

CAVELIER

ABOGADOS

www.cavelier.com
cavelier@cavelier.com

EDIFICIO SISKI
CARRERA 4 No. 72 - 35
BOGOTÁ 8, COLOMBIA

Teléfono: (57-1) 347 3611
Telefax: (57-1) 211 8650
(57-1) 700 4814
Fax in U.S.A.: (1-305) 675 7743

Señor Director
DIRECCION DE NUEVAS CREACIONES
Superintendencia de Industria y Comercio
E. S. D.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-017840- -00009-0000

Fecha: 2012-12-03 16:34:14
Tra. 11 PATENTEIYII
Act. 523 RESPUESTA

Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Eve: 378 FASENACIONALI
Folios: 40

Trámite : 011
Evento : 378
Actuación : 444

Referencia : Expediente No. **09.017.840**
Asunto : Solicitud de patente para: **VACUNA RECOMBINANTE PARA LEISHMANIASIS QUE COMPRENDE UNA PROTEÍNA RECOMBINANTE A2 DE FORMAS AMASTIGOTE**
Solicitante : UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Fecha de solicitud : 23 de Febrero de 2009

1. Yo, Luz Clemencia DE PÁEZ, en mi condición de apoderada de la sociedad solicitante de la patente de la referencia, me refiero al oficio No. **13059** notificado por fijación en lista el 27 de Julio de 2012.

2. Mediante memorial del 22 de Octubre de 2012 se solicitó oportunamente plazo para responder la acción oficial.

3. Mediante oficio No. **13059** se puso en conocimiento del solicitante el informe que contiene las observaciones hechas por su Despacho sobre la presente solicitud de patente. Las observaciones realizadas en el oficio se refieren a la presencia de excepciones de claridad, a la amplitud del título, a la claridad del pliego reivindicatorio, a la claridad del capítulo descriptivo y a la novedad de las reivindicaciones 1 a 6 en vista de los documentos **D1 a D5**.

3. Respuesta a las objeciones

De este modo y con el objeto de atender las objeciones arriba mencionadas, se desea presentar las siguientes modificaciones, aclaraciones y argumentos:

3.1 Modificación de una solicitud en trámite

De acuerdo con el artículo 34 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, donde se establece que la modificación de una solicitud es posible en cualquier momento del trámite mientras no implique una ampliación de la solicitud inicial, me permito presentar un nuevo pliego reivindicatorio conformado por 6 reivindicaciones, junto con un nuevo capítulo descriptivo y un nuevo juego de figuras.

De esta forma, y de acuerdo a la objeción hecha por el señor examinador, se solicita el cambio de título de la presente solicitud de patente a: **"VACUNA RECOMBINANTE PARA LEISHMANIASIS QUE COMPRENDE UNA PROTEÍNA RECOMBINANTE A2 DE FORMAS AMASTIGOTE"**

3.2 Excepciones de patentabilidad

Se han eliminado las reivindicaciones 7 a 11 siguiendo las sugerencias del Examinador.

3.3 Argumentos a favor de la claridad del pliego reivindicatorio

La nueva reivindicación 1 corresponde a una delimitación de la materia anteriormente reclamada, en donde se define correcta, clara e inequívocamente la materia que se desea proteger. Puede notarse que dicha reivindicación no comprende términos generales, resultados a alcanzar ni definiciones inadecuadas.

3.4 Argumentos a favor de la claridad del capítulo descriptivo

Se ha especificado en la descripción que la solución salina tamponada corresponde a un tampón químico, que es un término ampliamente utilizado en el campo de la técnica y que es sinónimo de tampón, *buffer*, solución amortiguadora o solución reguladora. Adicionalmente, se han reemplazado las palabras "Imagen" y "Fotografía" por "Figura", con el fin de referirse inequívocamente a las figuras presentadas en la solicitud.

A pesar que la descripción de las figuras 1 y 2 especificaba "asociada o no con el (...) rIL-13" (subraya fuera del texto), se ha eliminado dicho término de la descripción para evitar confusiones.

Se han corregido las figuras 3, 6 y 13, de tal forma que definen cada una de las barras mediante palabras pertenecientes al idioma Castellano.

3.5 Argumentos a favor de la novedad de la invención

La nueva reivindicación 1 corresponde a una considerable limitación de la materia anteriormente reclamada. Puede notarse que la invención, tal y como se define en la nueva reivindicación 1, con todas sus características técnicas, no se encuentra divulgada en ninguno de los documentos citados como estado de la técnica.

De acuerdo con lo anterior, la nueva reivindicación independiente 1 es novedosa sobre el estado de la técnica. Como consecuencia de lo anterior, las reivindicaciones dependientes 2 a 6 son también novedosas en virtud de su dependencia.

De acuerdo a todos los argumentos presentados, la presente solicitud cumple a cabalidad con los requerimientos exigidos en la Decisión 486 y las objeciones formuladas por el Examinador se ven superadas.

4. Puesto que se ha dado respuesta a todas las objeciones formuladas por el Examinador, se solicita atentamente proceder al otorgamiento de la solicitud de patente. En este sentido, respetuosamente recordamos al Examinador que la patente no podrá ser negada con base en

objeciones diferentes a las expuestas en la acción oficial No. 13059, toda vez que al no haber sido trasladadas a mi representada, dicha decisión violaría tanto el tenor literal del artículo 45 de la Decisión 486 como el derecho constitucional al debido proceso. En este evento, y con base en el inciso 2 del artículo 45, respetuosamente solicitamos al Examinador expedir una nueva acción oficial que permita a mi representada contra argumentar las mismas o modificar la solicitud con el fin de cumplir los requisitos de patentabilidad. Adicionalmente, se desea mencionar que en el caso de que el señor examinador considere que una reivindicación, dependiente de una reivindicación independiente patentable, no es patentable, éste deberá conceder la reivindicación independiente y estará en libertad de negar la reivindicación dependiente no patentable.

5. Anexos

- Nuevo pliego reivindicatorio conformado por 6 reivindicaciones
- Nuevo capítulo descriptivo.
- Nuevo juego de figuras
- Formulario de modificaciones en solicitud pendiente

Señor Director,


LUZ CLEMENCIA DE PAEZ

C.C. 35.456.344 de Usaquén

T.P.A. No. 23.555

COLO-16936-0841-001-8
SML\SML\ID-231607\WPC16936
No. M-2012-231607\SML

5

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	Espacio reservado para el adhesivo de radicación
---	--

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES
MODIFICACIONES Y/O CORRECCIONES

1. Identificación del Trámite	
☐ Error material	☒ Modificación a una Solicitud en trámite
☒ Patente de Invención	
☐ Patente de Modelo de Utilidad	
☐ Registro de Diseño Industrial	
☐ Esquema de Trazado de Circuitos Integrados	

2. Datos del solicitante			
Persona Natural ☐	Persona Jurídica ☒		
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS			
Nombre o denominación / Nombre o razón social completa			
Nombre representante legal			
Tipo de empresa	Micro ☐ Pequeña ☐ Mediana ☐ Otra ☐		
Documento de identificación:	☐ C.C. ☐ C.E. ☐ NIT ☐ Otro Número _____		
Nacionalidad/País de constitución	Dirección y domicilio del titular	Ciudad	
Brasil	Avenida Antônio Carlos, 6627 Reitoria 7º andar Sala 7005, Minas Gerais, 31270-901,	Belo Horizonte	
Dirección electrónica		No. Fax	Número telefónico
clientes@cavelier.com		2 11 86 50	3 47 36 11

☐ Autorizo expresamente a la Superintendencia de Industria y Comercio para que todas las comunicaciones sean enviadas a través de la dirección de correo electrónico

3. Datos del apoderado:		
Apellidos y Nombre	Documento de identificación	Tarjeta profesional
De Páez Luz Clemencia	C.C. 35.456.344	T.P.A. 23.555
Dirección y domicilio		Ciudad
Carrera 4ª No. 72 –35		Bogotá
Dirección electrónica	No. Fax	Número telefónico
cavelier@cavelier.com	2 11 86 50	3 47 36 11
En caso de haber presentado poder general para asuntos que se adelanten ante la Delegatura de Propiedad Industrial, sírvase indicar el número de su radicación o protocolo de poder general		

4. Datos del trámite

Corrección:

Expediente No 09.017.840

Aparece

Debe ser

Modificación:

- ☒ **Modificación al capítulo reivindicatorio.**
Presento nuevo capítulo reivindicatorio compuesto por 6 reivindicaciones y pido respetuosamente que el examen de patentabilidad sea realizado sobre estas nuevas reivindicaciones presentadas.
Respetuosamente manifiesto que a pesar de eliminar materia del pliego reivindicatorio originalmente presentado, mi representada no renuncia a la protección que pueda obtener sobre dicha materia y se reserva el derecho de presentar una solicitud divisional que la contenga durante el trámite de la presente solicitud, beneficiándose de la fecha de prioridad inicialmente reivindicada.
- ☒ **Modificación al capítulo descriptivo.**
Presento nuevo capítulo descriptivo , el cual solicito que sea tenido en cuenta al realizar del examen de patentabilidad
- ☐ **Modificación al resumen.**
- ☒ **Modificación a los dibujos.**
Presento nuevo juego de 13 figuras.
- ☒ **Modificación del Título.**
Solicito respetuosamente a su despacho tener en cuenta que el nuevo título de esta solicitud de patente ha quedado como sigue: **"VACUNA RECOMBINANTE PARA LEISHMANIASIS QUE COMPRENDE UNA PROTEÍNA RECOMBINANTE A2 DE FORMAS AMASTIGOTE"**

5. Anexos

- ☐ Poder, si fuere el caso.
- ☒ Documento que contiene las modificaciones o correcciones.
- ☐ Copia de la solicitud y sus anexos en formato magnético.

6. Firma	
Nombre y apellidos	Firma
LUZ CLEMENCIA DE PAEZ	
C.C. 35.456.344 DE Usaquén	Tarjeta Profesional 23.555

S

SML\NCA\WPC16936\ID-231722

**VACUNA RECOMBINANTE PARA LEISHMANIASIS QUE COMPRENDE UNA
PROTEÍNA RECOMBINANTE A2 DE FORMAS AMASTIGOTE**

La presente invención se refiere a la vacuna recombinante contra leishmaniasis visceral canina que contiene la proteína A2 recombinante y saponina, como un adyuvante, que permite la distinción entre animales vacunados e infectados a través de las pruebas convencionales ELISA o de inmuno-fluorescencia que emplea antígenos de las formas promastigota de *Leishmania*.

La leishmaniasis constituye un grupo de enfermedades parasitarias que se presentan clínicamente como heridas cutáneas o mucocutáneas, o en la forma de una infección visceral. Ellas ocurren debido a la infección por una variedad de especies de protozoarios que pertenecen al género *Leishmania* (Organización Mundial de la Salud. Programa para la vigilancia y control de la leishmaniasis. <http://who.int/emc/diseases/leish/index.html>.2005). Las leishmaniasis son endémicas en aproximadamente ochenta y ocho países. De estos, setenta y dos son países en desarrollo, y en este grupo se incluyen trece de los países con la tasa de desarrollo más baja del mundo. La forma visceral ocurre debido a infecciones causadas por las especies *Leishmania* (*Leishmania*) *donovani* y *L. (L.) infantum* en países de Europa, Asia, África y el Medio Este, y debido a la especie *L. (L.) chagasi* en países de Latino América (DESJEUX, P. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis*: 27, 2004). Las alteraciones en las funciones del bazo, el hígado, y la médula ósea se observan en pacientes infectados, y la infección se vuelve crónica, originando fiebre irregular de larga duración, hepatoesplenomegalia, inmunodeficiencia, anemia, leucopenia, edema, desfallecimiento progresivo y pérdida de peso, y posiblemente causando la muerte si no se administra tratamiento. Los individuos infectados también pueden permanecer asintomáticos, aunque el 20% de los individuos en regiones endémicas desarrollan la forma clásica de la enfermedad. Los síntomas son progresivos, y las complicaciones que se derivan de la evolución de la infección son responsables de la mayor parte de las muertes (SUNDAR, S. & RAI. M. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 9: 2002).

L. (L.) chagasi ha conseguido una vasta distribución geográfica en las Américas, encontrándose en Brasil, Argentina, Colombia, Bolivia, El Salvador, Guatemala, Honduras, México, Paraguay, y Venezuela. Las especies tales como los marsupiales y las zorrillas son reservorios silvestres bien conocidos del parásito. En ambientes domésticos, se considera que el perro es el principal reservorio en el ciclo de transmisión doméstica de la leishmaniasis visceral (VL), debido a la alta prevalencia de la infección canina comparada con la humana. Los perros infectados, aún aquellos asintomáticos, presentan una gran cantidad de parásitos en la piel, facilitando la infección del insecto vector

proveniente de este reservorio, y consecuentemente, la transmisión de la enfermedad a la gente (TESH, R. *Am. J. Med. Hyg.*: 52, 1995).

El tratamiento de la VL canina, cualquiera que sea la medicina utilizada, no es viable como una medida para el control de la enfermedad, por ser costosa. Más aún, los perros tratados y clínicamente curados muestran frecuentemente reaparición de la enfermedad, permaneciendo como fuentes de infección para el vector, y éste origina la opción de seleccionar líneas que son resistentes a tales medicinas, con serias implicaciones para el tratamiento humano (GRAMICCIA, M. & GRADONI, L. *int. J. Parasitol.* 35: 2005).

Este hecho, asociado al carácter letal del VL humano cuando no se trata, ha hecho que la Organización Mundial de la Salud (OMS) pretenda la eliminación de los perros cuando ellos sean seropositivos para los antígenos de *Leishmania*, como una medida para que las organizaciones de salud pública controlen la enfermedad. De esta manera, el Ministro de Salud del Brasil adoptó tal procedimiento. Por lo tanto, una de las acciones más utilizadas en el control del VL es la eliminación de perros infectados, que se detectan a través de diagnóstico serológico o por la presencia de síntomas clínicos. Sin embargo, tales procedimientos generan una tristeza profunda e indignación a sus propietarios, quienes, muchas veces prefieren olvidar la mención de la enfermedad a las organizaciones competentes hasta cuando los animales están cerca de su muerte, cuando ellos se convierten en transmisores importantes del parásito (TESH, R. *Am. J. Med. Hyg.*: 52, 1995).

La mayoría de las investigaciones o los desarrollos de vacunas se basan en la identificación de moléculas del parásito y en los protocolos de inmunización que pueden inducir respuesta inmune celular Th1, un requisito esencial para inducir la protección de la enfermedad. Entre los perros, la resistencia o la susceptibilidad a la enfermedad está, probablemente, también asociada a la dicotomía de la respuesta Th1/Th2. La resistencia se asocia a una respuesta linfoproliferativa específica alta y con una reacción de hipersensibilidad retrasada positiva (DHR), además de la baja cantidad de anticuerpos específicos del parásito. La resistencia a la infección y la protección entre los perros, estaría relacionada con una alta producción de interferón-gama (INF- γ) y de óxido nítrico (NO), y a la actividad leishmanicida de los macrófagos infectados con el parásito, lo que significa un perfil de respuesta inmune Th1. Los altos niveles de anticuerpos IgG1 estarían relacionados con la susceptibilidad, aunque niveles altos de IgG2a estarían asociados con la resistencia (Moreno, J. & Alvar, J. *Trends Parasitol.*: 18, 2002; Molano, I. et al., *Vet. Immunol. Parasitol.*: 92, 2003). Por lo tanto, en estudios que evalúan la efectividad de la vacuna contra la infección por *Leishmania*, se utilizan los anticuerpos

IFN- γ e IgG2 (perros) o IgG2a (ratones) como marcadores de la respuesta Th1 y marcadores inductores de resistencia. La interleucina-4, la interleucina-10 y los anticuerpos IgG2 (perros) o IgG2a (ratones), de otro lado, se utilizan como marcadores de susceptibilidad y respuesta Th2.

5

Las vacunas contra la Leishmaniasis canina son difíciles de desarrollar, y debido a esto son aún raras. Está disponible una vacuna canina, Leishmune®. Ésta utiliza como su principio de vacuna activa un complejo antigénico purificado, que incluye proteínas, que corresponden al Ligando Fucosa-Manosa (FML), presente en la superficie del parásito, de acuerdo con la solicitud de patente nacional No. PI 9302386-3 (composición que contiene fracciones de células de *Leishmania* denominadas antígeno fml, "ligando fucosa-manosa" o "conector fucosa-manosa", el uso del antígeno fml y sus subfracciones y componentes para aplicaciones en inmunodiagnóstico específico para leishmaniasis visceral humana y animal, para aplicaciones en vacunas y para el tratamiento o inmunoterapia contra leishmaniasis visceral humana y canina).

10

15

La principal característica del Leishmune® es la inducción de respuesta humoral. El perro vacunado desarrolla rápidamente una respuesta a través de la producción de anticuerpos específicos contra el parásito. Muchas pruebas, presentadas por el inventor y compañeros de la mencionada vacuna, muestran que la vacuna protege aproximadamente el 86% de los animales que la reciben cuando se coloca en áreas endémicas. Los resultados de estos estudios se cuestionaron por la comunidad científica, así como también por la industria, en razón a que el control de los animales vacunados se localizó en diferentes ciudades. Otra falla importante de la prueba mencionada fue la presencia de perros, en ambos grupos, que utilizaban collares impregnados con repelente para insectos. El parásito se transmite por la picadura de un insecto, y si se detiene el contacto con el insecto vector por el uso de collares repelentes el perro no se expone realmente a la provocación natural pretendida. Con base en los anteriores datos, el porcentaje de protección descrito es cuestionable. Por lo tanto, se han llevado a cabo otros estudios y algunos se han llevado a cabo por solicitud de la organización reguladora de salud pública.

20

25

30

Particularmente, en lo que corresponde a la salud pública, se conoce que de acuerdo con las reglamentaciones de la OMS los animales seropositivos se deben sacrificar. También se conoce que se adoptó esta medida en Brasil. Una vez que se ha recibido esta vacuna, el animal desarrollará una fuerte respuesta a través de anticuerpos específicos al parásito, volviéndose seropositivo. El diagnóstico manifestado por las organizaciones públicas es el serológico, debido a que éste es barato y fácilmente

35

11
ejecutable, capaz así de aplicarse en todas las regiones del país sin problemas adicionales. Los perros vacunados se deben sacrificar.

La no distinción, mediante los métodos tradicionales, de animales infectados de aquellos vacunados, crea simplemente un mayor problema de salud pública. Los propietarios de los animales vacunados muestran el carné de vacuna y no permiten que se sacrifique el animal. Teniendo en cuenta que por cada cien animales que recibieron la vacuna, aproximadamente catorce se infectaron, se conduce a un incremento en la cantidad de posibles reservorios de leishmaniasis doméstica. Otro tema importante es el relacionado con las inquietudes epidemiológicas hechas por el Ministerio de Salud, que son una forma importante de identificar la evolución de la enfermedad en diferentes regiones. Esta inquietud se basa parcialmente en los resultados serológicos de los perros. Con el advenimiento de la vacunación con Leishmune® los resultados obtenidos no son reales, porque los animales seropositivos pueden no estar infectados, sino simplemente vacunados. Es posible distinguir entre perros que sean seropositivos debido a la vacunación o debido a la infección mediante exámenes que detectan la presencia del parásito, tal como la Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR) o inmunocitoquímica. Sin embargo, para desarrollar estas pruebas, se requieren técnicas finas y un equipo y reactivos costosos, además de técnicos entrenados, con el fin de garantizar la precisión de los resultados. El PCR se hace en clínicas privadas; su uso en salud pública es difícil de implementar y de costos financieros elevados.

Además de esto, el Leishmune® tiene unos altos costos de producción, llegando al mercado a precios que hacen imposible el acceso a éste para toda la población. Se sabe que Brasil tiene una gran población de bajos ingresos, y estas personas no tienen acceso al producto mencionado. Como ésta es una enfermedad que se expande a sí misma en muchas regiones del país, es aún más importante adoptar medidas que impidan la continuidad de la transmisión del parásito, especialmente la infección de perros que viven en áreas domésticas o adjuntas. El posible uso de este producto en campañas de salud pública sería costoso, además de los problemas anteriormente mencionados. El Leishmune® presenta características inmunológicas interesantes, pero va en contra de las medidas de control adoptadas para las epidemias habituales, deteniendo el sacrificio de los perros seropositivos, interfiriendo en las inquietudes epidemiológicas y también siendo de alto costo para el uso en salud pública.

Se ha identificado el antígeno A2, inicialmente, en la especie, *L. (L.) donovani*, por Charest & Matlashewsky (*Mol. Cell. Biol.*: 14, 1994), por una colección de formas amastigotas del cADN de *L. (L.) donovani*. Se agrupan copias múltiples del gen A2 en el cromosoma 22 de *L. (L.) donovani* (850 kb). Estos genes se mantienen en las especies *L.*

(*L. donovani*, *L. (L.) infantum*, *L. (L.) chagasi*, *L. (L.) amazonensis* y *L. (L.) mexicana* (Ghedini et al., *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*: 4, 1997).

En búsquedas previamente realizadas a través de los bancos de patentes, se encontraron solicitudes de patentes relacionadas con el uso del antígeno A2 como un reactivo para la vacunación contra leishmaniasis, como se describe adelante. El número de patente US5733778 establece la secuencia de nucleótido del gen A2 y reivindica la protección de su expresión en anfitriones microbianos. La secuencia del gen A2 de la cadena del *L. (L.) donovani* VL9 se depositó en el Genebank, como se describe adelante:

LOCUS	S69693	mARN lineal 2817 bp	INV 26-MAR-2002
ACCESO	S69693		
VERSIÓN	S69693.1	GI:546453	
ORGANISMO	<u>Leishmania (donovani) infantum</u> Eucaryota; Euglenozoa; Kinetoplastida; Trypanosomatidae; Leishmania.		
OBSERVACIÓN	El grupo del GenBank en la Biblioteca Nacional de Medicina creó éste		
CARACTERÍSTICAS	Localización/Calificadores		
fuelle	1..2817	/organism= "Leishmania donovani infantum" /mol_type= "mRNA" /strain= "Ethiopian LV9" /sub_species= "infantum" /db_xref= "taxon:5662" /dev_stage= "amastigote"	
gen	1..2817	/gene= "A2"	
CDS	72..782	/gene= "A2" /note= "Plasmodium falciparum S antigen homolog; This sequence comes from Fig. 5A" /codon_start=1 /product= "stage-specific S antigen homolog" /protein_id= " <u>AAB30592.1</u> " /db_xref= "GI:546454"	

ORIGEN

1 gagctcccc agcgaccctc tcggcaacgc gagcgcccca gtccccccac gcacaacttt

61 gaccgagcac aatgaagatc cgcagcgtgc gtccgcttgt ggtgttgcgtg gtgtgcgtcg
 121 cggcgggtgct cgcactcagc gcctccgctg agccgcacaa ggcggccggt gacgtcggcc
 181 cgctctccgt tggcccgag tccgtcggcc cgctctctgt tggcccgag gctgttggcc
 241 cgctctccgt tggcccgag tccgtcggcc cgctctctgt tggcccgag gctgttggcc
 301 cgctctctgt tggcccgag tccgttggcc cgctctccgt tggcccgctc tccgttggcc
 361 cgcagtctgt tggcccgctc tccgttggct cgcagtccgt cggcccgctc tctgttggc
 421 cgcagtccgt cggcccgctc tccgttggcc cgcaggctgt tggcccgctc tccgttggcc
 481 cgcagtccgt cggcccgctc tctgttggcc cgcaggctgt tggcccgctc tctgttggcc
 541 cgcagtccgt tggcccgctc tccgttggcc cgcagtctgt tggcccgctc tccgttggcc
 601 cgcagtccgt cggcccgctc tctgttggc cgcagtccgt cggcccgctc tccgttggcc
 661 cgcagtctgt cggcccgctc tccgttggcc cgcagtccgt cggcccgctc tccgttggc
 721 cgcagtccgt tggcccgctc tccgttggcc cgcagtccgt tgacgtttct ccggtgtctt
 781 aaggctcggc gtccgcttc cgggtgtcgt aaagtatatg ccatgaggca tggtagcag
 841 gcaaaccttg tcagcaatgt ggcattatcg taccctgca agagcaacag cagagctgag
 901 tgttcagggtg gccacagcac cagctctctg tgacactccg tggggtgtgt gtgacctgg
 961 ctgctgttc caggcggatg aactgcgagg gccacagcag cgcaagtgc gctccaacc
 1021 ttgcgacttt cagccacag acgcatagca gcgcctgcc tgcgcggcg catgcgggca
 1081 agccatctag atgcgcctct ccacgacatg gccggaggcg gcagatgaag gcagcgaccc
 1141 cttttcccg gccacgacgc cgcgtgagg cgggccccac agcgcagaac tgcgagcgcg
 1201 gtgcgcgggc gctgtgacgc acagccggca cgcagcgtac cgcacgcaga cagtgcattg
 1261 ggaggccgga ggagcaagag cggtagcgg gaacggcgcg aagcatgcgg cacgccctcg
 1321 atgtgcctgt gtgggtgat gaggcgcgga tgccggaagc gtggcgaggg catcccagat
 1381 tgcaccgtcg agtctccag gccgaatgt ggcgagcctg cggggagcag attatggat
 1441 gcggctgctc gaagcgaccg agggcgctga ccggaagggt gccacttcc tctcgggccc
 1501 tgtgcggcat ccgccctga tgggagccc gaatggtggc cgcgcgggtg aaggcgtgc
 1561 gccacccgc gtctccgtgt ggcgcgctg ggggcagggt cgctgtggct gtgtatgtc
 1621 gctgatgtc tgactgttc gtgtgggct atgggcacgg tgaggggcca cgttggccct
 1681 tctgacttc ctctgcttc ttattattct cagtgcctcc gctggattgg gctgcattcg
 1741 cggctgtat cgcgttgtc tctctattt gacggctgcg cgctcccg cctccact
 1801 cgtgctgtg gatggaggca cggccgggt ctgtgtgtg tgcaccgct gcaagaattc
 1861 agatgaggga ctccgagcg agcagacaaa gcagcagcag caacaggaag gcaggcctga
 1921 gcacgtttc tttctctct tgagactgcg gactacggga atcagagacg tcgtcagaga
 1981 cgcgcatccg caccgcgcg ctatgcttc tcttctctc tccgcccc tctgtgcg
 2041 ctgcctgtct gcgtgcgcg agcgcggtg cggcggtct ctctccctc cttcgttc
 2101 tctctgcaa gcgttctt ttacagcc gaacgttct gctgcctgg aggcgttc
 2161 cctcttct atctctgcat ttattttac acgtgcttt gcttggctt cctgacgatg
 2221 ccggccacct caccgcggtg tcagggccca gcgccactc ttgtgggca ggccaagtag
 2281 cctgcagcct gccatgagc acggctgtg actcttggt ccagcggaca ggtgtgggt
 2341 ggcgctgtc cggtagacc aacggtcatg atgacgctg gaccagctca ctgcggatca

2401 tgccgacgat tcaacgaatg cgcgcatcca cctactgcct ttctgccttt gctgcgctgc
 2461 ggtggtgctg agcgtggtcc cggggcctag cctgcgctgt acgcagcggc attgcggtgg
 2521 gctgagcggc gccaggcggg gctggccggc cctgctgctt ggcatagccg tggcgtgcag
 2581 cagatgcgga tgggctgtgg ctgcgcatgc gtgtgtcgt tgactgttc gtggtggcg
 2641 ggcacgtaaa cggcaaaatg cgctttggcg ttccggcgcc acgctccggc gctggtgcgg
 2701 tattcgaata cgcgctgaa gaggtggcga ggaaaatggc acgaggcgca gagggaaaaa
 2761 acgaaaagtg caaagtgcgc aaaccgcgca gaaaatgcgg gaaaaacgaa aagtgcg

Las solicitudes de patente US570591, WO9506729, EP0716697 y
 MXPA03008832 reportan la secuencia de aminoácidos de la proteína A2. El A2 está
 compuesto de una secuencia de diez aminoácidos, repetida de cuarenta a noventa veces,

dependiendo del gen de la "familia A2" que lo codifica (Charest & Matlashewski. *Mol. Cell.*
Biol.: 14, 1994; Zhang et al., *Mol. Bioch. Parasitol.*:78, 1996), como se muestra adelante:
 MKIRSVRPLVLLVCVA AVLALSASAEPHKA AVDVGPLSVGPQSVGPLSVGPQAVGPLSV
 GPQSVGPLSVGPQAVGPLSVGPQSVGPLSVGPQSVGPLSVGSGSVGPLSVGPQ
 SVGPLSVGPQAVGPLSVGPQSVGPLSVGPQAVGPLSVGPQSVGPLSVGPQSVGPLSVG
 SSVGPLSVGPQSVGPLSVGPQSVGPLSVGPQSVGPLSVGPQSVGPLSVGPQSVGVSP
 VS.

La solicitud de patente US5780591, que describe además la proteína nativa A3,
 es decir, describe cómo ésta se encuentra en el parásito, reivindica su posible uso como
 una vacuna o un antígeno de diagnóstico. La solicitud de patente US5733778 describe la
 secuencia de ADN del gen A2 y su expresión bacteriana. La solicitud de patente
 US6133017 describe la obtención de parásitos atenuados (*Leishmania donovani*)
 mediante la supresión del gen A2, así como también su utilización como vacunas
 atenuadas. Las patentes WO9506729, EP0716697 o MXPA03008832 se relacionan una
 con la otra y reivindican la utilización del antígeno A2 en la forma de una proteína
 recombinante, ADN o parásitos atenuados como una vacuna. En Brasil la solicitud de
 patente PI0208532 (número PCT CA0200437) se registró en el INPI (Instituto Nacional de
 la Propiedad Industrial), bajo el título genérico de "vacina contra leishmania" (vacuna
 contra leishmania), que describe la invención de una vacuna de ADN cuyo componente
 antigénico es el antígeno A2, y también describe el proceso para administrar esta vacuna
 de ADN que induce respuesta inmune a la infección de *Leishmania* en el anfitrión al cual
 se administra.

Las evidencias experimentales que soportan las solicitudes de protección para
 las vacunas anteriores, sin embargo, consisten esencialmente de dos estudios de
 vacunación (Ghosh et al. *Vaccine*: 19, 2001; Ghosh et al., *Vaccine*: 20, 2002). En estos
 estudios se evaluaron modelos experimentales (ratones), haciendo uso del antígeno A2

bajo la proteína recombinante asociada a *Cornybacterium parvum*, como un adyuvante, o en la forma de ADN con el plásmido pCDNA3/E6. De acuerdo con aquellos estudios, los animales inmunizados con el antígeno A2 y expuestos con *L. donovani* han presentado una reducción significativa de la carga parasitaria en el hígado y una alta producción de los anticuerpos INF- γ e IgG2a específicos para la proteína A2. Aún cuando la vacunación con el ADN A2 otorga protección, la protección fue más significativa cuando el ADN se asocia al plásmido pCDNA3/E6. Aunque necesaria para la validación de la eficacia de la formulación de vacuna, la etapa de evaluación en muchos modelos experimentales no se puede considerar concluyente, aún cuando ésta presenta resultados positivos.

El desarrollo de una vacuna que sea efectiva para proteger los perros y, consecuentemente, disminuir las posibilidades de transmisión a los humanos, sería de gran importancia para el control de la leishmaniasis. En Brasil, los Ministerios de Salud y Agricultura, de acuerdo con un edicto que está disponible para consulta pública (www.mapa.gov.br), manifiesta que esta vacuna, una vez aplicada a los perros, debe ser capaz de inducir una respuesta inmunológica efectiva para reducir el parasitismo en el tejido y la transmisión del parásito al insecto vector. Esto se puede verificar a través de xenodiagnóstico, reacción en cadena de polimerasa (PCR) o inmunoistoquímica. Además de esto, la vacuna debe permitir la distinción serológica entre perros vacunados e infectados aunque empleando métodos de laboratorio de bajo costo que estén disponibles para la red pública, no sobrecargando así el Sistema de Salud Pública. Por lo tanto, la adopción de una vacuna como una nueva medida de control no debe interferir con las medidas de control habituales.

La presente invención propone el empleo del antígeno A2 amastigoto específico en preparaciones de vacuna como una solución para estos aspectos relacionados con el desarrollo de una vacuna aplicable al contexto epidemiológico de la leishmaniasis, especialmente en Brasil. En razón a que éste es un antígeno específico de la forma amastigota de varias especies de *Leishmania*, los anticuerpos producidos por los perros en el proceso de vacunación con este antígeno no son reactivos a las pruebas de infección en diagnóstico serológico. Esto se debe al hecho de que en la rutina del laboratorio disponible a la red de salud pública brasileña estas pruebas utilizan antígenos basados en la forma promastigota del parásito, que es más barata de obtener.

Después de muchas evaluaciones y la verificación de la eficacia del antígeno A2 para inducir protección contra la infección causada por *L. chagasi* y *L. amazonensis*, se desarrollan las especies principales de *Leishmania* que originan VL en Brasil, y después de caracterizar la respuesta inmune inducida por el antígeno A2 en ratones, se describe adelante la formulación de vacuna, que se va a utilizar en perros. La capacidad de esta

formulación para inducir una respuesta inmune humoral y celular adecuada en perros se evaluó entonces considerando que ésta se debe adecuar al uso como una vacuna VL en el contexto epidemiológico de esta enfermedad en regiones donde el sacrificio de los animales seropositivos se adopta como una medida de control. Habitualmente, las pruebas de diagnóstico utilizadas por la red de salud pública no permiten la distinción serológica entre animales infectados y aquellos que recibieron vacunas hechas de antígenos de las formas promastigota del parásito. El objetivo de esta solicitud actual es una formulación que permita tal distinción, en razón a que ésta se hace de un antígeno de las formas amastigota del parásito, evitando el sacrificio de animales saludables, los cuales, por lo tanto, no han contraído la enfermedad.

La invención aquí descrita presenta así una nueva formulación de vacuna compuesta de la proteína A2 recombinante, asociada a adyuvantes tal como la saponina, que no es limitante y presente eficacia probada para inducir protección adecuada y respuesta inmune, no solamente en modelos experimentales, sino también en perros.

La formulación se compone del antígeno A2 de *Leishmania*, producido en *Escherichia coli*, en la forma de proteína recombinante (o antígeno). Las fórmulas cualitativa y cuantitativa contienen:

Proteína A2-HIS (rA2) recombinante	50 a 200,00 µg/mL
Saponina	0,125 a 0,500 mg/mL
Solución salina tamponada q.s.p (<i>tampón químico</i>).....	1,00 mL
Timerosal	0,01 mL

Para la producción de la proteína A2 recombinante la secuencia codificante de este antígeno se clonó en el vector de expresión de la proteína pET. Se transformó la cadena de *Escherichia coli* BL21, y de esta manera la proteína A2 se expresó con una cola de seis aminoácidos de histidina, que permite la purificación de la proteína recombinante a través de cromatografía de afinidad para níquel. Las pruebas de electroforesis en los sistemas SDS-PAGE, las pruebas Western-Blot y la secuenciación de ADN confirmaron la identidad de la proteína A2 clonada en *E. coli*. La expresión de la proteína A2 recombinante (rA2) se obtuvo después de la inducción del cultivo bacteriano con 1,0 mM de IPTG (isopropil-β-D-tiogalactopiranosida). La proteína rA2 se purificó a través de la cromatografía de afinidad en la columna que contiene iones de níquel. Después de purificarse, se evaluaron la integridad y la pureza de la proteína a través de la técnica de Inmuno Blot. El ajuste de la concentración de proteína por mL se hace utilizando una solución salina tamponada (*tampón químico*) que contiene 0,5 mg de saponina y timerosal.

La principal innovación de la formulación de esta vacuna es su capacidad de inducir respuesta inmune celular en perros, caracterizada por la inducción en altos niveles de INF- γ , y respuesta inmune humoral, caracterizadas por la producción de anticuerpos específicos contra el antígeno de vacuna que, aún, no reacciona con el extracto no soluble (bruto) o soluble de las formas promastigota de la *Leishmania* en las pruebas ELISA o en la reacción de inmunofluorescencia.

De esta manera, los perros vacunados con la formulación de vacuna permanecen seronegativos después de que cada una de las dosis de vacuna necesarias para el proceso de inmunización, permite la distinción serológica entre animales vacunados con A2 y aquellos infectados, que son seropositivos en las pruebas ELISA, por medio del extracto no soluble (bruto) o soluble de los parásitos.

De esta manera, los perros vacunados con esta formulación de vacuna permanecen seronegativos después de cada una de las dosis de vacuna necesarias para el proceso de inmunización. Es posible así desarrollar la distinción serológica entre solo vacunados con A2 de aquellos infectados, que son seropositivos en pruebas ELISA o en reacción con el extracto de parásito bruto o soluble.

Los resultados descritos anteriormente se pueden demostrar mediante los siguientes ejemplos:

Ejemplo 1: niveles de protección inducida contra la infección por *L. amazonensis* en ratones BALB/c inmunizados con el antígeno A2.

La inmunización con el antígeno A2, en la forma de la proteína A2 recombinante (rA2) asociada con el rIL-12 como un adyuvante, o en la forma de ADN A2, fue efectiva para otorgar protección en ratones BALB/c contra exposición-infección por *L. amazonensis*. En la evaluación de los animales inmunizados y expuestos se observó una reducción significativa del tamaño promedio de las heridas, así como también una reducción en la carga parasitaria en las garras infectadas (imágenes 1 y 2).

La Figura 1 presenta la evaluación del tamaño promedio de las heridas en las garras infectadas de los ratones BALB/c inmunizados con la proteína A2 recombinante (rA2), asociada o no con el rIL-12, con aDN A2 o con ADN pCDNA3 y expuestos a *L. amazonensis*. Se inmunizaron los grupos de ratones BALB/c (n=6, por ejemplo) con ADN A2, en el músculo tibial izquierdo, a intervalos de 21 días. Los grupos de control recibieron solamente PBS o se inmunizaron con el plásmido vacío (pCDNA3 ADN). Como un control

adyuvante, los ratones también se inmunizaron subcutáneamente con la proteína rA2, asociada o no con rIL-12 o solamente con el rIL-12. Los ratones fueron expuestos a 1×10^5 promastigotos de *L. amazonensis* en la fase de crecimiento estacionario, en la aponeurosis plantar. La evolución del tamaño de la herida se monitoreo a través de mediciones semanales del ancho de la garra infectada y la no infectada. Cada punto representa el promedio, con la desviación estándar agregada a o sustraída de ésta (en mm), obtenida mediante la diferencia entre el ancho de la garra infectada y la no infectada.

La Figura 2 representa la Evaluación de la carga parasitaria en las garras infectadas de los ratones BALB/c inmunizados con la proteína A2 recombinante (rA2), asociada o no con rIL-12, con ADN A2 o con ADN pCDNA3 y expuesta a *L. amazonensis*. Los grupos de ratones BALB/c ($n=6$, por ejemplo) se inmunizaron con 2 dosis de $100 \mu\text{g}$ de ADN A2, en el músculo tibial izquierdo, a intervalos de 21 días. Los grupos de control recibieron solamente PBS o se inmunizaron con el plásmido vacío (pCDNA3 ADN). Como un control adyuvante, los ratones también se inmunizaron subcutáneamente con la proteína rA2, asociada o no con rIL-12 o solamente con rIL-12. 28 días después de la última dosis, los ratones fueron expuestos a 1×10^6 promastigotos de *L. amazonensis* en la fase de crecimiento estacionario, en la aponeurosis plantar. Aproximadamente ocho semanas después de la exposición-infección, la carga parasitaria en los animales ($n=4$ por grupo) se determinó mediante la técnica de dilución limitante, como se describe en la Sección de Materiales y Métodos. Cada barra representa el promedio, con la desviación estándar agregada o sustraída de ésta, que corresponde al logaritmo del número de parásitos obtenidos por mg de tejido. Las diferencias entre los promedios se verificaron mediante la prueba t de Student, que se considera significativa para p por debajo de 0,05.

Ejemplo 2: respuesta inmune celular y humoral en ratones BALB/c inmunizados con el antígeno A2 y expuestos a *L. amazonensis*

Los animales inmunizados con ADN A2 o con rA2/rIL-12 y expuestos a *L. (L.) amazonensis* presentaron una producción significativa de IFN- γ después de la estimulación *in vitro* de los esplenocitos con la proteína rA2 o con el extracto total de los promastigotos *L. (L.) amazonensis* (SLA) (Figura 3). Además de esto, se observaron bajos niveles de IL-4 e IL-10 en estos grupos, comparados con los grupos de control, después de estimulación de las células con la proteína rA2 o con SLA de *L. (L.) amazonensis* (Figuras 4 y 5).

La Figura 3 es una gráfica que representa la producción de IFN- γ mediante esplenocitos de ratones BALB/c inmunizados con la proteína A2 recombinante (rA2),

asociada o no con el rIL-12, con el rIL-12, ADN A2 o ADN pCDNA3 y expuesta a *L. (L.) amazonensis*. Las células de bazo de los ratones BALB/c se recolectaron antes de la exposición-infección, o aproximadamente ocho a nueve semanas después de la exposición en el caso de aquellos inmunizados a *L. (L.) amazonensis*. Como controles, se evaluaron células no estimuladas o células estimuladas con concanavalina A (5 µg/ml), con el fin de evaluar la viabilidad celular. Los cultivos se incubaron durante 48 horas en un horno a 37°C, con la presencia de CO₂ al 5%. Después de esto, se recolectó el sobreflotante y se determinó la producción de IFN-γ mediante ELISA de captura. El eje de las abscisas indica el estímulo utilizado en el cultivo celular, y también el momento cuando se recolectaron las células: antes o después de la exposición-infección. El eje de las ordenadas indica la concentración, en pg/ml, de IFN-γ. Cada barra representa la producción promedio del IFN-γ, con la desviación estándar de cada grupo agregada o sustraída de ésta.

La Figura 4 representa la producción IL-4 de esplenocitos de los ratones BALB/c inmunizados con la proteína A2 recombinante (rA2), asociada o no con rIL-12, con rIL-12, ADN A2 o ADN pCDNA3 y expuesta a *L. (L.) amazonensis*. Las células de bazo de los ratones BALB/c se recolectaron antes de la exposición-infección, o aproximadamente ocho a nueve semanas después de la exposición en el caso de aquellos inmunizados con *L. (L.) amazonensis*. Las células se cultivaron (1 x 10⁶/ml) en 1 ml de medio DMEM completo y estimulado con la proteína rA2 (10 µg/ml) y con el SLA de *L. (L.) amazonensis* (50 µg/ml). Como controles se evaluaron células no estimuladas o células estimuladas con concavalina A (5µg/ml), con el fin de evaluar la viabilidad celular. Los cultivos se incubaron durante 48 horas en un horno a 37°C, con la presencia de CO₂ al 5%. Después de esto, se recolectó el sobreflotante y se determinó la producción de IL-4 mediante ELISA de captura. El eje de las abscisas indica el estímulo utilizado en el cultivo celular, y el momento cuando se recolectaron las células: antes o después de la exposición-infección. El eje de las ordenadas indica la concentración, en pg/ml, de IL-4. Cada barra representa la producción promedio del IL-4, con la desviación estándar de cada grupo agregada o sustraída de ésta.

La Figura 5 muestra la gráfica que representa la producción de IL-1 mediante los esplenocitos de los ratones BALB/c inmunizados con la proteína A2 recombinante (rA2) asociada o no con rIL-12, con rIL-12, ADN A2 o ADN pCDNA3 y expuesta a *L. (L.) amazonensis*. Las células de bazo de los ratones BALB/c se recolectaron antes de la exposición-infección, o aproximadamente ocho a nueve semanas después de la exposición en el caso de aquellos inmunizados con *L. (L.) amazonensis*. Las células se cultivaron (1 x 10⁶/ml) en 1 ml de medio DMEM completo y estimulado con la proteína rA2 (10 µg/ml) y con el SLA de *L. (L.) amazonensis* (50 µg/ml). Como controles se evaluaron

células no estimuladas o células estimuladas con concavalina A (5µg/ml), con el fin de evaluar la viabilidad celular. Los cultivos se incubaron durante 48 horas en un horno a 37°C, con la presencia de CO₂ al 5%. Después de esto, se recolectó el sobrenatante y se determinó la producción de IL-10 mediante ELISA de captura. El eje de las abscisas indica el estímulo utilizado en el cultivo celular, y el momento cuando se recolectaron las células: antes o después de la exposición-infección. El eje de las ordenadas indica la concentración, en pg/ml, de IL-10. Cada barra representa la producción promedio del IL-10, con la desviación estándar de cada grupo agregada o sustraída de ésta.

En la evaluación de la respuesta inmune humoral (Figura 6), las muestras de suero recolectadas de los animales inmunizados con rA2/rIL-12 o con ADN A2, y expuestas a *L. amazonensis* mostraron alta producción de anticuerpos IgG2a específicos a la proteína rA2 (anti-rA2) y la baja producción de anticuerpos específica al parásito (anti-SLA), opuesta a lo que se observó en los grupos de control (COELHO et al. *Infect. Immun.*: 71, 2003; COELHO. TESE, PhD in Immunology. Belo Horizonte: Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, 2004).

La Figura 6 muestra la producción del IgG total en las muestras de suero de ratones BALB/c inmunizados con la proteína A2 recombinante (rA2), asociada o no con rIL-12, con rIL-12, ADN A2 o ADN pCDNA3 y expuesta a *L. (L.) amazonensis*. Las muestras de suero de los ratones BALB/c se recolectaron antes de la exposición-infección, o aproximadamente ocho a nueve semanas después de la exposición en el caso de aquellos inmunizados con *L. (L.) amazonensis*. Las placas se sensibilizaron con la proteína rA2 (250 ng/pozo) o con *L. amazonensis* SLA. La producción del IgG total se determinó mediante ELISA de captura. Sobre el eje de las abscisas está la clase IgG total específica para la proteína rA2 o para el *L. amazonensis* SLA, y el momento cuando se recolectaron las muestras: antes o después de la exposición-infección. El eje de las ordenadas muestra la absorbancia a una longitud de onda de 492 nm. Cada barra representa la producción promedio del IgG total, con la desviación estándar de cada grupo agregada o sustraída de ésta.

En la evaluación de las subclases IgG1 e IgG2a específicas para la proteína rA2 o específicas para los antígenos del parásito (SLA), se puede observar (Figura 7) que las muestras de suero recolectadas de los animales inmunizados con rA2/rIL-12 o con ADN A2 y expuestas con *L. amazonensis* fueron predominantes en la producción de anticuerpos IgG2a específicos a la proteína rA2 (anti-rA2), cuando se comparó con los niveles de anticuerpos IgG1 anti-rA2 obtenidos. Los animales inmunizados con A2 permanecieron, sin embargo, seronegativos en las pruebas que utilizaron antígenos de la forma promastigota de *Leishmania* (SLA) (Coelho et al., 2003; Coelho, 2004).

La Figura 7 describe la producción del IgG1 e IgG2a en muestras de suero de ratones BALB/c inmunizados con la proteína A2 recombinante (rA2), asociada o no con rIL-12, con rIL-12, ADN A2 o ADN pCDNA3 y expuesta a *L. (L.) amazonensis*. Las muestras de suero de los ratones BALB/c se recolectaron antes de la exposición-infección, o aproximadamente ocho a nueve semanas después de la exposición en el caso de aquellos inmunizados con *L. (L.) amazonensis*. Las placas se sensibilizaron con la proteína rA2 (250 ng/pozo) o con SLA *L. amazonensis*. La producción del IgG1 e IgG2a se determinó mediante ELISA de captura. El eje de las abscisas muestra indicaciones de las sub-clases IgG1 e IgG2a específicas para la proteína rA2 o específicas para el SLA *L. amazonensis*, y el momento cuando se recolectaron las muestras: antes o después de la exposición-infección. El eje de las ordenadas muestra la absorbancia a una longitud de onda de 492 nm. Cada barra representa la producción promedio del IgG1 e IgG2a, con la desviación estándar de cada grupo agregada o sustraída de ésta.

Ejemplo 3: niveles de protección inducidos contra la infección por *L. chagasi* en ratones BALB/c inmunizados con el antígeno A2

El antígeno A2, cuando se administra en la forma de ADN A2, también probó ser efectivo para otorgar protección a ratones BALB/c contra la exposición-infección con *L. chagasi*, el agente etiológico principal de la Leishmaniasis Visceral en los países de Sur América. Los animales inmunizados y expuestos desplegaron una reducción en la expresión en la carga parasitaria en el hígado (Figura 8) y en el bazo (Figura 9).

Figura 8: Evaluación de la carga parasitaria en el hígado de ratones BALB/c inmunizados con ADN A2 y expuestos a *L. chagasi*. Los grupos de ratones BALB/c (n=6 por grupo), después de los protocolos de inmunización, fueron expuestos con 1×10^7 promastigotos de *L. chagasi* en la fase de crecimiento estacionario, mediante el método endovenoso, como se describe en la Sección de Materiales y Métodos. Treinta y cinco días después de la exposición los animales (n=4 por grupo) se sacrificaron y se recuperó el hígado, con el fin de determinar la carga parasitaria. Las barras representan el log promedio del número de parásitos por órgano, con la desviación estándar de cada grupo agregada o sustraída de ésta. El log promedio del número total de parásitos por órgano se comparó a través de la prueba t de Student. Las diferencias estadísticas se consideraron significativas para p menor de 0,05. Hubo una diferencia significativa entre la carga parasitaria hepática de los animales provenientes del grupo ADN A2 y aquellos provenientes del grupo PBS (p es menor de 0,0005) y del grupo pCI (p es menor de 0,005).

La Figura 9 muestra el resultado de la evaluación de la carga parasitaria en el bazo de los ratones BALB/c inmunizados con ADN A2 y expuestos con *L. chagasi*. Los grupos de ratones BALB/c (n=6 por grupo), después de los protocolos de inmunización, se expusieron con 1×10^7 promastigotos de *L. chagasi* en la fase de crecimiento estacionario, mediante el método endovenoso, como se describe en la Sección de Materiales y Métodos. Treinta y cinco días después de la exposición los animales (n=4 por grupo) se sacrificaron y se recuperó el bazo, con el fin de determinar la carga parasitaria. Las barras representan el log promedio del número de parásitos por órgano, con la desviación estándar de cada grupo agregada o sustraída de ésta. El log promedio del número total de parásitos por órgano se comparó a través de la prueba t de Student. Las diferencias estadísticas se consideraron significativas para p menor de 0,05. Hubo una diferencia significativa entre la carga parasitaria del bazo de los animales provenientes del grupo ADN A2 y aquellos provenientes de los grupos PBS y pCI (p es menor de 0,005 y 0,05, respectivamente).

Ejemplo 4: respuesta inmune celular en ratones BALB/c inmunizados con el antígeno A2 y expuestos a *L. amazonensis*

Los ratones BALB/c inmunizados con el antígeno A2, en la forma de ADN, y expuestos a *L. chagasi* produjo niveles significativamente superiores de IFN- γ (Figura 10) y niveles significativamente menores de IL-10 (Figura 11) después del estímulo de los esplenocitos con la proteína rA2 o con el extracto total de las proteínas *L. chagasi* (LcPA), comparada con los animales provenientes del grupo de control.

Figura 10: gráfica de la producción de IFN- γ mediante esplenocitos de ratones BALB/c inmunizados con ADN A2 antes y después de la exposición a *L. chagasi*. Las células del bazo de los ratones BALB/c inmunizados se recolectaron cuatro semanas después de la inmunización o aproximadamente nueve semanas después de la infección con *L. chagasi*. Las células (2×10^5 células por ml) se cultivaron en DMEM completo y se estimularon con las proteínas recombinantes rNH, rA2 o rLACK (concentraciones de 10 μ g/mL) o con el extracto de proteína de *L. chagasi* (50 μ g/mL). Los sobreflotantes se recolectaron 48 horas después del cultivo y estímulo de las células. La producción del IFN- γ se determinó mediante ELISA de captura. El eje de las abscisas indicó los estímulos utilizados en el cultivo celular, y el eje de las ordenadas indica la concentración de IFN- γ (pg/ml). Cada barra representa el promedio, con la desviación estándar de la producción de IFN- γ de cada grupo agregada o sustraída de ésta. La producción base de IFN- γ es 428,0, al cual se agrega o se sustrae 66,45 pg/mL. (*) Indica la diferencia significativa en relación con los grupos de control PBS y ADN, evaluada mediante la prueba t de Student. Los valores se consideran significativos para un p inferior de 0,05.

La Figura 11 muestra la producción de IL-10 mediante los esplenocitos de los ratones BALB/c inmunizados con los plásmidos de ADN AH, ADN A2, ADN LACK o sus asociaciones antes y después de la exposición con *L. chagasi*. Los grupos de los ratones BALB/c (n=6 por grupo), después de los protocolos de inmunización, se expusieron con 1x10⁷ promastigotos de *L. chagasi* en fase de crecimiento estacionario, mediante el método endovenoso, como se describe en la Sección de Materiales y Métodos. Veintiocho días después de la inmunización o treinta y cinco días después de la exposición-infección se cultivaron las células de bazo en medio DMEM completo y se estimuló con las proteínas recombinantes rNH, rA2 o LACK (de 10 µg/mL) o con el extracto soluble de *L. chagasi* (LcPA, 50 µg/mL). Los sobreflotantes se recolectaron 48 horas después del cultivo y estímulo de las células. La producción del IFN-γ se determinó mediante ELISA de captura. El eje de las abscisas indicó los estímulos utilizados en el cultivo celular, y el eje de las ordenadas indica la concentración de IL-10 (pg/ml). Cada barra representa la producción de IL-10 promedio, con cada desviación estándar del grupo agregada o sustraída de ésta. La producción base de IL-10 es 653,5, al cual se agrega o se sustrae 59,6 pg/mL. (*) Indica la diferencia significativa en relación con el grupo PBS y (**) indica que hay una diferencia significativa en relación tanto con los grupos PBS como ADN. El análisis estadístico se hace mediante la prueba t de Student. Los valores se consideran significativos para un p inferior de 0,05.

Ejemplo 5: respuesta inmune celular y humoral inducida mediante la inmunización con el antígeno A2 en perros Beagle

Los perros Beagle se dividieron en grupos y se inmunizaron con tres dosis de formulación de vacuna A2/saponina a intervalos de 21 días, mediante el método subcutáneo, de acuerdo con el protocolo de inmunización descrito adelante. Como controles, los grupos de animales se inmunizaron con un adyuvante (saponina), o recibieron solamente PBS.

GRUPOS	MÉTODO DE INMUNIZACIÓN
GRUPO 1 (n=17)	Antígeno A2
GRUPO 2 (n=7)	saponina
GRUPO 3 (control) (n=7)	Solución Salina Amortiguada de Fosfato (PBS)

Después de la administración de cada dosis, se evaluó la respuesta humoral mediante la determinación del nivel de anticuerpos IgG total a través del método ELISA. También se evaluó mediante la determinación de los isotipos IgG1 e IgG2, que son marcadores indirectos de la inducción de la respuesta celular Th2 y Th1, respectivamente.

El nivel de anticuerpos producido contra el antígeno de vacuna y contra el extracto total de antígenos de las formas promastigota total se evaluó (método de diagnóstico clásico VL).

5 Como se puede ver en las figuras 12 y 13, los animales vacunados con la formulación de vacuna presentan reacción serológica contra el antígeno de vacuna, pero permanecen seronegativos en la reacción con el extracto de parásito total. Como resultado, es posible desarrollar una distinción serológica entre los animales solo vacunados con A2 y aquellos infectados, los cuales son seropositivos en pruebas ELISA, 10 en una reacción con el extracto no soluble (bruto) o soluble de los parásitos.

Por lo tanto, la principal innovación de esta formulación de vacuna es su capacidad para inducir respuesta inmune humoral en perros. Esto se caracteriza mediante la producción de anticuerpos específicamente contra el antígeno de vacuna, el cual, sin 15 embargo, no reacciona con el extracto no soluble (bruto) o soluble de las formas promastigota de *Leishmania* en las pruebas ELISA o en la reacción de inmunofluorescencia (datos no presentados).

La Figura 12 presenta una gráfica con los niveles de los anticuerpos IgG, IgG1 e 20 IgG2 totales en muestras de suero de los perros, antes y después de cada dosis de las inmunizaciones así como también antes y después de la exposición-infección con *L. chagasi*. Las placas ELISA se sensibilizaron con la proteína A2 recombinante (250 ng) o con LcPA de *L. chagasi* (1 µg/pozo). La producción de IgG total se determinó mediante ELISA directo; la producción de IgG1 e IgG2 se determinó mediante ELISA indirecto. El 25 eje de las ordenadas representa la absorbancia a longitud de onda de 492 nm. Sobre el eje de las abscisas, cada barra indica la producción promedio del IgG total y de las subclases IgG1 e IgG2, de cada una de las desviaciones estándar del grupo agregada o sustraída de ésta.

30 La parte de la invención descrita aquí se refiere a la producción de IFN en respuesta al antígeno de vacuna. La respuesta inmune celular se evaluó por medio de la dosis de IFN-γ a través de ELISA de captura, después de recolectar y cultivar las células mononucleares de la sangre periférica (PBMC) *in vitro* y estimularlas con la proteína A2-HIS recombinante o con el extracto soluble de *L. chagasi* (LcPA). Las células también se 35 estimularon con concavalina A (ConA), como un control para la viabilidad celular. Además de esto, se hizo control basal, en el cual las células no se estimularon.

Como se puede ver en la Figura 13, los animales inmunizados con la composición de vacuna antígeno A2/saponina produjo niveles significativamente mayores

de IFN- γ en cultivos celulares estimulados con la proteína A2 recombinante, comparados con los grupos "Control" ($p=0,003926799$) y "Adyuvante" ($p=0,018896129$), bajo el mismo estímulo. Comparando la producción de IFN- γ de los grupos de perros evaluados en los cultivos celulares no estimulados y en los cultivos estimulados con LcPA y con ConA, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas. Además de esto, la producción fue significativamente superior en células estimuladas con la proteína A2-HIS, comparado con aquellas no estimuladas ($p=0,001374901$), a aquellas estimuladas con ConA ($p=0,00199055$) o con aquellas estimuladas con LcPa ($p=0,015277637$) – evaluando el grupo inmunizado con la composición de vacuna antígeno A2/saponina. Las diferencias estadísticamente significativas no se encontraron dentro de los grupos "Adyuvante" y "Control" bajo el mismo estímulo (Figura 13).

Los animales del grupo "Vacunado" desplegaron una producción significativamente mayor del IgG2, específico al rA2, comparado con el IgG1, antes y después de la exposición infección con *L. chagasi* ($p=0,0000000004$ y $p=0,0000000615$, respectivamente). Esto también se observó en el grupo "Control", después de la exposición infección ($p=0,0341668528$). Los perros del grupo "Vacunado", antes y después de la exposición-infección, desplegaron una proporción IgG1/IgG2 menor de 1, que es indicativa de respuesta Th1 (0,12224007 y 0,1085985, respectivamente) (Tabla 1). Los perros de los grupos "Adyuvante" y "Control", de otra parte, produjeron realmente bajas cantidades de estos anticuerpos (Figura 12). Las proporciones de IgG1/IgG2, antes y después de la infección, son 2,1096344 y 0,52443 para el grupo "Adyuvante", y 0,9171905 y 0,4106352 para el grupo "Control" (Tabla 1).

Agente Sensibilizante		
PROTEÍNA A2-HIS		
Grupo evaluado	Antes de exposición	Después de exposición
Vacunado	0,122241	0,108599
Adyuvante	2,109744	0,52443
Control	0,917787	0,410635

Tabla 1: Proporción de las sub-clases IgG1/IgG2 en las muestras de suero de perros inmunizados con la proteína A2 (vacunados) y de los perros provenientes de los grupos de Adyuvante y Control (PBS), antes y después de la exposición-infección (período de un mes) con *L. chagasi*. Las placas se sensibilizaron con la proteína A2-HIS recombinante (250 ng) o con el LcPA de *L. chagasi* (1 μ g/pozo). La producción de las sub-clases IgG1 e IgG2 se determinó mediante ELISA indirecto.

Estos resultados muestran que la formulación de vacuna indujo el desarrollo de la respuesta Th1, que se relaciona con el perfil observado en perros asintomáticos o resistentes a la infección (Pinelli *et al.*, 1994; Quinnell *et al.*, 2001; Santos-Gomes *et al.*, 2002).

5

La Figura 13 muestra una gráfica que representa la producción de IFN- γ mediante células mononucleadas con sangre periférica (PBMC) de perros Beagle inmunizados con la formulación de vacuna de antígeno A2/saponina, antes de la exposición-infección con *L. chagasi*. Las células se cultivaron (1×10^6 /ml) en un ml de medio DEMEM completo y se estimuló con la proteína A2 recombinante ($10 \mu\text{g/mL}$) y con LcPA de *L. chagasi*, a una concentración de $50 \mu\text{g/mL}$. Como control, se evaluaron las células no estimuladas (Medio). La concavalina A (2,5), un mitógeno, también se utilizó como un control para evaluar la viabilidad celular. Los cultivos se incubaron en un horno a 37°C , con 5% de CO_2 . Después de 48 horas se recolectó el sobreflotante y se determinó la producción de IFN- γ mediante ELISA de captura. El eje de las ordenadas representa la concentración, en pg/ml, del IFN- γ . El eje de las abscisas muestra los grupos de perros, donde "Vacunados" corresponde a un grupo de perros que recibió la formulación de vacuna de antígeno A2/saponina, "Adyuvante" corresponde al grupo que recibió solamente el adyuvante, y "Control" al grupo que recibió PBS. Cada barra representa la producción de IFN- γ promedio y cada desviación estándar del grupo. * Indica la diferencia significativa entre los grupos Vacunados y Adyuvante (A2-HIS), $p=0,018896129$. ** Indica la diferencia significativa entre los grupos Vacunados y de Control (A2-HIS), $p=0,003926799$; prueba t de Student (Excel).

10

15

20

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una vacuna recombinante para Leishmaniasis que comprende una proteína recombinante A2 de formas amastigote que permite la distinción serológica entre animales vacunados e infectados mediante pruebas serológicas convencionales, ELISA e inmunofluorescencia, usando antígenos de las formas promastigote de *Leishmania amazonensis*, *Leishmania donovani*, *Leishmania infantum* y *Leishmania chagasi*, **caracterizada en que:**
- 10 dicha vacuna está compuesta del antígeno A2 de *Leishmania*, producido en *Escherichia coli*, en la forma de proteína recombinante (o antígeno), en donde una fórmula cualitativa y cuantitativa contiene:
- | | |
|--------------------------------------|---------------------|
| proteína recombinante A2-HIS (rA2) | 50 a 200,00 µg/mL |
| saponina | 0,125 a 0,500 µg/mL |
| q.s.p de solución salina amortiguada | 1,00 mL |
| timerosal | 0,01. |
- 15
- 20 2. Una vacuna recombinante para leishmaniasis de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicha vacuna contiene un antígeno A2 recombinante de las formas promastigota de *Leishmania*.
- 25 3. Una vacuna recombinante para leishmaniasis de acuerdo con las reivindicaciones 1 y 2, caracterizada por inducir una respuesta inmune humoral en especies caninas a través de la producción de anticuerpos específicos contra el antígeno A2.
- 30 4. Una vacuna recombinante para leishmaniasis de acuerdo con las reivindicaciones 1-3, caracterizada por inducir respuesta inmune celular en especies caninas a través de niveles elevados de IFN-γ.
- 35 5. Una vacuna recombinante para leishmaniasis de acuerdo con las reivindicaciones 1-4, caracterizada por el mantenimiento de resultados negativos para las pruebas serológicas convencionales para leishmaniasis en especies caninas.
6. Una vacuna recombinante para leishmaniasis de acuerdo con las reivindicaciones 1-5, que comprenden uno o más de un excipiente, portador, amortiguador, estabilizador, agente de isotonicidad, conservante o antioxidante farmacéuticamente aceptable.

FIGURAS

Fig. 1

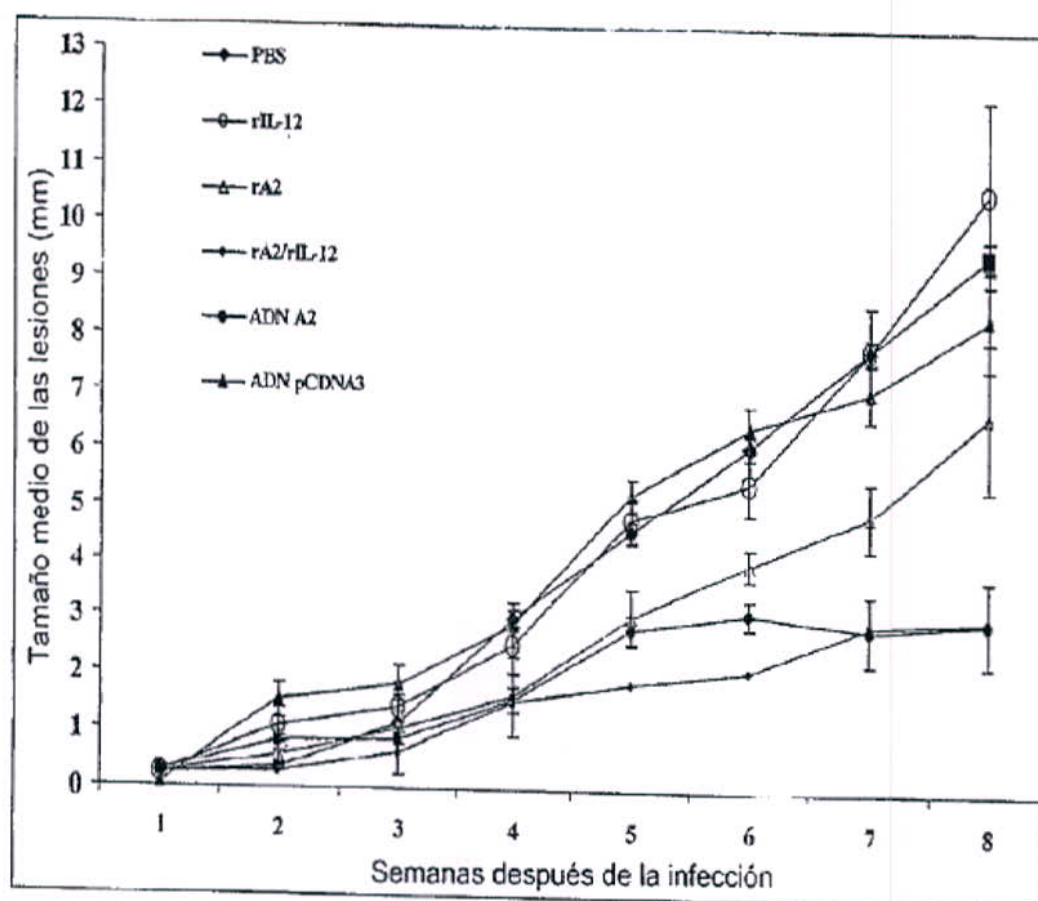


Fig. 2

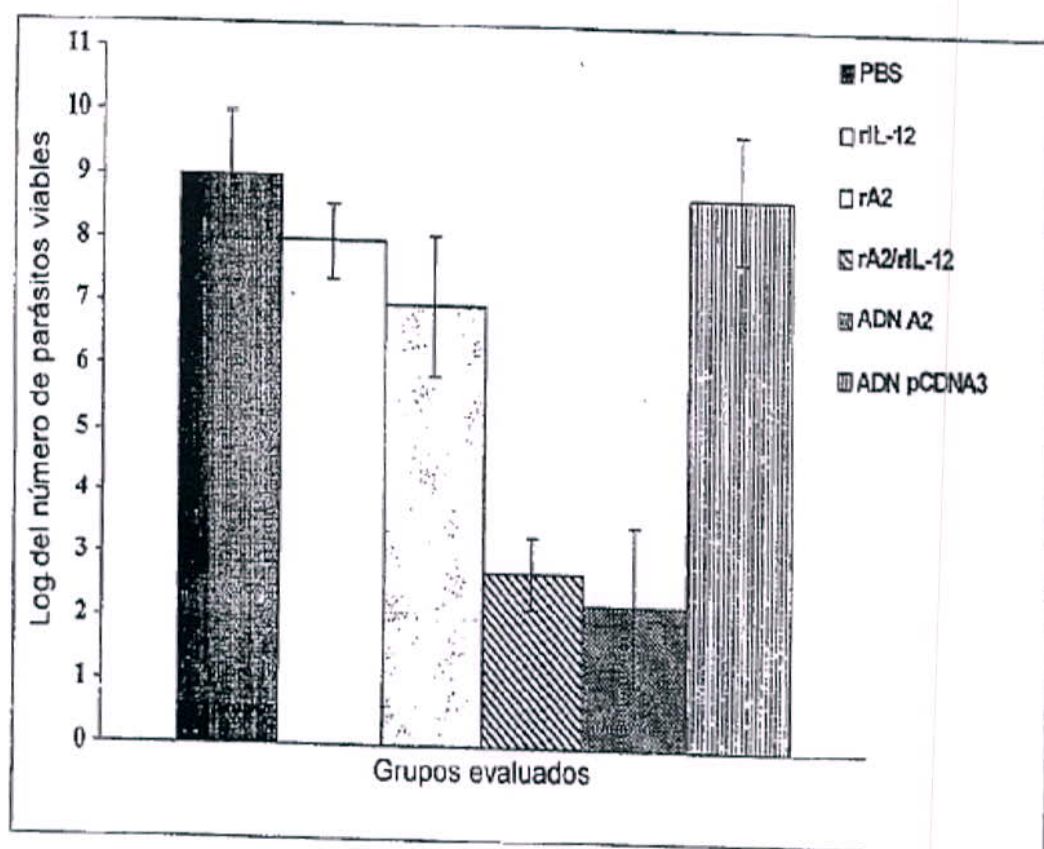


Fig. 3

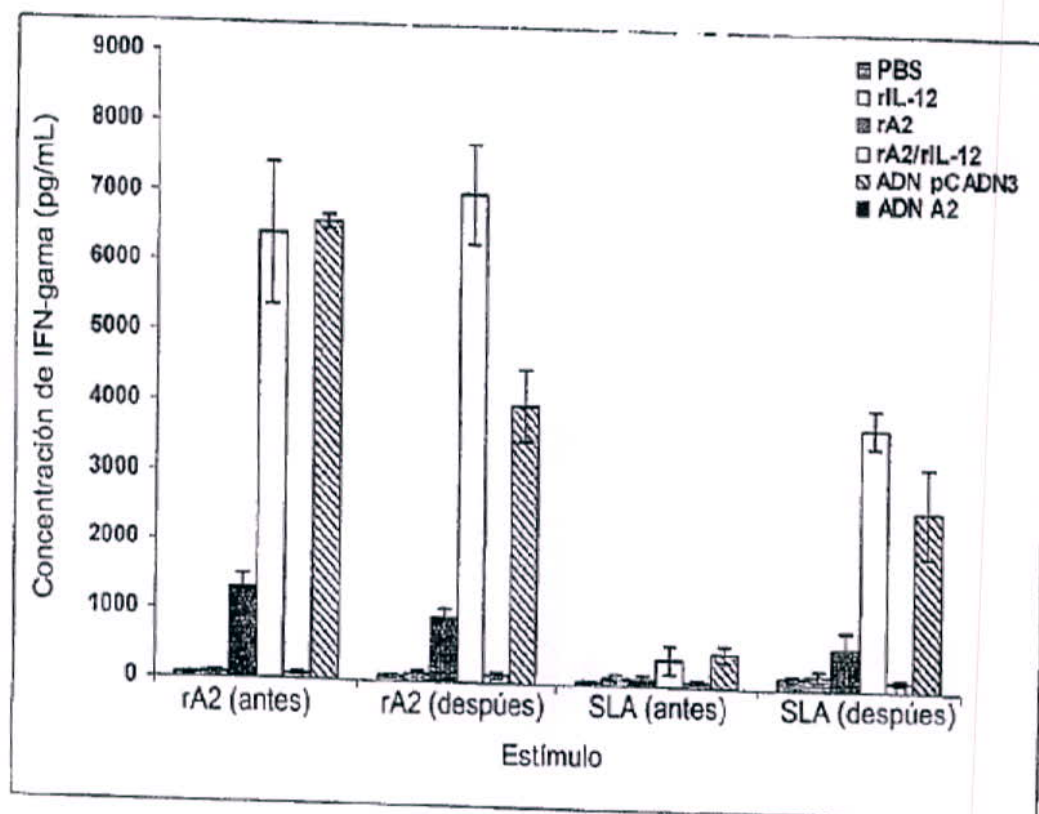


Fig. 4

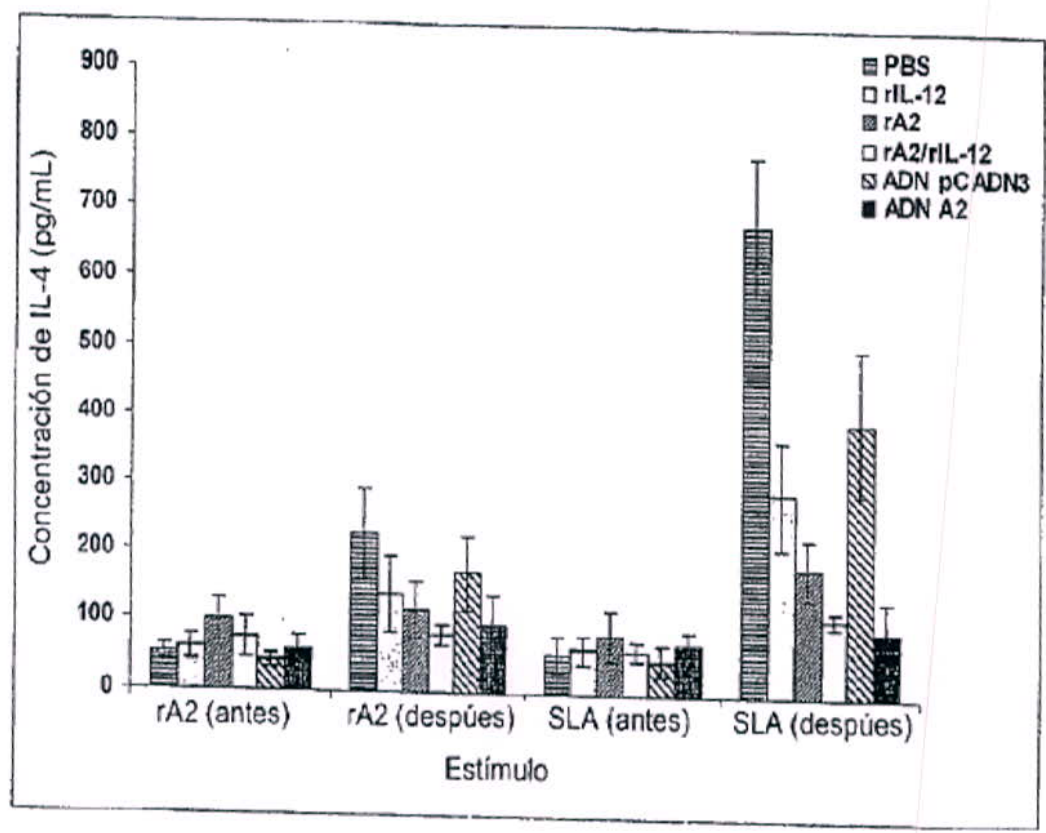


Fig. 5

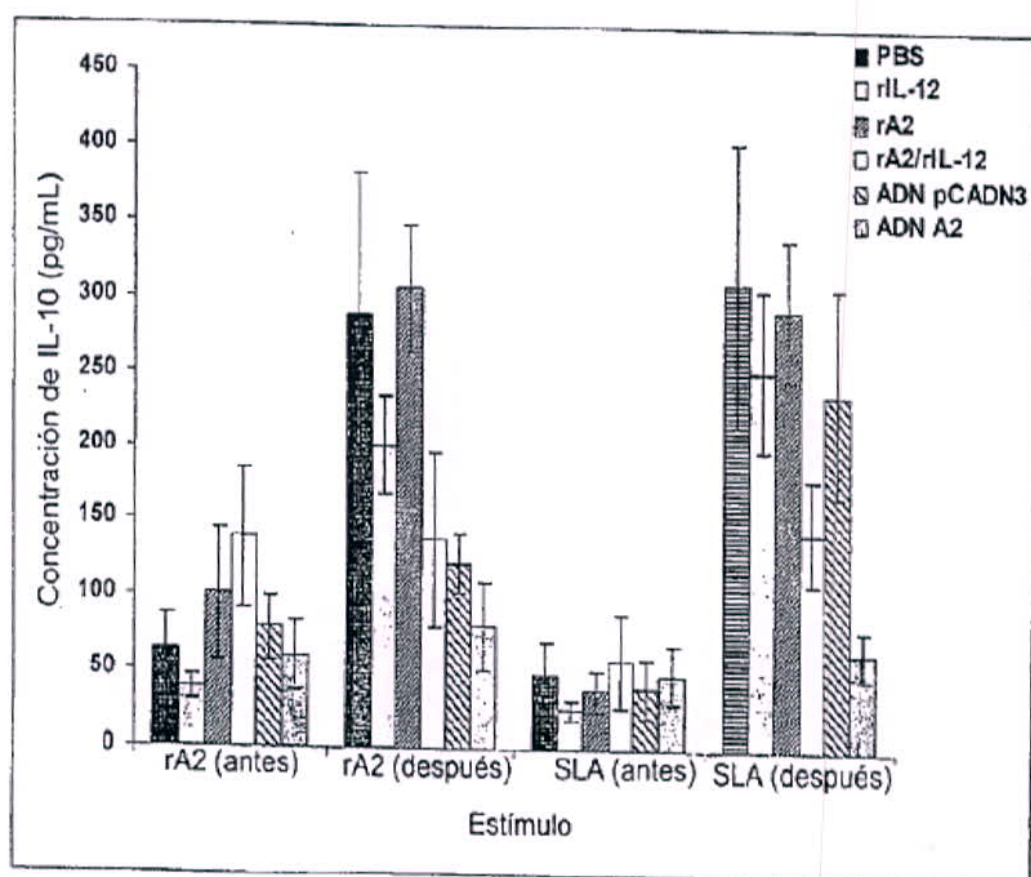


Fig. 6

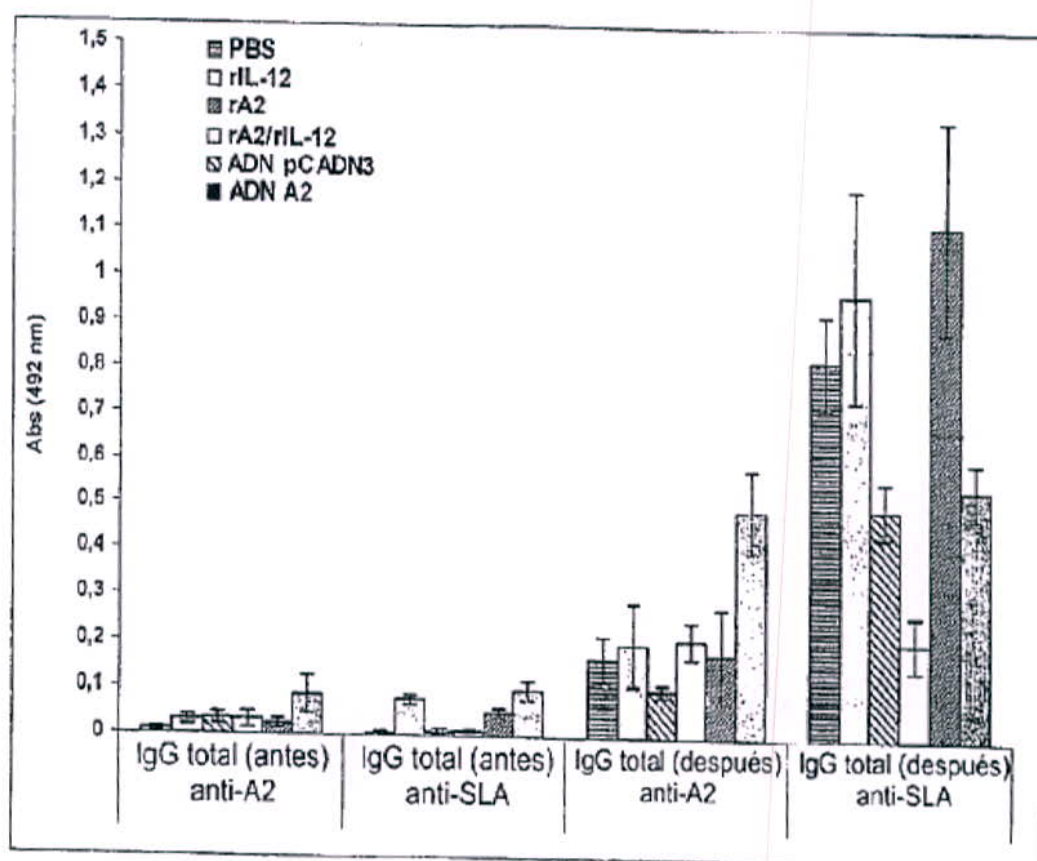


Fig. 7

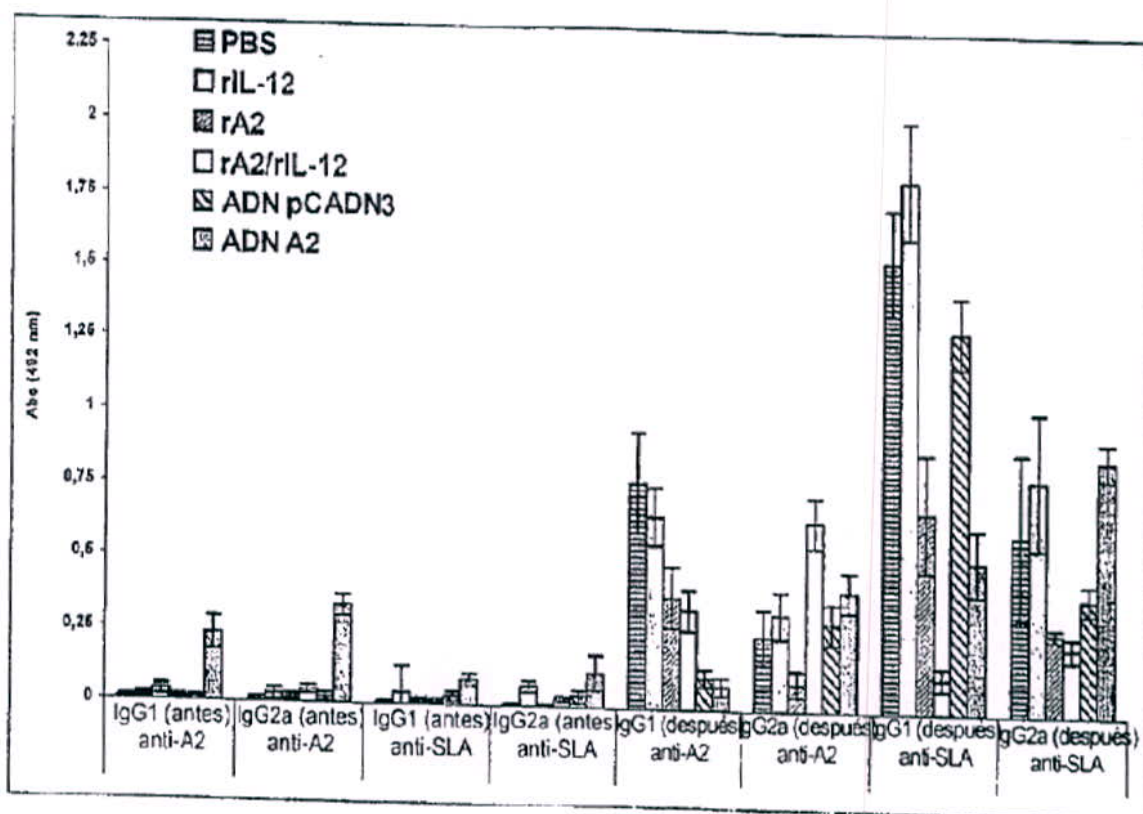


Fig. 8

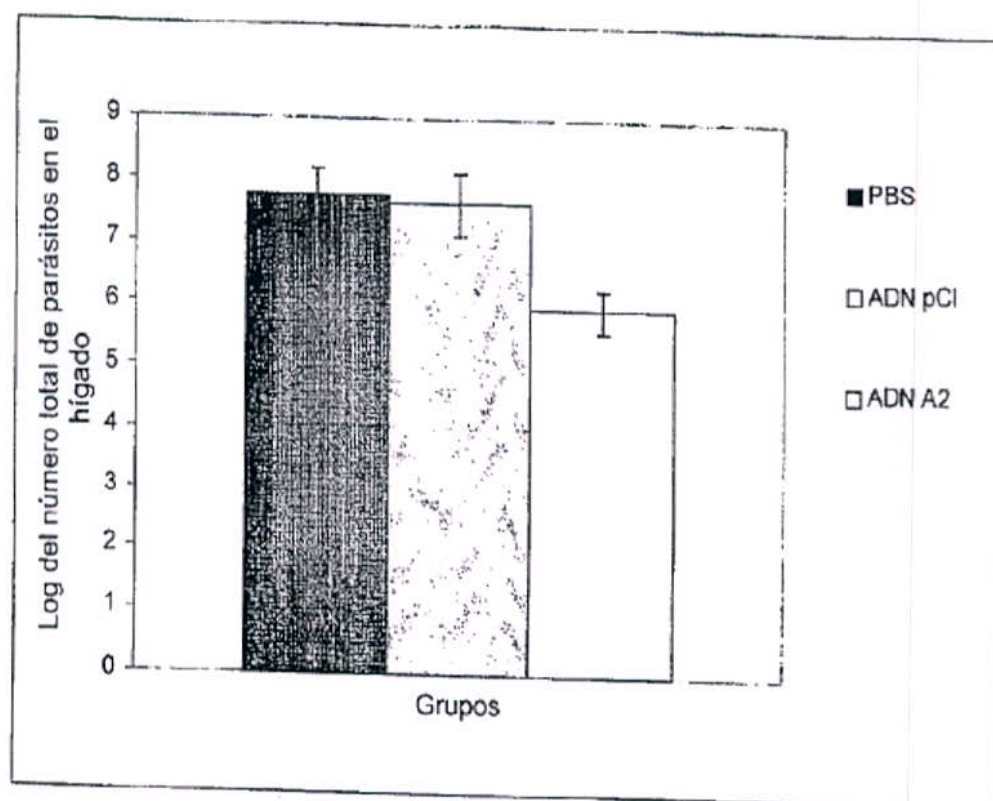


Fig. 9

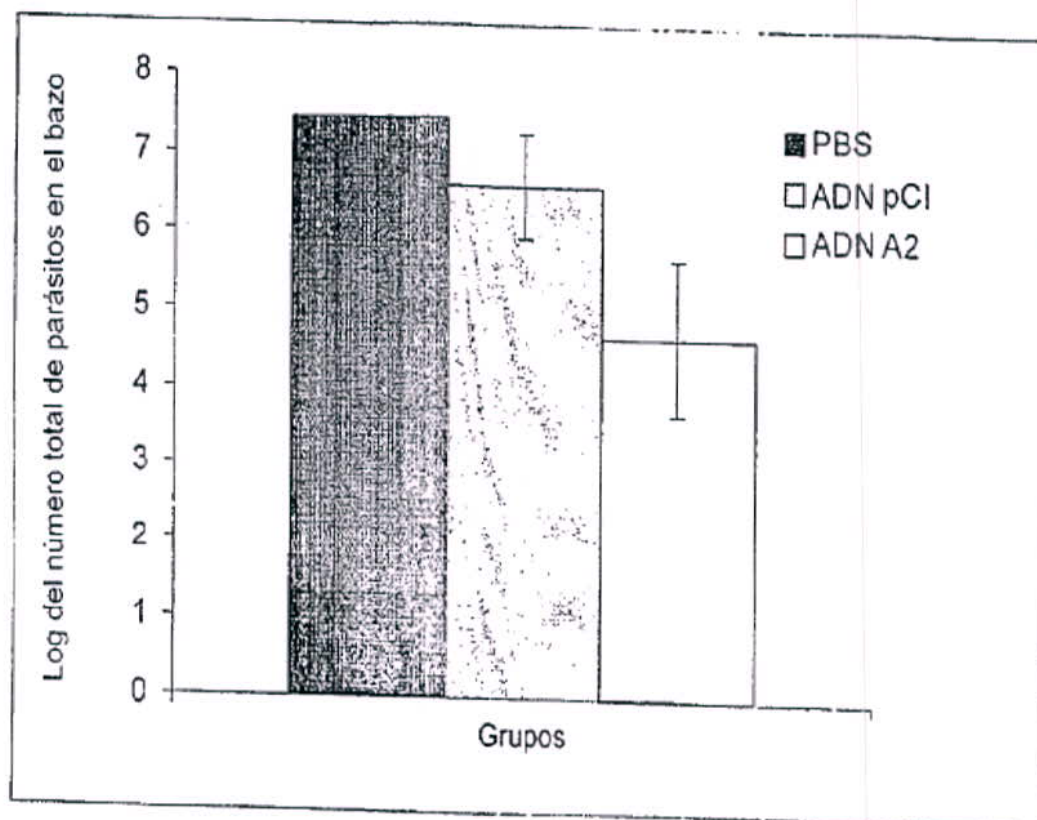


Fig. 10

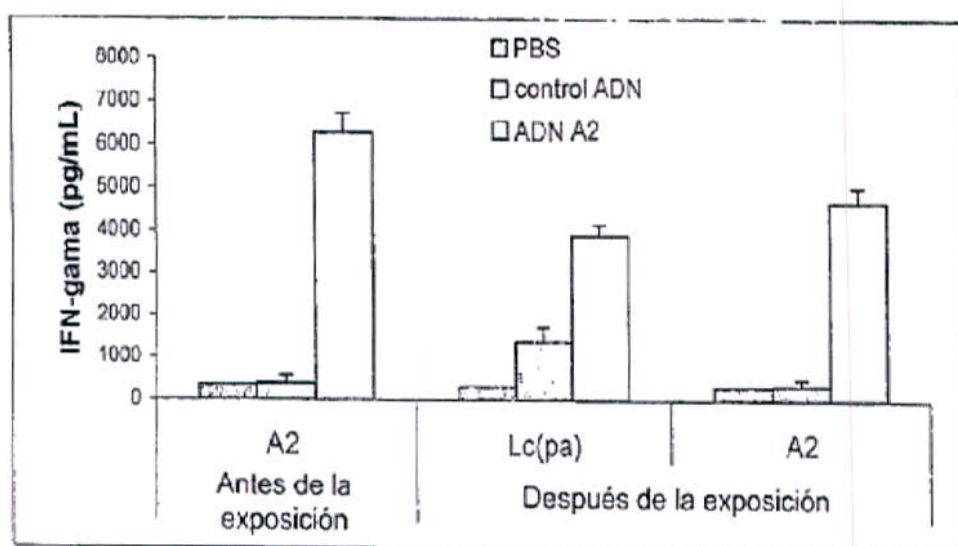


Fig. 11

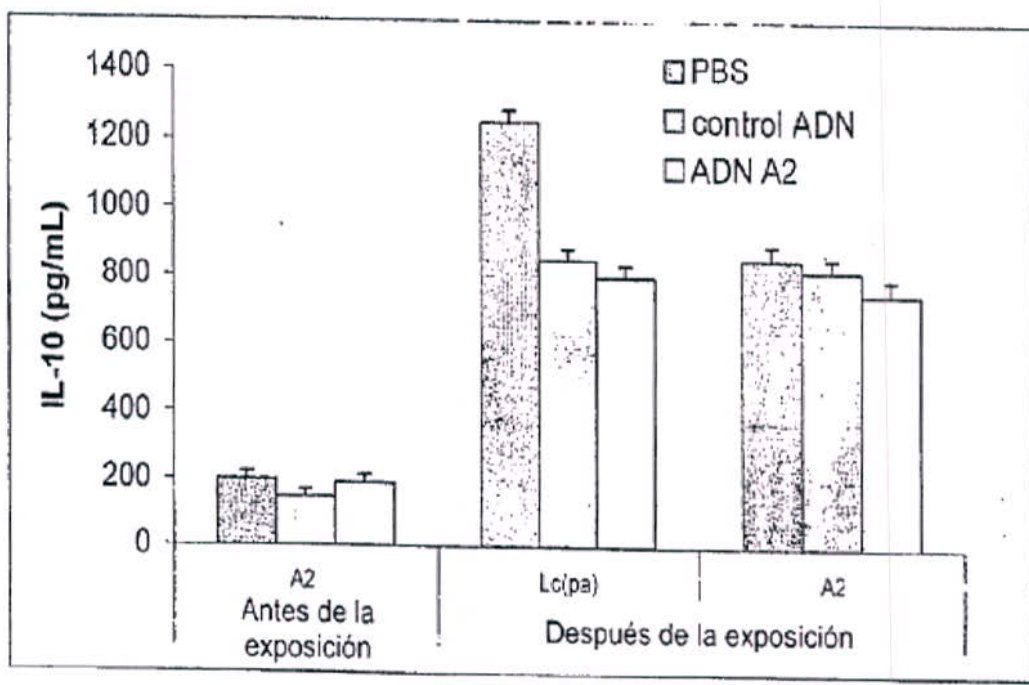


Fig. 12

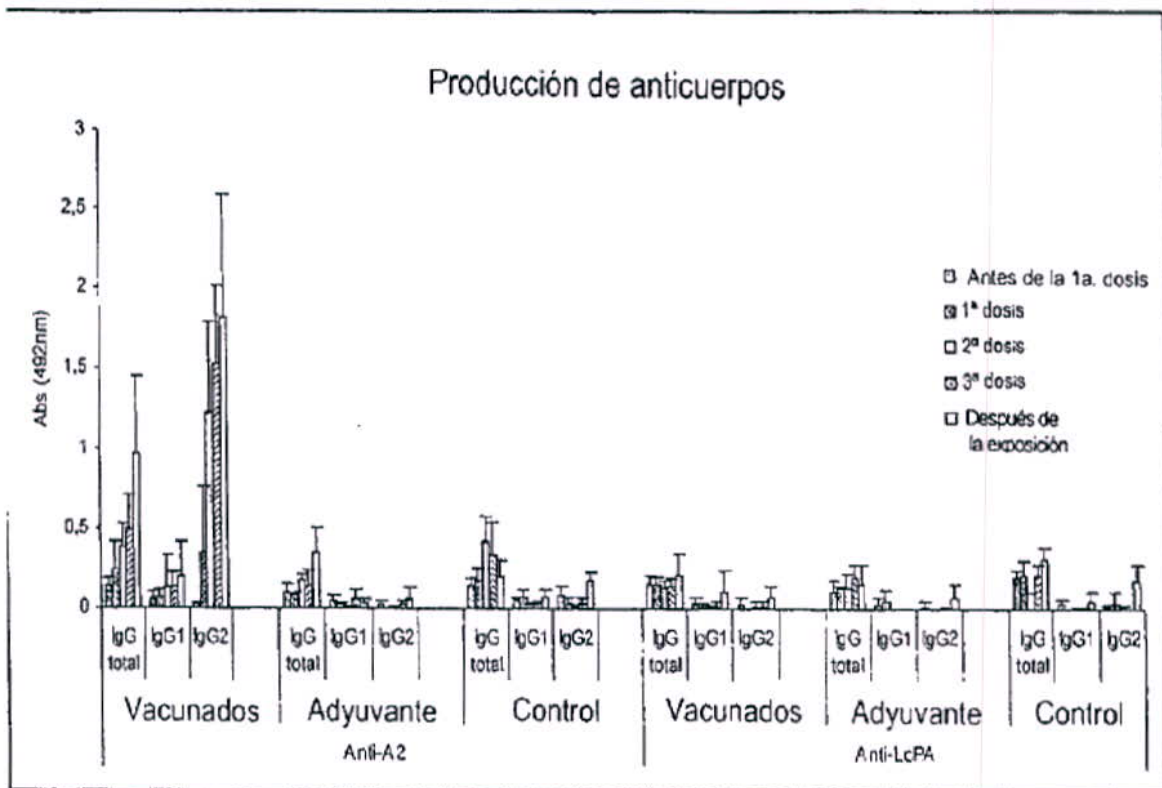
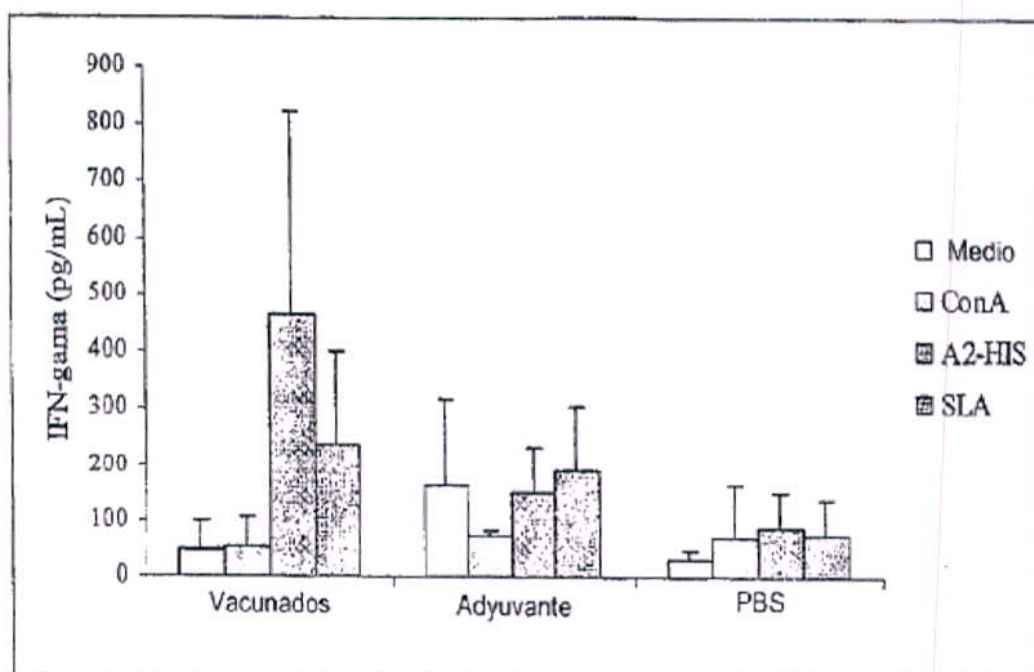


Fig. 13



SML\SML\ID-231608\WPC16936