentes en la vacuna de conformidad con la invención en una concentración comprendida entre 0.01 y 5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, por ejemplo entre 0.01 y 2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ o entre 0.4 y 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

Finalmente, la invención se refiere también a un vector de expresión capaz de expresar el polipéptido o el polipéptido variante de conformidad con la invención, que comprende una molécula de ácido nucleico de conformidad con la invención.

El término "vector de expresión" significa el medio por el cual los ácidos nucleicos, principalmente el ADN, ADN complementario, ARN o variantes de los mismos, son introducidos en una célula, particularmente una célula procariótica, para expresar o

producir una proteína determinada.

En el objetivo de expresar cierta proteína o cierto polipéptido, el vector de expresión puede contener cuando menos un promotor, cuando menos un operador, cuando menos un codón de terminación, así como cualquier secuencia necesaria para lograr una transcripción eficaz y una traducción de los ácidos nucleicos a partir del vector. El conjunto de estos elementos es conocido por los técnicos en la materia.

La invención también tiene como objetivo células huésped, por ejemplo procarióticas, principalmente bacterias, transformadas o transfectadas por un vector de expresión que comprende un polinucleótido que codifica para el polipéptido de conformidad con la invención, bajo condiciones que permitan su expresión.

La invención también tiene como objetivo un plásmido pET-CH2B que comprende la secuencia de la porción carboxilo-terminal de la proteína H2B, depositado en la Colección Nacional de Cultivos de Microorganismos (CNCM), con el No. I-3362, el 24 de febrero del 2005.

La invención también tiene como objetivo un plásmido pET-NH2B, que contiene la secuencia de la porción amino-terminal divergente de la proteína H2B, depositado en la Colección Nacional de Cultivos de Microorganismos (CNCM), con el No. I-3363, el 24 de febrero del 2005.

La invención también tiene como objetivo un plásmido pET-H2B, que contiene la secuencia de la proteína H2B, depositado en la

Colección Nacional de Cultivos de Microorganismos (CNCM), con el No. I-3361, el 24 de febrero del 2005.

Figura 1: *Secuencia nucleotídica y proteína de la histona H2B de L. major.* Las secuencias representadas por las notaciones H2B1 P-ND up, H2B2 X-S rev, H3B P-Nd up y H3B P-Xh rev, corresponden a los cebadores de amplificación de las dos partes h2b Δ C65(1-138pb) (N-terminal) y h2b Δ N46(139-333pb) (C-terminal) de la proteína.

Figura 2: *Análisis de la expresión y purificación de las proteínas histonas recombinantes H2B Δ C65 (A), H2B Δ N46 (B) y H2B (C) de L. major, en gel de poliacrilamida al 18%, después de una tinción con azul de Commassie.*

Pozo 1: extracto crudo de bacterias BL21 transformadas con los plásmidos recombinantes respectivos y no inducidas con IPTG.

Pozo 2: extracto crudo de bacterias BL21 transformadas con los plásmidos recombinantes respectivos e inducidas con IPTG.

Pozo 3: proteínas histonas recombinantes purificadas en una columna de níquel (H2B, H2B Δ C65 y H2B Δ N46 de L. major).

Pozo PM: marcadores de peso molecular.

Figura 3: *Análisis por inmunoelectrotransferencia (immunoblot) de la reactividad de anticuerpos policlonales anti-H2B de conejo, frente a las proteínas histonas recombinantes H2B, H2B Δ C65 y H2B Δ N46 de L. major, después de una purificación en una columna de níquel.*

Pozo 1: extracto crudo de bacterias BL21 transformadas

con los plásmidos recombinantes respectivos y no inducidas con IPTG.

Pozos 2, 3, 4: proteínas histonas recombinantes purificadas en una columna de níquel (H2B, H2B Δ C65 y H2B Δ N46 de *L. major*).

Figura 4: representación gráfica de la evolución del diámetro de las lesiones en ratones BALB/c de control (PBS) o inmunizados con H2B (H2B-CpG) o sólo la parte amino-terminal de H2B (H2B Δ C65-CpG), e presencia de 25 μ g de CpG/inyección, utilizado como adyuvante. Los ratones fueron infectados 30 días después del inicio, con 10^5 promastigotes de *L. major*. Los valores representan el promedio de las lesiones, expresado en mm $\pm$ desviación estándar.

Figura 5: Determinación del promedio del número de parásitos por ganglio, por la técnica de diluciones límite en los diferentes grupos de ratones inmunizados dos veces por vía subcutánea, en la almohadilla plantar, con H2B+CpG, H2B Δ C65+CpG y H2B Δ N46+CpG. La cuantificación se realizó 8 semanas después del desafío con 10^6 promastigotes de *L. major*. Los resultados se expresan en el promedio del número de parásitos por ganglio de la dilución más alta en la cual al menos un promastigote de *L. major* era viable.

Figura 6: Representación gráfica de la evolución del promedio de los diámetros de las lesiones (mm), en ratones BALB/c vacunados o no, y después de un desafío con *L. major*, a razón de

87

10^5 (A) ó 10^6 (B) promastigotes metacíclicos.

T+5 ó 6: grupo control (PBS) después de un desafío con 10^5 (5) ó 10^6 (6) parásitos.

N+5 ó 6: ratones que recibieron la región amino-terminal
5 de la H2B.

C+5 ó 6: ratones que recibieron la región carboxilo-terminal de la H2B.

CpG+5 ó 6: ratones que recibieron solamente adyuvante (CpG).

10 Los valores representan el promedio de las lesiones, expresado en mm $\pm$ desviación estándar.

Figura 7: determinación de la carga parasitaria, por la técnica de diluciones límite en diferentes grupos de ratones inmunizados tres veces, por vía subcutánea, en la almohadilla
15 plantar, con H2B Δ N46+CpG, H2B Δ C65+CpG, así como los controles CpG. La cuantificación se realizó 10 semanas después del desafío con 10^5 ó 10^6 promastigotes de *L. major*. Los resultados se expresan como en la Figura 5.

EJEMPLOS

20 **Material y Métodos**

Parásitos y condiciones de cultivo

La cepa parasitaria MHOM/TN/94/GLC95 (GLC94) aislada de una lesión humana de leishmaniasis cutánea zoonótica (LCZ), se utilizó en el presente trabajo (Louzir *et al.*, 1998). Este aislamiento
25 pertenece a la especie *L. major*, zimodemo MON25 (Kebaier *et al.*,

24

2001). Los parásitos se cultivaron en medio NNN a 26°C y progresivamente fueron transferidos a medio RPMI (SIGMA, St. Louis, MO) que contenía L-glutamina 2 mM, 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina y 10% de suero fetal de ternera inactivado (medio completo). Los promastigotes, tomados en fase logarítmica de crecimiento, se ajustaron a 10^6 parásitos/mL en un volumen constante de medio completo y después se incubaron a 26°C. La fase estacionaria de crecimiento se alcanzó después de 4 a 6 días de cultivo, con una densidad de parásitos de $3 \cdot 10^7$ a $8 \cdot 10^7$ parásitos/mL. Los promastigotes metacíclicos, posteriormente, se purificaron bajo un gradiente de Ficoll al 5-20%, se lavaron, se contaron y después se inyectaron a los ratones.

Expresión y purificación de las diferentes proteínas recombinantes en bacterias *E. coli* BL21

Las secuencias que codifican para la proteína histona H2B completa (339pb), la porción amino-terminal (aminoácidos del 1 al 46) divergente H2B Δ C65 (138pb) y la porción carboxilo-terminal (aminoácidos del 47 al 111) conservada H2B Δ N46 (198pb), se clonaron en el vector de expresión bacteriano pET-22b (Novagen) (Figura 1). Las bacterias *E. coli* BL21 que contenían los plásmidos recombinantes (pET-22b-H2B, pET-H2B Δ C65 y pET-H2B Δ N46), se cultivaron en el medio LB y después se indujo la síntesis de la proteína recombinante en presencia de isopropil-1-tio- β -D-galactopiranósido (IPTG) 1 mM, durante 4 horas. Las proteínas recombinantes se purificaron por cromatografía de afinidad, en una

columna de níquel (Ni^{2+}) (Amersham-Pharmacia). La pureza de las proteínas producidas se verificó por electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (EGPA-DSS) (Figura 2).

El plásmido pET-CH2B que contenía la secuencia de la
5 porción carboxilo-terminal de la proteína H2B, se depositó en la Colección Nacional de Cultivos de Microorganismos (CNCM), el 24 de febrero del 2005, con el No. I-3362.

Descripción del pET-CH2B. El plásmido pET-CH2B se obtuvo por clonación en el plásmido pET-22b+ (Novagen), de la
10 secuencia de ADN complementaria que codifica para la proteína histona H2B truncada, de los 46 primeros aminoácidos ($\text{H2B}\Delta\text{N46}$) de *Leishmania major*. El gen $\text{H2B}\Delta\text{N46}$ fue clonado a nivel de los sitios de restricción *NdeI* y *XhoI* del pET-22b+. Las bacterias recombinantes *E. coli* XL1-blue se transformaron con el plásmido
15 pET-CH2B. Éstas son resistentes a la tetraciclina y a la ampicilina. Los genes de resistencia a la tetraciclina y a la ampicilina son portados por las bacterias XL1-blue y el plásmido pET-22b+ rcombinante.

El plásmido pET-NH2B que contenía la secuencia de la
20 porción amino-terminal divergente de la proteína H2B, se depositó en la Colección Nacional de Cultivos de Microorganismos (CNCM), el 24 de febrero del 2005, con el No. I-3363.

Descripción del pET-NH2B: el plásmido pET-NH2B se obtuvo mediante la clonación en el plásmido pET-22b+ (Novagen) de
25 la secuencia de ADN complementaria que codifica para la proteína



histona H2B truncada de los últimos 65 aminoácidos (H2B Δ C65) de *Leishmania major*.

El gen H2B Δ C65 se clonó a nivel de los sitios de restricción *Nde*I y *Xho*I. Se transformaron bacterias recombinantes *E. coli* XL1-blue con pET-NH2B. Éstas son resistentes a la tetraciclina y a la ampicilina. Los genes de resistencia a la tetraciclina y a la ampicilina son portados por las bacterias XL1-blue y el plásmido pET-22b+ recombinante.

El plásmido pET-H2B que contenía la secuencia de la proteína H2B, se depositó en la Colección Nacional de Cultivos de Microorganismos (CNCM), el 24 de febrero del 2005, con el No: I-3361.

Descripción del pET-H2B: el plásmido pET-H2B se obtuvo mediante la clonación en el plásmido pET-22b+ (Novagen) de la secuencia de ADN complementaria que codifica para la proteína histona H2B completa de *Leishmania major*. El gen H2B fue clonado a nivel de los sitios de restricción *Nde*I y *Xho*I.

Se transformaron bacterias recombinantes *E. coli* XL1-blue con pET-H2B. Éstas son resistentes a la tetraciclina y a la ampicilina. Los genes de resistencia a la tetraciclina y a la ampicilina son portados por las bacterias XL1-blue y por el plásmido pET-22b+ recombinante.

El plásmido pET-H2B, en lo sucesivo, se designará como pET-22b-H2B.

El plásmido pET-CH2B, en lo sucesivo, se designará como

pET-H2B Δ N46.

El plásmido pET-CH2B, en lo sucesivo, se designará como pET-H2B Δ C65.

Las condiciones de cultivo de las bacterias transformadas
5 fueron las siguientes:

Medio de cultivo propuesto

Las bacterias recombinantes se cultivaron ya sea en medios de cultivo líquidos o bien, en medios de cultivo sólidos.

El medio de cultivo líquido, Caldo Luria (LB), está
10 compuesto de: bactotripton a 1% (peso/volumen), 0.5% (p/v) de extracto de levadura y NaCl al 1% (p/v). El pH del medio debe estar regulado a 7. Este medio se propone para la multiplicación de los plásmidos pET-22b+ que contienen el gen H2B Δ C65 (o que contienen el gen H2B Δ N46 ó el gen H2B).

15 El medio de cultivo sólido, Agar de Caldo Luria (Agar-LB) está constituido por: bactotripton a 1% (peso/volumen), 0.05% (p/v) de extracto de levadura, NaCl al 1% (p/v) y 1.5% (p/v) de agar. Este medio se propone esencialmente cuando se realizan cultivos a partir de bacterias recombinantes congeladas a -0.80°C.

20 Estos dos medios de cultivo se esterilizan a 120°C durante 20 minutos, justo después de su preparación.

Condiciones de almacenamiento

Las bacterias recombinantes congeladas a -80°C, se extendieron en una botella que contenía medio de cultivo sólido Agar-
25 LB suplementado con 15 μ g/mL de tetraciclina y 50 μ g/mL de

88

ampicilina, durante 18 horas, a 37°C, y después una colonia aislada se tomó y se incubó en 5 mL de LB adicionando los mismos antibióticos. El cultivo se realizó durante 18 horas a 37°C.

Incubación (temperatura, atmósfera, agitación,
5 iluminación).

La temperatura del cultivo siempre fue a 37°C bajo una agitación de 200 revoluciones/min (aparato Incubadora Orbital Sanyo). El cultivo se realiza bajo la atmósfera ambiental y bajo una iluminación natural.

10 Protocolo de vacunación y desafío en ratones

Se realizaron dos protocolos experimentales, en el primer protocolo, los ratones fueron inyectados dos veces a intervalos de 15 días con las diferentes preparaciones de vacuna (Tabla 1). El segundo protocolo se utilizó para confirmar y optimizar ciertos
15 resultados (véanse los detalles en la Tabla 2).

Todas las inyecciones fueron por vía subcutánea, en la almohadilla plantar de la pata delantera derecha, con un volumen final de 50 µl por inyección. Cuatro semanas después de la última inyección, los ratones recibieron una inyección de parásitos *L. major*
20 (promastigotes metacíclicos), en la almohadilla plantar de la pata delantera derecha. Se utilizaron dos cantidades de parásitos, 10⁵ y 10⁶ parásitos/inyección. El seguimiento de la evolución de la enfermedad experimental, se realizó mediante la medición semanal del diámetro de la lesión.

89

TABLA 1

Experimento 1, protocolo experimental de inmunización y desafío en ratones.

5	10	No. de grupo (No. de ratones)	Preparación de vacuna	Dosis	Vía de admon.	Desafío
		1 (4 ratones)	PBS	50 µl	Subcutánea	10 ⁵ parásitos
		2 (4 ratones)	H2B+CpG	25µg/20µg	Subcutánea	10 ⁵ parásitos
		3 (4 ratones)	H2B+nCpG	25µg/20µg	Subcutánea	10 ⁵ parásitos
		4 (4 ratones)	H2BΔC65+CpG	25µg/20µg	Subcutánea	10 ⁵ parásitos
15		5 (4 ratones)	H2BΔC65+nCpG	25µg/20µg	Subcutánea	10 ⁵ parásitos
		6 (4 ratones)	H2BΔN46+CpG	25µg/20µg	Subcutánea	10 ⁵ parásitos
		7 (4 ratones)	H2BΔN46+nCpG	25µg/20µg	Subcutánea	10 ⁵ parásitos
		8 (4 ratones)	CpG	20µg	Subcutánea	10 ⁵ parásitos
		9 (4 ratones)	nCpG	20µg	Subcutánea	10 ⁵ parásitos
		10 (4 ratones)	H2B	25µg	Subcutánea	10 ⁵ parásitos
		11 (4 ratones)	H2BΔC65	25µg	Subcutánea	10 ⁵ parásitos
		12 (4 ratones)	H2BΔN46	25µg	Subcutánea	10 ⁵ parásitos

90

TABLA 2

Experimento 2, protocolo experimental de inmunización y desafío en ratones.

5	No. de grupo (No. de ratones)	Preparación de vacuna	Dosis/Vol	Vía de admon.	Desafío
	1 (6 ratones)	CpG	50µg	Subcutánea	10 ⁵ parásitos
	2 (6 ratones)	CpG	50µg	Subcutánea	10 ⁶ parásitos
	3 (6 ratones)	H2BΔC65+CpG	20µg/50µg	Subcutánea	10 ⁵ parásitos
10	4 (6 ratones)	H2BΔC65+CpG	20µg/50µg	Subcutánea	10 ⁶ parásitos
	5 (6 ratones)	H2BΔN46+CpG	20µg/50µg	Subcutánea	10 ⁵ parásitos
	6 (6 ratones)	H2BΔN46+CpG	20µg/50µg	Subcutánea	10 ⁶ parásitos
	7 (6 ratones)	PBS	50µg	Subcutánea	10 ⁵ parásitos
	8 (6 ratones)	PBS	50µg	Subcutánea	10 ⁶ parásitos

15 Carga parasitaria

La cuantificación de los parásitos se estimó a nivel de los sitios de lesión, utilizando una variante de la técnica de diluciones limitadas (Titus RG, Marchand M, Boon T, Louis JA. A limiting dilution assay for quantifying *Leishmania major* in tissues of infected mice. Parasite Immunol 1985; 7:545-55). Brevemente, la pata infectada se cortó, se homogeneizó en un volumen de 5 ml de medio RPMI adicionado con antibióticos y después se hizo una serie de diluciones de 1:10 hasta 1:10¹¹, por cuádruplicado, en una placa de microtitulación (96 pozos, Nunc, Roskilde, Dinamarca) que contenia medio RPMI suplementado con 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de

91

estreptomycin, L-glutamina 2 mM y suero bovino sin complementado al 10%. Las placas se incubaron a 26°C durante cuando menos 15 días. La búsqueda de parásitos vivos se realizó con un microscopio invertido. La carga parasitaria se expresó como el promedio del 5 logaritmo negativo de la última dilución en la cual se detectaron parásitos móviles.

Resultados

Producción y purificación de las diferentes proteínas recombinantes

10 La proteína H2B completa (111 aa), la porción divergente de la H2B situada a nivel de los 46 primeros aminoácidos y la porción conservada de la H2B localizada entre los aa 47 y 111, se expresaron utilizando el sistema de expresión procariótico pET, y después se purificaron por cromatografía de afinidad en una columna de níquel 15 (Fig. 2). Los anticuerpos policlonales anti-H2B obtenidos después de la inmunización de ratones BALB/c con la proteína recombinante H2B completa, reconocieron específicamente, por inmunoelctrotransferencia, las proteínas recombinantes H2B, H2B Δ C65 y H2B Δ N46 (Fig. 3).

20 **Evaluación clínica y patológica del efecto de la vacunación de ratones BALB/c con la proteína H2B completa, o mutada, seguida por un desafío con *L. major* virulenta.**

Los experimentos preliminares realizados en ratones BALB/c vacunados con la proteína H2B por sí sola o en presencia de 25 un adyuvante (dos inyecciones de 20 mg de proteína $\pm$ 25 μ g de CpG,

a intervalos de 15 días), demostraron que estos ratones fueron capaces, un mes después de la última inmunización, de producir grandes cantidades de INF- γ cuando sus células ganglionares (drenadas de los sitios de inyección) fueron reestimuladas *in vitro* con la proteína H2B. Las cantidades de IL-10 ó IL-4 fueron muy bajas o no detectables. Estos resultados sugieren que la proteína H2B tiene la capacidad de inducir, en ratones BALB/c, una respuesta específica Th1.

La capacidad de las diferentes preparaciones de vacuna para inducir una protección en el modelo murino de leishmaniasis experimental, fue evaluada en ratones sensibles BALB/c, utilizando dos experimentos diferentes y complementarios.

Experimento 1

Dos grupos de ratones BALB/c (4 ratones por grupo), hembras de 6 a 8 semanas de edad, fueron inyectados dos veces a intervalos de 15 días, con diferentes preparaciones de vacuna (Tabla 1). Las proteínas recombinantes probadas ya sea fueron auxiliadas con el adyuvante CpG, o bien, con un control negativo de CpG, denominado no-CpG (nCpG). El CpG es un oligodesoxinucleótido de ADN no metilado, que posee una porción particular de CpG. Se ha demostrado claramente en la literatura científica, que el adyuvante CpG es capaz de activar monocitos, macrófagos y células dendríticas. Asimismo, el CpG inyectado al mismo tiempo que un antígeno, puede orientar la respuesta inmune específica hacia el tipo Th1 (para revisión, véase Klinman et al., 2004).

45

Se realizaron dos inmunizaciones por vía subcutánea, en la almohadilla plantar de la pata delantera derecha. Un mes después, los diferentes grupos de ratones BALB/c fueron infectados con 2×10^5 promastigotes metacíclicos de la cepa parasitaria virulenta *L. major* (GLC94), en la almohadilla plantar de la pata delantera izquierda. El resultado de la evolución de la lesión en cada lote de ratones inmunizados e infectados, se expresó como el promedio del tamaño de las lesiones observadas en los ratones del mismo grupo. Después de un seguimiento clínico de 8 semanas, sólo dos lotes de ratones mostraron una mejoría muy significativa de las lesiones experimentales. Se trata de los ratones inmunizados con la proteína H2B completa, en presencia de CpG (H2B+CpG) y los ratones inmunizados con la porción amino-terminal de la H2B, en presencia de CpG (H2B Δ C65+CpG). Las diferencias fueron muy significativas con respecto a los otros grupos, incluyendo el grupo de ratones de control ($p < 0.001$ a partir de la semana 5) (Fig. 4). Es muy interesante subrayar que los ratones inmunizados con la porción amino-terminal de la H2B, en presencia de CpG, fueron más resistentes que aquellos inmunizados, bajo las mismas condiciones, con la proteína completa ($p < 0.05$, a partir de la semana 5), cuando fueron posteriormente infectados con *L. major*. Además, todos los demás grupos desarrollaron una enfermedad experimental similar a la observada en los ratones de control (inyectados con PBS).

En conclusión, los resultados obtenidos demuestran que la porción NH₂-terminal de la proteína H2B y la proteína H2B completa,

af

en presencia del adyuvante CpG, son capaces de inducir un efecto protector en ratones BALB/c, después de un desafío con *L. major* virulenta. Además, la comparación de las curvas de evolución de las lesiones entre estos dos lotes de ratones, demuestra una mayor
5 resistencia (estadísticamente significativa) de los ratones vacunados con H2BΔC65+CpG, con respecto a los ratones vacunados con H2B+CpG.

Evaluación de la carga parasitaria.

La determinación de la carga parasitaria en ganglios
10 poplíteos drenados de la lesión, representó un factor determinante en la evaluación de la vacuna contra la leishmaniasis (Kébaier et al.; 2001, "Heterogeneity of wild *Leishmania major* isolates in experimental murine pathogenicity and specific immune response, Infect. Immun. 2001, Ago, 69(8):4906-15). La carga parasitaria fue
15 evaluada (8 semanas después de la infección experimental) únicamente en los grupos de ratones que se mencionan a continuación:

- ratones de control (PBS)
- ratones vacunados con H2B+CpG
- 20 - ratones vacunados con H2BΔC65+CpG
- ratones vacunados con H2BΔN46+CpG

En la Fig. 5 se representan los resultados de la carga parasitaria analizada en ganglios drenados del sitio de inyección de parásitos. Existe una muy buena correlación entre la carga
25 parasitaria y la gravedad de las lesiones experimentales inducidas en

los diferentes grupos de ratones. Los ratones vacunados con H2B Δ N46, no protegidos, tuvieron una carga parasitaria similar a la observada en los ratones de control. En cambio, los dos grupos de ratones que recibieron H2B o la porción amino-terminal (H2B Δ C65),
5 presentaron una carga parasitaria muy inferior a la de los grupos de control (de 100 a 1000 veces inferior). Es interesante subrayar que los ratones inmunizados con la porción amino-terminal de la H2B, presentaron una carga parasitaria promedio al menos 10 veces inferior a la encontrada en los ratones inmunizados con la proteína
10 completa (H2B). Estos resultados confirman la superioridad de la porción divergente (amino-terminal) con respecto a la proteína H2B completa, en su capacidad de conferir una protección de los ratones sensibles BALB/c contra un desafío con *L. major* virulenta.

Experimento 2

15 Con el fin de confirmar los resultados utilizando 10 veces más parásitos para el desafío, los inventores se interesaron en las proteínas truncadas de la H2B (H2B Δ C65 y H2B Δ N46), utilizando una concentración más elevada de CpG (50 μ g/inyección) y tres inmunizaciones a intervalos de 21 días. Además, se emplearon dos
20 grupos de control (un grupo que recibió solamente CpG y el otro que recibió solamente solución reguladora PBS). Un mes después de la última dosis de vacuna, los ratones fueron infectados con dos dosis de parásitos (ya sea 10^5 , o bien, 10^6 parásitos (promastigotes metacíclicos)/inyección). El protocolo experimental se detalla en la
25 Tabla 2.

AT

Las Figs. 6 y 7 demuestran claramente que sólo los ratones inmunizados con la porción divergente de la proteína H2B (H2BΔC65), resistieron la infección experimental por *L. major*, después del uso de 10^6 promastigotes metacíclicos para el desafío. Existe una perfecta correlación entre la resistencia clínica y la carga parasitaria observada al final del protocolo (10 semanas después de la infección).

Estos resultados confirman los obtenidos en el primer experimento y sugieren que el segundo protocolo de inmunización confiere una mayor protección a los ratones BALB/c contra la infección por *L. major*.

Discusión

Según las cifras de la Organización Mundial de la Salud (OMS), la leishmaniasis es una amenaza en 88 países, 350 millones de personas están expuestas a los riesgos de picaduras de flebotomos, que son los insectos vectores, y se estima un número de 12 millones de individuos infectados. En su forma más grave, esta enfermedad causa la muerte. El hecho de que la mayoría de los individuos que han desarrollado una leishmaniasis, o simplemente una infección asintomática, han resistido la infección, justifica las investigaciones para el desarrollo de vacunas. No obstante, todavía existen dos grandes problemas: un mejor conocimiento de la naturaleza precisa de los mecanismos efectores de la resistencia, así como la naturaleza de los antígenos parasitarios y el adyuvante a utilizar. Actualmente no existen vacunas para aplicación en seres

humanos. Las vacunas de primera generación, que son las únicas que se han probado en seres humanos, demostraron su ineficacia (Sharifi et al., 1988; Khalil et al., 2000; De Luca et al., 2001; Armijos et al., 2004).

5 Los experimentos aquí reportados, permiten identificar y evaluar novedosos candidatos para vacuna contra la leishmaniasis.

La proteína histona H2B de *L. infantum*, inicialmente fue seleccionada en el laboratorio como proteína parasitaria de bajo peso molecular, capaz de inducir una respuesta Th1 en seres humanos.

10 Los resultados más recientes sugieren la función de esta proteína como candidato para vacuna (Melby, 2000; Probst et al., 2001; Iborra et al., 2004).

Los trabajos aquí descritos, se basan en el análisis comparativo de la inmunogenicidad y de la función protectora de dos
15 regiones (divergente y conservada) de la proteína recombinante H2B de *Leishmania*, así como la proteína completa. Los resultados demuestran claramente que la porción amino-terminal (divergente) de la H2B, con el adyuvante CpG, confieren una muy buena protección a ratones sensibles BALB/c contra un desafío con *L. major* virulenta.
20 Por el contrario, la porción conservada (carboxilo-terminal), inyectada bajo las mismas condiciones, no tuvo ningún efecto protector. Es muy interesante señalar que la proteína H2B completa confiere una protección mediana. El conjunto de resultados sugiere que la porción amino-terminal (divergente) de la H2B, puede constituir un buen
25 candidato para vacuna contra la leishmaniasis.

Referencias

Alimohammadian MH, Khamesipour A, Darabi H, *et al.* The role of BCG in human immune responses induced by multiple injections of autoclaved *Leishmania major* as a candidate vaccine
5 against leishmaniasis. *Vaccine* **2002**; 21:174-80.

Armijos RX, Weigel MM, Calvopina M, Hidalgo A, Cevallos W, Correa J. Safety, immunogenicity, and efficacy of an autoclaved *Leishmania amazonensis* vaccine plus BCG adjuvant against New World cutaneous leishmaniasis. *Vaccine*. 12 marzo 2004; 22(9-10):1320-6.

10 Belkaid Y, Piccirillo CA, Mendez S, Shevach EM, Sacks DL: CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells control *Leishmania major* persistence and immunity. *Nature* **2002**; 420-502-507.

Brodszyn C, Beverley SM, Titus RG. Virulent or avirulent (dhfr-ts-) *Leishmania major* elicit predominantly a type-1 cytokine
15 response by human cells *in vitro*. *Clin Exp Immunol*. **2000**; 119(2):299-304.

Campbell K, Diao H, Ji J, Soong L. DNA immunization with the gene encoding P4 nuclease of *Leishmania amazonensis* protects mice against cutaneous Leishmaniasis. *Infect Immun*. **2003**;
20 71(11):6270-8.

Campos-Neto A, Webb JR, Greeson K, Coler RN, Skeiky YA, Reed SG. Vaccination with plasmid DNA encoding TSA/LmSTI1 leishmanial fusion proteins confers protection against *Leishmania major* infection in susceptible BALB/c mice. *Infect Immun*. **2002**; 70(6):2828-
25 36.

we

Coler RN, Skeiky YA, Bernards K, Greeson K, Carter D, Comellison CD, Modabber F, Campos-Neto A, Reed SG. Immunization with a polyprotein vaccine consisting of the T-Cell antigens thiol-specific antioxidant, *Leishmania* major stress-inducible protein 1, and *Leishmania* elongation initiation factor protects against leishmaniasis. Infect Immun. **2002**; 70(8):4215-25.

Davies CR, Lianos-Cuentas EA, Pyke SDM *et al.* Cutaneous leishmaniasis in the Peruvian Andes: an epidemiological study of infection and immunity. Epidemiol Infect **1995**; 114:297-318.

10 De Luca PM, Mayrink W, Pinto JA, *et al.* A randomized double-blind placebo-controlled trial to evaluate the immunogenicity of a candidate vaccine against American Tegumentary leishmaniasis. Acta Trop **2001**; 80:251-60.

Desjeux P. Leishmaniasis. Public health aspects and control. Clin Dermatol **1996**; 14:417-23.

Dumonteil E, Maria Jesus RS, Javier EO, Maria del Rosario GM. DNA vaccines induce partial protection against *Leishmania mexicana*. Vaccine. **2003**; 21(17-18):2161-8.

Gavin, M. and Rudensky, A. Control of immune homeostasis by naturally arising regulatory CD4⁺ T cells. Curr. Opin. Immunol **2003**; 15(6):690-6.

Guirges SY. Natural and experimental re-infection of man with oriental score. Ann Trop Med Parasitol **1971**; 65:197-205.

Gurunathan S, Sacks DL, Brown DR, Reiner SL, Charest H, 25 Glaichenhaus N, Seder RA. Vaccination with DNA encoding the

immunodominant LACK parasite antigen confers protective immunity to mice infected with *Leishmania major*. *J Exp Med*. **1997**; 186(7):1137-47.

Handman E, Symons FM, Baldwin TM, Curtis JM, Scheerlinck JP. Protective vaccination with promastigote surface antigen 2 from *Leishmania major* is mediated by a TH1 type of immune response. *Infect Immun*. **1995**; 63(11):4261-7.

Iborra S, Sot M, Carrion J, Nieto A, Fernandez E, Alonso C, Requena JM. The *Leishmania infantum* acidic ribosomal protein P0 administered as a DNA vaccine confers protective immunity to *Leishmania major* infections in BALB/c mice. *Infect Immun*. **2003**; 71(11):6562-72.

Iborra S, Soto M, Carrion J, Alonso C, Requena JM. Vaccination with a plasmid DNA cocktail encoding the nucleosomal histones of *Leishmania* confers protection against murine cutaneous leishmaniasis. *Vaccine*. **2004**; 22(29-30):3865-76.

Kébaïer C, Louzir H, Chenik M, Ben Salah A, Dellagi K. Heterogeneity of wild *Leishmania major* isolates in experimental murine pathogenicity and specific immune response. *Infection and Immunity*. **2001**. 69(8), 4906-4915.

Khalil, EA, El Hassan AM, Zijlstra EE, *et al*. Autoclaved *Leishmania major* vaccine for prevention of visceral leishmaniasis: a randomized, double-blind, BCG-controlled trial in Sudan. *Lancet* **2000**; 356:1565-9.

Klinman DM. Use of CpG oligodeoxynucleotides as immunoprotective agents. *Expert Opin Biol Ther*. **2004**; 4(6):937-46.

WHO Expert Committee. Control of the Leishmaniasis. WHO Tech Rep Ser **1990**; 793: 0-158.

Louzir H, Melby PC, Ben Salah A, Marrakchi H, Aoun K, Ben Ismail R, Dellagi K. Immunologic determinants of disease evolution in
5 localized cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania major*. Journal of Infectious Diseases. **1998**. 177(6), 1687-1695.

Maalej IA, Chenik M, Louzir H, Ben Salah A, Bahloul C, Amri F, Dellagi K. Comparative evaluation of ELISAs based on ten recombinant or purified *Leishmania* antigens for the serodiagnosis of
10 Mediterranean visceral leishmaniasis. Am J Trop med Hyg. **2003**; 68(3):312-20.

Melby PC, Ogden GB, Flores HA, Zhao W, Geldmacher C, Biediger NM, Ahuja SK, Uranga J, Melendez M. Identification of vaccine candidates for experimental visceral leishmaniasis by immunization with
15 sequential fractions of a cDNA expression library. Infect Immun. **2000**;68(10):5595-602.

Probst P, Stromberg E, Ghalib HW, Mozel M, Badaro R, Reed SG, Webb JR. Identification and characterization of T cell-stimulating antigens from *Leishmania* by CD4 T cell expression cloning. J Immunol.
20 **2001**; 166(1):498-505.

Ramiro MJ, Zarate JJ, Hanke T, Rodriguez D, Rodriguez JR; Esteban M, Lucientes J, Castillo JA, Laraga V. Protection in dogs against visceral leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* is achieved by immunization with a heterologous prime-boost regime using
25 DNA and vaccinia recombinant vectors expressing LACK. Vaccine.

2003; 21(19-20):2474-84.

Sharifi I, Reza A, Aflatonian MR, *et al.* Randomised vaccine trial of single dose of killed *Leishmania major* plus BCG against anthroponotic cutaneous leishmaniasis in Bam, Iran. Lancet 1998; 5 351:1540-3.

Skeiky YA, Coler RN, Brannon M, Stromberg E, Greeson K, Crane RT, Webb JR, Campos-Neto A, Reed SG. Protective efficacy of a tandemly linked, multi-subunit recombinant leishmanial vaccine (Leish-111f) formulated in MPL adjuvant. Vaccine. 2002; 10;20(27-28):3292-10 303.

Skeiky YA, Kennedy M, Kaufman D, Borges MM, Guderian JA, Scholler JK, Ovendale PJ, Picha KS, Morrissey PJ, Grabstein KH, Campos-Neto A, Reed SG. LeIF: a recombinant Leishmania protein that induces and IL-12-mediated Th1 cytokine profile. J Immunol. 1998; 15 161(11):6171-9.

Soto M, Requena JM, Quijada L, Perez MJ, Nieto CG, Guzman F, Patarroyo ME, Alonso C. Antigenicity of the Leishmania infantum histones H2B and H4 during canine viscerocutaneous leishmaniasis. Clin Exp Immunol. 1999;115(2):342-9.

Spitzer N, Jardim A, Lippert D, Olafson RW. Long-term protection of mice against Leishmania major with a synthetic peptide vaccine. Vaccine. 17 marzo 1999;17(11-12):1298-300.

Streit JA, Recker TJ, Filho FG, Beverley SM, Wilson ME. Protective immunity against the protozoan Leishmania chagasi is induced 25 by subclinical cutaneous infection with virulent but not avirulent

organisms. J Immunol. **2001**; 166(3):1921-9.

Wolffe AP. Transcriptional regulation in the context of chromatin structure. Essays Biochem. **2001**;37:45-57.

W1

REIVINDICACIONES

1. Una composición inmunogénica caracterizada porque comprende: i) un polipéptido antigénico que consiste de un fragmento de la proteína H2B de *Leishmania*, en donde el fragmento
5 comprende la totalidad o una parte de la región N-terminal de dicha proteína histona H2B, y ii) un adyuvante que estimula la respuesta inmunitaria.

2. La composición inmunogénica de conformidad con la reivindicación 1, en donde el polipéptido tiene una secuencia
10 polipeptídica menor de 65 aminoácidos, de preferencia menor de 50 aminoácidos.

3. La composición inmunogénica de conformidad con la reivindicación 1 ó 2, en donde uno o una pluralidad de aminoácidos del polipéptido, denominado polipéptido de referencia, son
15 sustituidos, eliminados o agregados, para formar un polipéptido variante que conserva cuando menos el 50% de identidad, de preferencia cuando menos el 80% de identidad, con el polipéptido de referencia, en donde el polipéptido variante conserva las propiedades inmunogénicas del polipéptido de referencia.

20 5. La composición inmunogénica de conformidad con la reivindicación 4, en donde el polipéptido variante tiene una secuencia polipeptídica menor de 75 aminoácidos, de preferencia menor de 60 aminoácidos.

6. La composición inmunogénica de conformidad con
25 cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el adyuvante

favorece una respuesta inmunitaria de tipo celular.

7. La composición inmunogénica de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el adyuvante es CpG.
- 5 8. La composición inmunogénica de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que además comprende cuando menos otro antígeno de *Leishmania* que tiene propiedades inmunogénicas para inducir y/o favorecer una respuesta inmunitaria de tipo B y/o T, en seres humanos o animales.
- 10 9. La composición inmunogénica de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, que además comprende cuando menos un polipéptido que consiste de un fragmento de cuando menos una proteína histona suplementaria de *Leishmania*.
- 15 10. La composición inmunogénica de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, que además comprende cuando menos una proteína histona completa de *Leishmania*.
11. La composición inmunogénica de conformidad con la reivindicación 9 ó 10, en donde dicha cuando menos una proteína histona se selecciona principalmente de entre H2A, H3 y H4.
- 20 12. La composición inmunogénica de conformidad con las reivindicaciones 9, 10 u 11, en donde dicha cuando menos una proteína histona es característica de *L. major*, *L. infantum*, *L. donovani*, *L. tropica* o *L. enrietti*.
- 25 13. La composición inmunogénica de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, que además comprende un

107

vehículo farmacéuticamente aceptable, para ser administrada a un huésped humano o animal.

14. La composición inmunogénica de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, caracterizada porque es capaz de inducir una respuesta inmunitaria de tipo celular, de células T efectoras de inmunidad, cuando es administrada a un ser humano o un animal.

15 15. La composición inmunogénica de conformidad con la reivindicación 14, caracterizada porque es capaz de inducir una respuesta inmunitaria de tipo Th1.

16. La composición inmunogénica de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, en donde el polipéptido o polipéptido variante, está presente en una concentración comprendida entre 0.01 y 5 µg/ml.

15 17. Un polipéptido que consiste de un fragmento de la proteína histona H2B de *Leishmania*, en donde el fragmento comprende la totalidad o una parte de la región N-terminal de dicha proteína histona H2B.

20 18. El polipéptido de conformidad con la reivindicación 17, característico de *Leishmania major*.

19. El polipéptido de conformidad con la reivindicación 17 ó 18, que tiene una secuencia polipeptídica menor de 65 aminoácidos, de preferencia menor de 50 aminoácidos.

25 20. El polipéptido de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 17 a 19, que tiene la siguiente secuencia de

108

aminoácidos: M A S S R S A S R K A S N P H K S H R K P K R S W
N V Y V G R S L K A I N A Q M S M S H R T.

21. Un polipéptido variante que conserva cuando menos el 50% de identidad o similitud, de preferencia cuando menos el 80% de identidad o similitud, con el polipéptido de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 17 a 20, en donde el polipéptido variante presenta una sustitución, una delección o una adición, de cuando menos un aminoácido, con respecto a la secuencia de dicho polipéptido, y conserva las propiedades inmunogénicas de dicho polipéptido.

22. El polipéptido variante de conformidad con la reivindicación 21, que posee menos de 75 aminoácidos, de preferencia menos de 60 aminoácidos.

23. Una molécula de ácido nucleico, que codifica para el polipéptido o polipéptido variante de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 17 a 22.

24. La molécula de ácido nucleico de conformidad con la reivindicación 23, que posee la siguiente secuencia nucleotídica o una porción de dicha secuencia: ATG GCC TCT TCT CGC TCT GCT
TCC CGC AAG GCT TCC AAC CCG CAC AAG TCG CAC CGC AAG
CCG AAG CGC TCG TGG AAC GTG TAC GTG GGC CGC TCG CTG
AAG GCG ATC AAC GCC CAG ATG TCG ATG TCG CAC CGC ACG.

25. Una vacuna que permite obtener protección contra una infección causada por *Leishmania*, caracterizada porque su principio activo comprende el polipéptido de conformidad con

cualquiera de las reivindicaciones 17 a 20, el péptido variante de conformidad con la reivindicación 21 ó 22, o la molécula de ácido nucleico de conformidad con la reivindicación 23 ó 24.

26. La vacuna de conformidad con la reivindicación 25,
5 que además comprende un adyuvante que estimula la respuesta inmunitaria, cuando es administrada a un huésped humano o animal.

27. La vacuna de conformidad con la reivindicación 26,
en donde el adyuvante favorece una respuesta inmunitaria de tipo celular.

10 28. La vacuna de conformidad con la reivindicación 26 ó 27, en donde el adyuvante es CpG.

29. La vacuna de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 25 a 28, que comprende cuando menos otro antígeno de *Leishmania*, agregado como principio activo, en donde dicho
15 antígeno tiene propiedades inmunogénicas para inducir y/o favorecer una respuesta inmunitaria, de tipo B y/o T, en un huésped humano o animal.

30. La vacuna de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 25 a 28, que además comprende cuando menos un
20 polipéptido que consiste de un fragmento de cuando menos una proteína histona diferente de la H2B de *Leishmania*, o una molécula de ácido nucleico que codifica para dicho o dichos polipéptidos.

31. La vacuna de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 25 a 28, que además comprende cuando menos una
25 proteína histona completa de *Leishmania*, o una molécula de ácido



nucleico que codifica para dicha o dichas proteínas histonas completas.

32. La vacuna de conformidad con la reivindicación 30 ó 31, en donde dicha cuando menos una proteína histona, se
5 selecciona principalmente de entre H2A, H3 y H4.

33. La vacuna de conformidad con las reivindicaciones 30, 31 ó 32, en donde dicha cuando menos una proteína histona, es característica de *L. major*, *L. infantum*, *L. donovani*, *L. tropica* o *L. enrietti*.

10 34. La vacuna de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 25 a 33, para prevenir o tratar una infección causada por *Leishmania major*.

35. La vacuna de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 25 a 34, caracterizada porque es capaz de inducir
15 una respuesta inmunitaria de tipo celular, de células T efectoras de inmunidad, cuando es administrada a un ser humano o un animal.

36. La vacuna de conformidad con la reivindicación 35, caracterizada porque es capaz de inducir una respuesta inmunitaria de tipo Th1, cuando es administrada a un ser humano o un animal.

20 37. Un vector de expresión capaz de expresar el polipéptido o polipéptido variante de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 17 a 22, que comprende una molécula de ácido nucleico de conformidad con la reivindicación 23 ó 24.

38. El plásmido pET-CH2B que contiene la secuencia de
25 la porción carboxilo-terminal de la proteína H2B, depositado en la

Colección Nacional de Cultivos de Microorganismos (CNCM), con el número I-3362.

39. El plásmido pET-NH2B que contiene la secuencia de la porción amino-terminal divergente de la proteína H2B, depositado
5 en la Colección Nacional de Cultivos de Microorganismos (CNCM), con el número I-3363.

40. El plásmido pET-H2B que contiene la secuencia de la proteína H2B, depositado en la Colección Nacional de Cultivos de Microorganismos (CNCM), con el número I-3361.

RESUMEN

La presente invención se refiere a una composición inmunogénica que comprende: i) un polipéptido antigénico que consiste de un fragmento de la proteína histona H2B de *Leishmania*,
5. en donde el fragmento comprende la región N-terminal de dicha proteína histona H2B, y ii) un adyuvante estimulante de la respuesta inmunitaria.

114

N	A	S	S	R	S	A	S	R	K	A	S	N	P	H	K	S	H	18
ATG	GCC	TCT	TCT	CGC	TCT	GCT	TCC	CGC	AAG	GCT	TCC	AAC	CCG	CAC	AAG	TCG	CAC	54
H ₂ B ₁ P-Nd																		
R	K	P	K	R	S	W	N	V	Y	V	G	R	S	L	K	A	I	36
CGC	AAG	CCG	AAG	CGC	TCG	TGG	AAC	GTG	TAC	GTG	GGC	CGC	TCG	CTG	AAG	GCG	ATC	108
N	A	Q	M	S	M	S	H	R	T	M	K	I	V	N	S	Y	V	54
AAC	GCC	CAG	ATG	TCG	ATG	TCG	CAC	CGC	ACG	ATG	AAG	ATC	GTG	AAC	TCG	TAC	GTG	162
H ₂ R ₂ X-S									H ₃ R P-Nd									
N	D	V	M	E	R	I	C	T	E	A	A	S	I	V	R	A	N	72
AAC	GAC	GTG	ATG	GAG	CGC	ATC	TGC	ACC	GAG	GCC	GCG	TCG	ATT	GTT	CGC	GCG	AAC	216
K	K	R	T	L	G	A	R	E	V	Q	T	A	V	R	I	V	L	90
AAG	AAG	CGC	ACG	TTG	GGT	GCG	CGC	GAG	GTG	CAG	ACG	GCG	GTG	CGC	ATT	GTG	CTG	270
P	A	E	L	A	K	H	A	M	A	E	G	T	K	A	V	S	S	108
CCG	GCG	GAG	CTC	GCG	AAG	CAC	GCC	ATG	GCT	GAG	GGC	ACG	AAG	GCC	GTG	TCG	AGC	324
A	S	A	*															112
GCG	TCG	GCT	TGA															336
H ₃ B P-Xh																		

Figura 1

117

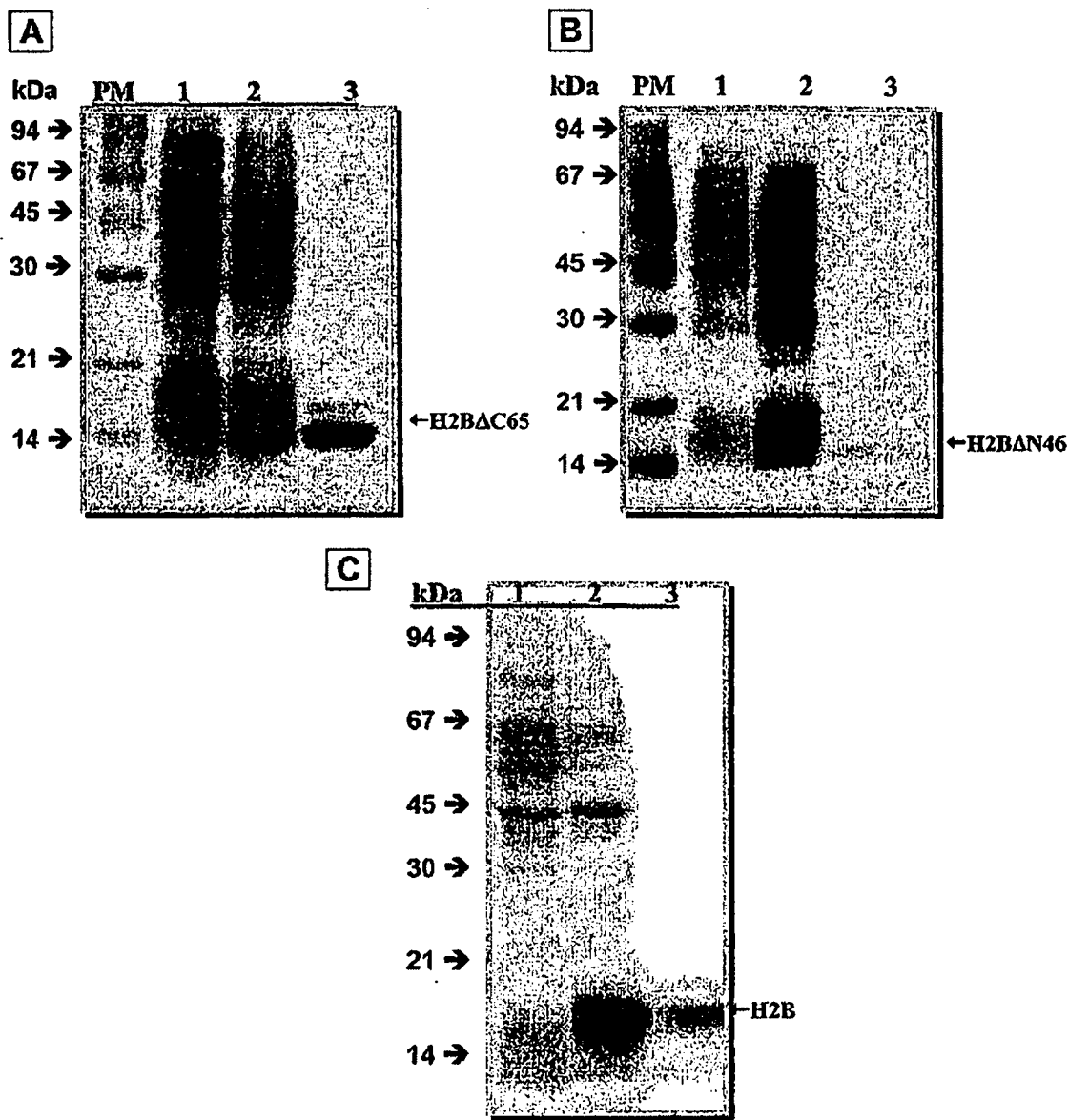


Figura 2

116

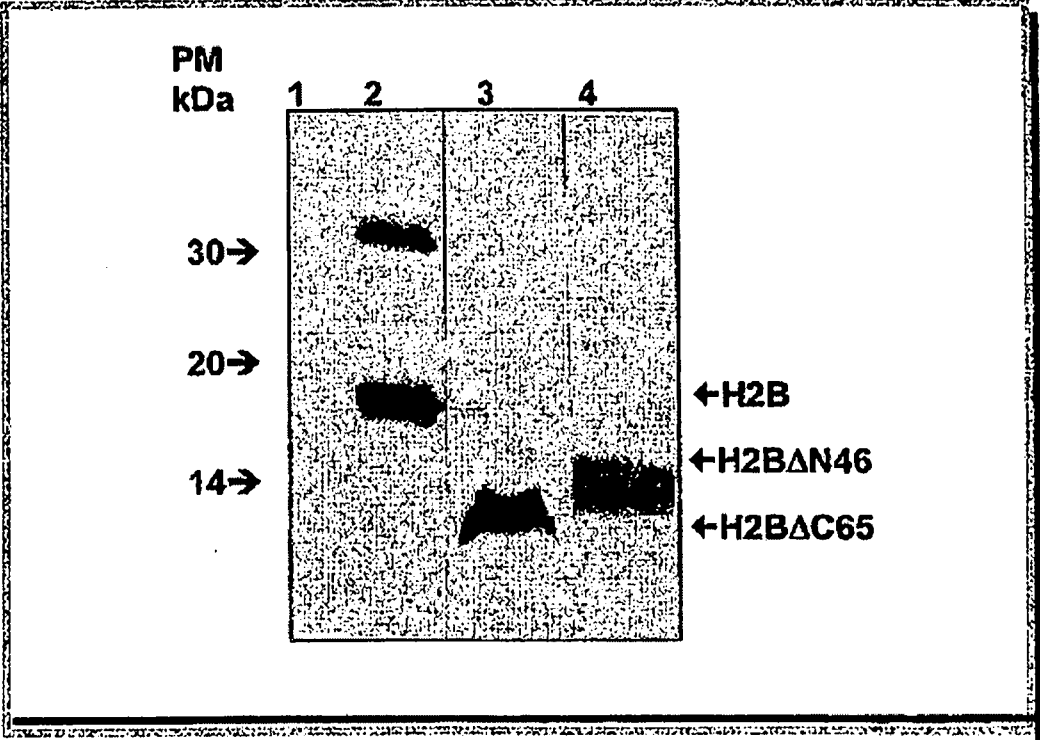


Figura 3

117

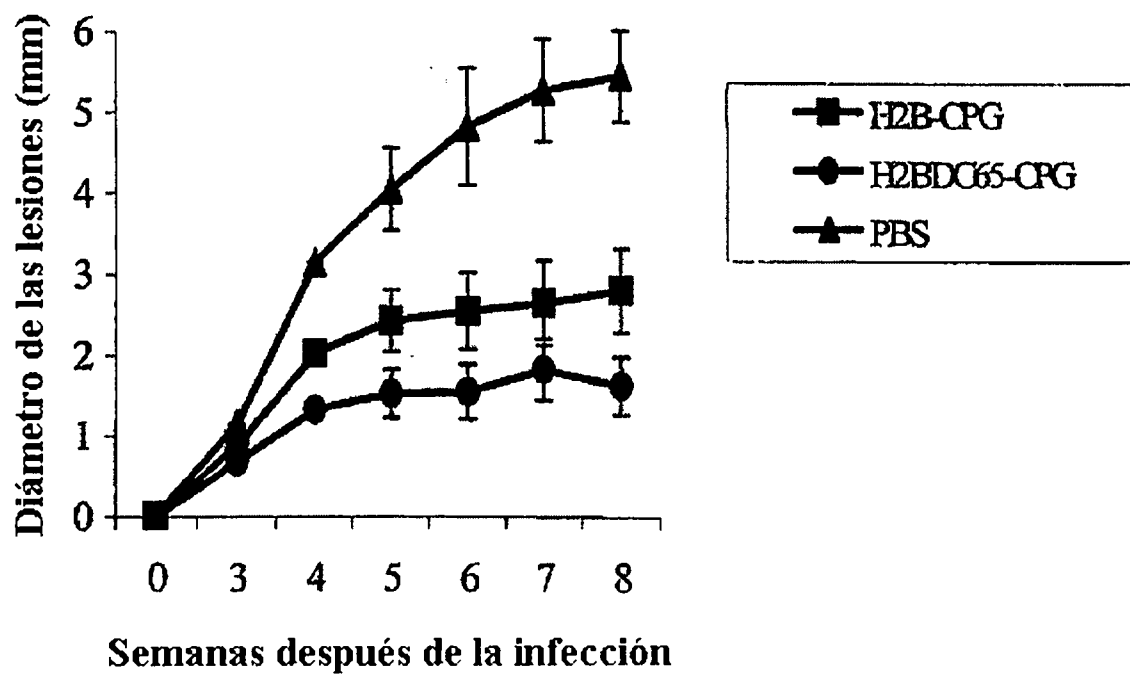


Figura 4

118

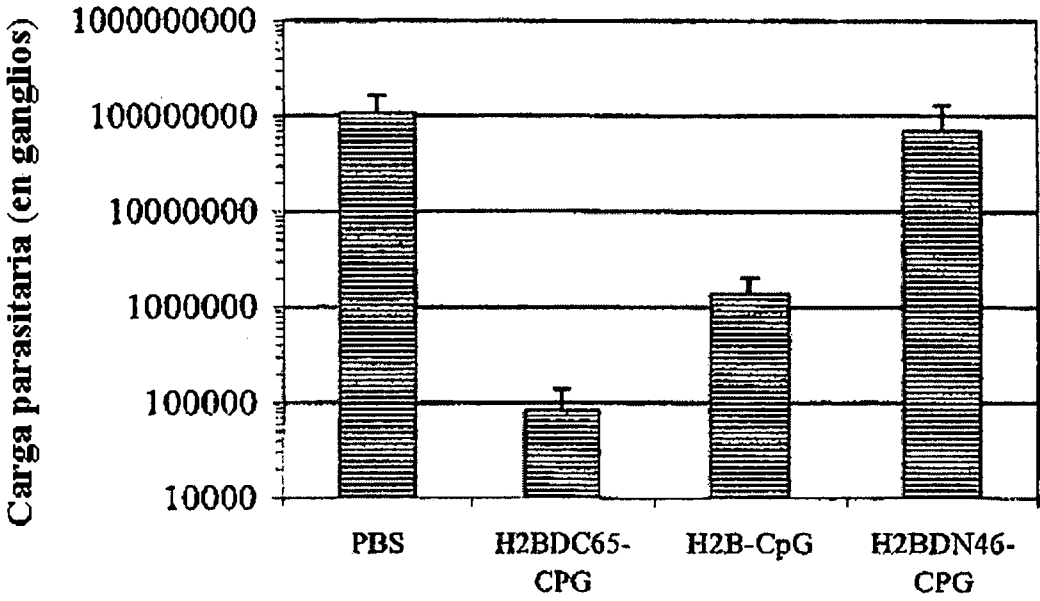
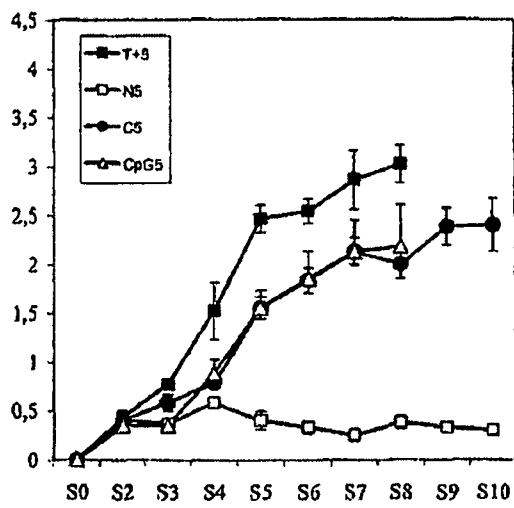
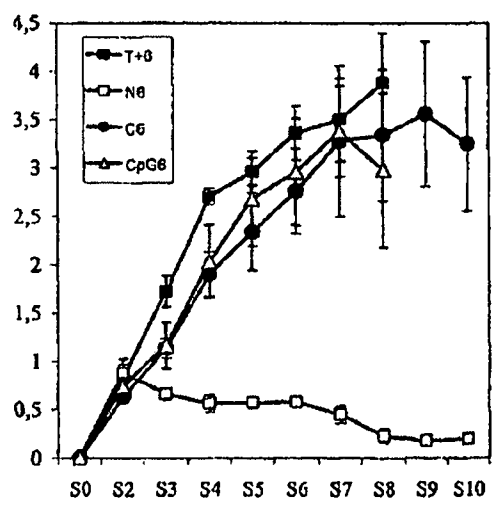


Figura 5

A



B



Semanas después de la infección

Figura 6

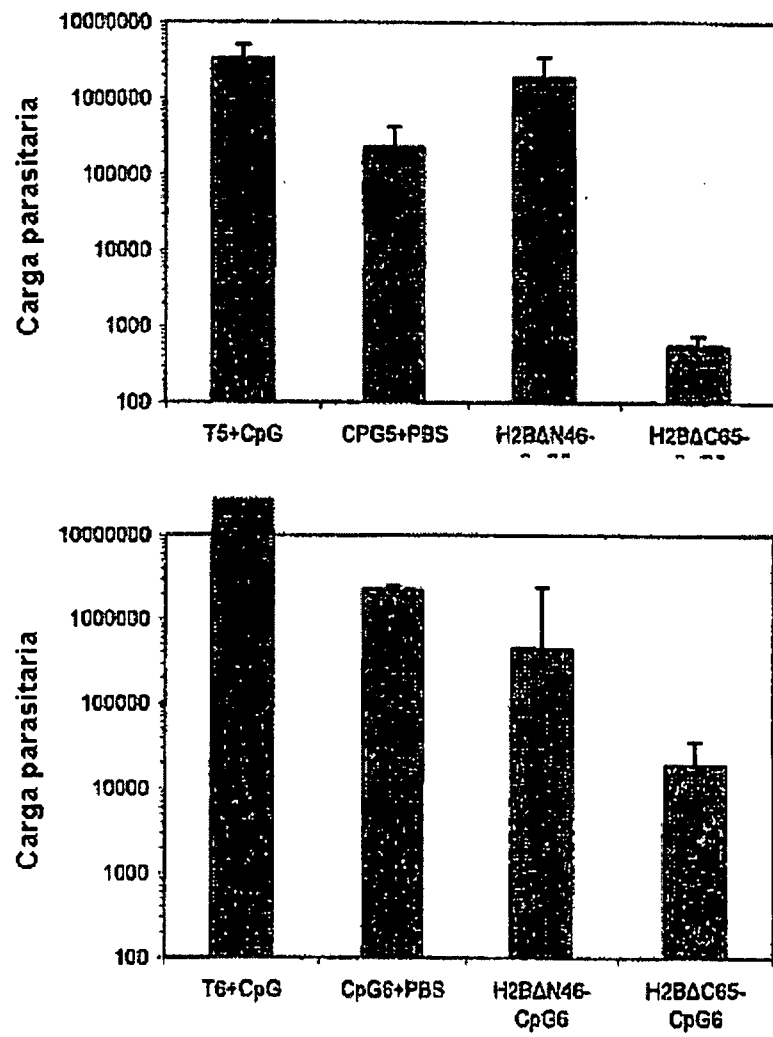


Figura 7

B6259A.ST25.txt
SEQUENCE LISTING

12

<110> INSTITUT PASTEUR DE PARIS
INSTITUT PASTEUR DE TUNIS

<120> COMPOSITION COMPRENANT LA REGION N-TERMINALE D'HISTONE H2B DE
LEISHMANIA - UTILISATION POUR INDUIRE UNE REPONSE IMMUNITAIRE

<130> B6259A-AD/YH/KP

<140> New Pct patent application

<141> 2006-03-17

<150> FR2005/02725

<151> 2005-03-18

<160> 2

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 111

<212> PRT

<213> Nature1

<400> 1

Met Ala Ser Ser Arg Ser Ala Ser Arg Lys Ala Ser Asn Pro His Lys
1 5 10 15

Ser His Arg Lys Pro Lys Arg Ser Trp Asn Val Tyr Val Gly Arg Ser
20 25 30

Leu Lys Ala Ile Asn Ala Gln Met Ser Met Ser His Arg Thr Met Lys
35 40 45

Ile Val Asn Ser Tyr Val Asn Asp Val Met Glu Arg Ile Cys Thr Glu
50 55 60

Ala Ala Ser Ile Val Arg Ala Asn Lys Lys Arg Thr Leu Gly Ala Arg
65 70 75 80

Glu Val Gln Thr Ala Val Arg Ile Val Leu Pro Ala Glu Leu Ala Lys
85 90 95

His Ala Met Ala Glu Gly Thr Lys Ala Val Ser Ser Ala Ser Ala
100 105 110

<210> 2

<211> 336

<212> DNA

<213> Nature1

<400> 2

atggcctctt ctcgctctgc ttcccgaag gcttccaacc cgcacaagtc gcaccgcaag 60

ccgaagcgct cgtggaacgt gtacgtgggc cgctcgctga aggcgatcaa cgcccagatg 120

tcgatgtcgc accgcacgat gaagatcgtg aactcgtacg tgaacgacgt gatggagcgc 180

atctgcaccg aggccgcgtc gattgttcgc gcgaacaaga agcgcacgtt ggggtgcgcgc 240

B6259A.ST25.txt

gaggtgcaga cggcgggtgcg cattgtgctg ccggcgggagc tcgcgaagca cgccatggct 300
gagggcacga aggccgtgtc gagcgcgtcg gcttga 336

LISTADO DE SECUENCIAS

127

<110> INSTITUT PASTEUR DE PARIS
INSTITUT PASTEUR DE TUNIS
<120> COMPOSICIÓN QUE COMPRENDE LA REGIÓN N-TERMINAL DE
LA HISTONA H2B DE LEISHMANIA - USO PARA INDUCIR
UNA RESPUESTA INMUNITARIA
<130> B6259A-AD/YH/KP
<140> Nueva Solicitud de Patente PCT
<141> 2006-03-17
<150> FR2005/02725
<151> 2005-03-18
<160> 2
<170> PatentIn versión 3.3
<210> 1
<211> 111
<212> PRT
<213> Natural

124

<400> 1

Met Ala Ser Ser Arg Ser Ala Ser Arg Lys Ala Ser Asn Pro His Lys
1 5 10 15

Ser His Arg Lys Pro Lys Arg Ser Trp Asn Val Tyr Val Gly Arg Ser
20 25 30

Leu Lys Ala Ile Asn Ala Gln Met Ser Met Ser His Arg Thr Met Lys
35 40 45

Ile Val Asn Ser Tyr Val Asn Asp Val Met Glu Arg Ile Cys Thr Glu
50 55 60

Ala Ala Ser Ile Val Arg Ala Asn Lys Lys Arg Thr Leu Gly Ala Arg
65 70 75 80

Glu Val Gln Thr Ala Val Arg Ile Val Leu Pro Ala Glu Leu Ala Lys
85 90 95

His Ala Met Ala Glu Gly Thr Lys Ala Val Ser Ser Ala Ser Ala
100 105 110

<210> 2

<211> 336

<212> ADN

<213> Natural

<400> 2

atggcctctt ctcgctctgc ttcccgaag gcttccaacc cgcacaagtc gcaccgcaag	60
ccgaagcgct cgtggaacgt gtacgtgggc cgctcgctga aggcgatcaa cgcccagatg	120
tcgatgtcgc accgcacgat gaagatcgtg aactcgtacg tgaacgacgt gatggagcgc	180
atctgcaccg aggccgcgtc gattgttcgc gcgaacaaga agcgcacgtt ggggtgcgcgc	240
gaggtgcaga cggcgggtgcg cattgtgctg ccggcggagc tcgcgaagca cgccatggct	300
gagggcacga aggccgtgtc gagcgcgtcg gcttga	336

121

TRAITÉ DE BUDAPEST SUR LA RECONNAISSANCE
INTERNATIONALE DU DÉPÔT DES MICRO-ORGANISMES
AUX FINS DE LA PROCÉDURE EN MATIÈRE DE BREVETS

FORMULE INTERNATIONALE

DESTINATAIRE :

1. INSTITUT PASTEUR
Service des Brevets et Inventions
29-28, rue du Docteur Roux
75724 Paris Cedex 15

2. INSTITUT PASTEUR DE TUNIS
13, place Pasteur
1002 TUNIS BELVEDERE - TUNISIE
NOM ET ADRESSE
DU DÉPOSANT

RECEPISSE EN CAS DE DÉPÔT INITIAL,
délivré en vertu de la règle 7.1 par
l'AUTORITÉ DE DÉPÔT INTERNATIONALE
identifiée au bas de cette page

I. IDENTIFICATION DU MICRO-ORGANISME	
référence d'identification donnée par le DÉPOSANT : PET-NH2B	Numéro d'ordre attribué par l'AUTORITÉ DE DÉPÔT INTERNATIONALE : CNCM I-3363
II. DESCRIPTION SCIENTIFIQUE ET/OU DÉSIGNATION TAXONOMIQUE PROPOSÉE	
Le micro-organisme identifié sous chiffre I était accompagné :	
☒ d'une description scientifique	
☒ d'une désignation taxonomique proposée	
(Cocher ce qui convient)	
III. RÉCEPTION ET ACCEPTATION	
La présente autorité de dépôt internationale accepte le micro-organisme identifié sous chiffre I, qu'elle a reçu le 24 février 2005 (date du dépôt initial)	
IV. RÉCEPTION D'UNE REQUÊTE EN CONVERSION	
La présente autorité de dépôt internationale a reçu le micro-organisme identifié sous chiffre I le (date du dépôt initial) et a reçu une requête en conversion du dépôt initial en dépôt conforme au traité de Budapest le (date de réception de la requête en conversion)	
V. AUTORITÉ DE DÉPÔT INTERNATIONALE	
Nom : COLLECTION NATIONALE DE CULTURES DE MICROORGANISMES (CNCM) Adresse : Institut Pasteur 25, rue du Docteur Roux F-75724 Paris Cedex 15 (France)	Signature(s) de la (des) personne(s) constante(s) pour représenter l'autorité de dépôt internationale ou de la (des) personne(s) autorisée(s) : Georges Wagener Paris, le 02 mai 2005

1 En cas d'application de la règle 6.4.d) Écrire date de la date à laquelle le statut
d'autorité de dépôt internationale a été acquis

146

Le demandeur a déclaré que l'invention est nouvelle, qu'elle est inventive et qu'elle est susceptible d'application industrielle.

Le demandeur a déclaré que l'invention est nouvelle, qu'elle est inventive et qu'elle est susceptible d'application industrielle.

Madame Danielle BERNEMAN

Service des Brevets et Inventions

INSTITUT PASTEUR
25-28, rue du Docteur Roux
75724 PARIS Cedex 15

Le demandeur a déclaré que l'invention est nouvelle, qu'elle est inventive et qu'elle est susceptible d'application industrielle.

Le demandeur a déclaré que l'invention est nouvelle, qu'elle est inventive et qu'elle est susceptible d'application industrielle.

1. INSTITUT PASTEUR 2. INSTITUT PASTEUR DE TUNIS		NOM DE L'INVENTION : CNCM I-3363 DATE DE DÉPÔT : 24 février 2005
1. Service des Brevets et Inventions 25-28, rue du Docteur Roux 75724 Paris Cedex 15 2. 13, place Pasteur, 1002 TUNIS BELVEDERE - TUNISIE		
La date de dépôt est le 24 février 2005		
☒	NOM DE L'INVENTION	
☐	NOM DE L'INVENTION	

1. Indiquer la date du dépôt, le jour, le mois et l'année, ou la date de la signature, ou la date de la publication, ou la date de la délivrance, ou la date de la rétroaction, ou la date de la rétroaction, ou la date de la rétroaction.
2. Indiquer la date du dépôt, le jour, le mois et l'année, ou la date de la signature, ou la date de la publication, ou la date de la délivrance, ou la date de la rétroaction, ou la date de la rétroaction, ou la date de la rétroaction.
3. Indiquer la date du dépôt, le jour, le mois et l'année, ou la date de la signature, ou la date de la publication, ou la date de la délivrance, ou la date de la rétroaction, ou la date de la rétroaction, ou la date de la rétroaction.

124

1. COLLECTION NATIONALE DE CULTURES DE MICROORGANISMES (CNCM)	
2. Georges Wegener	
3. Institut Pasteur 25, rue du Docteur Roux F-75724 Paris Cedex 15 (France)	4. Paris, le 02 mai 2005

5. **Je soussigné, Georges Wegener, Directeur de l'Unité de Recherche sur les Interactions Microbiennes et l'Environnement, certifie que les informations fournies ci-dessus sont exactes et conformes à la réalité.**

128

TRATADO DE BUDAPEST SOBRE EL RECONOCIMIENTO
INTERNACIONAL DEL DEPÓSITO DE MICROORGANISMOS
PARA FINES DE PROCEDIMIENTOS EN MATERIA DE PATENTES

FÓRMULA INTERNACIONAL

DESTINATARIO

1. INSTITUTO PASTEUR
Servicio de Patentes e Invenciones
25.28, Rue du Docteur Roux
75724 Paris Cedex 15

2. INSTITUTI PASTEUR DE TÚNEZ
13, place Pasteur
1002 TUNIS BELVEDERE - TÚNEZ
NO ES LA DIRECCIÓN DEL DEPOSITANTE

RECEPCIÓN EN CASO DE DEPÓSITO INICIAL,
otorgada en vista de la Regla 7.1 por la
AUTORIDAD DE DEPÓSITO INTERNACIONAL
identificada al calce de esta página

I. IDENTIFICACIÓN DEL MICROORGANISMO	
Referencia de la identificación hecha por el depositante: pET-NH2B	Número de orden otorgado por la AUTORIDAD DE DEPÓSITO INTERNACIONAL: CNCM I-3363
II. DESCRIPCIÓN CIENTÍFICA Y/O DESIGNACIÓN TAXONÓMICA PROPUESTA:	
El microorganismo identificado con el número anterior, está acompañado:	
☒ por una descripción científica	
☒ por una designación taxonómica propuesta	
(marque con una cruz lo correspondiente)	
III. RECEPCIÓN Y ACEPTACIÓN	
La presente autoridad de depósito internacional, acepta el microorganismo arriba identificado y numerado, el cual fue recibido el 24 de febrero del 2005 (fecha de depósito inicial)	
IV. RECEPCIÓN DE UNA SOLICITUD DE CONVERSIÓN	
La presente autoridad de depósito internacional, recibió el microorganismo arriba identificado y numerado, el día (fecha de depósito inicial) y recibió una solicitud de conversión del depósito inicial, en depósito conforme al Tratado de Budapest, el día (fecha de recepción de la solicitud de conversión)	
V. AUTORIDAD DE DEPÓSITO INTERNACIONAL	
Nombre: COLECCIÓN NACIONAL DE CULTIVOS DE MICRO- ORGANISMOS (CNCM) Dirección: Instituto Pasteur 25, rue du Docteur Roux F-7524 Paris Cedex 15 (Francia)	Firma de la persona o personas del Instituto, que representan la autoridad de depósito internacional o (ilegible) autorizada: Georges Wagener (FIRMADO) París, 2 de mayo del 2005

I En caso de la aplicación de la Regla 6.4.d), (ilegible) fecha en la cual el estatuto de la autoridad de depósito internacional (ilegible)

(Un sello que dice: COLECCIÓN NACIONAL DE CULTIVOS DE MICROORGANISMOS C.N.C.M.)

129

TRATADO DE BUDAPEST SOBRE EL RECONOCIMIENTO
INTERNACIONAL DEL DEPÓSITO DE MICROORGANISMOS
PARA FINES DE PROCEDIMIENTOS EN MATERIA DE PATENTES

FÓRMULA INTERNACIONAL

DESTINATARIO (ILEGIBLE)

Sra. Danielle BERNEMAN
Servicio de Patentes e Invenciones

INSTITUTO PASTEUR
25.28, Rue du Docteur Roux
75724 Paris Cedex 15

(Ilegible)

I. DEPOSITANTE		II. (ilegible)
Nombre:	1. INSTITUTO PASTEUR 2. INSTITUTI PASTEUR DE TÚNEZ	Número de orden otorgado por la AUTORIDAD DE DEPÓSITO INTERNACIONAL: CNCM I-3363
Dirección:	1. Servicio de Patentes e Invenciones 25.28, Rue du Docteur Roux 75724 Paris Cedex 15 2. 13, place Pasteur 1002 TUNIS BELVEDERE - TÚNEZ	fecha del depósito (ilegible) 24 de febrero del 2005
III. (ilegible)		
(ilegible) 21 de marzo del 2005		
☒ (ilegible)		
☐ (ilegible)		

1. Indicar la fecha de depósito inicial o el número (ilegible)
2. (ilegible)
3. (ilegible)

120

IV. (ilegible)	
V. AUTORIDAD DE DEPÓSITO INTERNACIONAL	
Nombre: COLECCIÓN NACIONAL DE CULTIVOS DE MICRO-ORGANISMOS (CNCM)	Firma de la persona o personas del Instituto, que representan la autoridad de depósito internacional (ilegible): Georges Wagener (FIRMADO)
Dirección: Instituto Pasteur 25, rue du Docteur Roux F-7524 Paris Cedex 15 (Francia)	Paris, 02 de mayo del 2005

(ilegible)

(Un sello que dice: COLECCIÓN NACIONAL DE CULTIVOS DE MICROORGANISMOS C.N.C.M.)

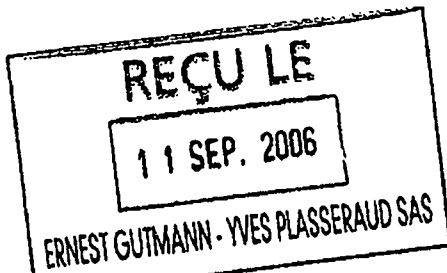
TRAITÉ DE COOPÉRATION EN MATIÈRE DE BREVETS

Expéditeur : L'ADMINISTRATION CHARGÉE DE
LA RECHERCHE INTERNATIONALE

PCT

Destinataire

ERNEST GUTMANN- YVES PLASSERAUD SAS
3 rue Auber
75009 Paris
FRANCE



NOTIFICATION DE TRANSMISSION DU
RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE
ET DE L'OPINION ÉCRITE DE L'ADMINISTRATION
CHARGÉE DE LA RECHERCHE INTERNATIONALE
OU DE LA DÉCLARATION
(règle 44.1 du PCT)

Date d'expédition
(jour/mois/année)

12/09/2006

Référence du dossier du déposant ou du mandataire

B6259A-AD

POUR SUITE À DONNER

voir les paragraphes 1 et 4 ci-après

Demande internationale n°

PCT/FR2006/000597

Date du dépôt international
(jour/mois/année)

17/03/2006

Déposant

INSTITUT PASTEUR

1. ☒ Il est notifié au déposant que le rapport de recherche internationale a été établi et lui est transmis ci-joint.

Dépôt de modifications et d'une déclaration selon l'article 19 :

Le déposant peut, s'il le souhaite, modifier les revendications de la demande internationale (voir la règle 46):

Quand? Le délai dans lequel les modifications doivent être déposées est de deux mois à compter de la date de transmission du rapport de recherche internationale.

Où? Directement auprès du Bureau international de l'OMPI, 34, chemin des Colombettes
1211 Genève 20, Suisse, n° de télécopieur: +41 22 338 82 70

Pour des instructions plus détaillées, voir les notes sur la feuille d'accompagnement.

2. ☐ Il est notifié au déposant qu'il ne sera pas établi de rapport de recherche internationale et que la déclaration à cet effet, prévue à l'article 17.2)a), ainsi que l'opinion écrite de l'administration chargée de la recherche internationale sont transmises par le présent formulaire.

3. ☐ **En ce qui concerne la réserve pouvant être formulée, conformément à la règle 40.2, à l'égard du paiement d'une ou de plusieurs taxes additionnelles, il est notifié au déposant que**

- ☐ la réserve ainsi que la décision y relative ont été transmises au Bureau international en même temps que la requête du déposant tendant à ce que le texte de la réserve et celui de la décision en question soient notifiés aux offices désignés.

☐ la réserve n'a encore fait l'objet d'aucune décision; dès qu'une décision aura été prise, le déposant en sera avisé.

4. Rappels

Peu après l'expiration d'un délai de **18 mois** à compter de la date de priorité, la demande internationale sera publiée par le Bureau international. Si le déposant souhaite éviter ou différer la publication, il doit faire parvenir au Bureau international une déclaration de retrait de la demande internationale, ou de la revendication de priorité, conformément aux règles 90bis.1 et 90bis.3, respectivement, avant l'achèvement de la préparation technique de la publication internationale.

Le déposant a la possibilité de présenter des observations de manière informelle au Bureau international sur l'opinion écrite de l'administration chargée de la recherche internationale. Le Bureau international enverra aux offices désignés une copie de ces observations, à moins qu'un rapport d'examen préliminaire international ait été établi ou doive être établi. Ces observations seront également mises à la disposition des tiers mais pas avant l'expiration d'un délai de 30 mois à compter de la date de priorité.

Dans un délai de **19 mois** à compter de la date de priorité, mais seulement en ce qui concerne certains offices désignés, le déposant doit présenter une demande d'examen préliminaire international s'il souhaite que l'ouverture de la phase nationale soit reportée à **30 mois** à compter de la date de priorité (ou même au-delà dans certains offices); si tel n'est pas le cas, le déposant doit accomplir, dans un délai de **20 mois** à compter de la date de priorité, les démarches prescrites pour l'ouverture de la phase nationale auprès de ces offices désignés.

En ce qui concerne d'autres offices désignés, le délai de 30 mois (ou plus) s'appliquera même si aucune demande d'examen préliminaire international n'est présentée dans le délai de 19 mois.

Voir l'annexe du formulaire PCT/IB/301 et, pour plus de précisions quant aux délais applicables, office par office, voir les chapitres nationaux dans le volume II du *Guide du déposant du PCT* et le site Internet de l'OMPI.

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la
recherche internationale



Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL-2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Stefan Brell

NOTES RELATIVES AU FORMULAIRE PCT/ISA/220

Les présentes notes sont destinées à donner les instructions essentielles concernant le dépôt de modifications selon l'article 19. Les notes sont fondées sur les exigences du Traité de coopération en matière de brevets (PCT), du règlement d'exécution et des instructions administratives du PCT. En cas de divergence entre les présentes notes et ces exigences, ce sont ces dernières qui priment. Pour de plus amples renseignements, on peut aussi consulter le *Guide du déposant du PCT*, qui est une publication de l'OMPI.

Dans les présentes notes, les termes "article", "règle" et "instruction" renvoient aux dispositions du traité, de son règlement d'exécution et des instructions administratives du PCT, respectivement.

INSTRUCTIONS CONCERNANT LES MODIFICATIONS SELON L'ARTICLE 19

Après réception du rapport de recherche internationale et de l'opinion écrite de l'administration chargée de la recherche internationale, le déposant a la possibilité de modifier une fois les revendications de la demande internationale. On notera cependant que, comme toutes les parties de la demande internationale (revendications, description et dessins) peuvent être modifiées au cours de la procédure d'examen préliminaire international, il n'est généralement pas nécessaire de déposer de modifications des revendications selon l'article 19 sauf, par exemple, au cas où le déposant souhaite que ces dernières soient publiées aux fins d'une protection provisoire ou a une autre raison de modifier les revendications avant la publication internationale. En outre, il convient de rappeler que l'obtention d'une protection provisoire n'est possible que dans certains États (voir les annexes B1 et B2 du volume I du *Guide du déposant du PCT*).

L'attention du déposant est attirée sur le fait que des modifications des revendications selon l'article 19 ne sont pas permises lorsque l'administration chargée de la recherche internationale a déclaré, conformément à l'article 17.2), qu'aucun rapport de recherche internationale ne sera établi (voir le paragraphe 296 du volume I du *Guide du déposant du PCT*).

Quelles parties de la demande internationale peuvent être modifiées?

Selon l'article 19, les revendications exclusivement.

Durant la phase internationale, les revendications peuvent aussi être modifiées (ou modifiées à nouveau) selon l'article 34 auprès de l'administration chargée de l'examen préliminaire international. La description et les dessins ne peuvent être modifiées que selon l'article 34 auprès de l'administration chargée de l'examen préliminaire international.

Lors de l'ouverture de la phase nationale, toutes les parties de la demande internationale peuvent être modifiées selon l'article 28 ou, le cas échéant, selon l'article 41.

Quand?

Dans un délai de deux mois à compter de la date de transmission du rapport de recherche internationale ou de 16 mois à compter de la date de priorité, selon l'échéance la plus tardive. Il convient cependant de noter que les modifications seront réputées avoir été reçues en temps voulu si elles parviennent au Bureau International après l'expiration du délai applicable mais avant l'achèvement de la préparation technique de la publication internationale (règle 46.1).

Où ne pas déposer les modifications?

Les modifications ne peuvent être déposées qu'auprès du Bureau International; elles ne peuvent être déposées ni auprès de l'office récepteur ni auprès de l'administration chargée de la recherche internationale (règle 46.2).

Lorsqu'une demande d'examen préliminaire international a été/est déposée, voir plus loin.

Comment?

Soit en supprimant entièrement une ou plusieurs revendications, soit en ajoutant une ou plusieurs revendications nouvelles ou encore en modifiant le texte d'une ou de plusieurs des revendications telles que déposées.

Une feuille de remplacement doit être remise pour chaque feuille des revendications qui, en raison d'une ou de plusieurs modifications, diffère de la feuille initialement déposée.

Toutes les revendications figurant sur une feuille de remplacement doivent être numérotées en chiffres arabes. Si une revendication est supprimée, il n'est pas obligatoire de renuméroter les autres revendications. Chaque fois que des revendications sont renumérotées, elles doivent l'être de façon continue (instruction 205.b)).

Les modifications doivent être effectuées dans la langue dans laquelle la demande internationale est publiée.

Quels documents doivent/peuvent accompagner les modifications?

Lettre (instruction 205.b)):

Les modifications doivent être accompagnées d'une lettre.

La lettre ne sera pas publiée avec la demande internationale et les revendications modifiées. Elle ne doit pas être confondue avec la "déclaration selon l'article 19.1)" (voir plus loin sous "Déclaration selon l'article 19.1)").

La lettre doit être rédigée en anglais ou en français, au choix du déposant. Cependant, si la langue de la demande internationale est l'anglais, la lettre doit être rédigée en anglais; si la langue de la demande internationale est le français, la lettre doit être rédigée en français.

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

(article 18 et règles 43 et 44 du PCT)

Référence du dossier du déposant ou du mandataire B6259A-AD	POUR SUITE À DONNER voir le formulaire PCT/ISA/220 et, le cas échéant, le point 5 ci-après.	
Demande internationale n° PCT/FR2006/000597	Date du dépôt international (jour/mois/année) 17/03/2006	(Date de priorité (la plus ancienne) (jour/mois/année) 18/03/2005
Déposant INSTITUT PASTEUR		

Le présent rapport de recherche internationale, établi par l'administration chargée de la recherche internationale, est transmis au déposant conformément à l'article 18. Une copie en est transmise au Bureau international.

Ce rapport de recherche internationale comprend 5 feuilles.

☒ Il est aussi accompagné d'une copie de chaque document relatif à l'état de la technique qui y est cité.

1. Base du rapport

a. En ce qui concerne la langue, la recherche internationale a été effectuée sur la base

☒

de la demande internationale dans la langue dans laquelle elle a été déposée

☐

d'une traduction de la demande internationale dans la langue suivante _____, qui est la langue d'une traduction remise aux fins de la recherche internationale (règles 12.3.a) et 23.1.b))

b. ☒ En ce qui concerne la ou les séquences de nucléotides ou d'acides aminés divulguées dans la demande internationale, (le cas échéant), voir le cadre n° I.

2. ☐ Il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche (voir le cadre n° II).

3. ☐ Il y a absence d'unité de l'invention (voir le cadre n° III).

4. En ce qui concerne le titre,

☒

le texte est approuvé tel qu'il a été remis par le déposant

☐

le texte a été établi par l'administration chargée de la recherche internationale et a la teneur suivante:

5. En ce qui concerne l'abrégé,

☒

le texte est approuvé tel qu'il a été remis par le déposant

☐

le texte, reproduit dans le cadre n° IV, a été établi par l'administration chargée de la recherche internationale conformément à la règle 38.2(b). Le déposant peut présenter des observations à l'administration chargée de la recherche internationale dans un délai d'un mois à compter de la date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

6. En ce qui concerne les dessins,

a. La figure des dessins à publier avec l'abrégé est la figure n° _____

☐

proposée par le déposant

☐

proposée par l'administration chargée de la recherche internationale, parce que le déposant n'a pas proposé de figure

☐

proposée par l'administration chargée de la recherche internationale, parce que cette figure caractérise mieux l'invention

b. ☒ Aucune des figures n'est publiée avec l'abrégé

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

134
Demande internationale n°

PCT/FR2006/000597

Cadre N° I Séquence(s) de nucléotides ou d'acides aminés (suite du point 1.b de la première feuille)

1. En ce qui concerne la ou les séquences de nucléotides ou d'acides aminés divulguées dans la demande internationale, le cas échéant, la recherche internationale a été effectuée sur la base des éléments suivants:
 - a. Nature de l'élément
 - ☒ un listing de la ou des séquences
 - ☐ un ou des tableaux relatifs au listing de la ou des séquences
 - b. Type de support
 - ☒ sur papier
 - ☒ sous forme électronique
 - c. Moment du dépôt ou de la remise
 - ☒ contenu(s) dans la demande internationale telle que déposée
 - ☐ déposé(s) avec la demande internationale, sous forme électronique
 - ☐ remis ultérieurement à la présente administration aux fins de la recherche
2. ☐ De plus, lorsque plus d'une version ou d'une copie d'un listing des séquences ou d'un ou plusieurs tableaux y relatifs a été déposée, la déclarations requises selon lesquelles les informations fournies ultérieurement ou au titre de copies supplémentaires sont identiques à celles initialement fournies et ne vont pas au-delà de la divulgation faite dans la demande internationale telle que déposée initialement, selon le cas, ont été remises.
3. Commentaire complémentaires:

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE INV. A61K39/008 C07K14/44		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) C07K A61K C12N		
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche		
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data, Sequence Search		
C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y DI	IBORRA S ET AL: "Vaccination with a plasmid DNA cocktail encoding the nucleosomal histones of Leishmania confers protection against murine cutaneous leishmaniosis" VACCINE, BUTTERWORTH SCIENTIFIC. GUILDFORD, GB, vol. 22, no. 29-30, 28 septembre 2004 (2004-09-28), pages 3865-3876, XP004567462 ISSN: 0264-410X cité dans la demande voir le document en entier et en particulier le résumé et le premier paragraphe du point 4. ----- -/--	1-37, 39
☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents ☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe		
* Catégories spéciales de documents cités: *A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée) *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée *T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention *X* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément *Y* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier *Z* document qui fait partie de la même famille de brevets		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée 9 juin 2006		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale 12/09/2006
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Fonctionnaire autorisé Ury, A

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
P,Y D2	WO 2005/044301 A (C.B.F. LETI, S.L. UNIPERSONAL; ALVAREZ, MANUEL, SOTO; IBORRA, SALVADOR) 19 mai 2005 (2005-05-19) voir le document en entier et en particulier l'Exemple 4.	1-37, 39
Y D3	SOTO M ET AL: "ANTIGENICITY OF THE LEISHMANIA INFANTUM HISTONES H2B AND H4 DURING CANINE VISCEROCUTANEOUS LEISHMANIASIS" CLINICAL AND EXPERIMENTAL IMMUNOLOGY, OXFORD, GB, vol. 2, no. 115, février 1999 (1999-02), pages 342-349, XP001086535 ISSN: 0009-9104 cité dans la demande voir résumé et page 348, colonne gauche, milieu du dernier paragraphe	1-37, 39
X	page 343, colonne de droite, dernier alinéa	17-19, 21,22
Y D4	MAALEJ IBTISSEM ABDMOULEH ET AL: "Comparative evaluation of ELISAs based on ten recombinant or purified Leishmania antigens for the serodiagnosis of Mediterranean visceral leishmaniasis." AMERICAN JOURNAL OF TROPICAL MEDICINE AND HYGIENE, vol. 68, no. 3, mars 2003 (2003-03), pages 312-320, XP002365318 ISSN: 0002-9637 cité dans la demande voir page 317, colonne gauche, fin du dernier paragraphe.	1-37, 39
X D5	DATABASE EMBL [Online] 21 mars 2001 (2001-03-21), "Leishmania major histone H2B (H2B) mRNA, complete cds." XP002384653 extrait de EBI accession no. EM_PRO:AF336276 Database accession no. AF336276 le document en entier	38,40
A D6	PROBST P ET AL: "Identification and characterization of T cell-stimulating antigens from Leishmania by CD4 T cell expression cloning." THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 166, no. 1, 1 janvier 2001 (2001-01-01), pages 498-505, XP002365319 ISSN: 0022-1767	

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale n°

PCT/FR2006/000597

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 2005044301 A	19-05-2005	AUCUN	

TRAITÉ DE COOPÉRATION EN MATIÈRE DE BREVETS

Expéditeur : L'ADMINISTRATION CHARGÉE DE
LA RECHERCHE INTERNATIONALE

138
PCT

Destinataire :

voir le formulaire PCT/SA/220

**OPINION ÉCRITE DE L'ADMINISTRATION
CHARGÉE DE LA RECHERCHE
INTERNATIONALE**

(règle 43bis.1 du PCT)

Date d'expédition

(jour/mois/année)

PCT/SA/210 (deuxième feuille)

voir le formulaire

Référence du dossier du déposant ou du mandataire
voir le formulaire PCT/SA/220

POUR SUITE À DONNER

Voir le point 2 ci-dessous

Demande internationale No.

PCT/FR2006/000597

Date du dépôt international (jour/mois/année)

17.03.2006

Date de priorité (jour/mois/année)

18.03.2005

Classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois classification nationale et CIB

INV. A61K39/008 C07K14/44

Déposant

INSTITUT PASTEUR

1. La présente opinion contient des indications et les pages correspondantes relatives aux points suivants :

- ☒ Cadre n°I Base de l'opinion
- ☒ Cadre n°II Priorité
- ☐ Cadre n°III Absence de formulation d'opinion quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle
- ☐ Cadre n°IV Absence d'unité de l'invention
- ☒ Cadre n°V Déclaration motivée selon la règle 43bis.1(a)(i) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration
- ☐ Cadre n°VI Certains documents cités
- ☐ Cadre n°VII Certaines irrégularités relevées dans la demande internationale
- ☐ Cadre n°VIII Certaines observations relatives à la demande internationale

2. **SUITE À DONNER**

Si une demande d'examen préliminaire internationale est présentée, la présente opinion sera considérée comme une opinion écrite de l'administration chargée de l'examen préliminaire international, sauf dans le cas où le déposant a choisi une administration différente de la présente administration aux fins de l'examen préliminaire international et que l'administration considérée a notifié au Bureau international, selon la règle 66.1bis.b), qu'elle n'entend pas considérer comme les siennes les opinions écrites de la présente administration chargée de la recherche internationale.

Si, comme cela est indiqué ci-dessus, la présente opinion écrite est considérée comme l'opinion écrite de l'administration chargée de l'examen préliminaire international, le déposant est invité à soumettre à l'administration chargée de l'examen préliminaire international une réponse écrite, avec le cas échéant des modifications, avant l'expiration d'un délai de 3 mois à compter de la date d'envoi du formulaire PCT/SA/220 ou avant l'expiration d'un délai de 22 mois à compter de la date de priorité, le délai expirant le dernier devant être appliqué.

Pour plus de détails sur les possibilités offertes au déposant, se référer au formulaire PCT/SA/220.

3. Pour de plus amples détails, se référer aux notes relatives au formulaire PCT/SA/220.

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale



Office européen des brevets
D-80298 Munich
Tél. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d
Fax: +49 89 2399 - 4465

Date à laquelle la présente opinion a été établie

voir le formulaire
PCT/SA/210

Fonctionnaire autorisé

Ury, A

N° de téléphone +49 89 2399-8411



**OPINION ÉCRITE DE L'ADMINISTRATION
CHARGÉE DE LA RECHERCHE INTERNATIONALE**

132
Demande internationale n°
PCT/FR2006/000597

Cadre n° I Base de l'opinion

1. En ce qui concerne la **langue**, la présente opinion a été établie sur la base
 - ☒ de la demande internationale dans la langue dans laquelle elle a été déposée
 - ☐ d'une traduction de la demande internationale dans la langue suivante , qui est la langue d'une traduction remise aux fins de la recherche internationale (règles 12.3.a) et 23.1.b)).
2. En ce qui concerne **la ou les séquences de nucléotides ou d'acides aminés** divulguées dans la demande internationale, le cas échéant, la recherche internationale a été effectuée sur la base des éléments suivants :
 - a. Nature de l'élément
 - ☒ un listing de la ou des séquences
 - ☐ un ou des tableaux relatifs au listing de la ou des séquences
 - b. Type de support
 - ☒ sur papier
 - ☒ sous forme électronique
 - c. Moment du dépôt ou de la remise
 - ☒ contenu(s) dans la demande internationale telle que déposée
 - ☒ déposé(s) avec la demande internationale, sous forme électronique
 - ☐ remis ultérieurement à la présente administration aux fins de la recherche
3. ☐ De plus, lorsque plus d'une version ou d'une copie d'un listing des séquences ou d'un ou plusieurs tableaux y relatifs a été déposée, les déclarations requises selon lesquelles les informations fournies ultérieurement ou au titre de copies supplémentaires sont identiques à celles initialement fournies et ne vont pas au-delà de la divulgation faite dans la demande internationale telle que déposée initialement, selon le cas, ont été remises.
4. Commentaires complémentaires :

Cadre n° II Priorité

1. ☒ Il n'a pas été possible d'apprécier la validité de la revendication de priorité dans la mesure où l'administration chargée de la recherche internationale n'a pas en sa possession une copie de la demande antérieure dont la priorité a été revendiquée ou, lorsque cela est exigé, de la traduction de cette demande antérieure. La présente opinion a néanmoins été établie sur la présomption selon laquelle la date pertinente est la date de la priorité revendiquée (règles 43bis.1 et 64.1).
2. ☐ La présente opinion a été établie comme si aucune priorité n'avait été revendiquée, du fait que la revendication de priorité a été jugée non valable (règles 43bis.1 et 64.1). Dès lors pour les besoins de la présente opinion, la date du dépôt international indiquée plus haut est considérée comme la date pertinente.
3. Observations complémentaires, le cas échéant :

**OPINION ÉCRITE DE L'ADMINISTRATION
CHARGÉE DE LA RECHERCHE INTERNATIONALE**

139
Demande internationale n°
PCT/FR2006/000597

Cadre n° V Déclaration motivée selon la règle 43bis.1(a)(i) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration

1. Déclaration

Nouveauté	Oui : Revendications	
	Non : Revendications	17-19, 21-22
Activité inventive	Oui : Revendications	
	Non : Revendications	1-40
Possibilité d'application industrielle	Oui : Revendications	
	Non : Revendications	

2. Citations et explications

voir feuille séparée

Concernant le point V

Déclaration motivée quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration

Il est fait référence aux documents suivants:

D1: Iborra et al.

D2: WO2005/044301

D3: Soto et al.

D4: Maalej et al.

D5: DB EMBL AF336276.

1. La présente demande ne remplit pas les conditions énoncées dans l'article 33(1) PCT, l'objet des revendications 17-19 et 21-22 n'étant pas conforme au critère de nouveauté défini par l'article 33(2) PCT.

D3 (page 343, colonne droite, dernier alinéa) décrit la synthèse d'une librairie de peptides "overlapping" de H2B. Cette divulgation est destructrice de nouveauté pour les revendications 17-19 et 21-22 car aucune caractéristique distinctive n'est présente dans lesdites revendications.

2. La présente demande ne remplit pas les conditions énoncées dans l'article 33(1) PCT, l'objet des revendications 1-40 n'impliquant pas une activité inventive telle que définie par l'article 33(3) PCT.

2.1 Revendications 1-37 et 39.

Le document D1 montre que dans le modèle de la leishmaniose expérimentale d'infection des souris BALB/c par *Leishmania*, la vaccination des souris par un cocktail d'ADN vaccin codant pour les protéines histones H2A, H2B, H3 et H4 de *Leishmania major* induit une importante réponse immune de type Th1 avec sécrétion d'IFN gamma associé à une protection partielle des souris vaccinées suite à un challenge par *Leishmania major*. Une réponse humorale limitée (dominée par les anticorps de l'isotype IgG2a) contre les histones est également observée.

Ces résultats sont confirmés par D2 qui montre également les résultats obtenus lors

de l'immunisation avec les histones sous forme individuelle (voir exemple 4).

D1 peut être considéré comme état de la technique le plus proche.

L'objet de la présente demande diffère de D1 en ce que la partie N-terminale de la protéine histone H2B (et non protéine histone H2B entière comme dans D1) est utilisée pour réaliser le vaccin. A noter que la formulation des revendications n'exclut pas la présence d'autres protéines histones telles que H2A, H3 et H4 (cf. revendications 11 et 32).

Le problème que se propose de résoudre la présente invention peut donc être considéré comme étant la réalisation d'un vaccin alternatif ou amélioré par rapport à D1.

La solution proposée dans les revendications de la présente demande n'est pas considérée comme inventive pour les raisons suivantes.

D3 (voir résumé et page 348, colonne gauche, milieu du dernier paragraphe) montre que les déterminants antigéniques linéaires majeurs (les épitopes immunodominants), cibles des anticorps de la protéine histone H2B, se situent dans sa partie N-terminale, divergente. Cette information est confirmée par D4 (page 317, colonne gauche, fin du dernier paragraphe).

Ainsi, pour améliorer la réponse immunitaire humorale limitée obtenue dans D1 (et D2), l'homme du métier aurait remplacé la protéine histone H2B entière par sa partie N-terminale divergente, connue de D3 (et D4) pour être plus riche en déterminants antigéniques linéaires majeurs (les épitopes immunodominants cibles des anticorps de la protéine histone H2B), et serait arrivé à la solution proposée par la présente demande.

- 2.2 Si il pouvait être montré qu'une activité inventive est quand même présente (sur la base d'un effet surprenant par exemple) les revendications devraient être limitées aux fragments susceptibles de présenter un tel effet surprenant. En effet, la seule réalisation expérimentale porte sur H2B Δ C65 (= acides aminés N-terminaux 1-46 de H2B). Il y a toutes les raisons de penser que de tels résultats ne seraient pas obtenus avec n'importe quel fragment N-terminal (par exemple de 2, 3, etc... amino acides) de H2B. Cette objection est soulevée en vertu des articles 33(3) et 5 PCT. Par ailleurs, l'élargissement des revendications à des variants conservant 50% d'identité (revendications 4 et 21) est également inacceptable pour les mêmes

raisons. D'autant plus que la limitation fonctionnelle "conservant les propriétés immunogènes du polypeptide de référence" est vague et ouverte à interprétation dans la mesure où il n'est pas précisé de quelles "propriétés immunogènes" il s'agit (Article 6 PCT).

2.3 Revendications 38 et 40.

D5 divulgue les séquences nucléotidique et peptidique de la protéine histone H2B de *Leishmania major*, à savoir les séquences de la protéine utilisée dans la présente demande. Le simple fait de prendre une séquence nucléotidique connue codant pour une protéine connue et de l'insérer dans un plasmide (revendication 40) ne fait pas preuve d'activité inventive. De même, le simple fait de prendre une partie d'une séquence nucléotidique connue codant pour une partie (C-term. par exemple) d'une protéine connue et de l'insérer dans un plasmide (revendication 38), sans que ladite partie ne présente d'effet (voir page 34, lignes 10-11) ne fait pas preuve non plus d'activité inventive.

147

Expéditeur : le BUREAU INTERNATIONAL

PCT

NOTIFICATION DE LA RÉCEPTION DE
L'EXEMPLAIRE ORIGINAL

(règle 24.2.a) du PCT)

Destinataire :

ERNEST GUTMANN-YVES PLASSERAUD SAS
3, rue Auber
F-75009 Paris
FRANCE

REÇU LE

3 - JUIL. 2006

ERNEST GUTMANN - YVES PLASSERAUD SAS

Date d'expédition (jour/mois/année) 22 juin 2006 (22.06.2006)	NOTIFICATION IMPORTANTE
Référence du dossier du déposant ou du mandataire B6259A-AD	Demande internationale n° PCT/FR2006/000597

Il est notifié au déposant que le Bureau international a reçu l'exemplaire original de la demande internationale précisée ci-après.

Nom(s) du ou des déposants et de l'État ou des États pour lesquels ils sont déposants :

INSTITUT PASTEUR et al (pour tous les pays désignés excepté US)
CHENIK, Mehdi et al (pour US)

Date du dépôt international : 17 mars 2006 (17.03.2006)
Date(s) de priorité revendiquée(s) : 18 mars 2005 (18.03.2005)
Date de réception de l'exemplaire original par le Bureau international : 12 mai 2006 (12.05.2006)

Liste des offices désignés :

AP: BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW
EA: AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM
EP: AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR

OA: BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG

National: AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

ATTENTION: Le déposant doit soigneusement vérifier les indications figurant dans la présente notification. En cas de divergence entre ces indications et celles que contient la demande internationale, il doit aviser immédiatement le Bureau international. En outre, l'attention du déposant est appelée sur les renseignements suivants donnés dans l'annexe :

- délais dans lesquels doit être abordée la phase nationale - voir renseignements importants mis à jour (à compter d'avril 2002)
- exigences relatives aux documents de priorité (le cas échéant)

Une copie de la présente notification est envoyée à l'office récepteur et à l'administration chargée de la recherche internationale.

Bureau international de l'OMPI 34, chemin des Colombettes 1211 Genève 20, Suisse n° de télécopieur +41 22 338 82 70	Fonctionnaire autorisé Chahine Leila n° de télécopieur +41 22 338 89 95 n° de téléphone +41 22 338 88 91
--	---

RENSEIGNEMENTS CONCERNANT L'OUVERTURE DE LA PHASE NATIONALE

Il est rappelé au déposant qu'il doit aborder la "phase nationale" auprès de chacun des offices désignés indiqués sur la page de couverture de la présente notification en payant les taxes nationales et en remettant les traductions, comme prévu par les articles 22 et 39 et par les législations nationales applicables. De plus, le déposant devra dans certains cas satisfaire à d'autres exigences particulières applicables dans certains offices. Il lui appartient de veiller à remplir en temps voulu les conditions requises pour l'ouverture de la phase nationale. La majorité des offices n'envoient pas de rappel à l'approche de la date limite pour aborder la phase nationale.

Le délai applicable pour l'ouverture de la phase nationale sera, sous réserve de ce qui est dit au paragraphe suivant, de 30 MOIS à compter de la date de priorité, non seulement en ce qui concerne tout office élu lorsqu'une demande d'examen préliminaire international aura été présentée avant l'expiration du délai de 19 mois à compter de la date de priorité (voir l'article 39.1)), mais également en ce qui concerne tout office désigné, en l'absence de présentation d'une telle demande d'examen, lorsque l'article 22.1) tel que modifié avec effet au 1^{er} avril 2002 sera applicable audit office désigné. Pour plus de renseignements, voir la *Gazette du PCT* n° 44/2001 du 1^{er} novembre 2001, pages 19927, 19933 and 19935, ainsi que le bulletin *PCT Newsletter*, numéros d'octobre et de novembre 2001 et de février 2002.

En pratique, des délais autres que celui de 30 mois vont continuer de s'appliquer, pour des durées diverses, en ce qui concerne certains offices désignés ou élus. Pour obtenir les mises à jour régulières relatives aux délais applicables (20, 21, 30 ou 31 mois ou autre délai), office par office, on se reportera à la *Gazette du PCT* (la partie "section IV" publiée chaque semaine), au bulletin *PCT Newsletter* (publié chaque mois) ainsi qu'aux chapitres nationaux pertinents dans le volume II du *Guide du déposant du PCT* (dont la version papier est mise à jour normalement deux fois par an et la version Internet normalement chaque semaine). Enfin, un tableau cumulatif de tous les délais applicables pour l'ouverture de la phase nationale est accessible sur le site Internet de l'OMPI, par l'intermédiaire de liens à partir de diverses pages du site, y compris celles de la *Gazette*, de la *Newsletter* et du *Guide*, à l'adresse suivante: <http://www.wipo.int/pct/fr/index.html>.

Des informations relatives aux exigences concernant la présentation d'une demande d'examen préliminaire international figurent dans le *Guide du déposant du PCT*, volume I/A, chapitre IX. Seul un déposant qui est ressortissant d'un État contractant du PCT lié par le chapitre II ou qui y a son domicile peut présenter une demande d'examen préliminaire international (actuellement, tous les États contractants du PCT sont liés par le chapitre II).

EXIGENCES RELATIVES AUX DOCUMENTS DE PRIORITÉ

Pour les déposants qui n'ont pas encore satisfait aux exigences relatives aux documents de priorité, il est rappelé ce qui suit.

Lorsque la priorité d'une demande nationale, régionale ou internationale antérieure est revendiquée, le déposant doit présenter une copie de cette demande antérieure, certifiée conforme par l'administration auprès de laquelle elle a été déposée ("document de priorité"), à l'office récepteur (qui la transmettra au Bureau international) ou directement au Bureau international, avant l'expiration d'un délai de 16 mois à compter de la date de priorité, étant entendu que tout document de priorité peut être présenté au Bureau international avant la date de publication internationale de la demande internationale, auquel cas ce document sera réputé avoir été reçu par le Bureau international le dernier jour du délai de 16 mois (règle 17.1.a)).

Lorsque le document de priorité est délivré par l'office récepteur, le déposant peut, au lieu de présenter ce document, demander à l'office récepteur de le préparer et de le transmettre au Bureau international. La requête à cet effet doit être formulée avant l'expiration du délai de 16 mois et peut être soumise au paiement d'une taxe (règle 17.1.b)).

Si le document de priorité en question n'est pas fourni au Bureau international et si la demande adressée à l'office récepteur de préparer et de transmettre le document de priorité n'a pas été faite (et la taxe correspondante acquittée, le cas échéant) avant l'expiration du délai applicable mentionné aux paragraphes précédents, tout État désigné peut ne pas tenir compte de la revendication de priorité; toutefois, aucun office désigné ne peut décider de ne pas tenir compte de la revendication de priorité avant d'avoir donné au déposant la possibilité, à l'ouverture de la phase nationale, de remettre le document de priorité dans un délai raisonnable en l'espèce (règle 17.1.c)).

Lorsque plusieurs priorités sont revendiquées, la date de priorité à prendre en considération aux fins du calcul du délai de 16 mois (et de tous les autres délais du PCT) est la date du dépôt de la demande la plus ancienne dont la priorité est revendiquée (article 2.xi)b)).

Expéditeur : le BUREAU INTERNATIONAL

PCT

NOTIFICATION RELATIVE
 À LA PRÉSENTATION OU À LA TRANSMISSION
 DU DOCUMENT DE PRIORITÉ

(instruction administrative 411 du PCT)

Date d'expédition (jour/mois/année) 23 juin 2006 (23.06.2006)		Destinataire : ERNEST GUTMANN-YVES PLASSERAUD SAS 3, rue Auber F-75009 Paris FRANCE	REÇU LE 6 - JUIL. 2006 ERNEST GUTMANN - YVES PLASSERAUD SAS
Référence du dossier du déposant ou du mandataire B6259A-AD			
Demande internationale n° PCT/FR2006/000597		NOTIFICATION IMPORTANTE	
Date de publication internationale (jour/mois/année) Pas encore publiée		Date du dépôt international (jour/mois/année) 17 mars 2006 (17.03.2006)	
		Date de priorité (jour/mois/année) 18 mars 2005 (18.03.2005)	
Déposant INSTITUT PASTEUR etc			

1. Par le présent formulaire, qui remplace toute notification antérieure relative à la présentation ou à la transmission de documents de priorité, il est notifié au déposant la date de réception par le Bureau international du ou des documents de priorité concernant toute demande antérieure dont la priorité est revendiquée. Sauf indication contraire consistant en les lettres "NR", figurant dans la colonne de droite, ou un astérisque figurant à côté d'une date de réception, le document de priorité en question a été présenté ou transmis au Bureau international d'une manière conforme à la règle 17.1.a) ou b).
2. (Le cas échéant) Les lettres "NR" figurant dans la colonne de droite signalent un document de priorité qui, à la date d'expédition du présent formulaire, n'a pas encore été reçu par le Bureau international selon la règle 17.1.a) ou b). Lorsque, selon la règle 17.1.a), le document de priorité doit être présenté par le déposant à l'office récepteur ou au Bureau international, mais que le déposant n'a pas présenté le document de priorité dans le délai prescrit par cette règle, l'attention du déposant est appelée sur la règle 17.1.c) selon laquelle aucun office désigné ne peut décider de ne pas tenir compte de la revendication de priorité considérée avant d'avoir donné au déposant la possibilité, à l'ouverture de la phase nationale, de remettre le document de priorité dans un délai raisonnable en l'espèce.
3. (Le cas échéant) Un astérisque (*) figurant à côté de la date de réception, dans la colonne de droite, signale un document de priorité présenté ou transmis au Bureau international mais de manière non conforme à la règle 17.1.a) ou b) (le document de priorité a été reçu après le délai prescrit par la règle 17.1.a) ou la demande d'établissement et de transmission du document de priorité a été soumise à l'office récepteur après le délai prescrit par la règle 17.1.b)). Même si le document de priorité n'a pas été remis conformément à la règle 17.1.a) ou b), le Bureau international transmettra une copie du document aux offices désignés, pour leur appréciation. Dans le cas où une telle copie n'est pas acceptée par un office désigné comme document de priorité, la règle 17.1.c) énonce que aucun office désigné ne peut décider de ne pas tenir compte de la revendication de priorité considérée avant d'avoir donné au déposant la possibilité, à l'ouverture de la phase nationale, de remettre le document de priorité dans un délai raisonnable en l'espèce.

<u>Date de priorité</u>	<u>Demande de priorité n°</u>	<u>Pays, office régional ou office récepteur selon le PCT</u>	<u>Date de réception du document de priorité</u>
18 mars 2005 (18.03.2005)	0502725	FR	12 mai 2006 (12.05.2006)

Bureau international de l'OMPI 34, chemin des Colombettes 1211 Genève 20, Suisse n° de télécopieur +41 22 338 82 70	Fonctionnaire autorisé Athina Nickitas-Etienne n° de télécopieur +41 22 338 89 95 n° de téléphone +41 22 338 94 43
--	---

Expéditeur : le BUREAU INTERNATIONAL

PCT

DEUXIÈME AVIS SUPPLÉMENTAIRE INFORMANT
LE DÉPOSANT DE LA COMMUNICATION DE LA
DEMANDE INTERNATIONALE (AUX OFFICES
DÉSIGNÉS QUI APPLIQUENT LE DÉLAI DE
30 MOIS SELON L'ARTICLE 22.1))

(règle 47.1.c) du PCT)

Destinataire :

ERNEST GUTMANN VIVES PLASSERAUD SAS
3, rue Auber
F-75009 Paris
FRANCE

REÇU LE

25 JUL. 2007

ERNEST GUTMANN VIVES PLASSERAUD SAS

AVIS IMPORTANT

Date d'expédition (jour/mois/année) 19 juillet 2007 (19.07.2007)		
Référence du dossier du déposant ou du mandataire B6259A-AD		
Demande internationale n° PCT/FR2006/000597	Date du dépôt international (jour/mois/année) 17 mars 2006 (17.03.2006)	Date de priorité (jour/mois/année) 18 mars 2005 (18.03.2005)
Déposant INSTITUT PASTEUR etc		

1. **ATTENTION** : Pour tout office désigné auquel le délai selon l'article 22.1) tel qu'il est en vigueur depuis le 1er avril 2002 (30 mois à compter de la date de priorité) ne s'applique pas, se reporter au formulaire PCT/IB/308 (Premier avis) émis antérieurement.

2. Il est notifié par la présente que l'office ou les offices désignés suivants – auxquels le délai selon l'article 22.1) tel qu'il est en vigueur depuis le 1er avril 2002 s'applique – ont demandé que la communication de la demande internationale, prévue à l'article 20, soit effectuée conformément à la règle 93bis.1. Le Bureau international a adressé cette communication à la date indiquée ci-dessous :
21 septembre 2006 (21.09.2006)

AU, AZ, BY, CN, CO, DZ, EP, HU, KG, KP, KR, MD, MK, MZ, NA, NG, PG, RU, SY, TM, US

Conformément à la règle 47.1.c-bis)i), ces offices accepteront le présent avis comme preuve déterminante du fait que la communication de la demande internationale a bien été effectuée à la date d'expédition indiquée ci-dessus et il ne sera pas exigé du déposant qu'il fournisse une copie de la demande internationale à l'office ou aux offices désignés.

3. Les offices désignés suivants, auxquels le délai selon l'article 22.1) tel qu'il est en vigueur depuis le 1er avril 2002 s'applique, n'ont pas demandé, à la date d'expédition du présent avis, que la communication de la demande internationale soit effectuée conformément à la règle 93bis.1 :

AE, AG, AL, AM, AP, AT, BA, BB, BG, BR, BW, BZ, CA, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EA, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KM, KN, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LV, LY, MA, MG, MN, MW, MX, NI, NO, NZ, OA, OM, PH, PL, PT, RO, SC, SD, SG, SK, SL, SM, TJ, TN, TR, TT, UA, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

Conformément à la règle 47.1.c-bis)ii), ces offices accepteront le présent avis comme preuve déterminante du fait que l'État contractant pour lequel cet office agit en tant qu'office désigné n'exige pas du déposant qu'il fournisse en vertu de l'article 22 une copie de la demande internationale.

4. DÉLAIS pour l'ouverture de la phase nationale

Pour le ou les offices désignés ou élus mentionnés ci-dessus, le délai applicable pour l'ouverture de la phase nationale sera, sous réserve de ce qui est dit au paragraphe suivant, de 30 MOIS à compter de la date de priorité.

En pratique, des délais autres que celui de 30 mois continueront de s'appliquer, pour des durées diverses, en ce qui concerne certains offices désignés ou élus mentionnés ci-dessus. Pour obtenir les mises à jour régulières relatives aux délais applicables (30 ou 31 mois, ou autre délai), office par office, on se reportera à la Gazette du PCT, au bulletin PCT Newsletter ainsi qu'aux chapitres nationaux pertinents dans le volume II du Guide du déposant du PCT, accessibles sur le site Internet de l'OMPI à l'adresse suivante : <http://www.wipo.int/pcu/fr/index.html>.

Le déposant est seul responsable du respect de tous les délais visés ci-dessus.

Bureau international de l'OMPI
34, chemin des Colombettes
1211 Genève 20, Suisse

Fonctionnaire autorisé

Athina Nickitas-Etienne

n° de télécopieur +41 22 338 82 70

courriel : pi04.pct@wipo.int

Expéditeur : le BUREAU INTERNATIONAL

PCT

PREMIER AVIS INFORMANT LE DÉPOSANT
DE LA COMMUNICATION DE LA DEMANDE
INTERNATIONALE (AUX OFFICES DÉSIGNÉS
QUI N'APPLIQUENT PAS LE DÉLAI DE
30 MOIS SELON L'ARTICLE 22.1))

(règle 47.1.c) du PCT)

Destinataire :

ERNEST GUTMANN-YVES PLASSERAUD SAS
3, rue Auber
F-75009 Paris
FRANCE

REÇU LE

30 OCT. 2006

ERNEST GUTMANN - YVES PLASSERAUD SAS

AVIS IMPORTANT

Date d'expédition (jour/mois/année)

19 octobre 2006 (19.10.2006)

Référence du dossier du déposant ou du mandataire
B6259A-AD

Demande internationale n°
PCT/FR2006/000597

Date du dépôt international (jour/mois/année)
17 mars 2006 (17.03.2006)

Date de priorité (jour/mois/année)
18 mars 2005 (18.03.2005)

Déposant

INSTITUT PASTEUR etc

- ATTENTION** : Pour tout office désigné auquel le délai selon l'article 22.1) tel qu'il est en vigueur depuis le 1^{er} avril 2002 (30 mois à compter de la date de priorité) s'applique, se reporter au formulaire PCT/IB/308(Deuxième avis supplémentaire) (qui sera émis à bref délai après l'expiration du délai de 28 mois à compter de la date de priorité).
- Il est notifié par la présente que l'office ou les offices désignés suivants – auxquels le délai selon l'article 22.1) tel qu'il est en vigueur depuis le 1^{er} avril 2002 ne s'applique pas – ont demandé que la communication de la demande internationale, prévue à l'article 20, soit effectuée conformément à la règle 93bis.1. Le Bureau international a adressé cette communication à la date indiquée ci-dessous :
21 septembre 2006 (21.09.2006)

CH

Conformément à la règle 47.1.c-bis)i), ces offices accepteront le présent avis comme preuve déterminante du fait que la communication de la demande internationale a bien été effectuée à la date d'expédition indiquée ci-dessus et il ne sera pas exigé du déposant qu'il fournisse une copie de la demande internationale à l'office ou aux offices désignés.

- Les offices désignés suivants, auxquels le délai selon l'article 22.1) tel qu'il est en vigueur depuis le 1^{er} avril 2002 ne s'applique pas, n'ont pas demandé, à la date d'expédition du présent avis, que la communication de la demande internationale soit effectuée conformément à la règle 93bis.1 :

LU, SE, TZ, UG, ZM

Conformément à la règle 47.1.c-bis)ii), ces offices accepteront le présent avis comme preuve déterminante du fait que l'État contractant pour lequel cet office agit en tant qu'office désigné n'exige pas du déposant qu'il fournisse en vertu de l'article 22 une copie de la demande internationale.

4. DÉLAIS pour l'ouverture de la phase nationale

Pour le ou les offices désignés mentionnés ci-dessus et à moins qu'une demande d'examen préliminaire international ait été présentée avant l'expiration du délai de 19 mois à compter de la date de priorité (voir l'article 39.1)), le délai applicable pour l'ouverture de la phase nationale sera, sous réserve de ce qui est dit au paragraphe suivant, de 20 MOIS à compter de la date de priorité.

En pratique, des délais autres que celui de 20 mois continueront de s'appliquer, pour des durées diverses, en ce qui concerne certains offices désignés mentionnés ci-dessus. Pour obtenir les mises à jour régulières relatives aux délais applicables (20 ou 21 mois, ou autre délai), office par office, on se reportera à la *Gazette du PCT*, au bulletin *PCT Newsletter* ainsi qu'aux chapitres nationaux pertinents dans le volume II du *Guide du déposant du PCT*, accessibles sur le site Internet de l'OMPI à l'adresse suivante : <http://www.wipo.int/pct/fr/index.html>.

Le déposant est seul responsable du respect de tous les délais visés ci-dessus.

Bureau international de l'OMPI
34, chemin des Colombettes
1211 Genève 20, Suisse

Fonctionnaire autorisé

Athina Nickitas-Etienne

n° de télécopieur +41 22 338 82 70

courriel : pt04@wipo.int

PCT

REQUÊTE

Le soussigné requiert que la présente demande internationale soit traitée conformément au Traité de coopération en matière de brevets.

Réservé à l'office récepteur

Demande internationale n°

Date du dépôt international

Nom de l'office récepteur et "Demande internationale PCT"

Référence du dossier du déposant ou du mandataire (facultatif)
(12 caractères au maximum) B6259A-AD

Cadre n° I TITRE DE L'INVENTION

COMPOSITION COMPRENANT LA REGION N-TERMINALE D'HISTONE H2B DE LEISHMANIA -
UTILISATION POUR INDUIRE UNE REPONSE IMMUNITAIRE.

Cadre n° II DÉPOSANT

☐ Cette personne est aussi inventeur

Nom et adresse : (Nom de famille suivi du prénom; pour une personne morale, désignation officielle complète. L'adresse doit comprendre le code postal et le nom du pays. Le pays de l'adresse indiquée dans ce cadre est l'Etat où le déposant a son domicile si aucun domicile n'est indiqué ci-dessous.)

INSTITUT PASTEUR
26-28 rue du Docteur Roux
FR-75724 PARIS CEDEX 15
FRANCE

n° de téléphone

n° de télécopieur

n° de téléimprimeur

n° sous lequel le déposant est inscrit auprès de l'office

Nationalité (nom de l'Etat) :

FRANCE

Domicile (nom de l'Etat) :

FRANCE

Cette personne est déposant pour :

☐

tous les Etats désignés

☒

tous les Etats désignés sauf les Etats-Unis d'Amérique

☐

les Etats-Unis d'Amérique seulement

☐

les Etats indiqués dans le cadre supplémentaire

Cadre n° III AUTRE(S) DÉPOSANT(S) OU (AUTRE(S)) INVENTEUR(S)

Nom et adresse : (Nom de famille suivi du prénom; pour une personne morale, désignation officielle complète. L'adresse doit comprendre le code postal et le nom du pays. Le pays de l'adresse indiquée dans ce cadre est l'Etat où le déposant a son domicile si aucun domicile n'est indiqué ci-dessous.)

INSTITUT PASTEUR DE TUNIS
13, place Pasteur
TN-1002 TUNIS BELVEDERE
TUNISIE

Cette personne est :

☒

déposant seulement

☐

déposant et inventeur

☐

inventeur seulement (Si cette case est cochée, ne pas remplir la suite.)

n° sous lequel le déposant est inscrit auprès de l'office

Nationalité (nom de l'Etat) :

TUNISIE

Domicile (nom de l'Etat) :

TUNISIE

Cette personne est déposant pour :

☐

tous les Etats désignés

☒

tous les Etats désignés sauf les Etats-Unis d'Amérique

☐

les Etats-Unis d'Amérique seulement

☐

les Etats indiqués dans le cadre supplémentaire

☒ D'autres déposants ou inventeurs sont indiqués sur une feuille annexe.

Cadre n° IV MANDATAIRE OU REPRÉSENTANT COMMUN; OU ADRESSE POUR LA CORRESPONDANCE

La personne dont l'identité est donnée ci-dessous est/a été désignée pour agir au nom du ou des déposants auprès des autorités internationales compétentes, comme:

☒

mandataire

☐

représentant commun

Nom et adresse : (Nom de famille suivi du prénom; pour une personne morale, désignation officielle complète. L'adresse doit comprendre le code postal et le nom du pays.)

ERNEST GUTMANN-YVES PLASSERAUD SAS
3, rue Auber
FR-75009 PARIS

n° de téléphone

33.1.44.51.18.00

n° de télécopieur

33.1.42.66.08.90

n° de téléimprimeur

n° sous lequel le mandataire est inscrit auprès de l'office

☐ Adresse pour la correspondance : cocher cette case lorsque aucun mandataire ni représentant commun n'est/n'a été désigné et que l'espace ci-dessus est utilisé pour indiquer une adresse spéciale à laquelle la correspondance doit être envoyée.

Suite du cadre n° III AUTRE(S) DÉPOSANT(S) OU (AUTRE(S)) INVENTEUR(S)	
Si aucun des sous-cadres suivants n'est utilisé, cette feuille ne doit pas être incluse dans la requête.	
Nom et adresse : (Nom de famille suivi du prénom; pour une personne morale, désignation officielle complète. L'adresse doit comprendre le code postal et le nom du pays. Le pays de l'adresse indiquée dans ce cadre est l'État où le déposant a son domicile si aucun domicile n'est indiqué ci-dessous.) CHENIK Mehdi 31, avenue de la république TN-2070 LA MARSA TUNISIE	Cette personne est : ☐ déposant seulement ☒ déposant et inventeur ☐ inventeur seulement (Si cette case est cochée, ne pas remplir la suite.) n° sous lequel le déposant est inscrit auprès de l'office
Nationalité (nom de l'État) : TUNISIE	Domicile (nom de l'État) : TUNISIE
Cette personne est déposant pour : ☐ tous les États désignés ☐ tous les États désignés sauf les États-Unis d'Amérique ☒ les États-Unis d'Amérique seulement ☐ les États indiqués dans le cadre supplémentaire	
Nom et adresse : (Nom de famille suivi du prénom; pour une personne morale, désignation officielle complète. L'adresse doit comprendre le code postal et le nom du pays. Le pays de l'adresse indiquée dans ce cadre est l'État où le déposant a son domicile si aucun domicile n'est indiqué ci-dessous.) LOUZIR Hechmi 12, avenue Taïeb Méhiri TN-2070 LA MARSA TUNISIE	Cette personne est : ☐ déposant seulement ☒ déposant et inventeur ☐ inventeur seulement (Si cette case est cochée, ne pas remplir la suite.) n° sous lequel le déposant est inscrit auprès de l'office
Nationalité (nom de l'État) : TUNISIE	Domicile (nom de l'État) : TUNISIE
Cette personne est déposant pour : ☐ tous les États désignés ☐ tous les États désignés sauf les États-Unis d'Amérique ☒ les États-Unis d'Amérique seulement ☐ les États indiqués dans le cadre supplémentaire	
Nom et adresse : (Nom de famille suivi du prénom; pour une personne morale, désignation officielle complète. L'adresse doit comprendre le code postal et le nom du pays. Le pays de l'adresse indiquée dans ce cadre est l'État où le déposant a son domicile si aucun domicile n'est indiqué ci-dessous.) DELAGI Koussay c/o INSTITUT PASTEUR DE TUNIS 13, place Pasteur TN-1002 TUNIS BELVEDERE TUNISIE	Cette personne est : ☐ déposant seulement ☒ déposant et inventeur ☐ inventeur seulement (Si cette case est cochée, ne pas remplir la suite.) n° sous lequel le déposant est inscrit auprès de l'office
Nationalité (nom de l'État) : TUNISIE	Domicile (nom de l'État) : TUNISIE
Cette personne est déposant pour : ☐ tous les États désignés ☐ tous les États désignés sauf les États-Unis d'Amérique ☒ les États-Unis d'Amérique seulement ☐ les États indiqués dans le cadre supplémentaire	
Nom et adresse : (Nom de famille suivi du prénom; pour une personne morale, désignation officielle complète. L'adresse doit comprendre le code postal et le nom du pays. Le pays de l'adresse indiquée dans ce cadre est l'État où le déposant a son domicile si aucun domicile n'est indiqué ci-dessous.)	Cette personne est : ☐ déposant seulement ☐ déposant et inventeur ☐ inventeur seulement (Si cette case est cochée, ne pas remplir la suite.) n° sous lequel le déposant est inscrit auprès de l'office
Nationalité (nom de l'État) :	Domicile (nom de l'État) :
Cette personne est déposant pour : ☐ tous les États désignés ☐ tous les États désignés sauf les États-Unis d'Amérique ☐ les États-Unis d'Amérique seulement ☐ les États indiqués dans le cadre supplémentaire	
☐ D'autres déposants ou inventeurs sont indiqués sur une feuille annexe.	

Cadres supplémentaires Si le cadre supplémentaire n'est pas utilisé, cette feuille ne doit pas être incluse dans la requête.

1. Si l'un des cadres du présent formulaire – à l'exception des cadres n° VIII.i) à v) pour lesquels une feuille annexe spéciale est prévue – ne suffit pas à contenir tous les renseignements : dans ce cas, indiquer "Suite du cadre n°..." (préciser le numéro du cadre) et fournir les renseignements conformément aux instructions données dans le cadre dans lequel la place était insuffisante; en particulier :

i) si plus de deux personnes doivent être indiquées comme déposants ou inventeurs et que l'on ne dispose d'aucune "feuille annexe" : dans ce cas, indiquer "Suite du cadre n° III" et fournir pour chaque personne supplémentaire le même type de renseignements que ceux qui sont demandés dans le cadre n° III. Le pays de l'adresse indiquée dans ce cadre est l'État où le déposant a son domicile si aucun domicile n'est indiqué ci-dessous;

ii) si, dans le cadre n° II ou dans l'un des sous-cadres du cadre n° III, la case "les États indiqués dans le cadre supplémentaire" est cochée : dans ce cas, indiquer "Suite du cadre n° II" ou "Suite du cadre n° III" ou "Suite des cadres n° II et III" (selon le cas), ainsi que le nom du ou des déposants en cause et, à côté de chaque nom, le ou les États pour lesquels la personne mentionnée a la qualité de déposant (ou, le cas échéant, la mention "brevet ARIPO", "brevet eurasienn", "brevet européen" ou "brevet OAPI");

iii) si, dans le cadre n° II ou dans l'un des sous-cadres du cadre n° III, l'inventeur ou l'inventeur/déposant n'a pas la qualité d'inventeur pour tous les États désignés ou pour les États-Unis d'Amérique : dans ce cas, indiquer "Suite du cadre n° II" ou "Suite du cadre n° III" ou "Suite des cadres n° II et III" (selon le cas), ainsi que le nom du ou des inventeurs et, à côté de chaque nom, le ou les États pour lesquels la personne mentionnée a la qualité d'inventeur (ou, le cas échéant, la mention "brevet ARIPO", "brevet eurasienn", "brevet européen" ou "brevet OAPI");

iv) si, en plus du ou des mandataires indiqués dans le cadre n° IV, il y a d'autres mandataires : dans ce cas, indiquer "Suite du cadre n° IV" et fournir pour chaque mandataire supplémentaire le même type de renseignements que ceux qui sont demandés dans le cadre n° IV;

v) si, dans le cadre n° VI, la priorité de plus de trois demandes antérieures est revendiquée : dans ce cas, indiquer "Suite du cadre n° VI" et fournir pour chaque demande antérieure supplémentaire le même type de renseignements que ceux qui sont demandés dans le cadre n° VI.

Suite du cadre n° IV, autres mandataires:

PARIS Fabienne
DESAIX Anne
GUTMANN Ernest
PLASSERAUD Yves
VAILLANT Jeanne
RAMEY Daniel
SELLIN Carole

2. Si le déposant a l'intention d'indiquer qu'il souhaite que la demande internationale soit traitée, dans certains États désignés, comme une demande de brevet d'addition, de certificat d'addition, de certificat d'auteur d'invention additionnel ou de certificat d'utilité additionnel : dans ce cas, indiquer le nom ou le code à deux lettres de chaque État désigné en cause, ainsi que "brevet d'addition", "certificat d'addition", "certificat d'auteur d'invention additionnel" ou "certificat d'utilité additionnel", le numéro de la demande principale ou du brevet principal ou de tout autre titre de protection principal et la date de délivrance du brevet principal ou de tout autre titre de protection principal ou la date de dépôt de la demande principale (règles 4.11.a)iii) et 49bis.1.a) ou b)).

3. Si le déposant a l'intention d'indiquer qu'il souhaite que la demande internationale soit traitée, aux États-Unis d'Amérique, comme une demande de "continuation" ou de "continuation-in-pati" d'une demande antérieure : dans ce cas, indiquer "États-Unis d'Amérique" ou "US" et "continuation" ou "continuation-in-pati" et le numéro et la date de dépôt de la demande principale (règles 4.11.a)iv) et 49bis.1.d)).

151

Cadre n° V DÉSIGNATIONS

Le dépôt de la présente requête vaut, selon la règle 4.9.a), désignation de tous les États contractants liés par le PCT à la date du dépôt international, aux fins de la délivrance de tout titre de protection disponible et, le cas échéant, aux fins de la délivrance à la fois de brevets régionaux et nationaux.

Cependant,

- ☐ DE Allemagne n'est désignée pour aucun titre de protection nationale
- ☐ KR République de Corée n'est désignée pour aucun titre de protection nationale
- ☐ RU Fédération de Russie n'est désignée pour aucun titre de protection nationale

(Les cases mentionnées ci-dessus peuvent être utilisées pour exclure (irrévocablement) les désignations concernées afin d'éviter qu'une demande nationale antérieure dont la priorité est revendiquée ne cesse de produire ses effets en vertu de la législation nationale. Voir les notes relatives au cadre n° V en ce qui concerne les conséquences de telles dispositions de la législation nationale dans ces États et dans certains autres.)

Cadre n° VI REVENDEICATION DE PRIORITÉ

La priorité de la ou des demandes antérieures suivantes est revendiquée :

Date de dépôt de la demande antérieure (jour/mois/année)	Numéro de la demande antérieure	Lorsque la demande antérieure est une :		
		demande nationale : pays ou membre de l'OMC	demande régionale :* office régional	demande internationale : office récepteur
point 1) 18 mars 2005 (18/03/2005)	0502725	FRANCE		
point 2)				
point 3)				

☐ D'autres revendications de priorité sont indiquées dans le cadre supplémentaire.

L'office récepteur est prié de préparer et de transmettre au Bureau international une copie certifiée conforme de la ou des demandes antérieures (seulement si la demande antérieure a été déposée auprès de l'office qui, aux fins de la présente demande internationale, est l'office récepteur) indiquées ci-dessus sous :

- ☐ tous les points ☒ le point 1) ☐ le point 2) ☐ le point 3) ☐ autre, voir le cadre supplémentaire

* Si la demande antérieure est une demande ARIPO, indiquer au moins un pays partie à la Convention de Paris pour la protection de la propriété industrielle ou un membre de l'Organisation mondiale du commerce pour lequel cette demande antérieure a été déposée (règle 4.10.b)ii)) :

Cadre n° VII ADMINISTRATION CHARGÉE DE LA RECHERCHE INTERNATIONALE

Choix de l'administration chargée de la recherche internationale (ISA) (si plusieurs administrations chargées de la recherche internationale sont compétentes pour procéder à la recherche internationale, indiquer l'administration choisie; le code à deux lettres peut être utilisé) :

ISA / OEB

Demande d'utilisation des résultats d'une recherche antérieure; mention de cette recherche (si une recherche antérieure a été effectuée par l'administration chargée de la recherche internationale ou demandée à cette dernière) :

Date (jour/mois/année) Numéro Pays (ou office régional)

31 janvier 2006 (31/01/2006) FA 663618 FRANCE

Cadre n° VIII DÉCLARATIONS

Les déclarations suivantes figurent dans les cadres n° VIII.i) à v) (cocher ci-dessous la ou les cases appropriées et indiquer dans la colonne de droite le nombre de chaque type de déclaration) :

		Nombre de déclarations
☐ cadre n° VIII.i)	déclaration relative à l'identité de l'inventeur	:
☐ cadre n° VIII.ii)	déclaration relative au droit du déposant, à la date du dépôt international, de demander et d'obtenir un brevet	:
☐ cadre n° VIII.iii)	déclaration relative au droit du déposant, à la date du dépôt international, de revendiquer la priorité d'une demande antérieure	:
☐ cadre n° VIII.iv)	déclaration relative à la qualité d'inventeur (seulement aux fins de la désignation des États-Unis d'Amérique)	:
☐ cadre n° VIII.v)	déclaration relative à des divulgations non opposables ou à des exceptions au défaut de nouveauté	:

Cadre n° IX BORDEREAU; LANGUE DE DÉPÔT

La présente demande internationale contient :

- a) sur papier le nombre de feuilles suivant :
- | | |
|---|----|
| requête (y compris la ou les feuilles pour déclaration) | 5 |
| description (à l'exception du listage des séquences ou des tableaux y relatifs) | 39 |
| revendications | 6 |
| abrégé | 1 |
| dessins | 7 |
| Sous-total de feuilles | 58 |
| listage des séquences | 2 |
| tableaux y relatifs | |
- (pour les deux éléments, nombre réel de feuilles s'ils sont déposés sur papier, qu'ils soient ou non également déposés sous forme électronique; voir c) ci-après)
- Nombre total de feuilles : 60

b) ☐ seulement sous forme électronique (instruction 801.a.ii))

- i) ☐ listage des séquences
ii) ☐ tableaux y relatifs

c) ☐ également sous forme électronique (instruction 801.a.ii))

- i) ☐ listage des séquences
ii) ☐ tableaux y relatifs

Type et nombre de supports (disquette, CD-ROM, CD-R ou autre) sur lesquels figurent le ou les

- i) ☐ listage des séquences :
ii) ☐ tableaux y relatifs :

(exemplaires supplémentaires à indiquer aux points 9.ii) ou 10.ii), dans la colonne de droite)

Le ou les éléments suivants sont joints à la présente demande internationale (cocher la ou les cases appropriées et indiquer dans la colonne de droite le nombre de chaque élément) :

- | | |
|---|-------------|
| 1. ☐ feuille de calcul des taxes | 1 |
| 2. ☐ original du pouvoir distinct | |
| 3. ☐ original du pouvoir général | |
| 4. ☐ copie du pouvoir général; le cas échéant, numéro de référence : | |
| 5. ☐ explication de l'absence d'une signature | |
| 6. ☐ document(s) de priorité indiqué(s) dans le cadre n° VI au(x) point(s) : | |
| 7. ☐ traduction de la demande internationale en (langue) : | |
| 8. ☒ indications séparées concernant des micro-organismes ou autre matériel biologique déposés | 3 |
| 9. ☒ listage des séquences sous forme électronique (indiquer type et nombre de supports) | 1 disquette |
| i) ☒ copie remise aux fins de la recherche internationale en vertu de la règle 13 ^{ter} seulement (et non en tant que partie de la demande internationale) | |
| ii) ☐ (seulement lorsque la case b)i) ou c)i) de la colonne de gauche est cochée) exemplaires supplémentaires, y compris, le cas échéant, copie remise aux fins de la recherche internationale en vertu de la règle 13 ^{ter} | |
| iii) ☒ avec la déclaration pertinente quant à l'identité entre la copie – ou les exemplaires supplémentaires – et le listage des séquences mentionné dans la colonne de gauche | 1 |
| 10. ☐ tableaux sous forme électronique relatifs au listage des séquences (indiquer type et nombre de supports) | |
| i) ☐ copie remise aux fins de la recherche internationale en vertu de l'instruction 802.b-quater) seulement (et non en tant que partie de la demande internationale) | |
| ii) ☐ (seulement lorsque la case b)ii) ou c)ii) de la colonne de gauche est cochée) exemplaires supplémentaires, y compris, le cas échéant, copie remise aux fins de la recherche internationale en vertu de l'instruction 802.b-quater) | |
| iii) ☐ avec la déclaration pertinente quant à l'identité entre la copie – ou les exemplaires supplémentaires – et les tableaux mentionnés dans la colonne de gauche | |
| 11. ☒ autres éléments (préciser) : rapport de recherche préliminaire FR | 1 |

Figure des dessins qui doit accompagner l'abrégé :

aucune

Langue de dépôt de la demande internationale :

française

Cadre n° X SIGNATURE DU DÉPOSANT, DU MANDATAIRE OU DU REPRÉSENTANT COMMUN

À côté de chaque signature, indiquer le nom du signataire et à quel titre l'intéressé signe (si cela n'apparaît pas clairement à la lecture de la requête).

Paris, le 17 mars 2006

DESAIX Anne

ERNEST GUTMANN - YVES PLASSERAUD SAS

Réservé à l'office récepteur

1. Date effective de réception des pièces supposées constituer la demande internationale :

3. Date effective de réception, rectifiée en raison de la réception ultérieure, mais dans les délais, de documents ou de dessins complétant ce qui est supposé constituer la demande internationale :

4. Date de réception, dans les délais, des corrections demandées selon l'article 11.2) du PCT :

5. Administration chargée de la recherche internationale (si plusieurs sont compétentes) : ISA /

6. ☐ Transmission de la copie de recherche différée jusqu'au paiement de la taxe de recherche

2. Dessins :

☐ reçus :☐ non reçus :

Réservé au Bureau international

Date de réception de l'exemplaire original par le Bureau international :

(13)

TRAITÉ DE BUDAPEST SUR LA RECONNAISSANCE
INTERNATIONALE DU DÉPÔT DES MICRO-ORGANISMES
AUX FINS DE LA PROCÉDURE EN MATIÈRE DE BREVETS

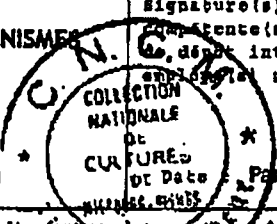
FORMULE INTERNATIONALE

DESTINATAIRE :

1. INSTITUT PASTEUR
Service des Brevets et Inventions
25-28, rue du Docteur Roux
75724 Paris Cedex 15

2. INSTITUT PASTEUR DE TUNIS
13, place Pasteur
1002 TUNIS BELVEDERE - TUNISIE
NOM ET ADRESSE
DU DÉPOSANT

RECEVOIR EN CAS DE DÉPÔT INITIAL,
délivré en vertu de la règle 7.1 par
l'AUTORITÉ DE DÉPÔT INTERNATIONALE
identifiée au bas de cette page

I. IDENTIFICATION DU MICRO-ORGANISME	
Référence d'identification donnée par le DÉPOSANT : PET-NH2B	Numéro d'ordre attribué par l'AUTORITÉ DE DÉPÔT INTERNATIONALE : CNCM I-3363
II. DESCRIPTION SCIENTIFIQUE ET/OU DÉSIGNATION TAXONOMIQUE PROPOSÉE	
Le micro-organisme identifié sous chiffre I était accompagné :	
☒ d'une description scientifique	
☒ d'une désignation taxonomique proposée	
(Cocher ce qui convient)	
III. RÉCEPTION ET ACCEPTATION	
La présente autorité de dépôt internationale accepte le micro-organisme identifié sous chiffre I, qu'elle a reçu le 24 février 2005 (date du dépôt initial) 1	
IV. RÉCEPTION D'UNE REQUÊTE EN CONVERSION	
La présente autorité de dépôt internationale a reçu le micro-organisme identifié sous chiffre I le (date du dépôt initial) et a reçu une requête en conversion du dépôt initial en dépôt conforme au Traité de Budapest le (date de réception de la requête en conversion)	
V. AUTORITÉ DE DÉPÔT INTERNATIONALE	
Nom : COLLECTION NATIONALE DE CULTURES DE MICROORGANISMES (CNCM) Adresse : Institut Pasteur 25, rue du Docteur Roux F-75724 Paris Cedex 15 (France)	Signature(s) de la (des) personne(s) présente(s) pour représenter l'autorité de dépôt internationale ou de la (des) représentant(s) autorisé(s) : Georges Wagener  Paris, le 02 mai 2005

1 En cas d'application de la règle 6.4.d), cette date est la date à laquelle le statut d'autorité de dépôt internationale a été reconnu.

154

RECEVEUR DE BREVETS DE MARQUE ET DE PATENTES
INSTRUMENTS DE DÉPÔT DES BREVETS DE MARQUE
DES PATENTES DE LA RÉPUBLIQUE DE TUNISIE

FORMULAIRE DE DÉPÔT

RECEVUE
Madame Danielle BERNEMAN
Service des Brevets et Inventions
INSTITUT PASTEUR
25-28, rue du Docteur Roux
75724 PARIS Cedex 15
NOM ET ADRESSE DE LA PERSONNE
A QUI LE BREVET EST DÉPOSÉ
NOM ET ADRESSE DE LA PERSONNE
A QUI LE BREVET EST DÉPOSÉ

RECEVUE DE BREVETS DE MARQUE
NOM ET ADRESSE DE LA PERSONNE
A QUI LE BREVET EST DÉPOSÉ
NOM ET ADRESSE DE LA PERSONNE
A QUI LE BREVET EST DÉPOSÉ

1. DÉPOSANT		2. DÉPOSITAIRE DU BREVET DÉPOSÉ	
NOM :	1. INSTITUT PASTEUR 2. INSTITUT PASTEUR DE TUNIS	NOM ET ADRESSE DE LA PERSONNE A QUI LE BREVET EST DÉPOSÉ	
ADRESSE :	1. Service des Brevets et Inventions 25-28, rue du Docteur Roux 75724 Paris Cedex 15 2. 13, place Pasteur 1002 TUNIS BELVEDERE - TUNISIE	CNCM I-3363 NOM ET ADRESSE DE LA PERSONNE A QUI LE BREVET EST DÉPOSÉ	
3. DATE DE DÉPÔT 21 mars 2005			
4. NOMBRE DE COPIES X 1000 exemplaires 1000 exemplaires plus 1000			

- 1. Indiquer la date de dépôt initial ou si un nouveau dépôt ou un transfert ont été effectués, la plus récente des dates précédentes (date du nouveau dépôt ou date du transfert).
- 2. Dans les cas où il y a eu un dépôt ou un transfert, indiquer la date du dépôt ou du transfert le plus récent.
- 3. Rappeler la date qui conviendrait.

155

1. COLLECTION NATIONALE DE CULTURES DE MICROORGANISMES (CNCM)

2. AUTORITE DE DROIT INTERNATIONAL

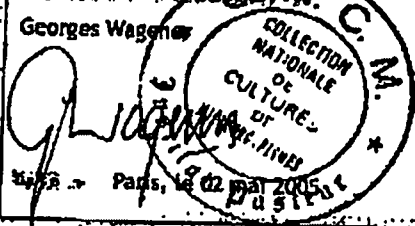
3. Nom :

**COLLECTION NATIONALE
DE CULTURES DE MICROORGANISMES (CNCM)**

Adresse :

Institut Pasteur
25, rue du Docteur Roux
F-75724 Paris Cedex 15 (France)

Signature et date de l'acte de dépôt
Le 12 mai 2005
Georges Wagnon



4. Remarque et cette information a été demandée par le Président du comité d'experts
Révisé,

136

TRAITE DE BUDAPEST SUR LA RECONNAISSANCE
INTERNATIONALE DU DEPOT DES MICRO-ORGANISMES
AUX FINS DE LA PROCEDURE EN MATIERE DE BREVETS

FORMULE INTERNATIONALE

DESTINATAIRE :

1. INSTITUT PASTEUR
Service des Brevets et inventions
25-28, rue du Docteur Roux
75724 Paris Cedex 15

RECEPISSE EN CAS DE DEPOT INITIAL,
délivré en vertu de la règle 7.1 par
l'AUTORITE DE DEPOT INTERNATIONALE
identifiée au bas de cette page

2. INSTITUT PASTEUR DE TUNIS
13, place Pasteur
1002 TUNIS BELVEDERE - TUNISIE
NOM ET ADRESSE
DU DEPOSANT

I. IDENTIFICATION DU MICRO-ORGANISME

Référence
d'identification donnée par le
DEPOSANT :

PET-H2B

Numéro d'ordre attribué par
l'AUTORITE DE DEPOT INTERNATIONALE :

CNCM I-3361

II. DESCRIPTION SCIENTIFIQUE ET/OU DESIGNATION TAXONOMIQUE PROPOSEE

Le micro-organisme identifié sous chiffre I était accompagné :



d'une description scientifique



d'une désignation taxonomique proposée

(Cocher ce qui convient)

III. RECEPTION ET ACCEPTATION

La présente autorité de dépôt internationale accepte le micro-organisme identifié sous chiffre I,
qu'elle a reçu le 24 février 2005 (date du dépôt initial) 1

IV. RECEPTION D'UNE REQUETE EN CONVERSION

La présente autorité de dépôt internationale a reçu le micro-organisme identifié sous
chiffre I le (date du dépôt initial)
et a reçu une requête en conversion du dépôt initial en dépôt conforme au Traité de
Budapest le (date de réception de la requête en conversion)

V. AUTORITE DE DEPOT INTERNATIONALE

Nom : COLLECTION NATIONALE
DE CULTURES DE MICROORGANISMES
(CNCM)

Adresse : Institut Pasteur
25, rue du Docteur Roux
F-75724 Paris Cedex 15 (France)

Signature(s) de la (des) personne(s)
compétente(s) pour représenter l'autorité
de dépôt internationale ou de la (des)
employé(s) autorisé(s) :

Georges Wagener

Paris, le 02 mai 2005

1 En cas d'application de la règle 6.1.1, la date à laquelle le statut
d'autorité de dépôt internationale a été accordé.

177

PROCEDE DE DEPOSIT

PROCEDE DE DEPOSIT

RECEVUE

Madame Danielle BERNEMAN
Service des Brevets et Inventions

INSTITUT PASTEUR
25-28, rue du Docteur Roux
75724 PARIS Cedex 15

BOURSE DE RECHERCHE DE LA SANTE
A CASERELLE DE L'INSTITUT PASTEUR
L'INSTITUT PASTEUR

RECEVUE DE LA SANTE
RECEVUE DE LA SANTE
RECEVUE DE LA SANTE
RECEVUE DE LA SANTE

1. OBJET		II. IDENTIFICATION DU MICRO-ORGANISME	
Nom : 1. INSTITUT PASTEUR 2. INSTITUT PASTEUR DE TUNIS		Nom du centre attribué par l'Autorité de Santé CNCM I-3361 Date de dépôt du micro-organisme : 24 février 2005	
Adresse : 1. Service des Brevets et Inventions 25-28, rue du Docteur Roux 75724 Paris Cedex 15 2. 13, place Pasteur 1002 TUNIS BELVEDERE - TUNISIE			
III. DATE DE DEPOSIT			
La date de dépôt du micro-organisme est indiquée sur la carte d'identité le 21 mars 2005			
y - A titre de la micro-organisme			
☒ N° de dépôt			
☐ N° de dépôt			

1. Indiquer la date du dépôt, l'endroit où, et les personnes mises en contact avec le micro-organisme, les plus récentes des dates pertinentes (date du dernier dépôt au sein du transport).
2. Dans les cas où il y a eu un transfert, mentionner la source de l'organisme.
3. Déposer la carte qui accompagne

118

1. Compléter dans l'espace ci-dessous le contenu de la notice de la souche.

2. RENSEIGNEMENTS DE DROIT INTERNATIONAL

Nom :

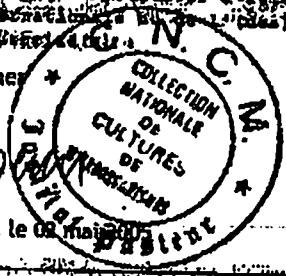
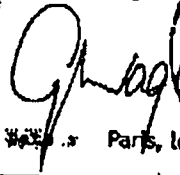
COLLECTION NATIONALE
DE CULTURES DE MICROORGANISMES (CNCM)

Adresse :

Institut Pasteur
25, rue du Docteur Roux
F-75724 Paris Cedex 15 (France)

Signature(s) de la souche déposée :
complémentaire pour l'identification
de droit international (si applicable)
N° de la souche : 118

Georges Wagener



Paris, le 02 mai 1970

3. Compléter et cette information a été soumise et si les résultats du contrôle sont négatifs.

159

TRAITE DE BUDAPEST SUR LA RECONNAISSANCE
INTERNATIONALE DU DEPOSIT DES MICRO-ORGANISMES
AUX FINS DE LA PROCEDURE EN MATIERE DE BREVETS

FORMULE INTERNATIONALE

DESTINATAIRE :

1. INSTITUT PASTEUR
Service des Brevets et Inventions
25-28, rue du Docteur Roux
75724 Paris Cedex 15

2. INSTITUT PASTEUR DE TUNIS
13, place Pasteur
1002 TUNIS BELVEDERE - TUNISIE
NOM ET ADRESSE
DU DEPOSANT

RECEPISSE EN CAS DE DEPOSIT INITIAL,
délivré en vertu de la règle 7.1 par
l'AUTORITE DE DEPOSIT INTERNATIONALE
identifiée au bas de cette page

I. IDENTIFICATION DU MICRO-ORGANISME

Référence
d'identification donnée par le
DEPOSANT :

PET-CH2B

Numéro d'ordre attribué par
l'AUTORITE DE DEPOSIT INTERNATIONALE :

CNCM I-3362

II. DESCRIPTION SCIENTIFIQUE ET/OU DESIGNATION TAXONOMIQUE PROPOSEE

Le micro-organisme identifié sous chiffre I était accompagné :

- ☒ d'une description scientifique
☒ d'une désignation taxonomique proposée

(Cocher ce qui convient)

III. RECEPTION ET ACCEPTATION

La présente autorité de dépôt internationale accepte le micro-organisme identifié sous chiffre I,
qu'elle a reçu le 24 février 2005 (date du dépôt initial) 1

IV. RECEPTION D'UNE REQUETE EN CONVERSION

La présente autorité de dépôt internationale a reçu le micro-organisme identifié sous
chiffre I le (date du dépôt initial)
et a reçu une requête en conversion du dépôt initial en dépôt conforme au Traité de
Budapest le (date de réception de la requête en conversion)

V. AUTORITE DE DEPOSIT INTERNATIONALE

NOM :
COLLECTION NATIONALE
DE CULTURES DE MICROORGANISMES
(CNCM)

Adresse : Institut Pasteur
25, rue du Docteur Roux
F-75724 Paris Cedex 15 (France)

Signature(s) de la (des) personne(s)
constituée(s) pour représenter l'autorité
de dépôt internationale ou de la (des)
autorité(s) :

Georges Wagener

COLLECTION NATIONALE
DE
CULTURES
DE
MICROORGANISMES

Paris, le 02 mai 2005

1 En cas d'application de la règle 6.4.d), cette date est la date à laquelle le statut
d'autorité de dépôt internationale a été acquis.

160

DISCONTINUITY

1. 1950年10月1日，中华人民共和国成立，标志着中国历史进入了一个新的纪元。这一天，中国人民在经历了长期的苦难和斗争后，终于迎来了民族独立和国家统一。2. 1950年10月1日，中华人民共和国成立，标志着中国历史进入了一个新的纪元。这一天，中国人民在经历了长期的苦难和斗争后，终于迎来了民族独立和国家统一。3. 1950年10月1日，中华人民共和国成立，标志着中国历史进入了一个新的纪元。这一天，中国人民在经历了长期的苦难和斗争后，终于迎来了民族独立和国家统一。4. 1950年10月1日，中华人民共和国成立，标志着中国历史进入了一个新的纪元。这一天，中国人民在经历了长期的苦难和斗争后，终于迎来了民族独立和国家统一。5. 1950年10月1日，中华人民共和国成立，标志着中国历史进入了一个新的纪元。这一天，中国人民在经历了长期的苦难和斗争后，终于迎来了民族独立和国家统一。6. 1950年10月1日，中华人民共和国成立，标志着中国历史进入了一个新的纪元。这一天，中国人民在经历了长期的苦难和斗争后，终于迎来了民族独立和国家统一。7. 1950年10月1日，中华人民共和国成立，标志着中国历史进入了一个新的纪元。这一天，中国人民在经历了长期的苦难和斗争后，终于迎来了民族独立和国家统一。8. 1950年10月1日，中华人民共和国成立，标志着中国历史进入了一个新的纪元。这一天，中国人民在经历了长期的苦难和斗争后，终于迎来了民族独立和国家统一。9. 1950年10月1日，中华人民共和国成立，标志着中国历史进入了一个新的纪元。这一天，中国人民在经历了长期的苦难和斗争后，终于迎来了民族独立和国家统一。10. 1950年10月1日，中华人民共和国成立，标志着中国历史进入了一个新的纪元。这一天，中国人民在经历了长期的苦难和斗争后，终于迎来了民族独立和国家统一。

WOMAN, 35, MARRIED, PR. LA. - EXHIBIT
IN INVESTIGATION OF PERSECUTION OF
FUGITIVE, 1941

[illegible]

101

1. **IDENTIFICATION DE L'ESPECE**

2. **PROVENANCE**

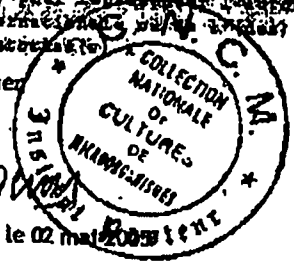
**COLLECTION NATIONALE
DE CULTURES DE MICROORGANISMES (CNCM)**

Institut Pasteur
25, rue du Docteur Roux
F-75724 Paris Cedex 15 (France)

Signature de la personne responsable
de la culture de l'organisme
de la souche internationale
de la souche nationale

Georges Wagener

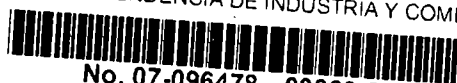
Georges Wagener



Paris, le 02 mai 1981

3. **REMARQUES**

Formule de demande de souche



No. 07-096478- -00000-0000

Fecha: 2007-09-18 16:30:17 Dep. 2020 NUECREACION
Tra. 11 PATENTE IYII Eve. 378 FASE NACIONAL I
Act. 411 PRESENTACION Folios: 101



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

REQUISITOS MINIMOS PARA ADMISION A TRAMITE

PCT

PATENTE DE INVENCION

☒

MODELO DE UTILIDAD ☐

- ◆ Indicación de que se solicita la concesión de una patente ☒
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud ☒
- ◆ Descripción de la invención ☒
- ◆ Dibujos de ser estos pertinentes ☒
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas ☒

COMPLETA ☒

INCOMPLETA ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial ☐
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud ☐
- ◆ Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del material que incorpora el diseño ☐
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas ☐

COMPLETA ☐

INCOMPLETA ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de un Esquema de Trazado ☐
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud ☐
- ◆ Representación gráfica del esquema trazado ☐
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas ☐

COMPLETA ☐

INCOMPLETA ☐

Claudio M. Neiva C.

Firma Responsable

Fecha 18 SET. 2007

Carrera 13 No. 27-00 Piso 5, 7 y 10
Conmutador: 3 82 08 40
Fax: 350 52 20
E-mail: Info@sic.gov.co
www.sic.gov.co
Bogotá, D.C., Colombia