

Organización y

# Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

Delegatura de Propiedad Industrial

División de Nuevas Creaciones



SOLICITUD

## PATENTE DE INVENCION

PCT

09-17840

21. EXPEDIENTE No.

54. TÍTULO

COMPOSICION DE VACUNA Y METODO DE INMUNIZACION

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL

71. SOLICITANTE

INIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

DOMICILIO

BELO HORIZONTE, MINAS GERAIS, BRASIL

74. APODERADO

EMILIO FERRERO  
C.C. 438.019 de Usaquén

22. BOGOTÁ, D. C.,

**Industria y Comercio**

SUPERINTENDENCIA

**PETITORIO**

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-017840- -00000-0000

Fecha: 2009-02-23 16:26:45 Dep. 2020 NUECREACION  
Tra. 11 PATENTEIYI Eve: 378 FASENACIONAL  
Act. 411 PRESENTACION Folios: 89**FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE  
PCT  
ENTRADA EN FASE NACIONAL****SOLICITUD DE:**

1

☒ Patente de Invención.☐ Patente de Modelo de Utilidad.☒ Capítulo I.☐ Capítulo II.

2

**SOLICITANTE  
(71)**Nombre: **UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
MINAS GERAIS**sociedad constituida y existente bajo las  
leyes de Brasil.Dirección: Avenida Antônio Carlos, 6627  
Reitoria 7º andar Sala 7005,  
Belo Horizonte,  
Minas Gerais, 31270-901,  
BrasilDomicilio: Belo Horizonte  
Minas Gerais,  
Brasil**IDENTIFICACIÓN**C.C. ☐NIT ☐C.E. ☐Otro ☐

Cual

Número

3

**REPRESENTANTE  
O APODERADO**Nombre: **EMILIO FERRERO**

Dirección: Carrera 4ª. No. 72-35

Teléfono: 347 36 11

Fax: 211 86 50

E-mail: [clientes@cavelier.com](mailto:clientes@cavelier.com)

Domicilio: Bogotá, Colombia.

**IDENTIFICACIÓN**C.C. ☒NIT ☐C.E. ☐Otro ☐

Cual

Número 438.019 T.P 31.929

4

**INVENTOR (ES)  
(72)**1. **Ana Paula SALLES MOURA FERNANDES**  
Rua Bernardo Guimarães, 3101/302,  
Barro Preto,  
Belo Horizonte, Minas Gerais,  
CEP. 30140-083,  
Brasil3. **Eduardo Antonio FERRAZ COELHO**  
Rua Antônio Dias, 707/801,  
Santo Antônio  
Belo Horizonte, Minas Gerais,  
CEP. 30350-150,  
Brasil2. **Christiane DE FREITAS ABRANTES**  
Rua Santa Catarina, 908/801,  
Lourdes,  
Belo Horizonte, Minas Gerais,  
CEP. 30170-080,  
Brasil4. **Ricardo TOSTES GAZZINELLI**  
Rua Espírito Santo, 2444/201,  
Lourdes,  
Belo Horizonte, Minas Gerais,  
CEP. 30150-370,  
Brasil

5

**PCT (86)**Solicitud Internacional No. PCT/BR2007/000248Fecha: 20 de julio de 2007Publicación Internacional No. WO 2008/009088 A2Fecha: 24 de enero de 2008

6

**Título (54)****COMPOSICIÓN DE VACUNA Y MÉTODO DE INMUNIZACIÓN**

7

**Clasificación Internacional (51) A61K 039/008**

8

**Prioridad**SI ☒ NO ☐

(33) País de Origen

BR

(32) Fecha

21 de julio de 2006

(31) Número de Solicitud

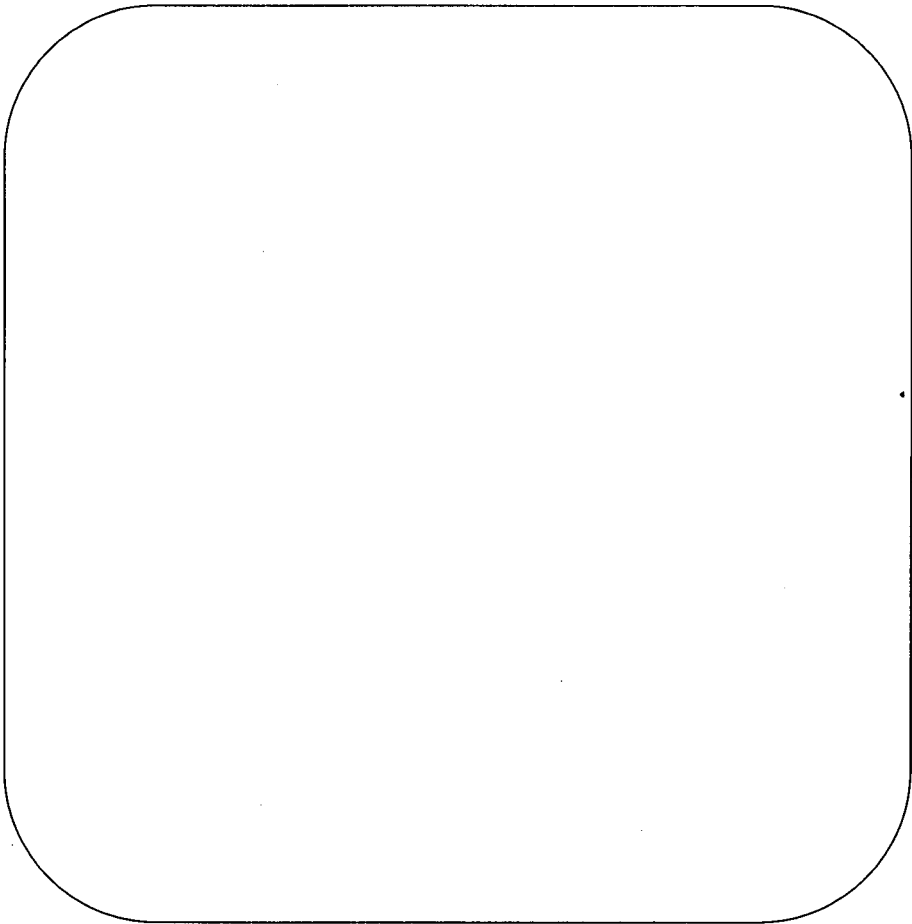
PI0603490-0

|               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                                                                             |
|---------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------|
| <div>9</div>  | <div>Comprobante de pago No.: 09-2,997</div> <div>Comprobante de pago No.: 09-2,998</div>                                                                                                                                                                                                             | <div>Fecha: 14 de enero de 2009</div> <div>Fecha: 14 de enero de 2009</div> |
| <div>10</div> | <div>Anexos:</div> <div><div><input checked="" type="checkbox"/></div>Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud por \$ 540.000.oo.</div> <div><input type="checkbox"/></div> Comprobante de pago por reivindicaciones adicionales después de la decimoquinta reivindicación por. |                                                                             |

☐☐☐☐☒☒☐☐☐☐☐☐☐☒

11

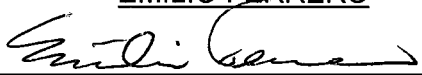
FIGURA CARACTERÍSTICA



12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: EMILIO FERRERO

FIRMA :   
C.C. 438.019 de Usaquén T.P. 31.929

SCT

**DOCUMENTOS ANEXOS**

1. ☒ Publicación Internacional WO 2008/009088 A2

Descripción:

Páginas 19 en el idioma original

Páginas 28 en español

Reivindicaciones: Número (s) 11

Figuras: Número (s) 13

2. ☒ **Forma PCT/ISA/210.** Informe de Búsqueda Internacional.

3. ☒ **Forma PCT/IB/306.** Notificación de la inscripción del cambio de nombre del solicitante  
**FEDERAL UNIVERSITY OF MINAS GERAIS – UFMG** por **UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

4. ☒ Extracto de publicación.

**NO SE REALIZARON MODIFICACIONES EN LA FASE INTERNACIONAL**

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization  
International Bureau



(43) International Publication Date  
24 January 2008 (24.01.2008)

PCT

(10) International Publication Number  
**WO 2008/009088 A2**

(51) International Patent Classification: Not classified

(21) International Application Number:  
PCT/BR2007/000248

(22) International Filing Date: 20 July 2007 (20.07.2007)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:  
PI0603490-0 21 July 2006 (21.07.2006) BR

(71) Applicant (for all designated States except US): **FEDERAL UNIVERSITY OF MINAS GERAIS - UFMG** [BR/BR]; AV. ANTÔNIO CARLOS, 6627 REITORIA - SALA 7005, PAMPULHA - BELO HORIZONTE, MINAS GERAIS CEP:31270-901 (BR).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): **ANA PAULA SALLES MOURA FERNANDES** [BR/BR]; RUA BERNARDO GUIMARÃES, 3101/302, BARRO PRETO - BELO HORIZONTE, MINAS GERAIS - CEP. 30140-083 (BR). **CHRISTIANE DE FREITAS ABRANTES** [BR/BR]; RUA SANTA CATARINA, 908/801, LOURDES - BELO HORIZONTE, MINAS GERAIS - CEP. 30170-080 (BR). **EDUARDO ANTÔNIO FERRAZ COELHO** [BR/BR]; RUA ANTÔNIO DIAS, 707/801, SANTO ANTÔNIO - BELO HORIZONTE, MINAS GERAIS - CEP. 30350-150 (BR). **RICARDO TOSTES GAZZINELLI** [BR/BR]; RUA ESPÍRITO SANTO, 2444/201, LOURDES - BELO HORIZONTE, MINAS GERAIS - CEP. 30150-370 (BR).

(74) Common Representative: **DE MOURA, Adriana Cláudia**; AV. ANTÔNIO CARLOS, 6627 REITORIA - SALA 7005, PAMPULHA - BELO HORIZONTE, MINAS GERAIS CEP:31270-901 (BR).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, 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).

**Published:**

— without international search report and to be republished upon receipt of that report

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: VACCINE COMPOSITION AND IMMUNIZATION METHOD

(57) Abstract: The present invention refers to the recombinant vaccine against canine visceral leishmaniasis containing the recombinant A2 protein and saponin, as an adjuvant, allowing the distinction between vaccinated and infected animals through conventional ELISA or immunofluorescence tests that employ antigens of promastigote forms of *Leishmania*.



WO 2008/009088 A2

## VACCINE COMPOSITION AND IMMUNIZATION METHOD

[001] The present invention refers to the recombinant vaccine against canine visceral leishmaniasis containing the recombinant A2 protein and saponin, as an adjuvant, allowing the distinction between vaccinated and infected animals through conventional ELISA or immunofluorescence tests that employ antigens of promastigote forms of *Leishmania*.

[002] The many leishmaniasis constitute a group of parasitical diseases that clinically present themselves as cutaneous or mucocutaneous wounds, or in the form of a visceral infection. They occur due to the infection by a variety of protozoan species belonging to the genus *Leishmania* (World Health Organization. Program for the surveillance and control of leishmaniasis. <http://who.int/emc/diseases/leish/index.html>. 2005). The many leishmaniasis are endemic in about eighty-eight countries. Of these, seventy-two are developing countries, and in this group are included thirteen of the countries with the lowest development rate in the world. The visceral form occurs due to infections caused by the species *Leishmania (Leishmania) donovani* and *L. (L.) infantum* in countries of Europe, Asia, Africa and the Middle-east, and due to the specie *L. (L.) chagasi* in Latin American countries (DESJEUX, P. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*: 27, 2004). Alterations in the functions of the spleen, the liver and the bone marrow are observed on infected patients, and the infection may become chronic, causing irregular long-lasting fever, hepatosplenomegaly, lymphadenopathy, anaemia, leucopeny, oedema, progressive enfeeblement and weight-loss, and possibly causing death if treatment is not administered. Infected individuals may also remain asymptomatic, though 20% of the individuals in endemic regions develop the classic form of the disease. The symptoms are progressive, and complications deriving from the infection's evolution are responsible for the greater part of the deaths (SUNDAR, S. & RAI, M. *Clin.Diagn. Lab. Immunol.*, 9: 2002).

[003] *L. (L.) chagasi* has got vast geographic distribution in the Americas, being found in Brazil, Argentina, Colombia, Bolivia, El Salvador, Guatemala, Honduras, Mexico, Paraguay, and Venezuela. Species such as marsupials and skunks are well-known wild reservoirs of the parasite. In domestic environments, the dog is considered the main reservoir in the domestic transmission cycle of visceral leishmaniasis (VL), due to the high prevalence of the canine infection as compared to the human one. Infected dogs, even the asymptomatic ones, present a great quantity of parasites in the skin, facilitating the infection of the vector insect from this reservoir, and, consequently, the transmission of the disease to people (TESH, R. *Am. J. Med. Hyg.*: 52, 1995).

[004] Canine VL treatment, whichever the medicine used, is not viable as a measure for the control of the disease, for it is costly. Moreover, treated and clinically cured dogs frequently display returns of the disease, remaining as infection sources for the vector, and it raises the chance of selecting lineages that are resistant to such medicines, with serious implications for human treatment (GRAMICCIA, M. & GRADONI, L. *Int. J. Parasitol.* 35: 2005).

[005] This fact, associated to the lethality of human VL when not treated, has taken the World Health Organization (WHO) to profess the elimination of dogs when they are seropositive for *Leishmania* antigens, as a measure for Public Health organizations controlling the disease. In this way, Brazil's Health Ministry adopted such procedure. Therefore, one of the most used actions in VL control is the elimination of infected dogs, which are detected through serological diagnosis or by the presence of clinical symptoms. However, such procedures bring deep sadness and indignation to their owners, who, many times, prefer omitting the disease to the competent organizations until the animals are near their deaths, when they become important transmitters of the parasite (TESH, R. *Am. J. Med. Hyg.*: 52, 1995).

[006] Most researches on vaccine development are based on the identification of molecules of the parasite and in immunization protocols that can induce Th1 cellular immune response, an essential requirement for inducing protection to the disease. Among dogs, the resistance or susceptibility to the disease is, probably, also associated to the dichotomy of the Th1/Th2 response. The resistance is associated to high specific lymphoproliferative response and with positive delayed hypersensitivity reaction (DHR), besides low quantity of parasite-specific antibodies. Resistance to the infection and protection, among dogs, would be related to a high interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ) and nitric oxide (NO) production, and to the leishmanicidal activity of the parasite-infected macrophages, which means a Th1 immune response profile. High levels of IgG1 antibodies would be related to susceptibility, while high levels of IgG2a would be associated to resistance (Moreno, J. & Alvar, J. *Trends Parasitol.*: 18, 2002; Molano, I. et al., *Vet. Immunol. Parasitol.*: 92, 2003). Therefore, in studies which assess vaccine effectiveness against infection by *Leishmania*, IFN- $\gamma$  and IgG2 (dogs) or IgG2a (mice) antibodies are used as Th1 response markers and resistance-inductor markers. Interleucine-4, interleucine-10 and IgG2 (dogs) or IgG2a (mice) antibodies, on the other hand, are used as Th2 answer and susceptibility markers.

[007] Vaccines against canine Leishmaniasis are hard to develop, and due to this are still rare. One canine vaccine is available, Leishmune®. It uses as its vaccine

active principle a purified antigenic complex, including proteins, that corresponds to the Fucose-Mannose Ligand (FML), present in the parasite's surface, according to the national patent request n° PI 9302386-3 (composition containing fractions of Leishmania cells called fml antigen, "fucose-mannose ligand" or "fucose-mannose connector", use of the fml antigen and its sub-fractions and components for applications in immunodiagnosis specific to human and animal visceral leishmaniasis, for applications in vaccines and for treatment or immunotherapy against human and canine visceral leishmaniasis).

[008] Leishmune®'s primary characteristic is the induction of humoral response. The vaccinated dog rapidly develops a response through the production of specific antibodies against the parasite. Many tests, presented by the mentioned vaccine's inventor and partners, show that the vaccine protects approximately 86% of the animals which received it when placed in endemic areas. These studies' results were questioned by the scientific community, as well as by the industry, since the control and the vaccinated animals were located in different cities. Another important failure of the mentioned test was the presence of dogs, in both groups, using insect-repellent-impregnated collars. The parasite is transmitted by an insect's sting, and if the contact with the vector insect is deterred by use of repellent collars the dog is not really exposed to the alleged natural challenge. Based on the above data, the described protection percentage is questionable. Therefore, other studies have been carried out and some are being carried out by request of the public health regulatory organization.

[009] Particularly, in what pertains to public health, it is known that according to WHO regulations seropositive animals must be sacrificed. It is also known that this measure is adopted in Brazil. Once having received this vaccine, the animal will develop heavy response through antibodies specific to the parasite, becoming seropositive. The diagnosis professed by the public organizations is the serologic one, due to it being cheap and easily executable, thus capable of being applied to all regions of the country without further problems. The vaccinated dogs must be sacrificed.

[010] The indistinction, by traditional methods, of infected animals from vaccinated ones, simply creates a great public health problem. The owners of vaccinated animals show the vaccine card and do not allow the animal to be sacrificed. Taking into account that for each one hundred animals which received the vaccine, about fourteen may become infected, leading to an increase in the amount of possible domestic leishmaniasis reservoirs. Another important issue is related to epidemiologic

inquiries made by the Ministry of Health, which are an important form of identifying the evolution of the disease in different regions. This inquiry is partially based on the serologic results of the dogs. With the advent of Leishmune® vaccination the obtained results are not real, for seropositive animals may not be infected, but merely vaccinated. It is possible to distinguish between dogs that are seropositive due to vaccination or due to infection by exams that detect the parasite's presence, such as Polymerase Chain Reaction (PCR) or immunocytochemistry. However, to perform these tests, requires fine techniques and costly equipment and reagents, besides trained technicians, in order to guarantee the accuracy of the results. PCR is done in private clinics; its use in public health is hard to be implemented and of elevated financial cost.

[011] In addition to this, Leishmune® has got high production costs, arriving at the market at prices that make it impossible for the whole population to have access to it. It is known that Brazil has a large low income population, and these people do not have access to the mentioned product. As this is a disease that expands itself in many regions of the country, it is ever more important to adopt measures that hinder the continuity of the parasite's transmission, especially the infection of dogs that live in domestic or adjoining areas. The possible use of this product in public health campaigns would be costly, besides the aforementioned problems. Leishmune® presents interesting immunologic characteristics, but goes against the control measures adopted for the current epidemic, deterring the sacrifice of seropositive dogs, interfering in the epidemiologic inquiries and also being of high cost for public health usage.

[012] The A2 antigen has been identified, initially, in the specie *L. (L.) donovani*, by Charest & Matlashewsky (*Mol. Cell. Biol.*: 14, 1994), by a library of amastigote forms of *L. (L.) donovani* cDNA. Multiple copies of the A2 gene are grouped in the *L. (L.) donovani* chromosome 22 (850 kb). These genes are maintained in the species *L. (L.) donovani*, *L. (L.) infantum*, *L. (L.) chagasi*, *L. (L.) amazonensis* and *L. (L.) mexicana* (Ghedin et al., *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*: 4, 1997).

[013] In previously conducted searches through patent banks, there were found patent requests related to the usage of the A2 antigen as a reagent for leishmaniasis vaccination, as described below. The patent number US5733778 states the nucleotide sequence of the A2 gene and claims the protection of its expression in microbial hosts. The VL9 *L. (L.) donovani* string's A2 gene sequence is deposited in Genebank, as described below:

WO 2008/009088

PCT/BR2007/000248

5

LOCUS S69693 2817 bp mRNA linear INV 26-MAR-2002

ACCESSION S69693

VERSION S69693.1 GI:546453

ORGANISM Leishmania (donovani) infantum

Eukaryota; Euglenozoa; Kinetoplastida; Trypanosomatidae;

Leishmania.

REMARK GenBank staff at the National Library of Medicine created this

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..2817

/organism="Leishmania donovani infantum"

/mol\_type="mRNA"

/strain="Ethiopian LV9"

/sub\_species="infantum"

/db\_xref="taxon:5662"

/dev\_stage="amastigote"

gene 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="AAB30592.1"

/db\_xref="GI:546454"

## ORIGIN

```
1 gagctcccc agcgaccctc tgggcaacgc gagcgcccca gtccccccac gcacaacttt
61 gaccgagcac aatgaagatc cgcagcgtgc gtccgcttgt ggtgttgctg gtgtgcgtcg
121 cggcgggtgct cgcactcagc gcctccgctg agccgcacaa ggcggccgtt gacgtcggcc
181 cgctctccgt tggcccgag tccgtcggcc cgctctctgt tggcccgag gctgttgcc
241 cgctctccgt tggcccgag tccgtcggcc cgctctctgt tggcccgag gctgttgcc
301 cgctctctgt tggcccgag tccgttgcc cgctctccgt tggcccgctc tccgttgcc
361 cgcagtctgt tggcccgctc tccgttggtc cgcagtccgt cggcccgctc tctgttggtc
```

421 cgcagtcctg cggcccgctc tccgttggcc cgcaggctgt tggcccgctc tccgttggcc  
481 cgcagtcctg cggcccgctc tctgttggcc cgcaggctgt tggcccgctc tctgttggcc  
541 cgcagtcctg tggcccgctc tccgttggcc cgcagtctgt tggcccgctc tccgttggct  
601 cgcagtcctg cggcccgctc tctgttggcc cgcagtcctg cggcccgctc tccgttggcc  
661 cgcagtctgt cggcccgctc tccgttggcc cgcagtcctg cggcccgctc tccgttggct  
721 cgcagtcctg tggcccgctc tccgttggcc cgcagtcctg tgacgtttct ccggtgtctt  
781 aaggctcggc gtcgcttct cgggtgtcgt aaagtatatg ccatgaggca tggtagcag  
841 gcaaacctg tcagcaatgt ggcaattatc taccctgca agagcaacag cagagctgag  
901 tgtcagggtg gccacagcac cagctcctg tgacactccg tggggtgtgt gtgacctg  
961 ctgctgttc caggcggatg aactgcgagg gccacagcag cgcaagtgc gttccaacc  
1021 ttgcgactt cagccacag acgcatagca ggccttgc tgcgcgcg catgcgggca  
1081 agccatctag atgcgctct ccacgacatg gccggaggcg gcagatgaag gcagcgaccc  
1141 ctttccccg gccacgacgc cgcgctgagg cgggccccac agcgcagaac tgcgagcg  
1201 gtgcgcggc gctgtgacgc acagccggca cgcagcgtac cgcacgcaga cagtgcattg  
1261 ggaggccgga ggagcaagag cgggtgacgg gaacggcgcg aagcatgcg cagccctcg  
1321 atgtgcctgt gtgggctgat gaggcgcgga tgcggaagc gtggcgagg catcccagt  
1381 tgcaccgtc agtctccag gccgaatgt gccgagcctg cggggagcag attatggat  
1441 gcggtgctc gaagcgaccg agggcgctga ccggaagggt gccacttcc tctcgggccc  
1501 tgtgcggcat ccgcccctga tgggagccc gaatggtggc cgcgcggtg aaggcgtgc  
1561 gccacccgc gtctcctgt ggcgccgtg ggggcagggt cgtgtggct gtgtatgtc  
1621 gctgatgtc tgactgttc gtgtgggct atgggcacgg tgagggcgga cgttggcct  
1681 tctgacttc ctctgcttc ttattattc cagtgcctcc gctggattg gctgcacgg  
1741 cggctgtat cgcgcttgc tctctattt gacggctgc cgcctccgc cctccact  
1801 cgtgctgtg gatggaggca cggccgggt ctgtgtgtg tgcaccgct gcaagaattc  
1861 agatgaggga ctgagcgagc agcagacaaa gcagcagcag caacaggaag gcaggcctga  
1921 gcagtttct tttctctt tgagactgc gactacggga atcagagacg tctcagaga  
1981 cgcgcatccg caccgcgag ctatgcttc tcttcttc tccgcccc tctgtgcg  
2041 ctgctgtct gcgtgtcgc agcgccgtg ccggcggtct ctctccctc ccttcgctc  
2101 tctttgcaa gcgttctt ttcacagcc gaacgttgc gctgcctgg aggcgttcc  
2161 cctcttct atctgtcat ttattttac acgtgcttt gcttggctt cctgacgat  
2221 cggccacct caccgcggtg tcagggcccc gcgcccactc ttgtgggca ggccaagtag  
2281 cctgcagcct gccatgagc acggctgtg actcttggt ccagcgga ggtgtggct  
2341 ggcgctgtc cgtgacac aacggtcat atgacgttg gaccagctca ctgaggatca  
2401 tgcgacgat tcaacgaat gcgcatcca cctactgct tctgcctt gctgcgtgc  
2461 ggtggtgct agcgtgttc cggggcctag cctgcgtgt acgacggc attcgggtg

2521 gctgagcggc gccaggcggg gctggccggc cctgctgctt ggcatagccg tggcgtgcag  
 2581 cagatgcgga tgggctgtgg ctgcgcatgc gtgtgtgcgt tgactgttc gtggtgggcg  
 2641 ggcacgtaaa cggcaaaatg cgctttggcg ttccggcgcc acgctccggc gctgggtcgg  
 2701 tattcgaata cgcgcctgaa gaggtggcga ggaaaatggc acgaggcgca gagggaaaaa  
 2761 acgaaaagtg caaagtgcgc aaaccgcgca gaaaatgcgg gaaaaacgaa aagtga

[014] The patent requests US570591, WO9506729, EP0716697 and MXPA03008832 report the amino acid sequence of the A2 protein. A2 is composed of a sequence of ten amino acids, repeated from forty to ninety times, depending on the "A2 family" gene that encodes it (Charest & Matlashewski. *Mol. Cell. Biol.*: 14, 1994; Zhang et al., *Mol. Bioch. Parasitol.*:78, 1996), as showed below:

MKIRSVRPLVLLVCVAAVLALSASAEPHKAAVDVGPLSVGPQSVGPLSVGPQAVGPL  
 SVGPQSVGPLSVGPQAVGPLSVGPQSVGPLSVGPQSVGPLSVGSQSVGPLS  
 VGPQSVGPLSVGPQAVGPLSVGPQSVGPLSVGPQAVGPLSVGPQSVGPLSVGPQS  
 VGPLSVGSQSVGPLSVGPQSVGPLSVGPQSVGPLSVGPQSVGPLSVGPQSVGPLSV  
 GPQSVDVSPVS.

[015] The patent request US5780591, besides describing the A2 native protein, i.e., describing how it is found in the parasite, claims its possible use as a vaccine or as a diagnosis antigen. The patent request US5733778 describes the DNA sequence of the A2 gene and its bacterial expression. The patent request US6133017 describes the obtainment of attenuated parasites (*Leishmania donovani*) by the deletion of the A2 gene, as well as their utilization as attenuated vaccines. The patents WO9506729, EP0716697 or MXPA03008832 are related one to another and claim the utilization of the A2 antigen in the form of a recombinant protein, DNA or attenuated parasites as a vaccine. In Brazil the patent request PI0208532 (PCT number CA0200437) was registered on INPI (*National Institute of Industrial Property*), under the generic title of "*vacina contra leishmania*" (vaccine against leishmania), which describes the invention of a DNA vaccine whose antigenic component is the A2 antigen, and also describes the processes for administering this DNA vaccine that induces immune response to *Leishmania* infection in the host to which it is administered.

[016] The experimental evidences that supported the protection requests for the vaccines above, however, consist essentially of two vaccination studies (Ghosh et al. *Vaccine*: 19, 2001; Ghosh et al., *Vaccine*: 20, 2002). In these studies experimental models (mice) were assessed, making use of the A2 antigen under the recombinant

protein associated to *Cornybacterium parvum*, as an adjuvant, or in DNA form with the plasmid pCDNA3/E6. According to those studies, animals immunised with the A2 antigen and challenged with *L. donovani* have presented significant reduction of the parasite load in the liver and high production of IFN- $\gamma$  and IgG2a antibodies specific to the A2 protein. Even though the vaccination with A2 DNA granted protection, the protection was more significant when the DNA was associated to the plasmid pCDNA3/E6. Albeit necessary for the validation of a vaccine formulation's efficacy, the assessment step in many experimental models cannot be considered conclusive, even when it presents positive results.

[017] The development of a vaccine that is effective in protecting the dog and, consequently, in lowering the chances of transmission to humans, would be of great relevance for the control of leishmaniasis. In Brazil, the Health and Agriculture Ministries, according to an edict that is available to public consultation ([www.mapa.gov.br](http://www.mapa.gov.br)), profess that this vaccine, once applied to the dogs, must be able to induce an immunologic response effective in reducing tissue parasitism and the transmission of the parasite to the vector insect. This can be verified through xenodiagnosis, polymerase chain reaction (PCR) or immunohistochemistry. In addition to this, the vaccine must allow the serologic distinction between vaccinated and infected dogs while employing low-cost laboratorial methods that are available to the public network, thus not encumbering the country's Health System. Therefore, the adoption of a vaccine as a new control measure must not interfere with the current control measures.

[018] This present invention proposes the employment of the specific amastigote A2 antigen in vaccine preparations as a solution for these aspects related to the development of a vaccine applicable to the epidemiologic context of leishmaniasis, especially in Brazil. Since it is a specific antigen of the amastigote form of various *Leishmania* species, the antibodies produced by the dogs in the vaccination process with this antigen are non-reactive to serologic diagnosis infection tests. This is due to the fact that in the laboratorial routine available to the Brazilian public health network these tests use antigens based on the promastigote form of the parasite, which is cheaper to obtain.

[019] After many assessments and the verification of antigen A2 efficacy in inducing protection against infection by *L. chagasi* and *L. amazonensis*, the main *Leishmania* species that cause VL in Brazil, and after characterizing the immune response induced by the antigen A2 in mice, the vaccine formulation described below,

to be used in dogs, was developed. The capacity of this formulation to induce adequate humoral and cellular immune response in dogs was then assessed considering that it must be adequate for use as a VL vaccine in the epidemiologic context of this disease in regions where the sacrifice of seropositive animals is adopted as a control measure. Currently, the diagnosis tests used in the public health network do not allow the serologic distinction between infected animals and those which received vaccines made of antigens of promastigote forms of the parasite. The object of this present request is a formulation which allows such distinction, since it is made of an antigen of amastigote forms of the parasite, avoiding the sacrifice of healthy animals, which, therefore, have not contracted the disease.

[020] The invention here described thus presents a new vaccine formulation composed of the recombinant A2 protein, associated to adjuvants such as saponin, which is non-limiting and presents proven efficacy in inducing adequate protection and immune response – not only in experimental models, but also in dogs.

[021] The formulation is composed of the A2 antigen of *Leishmania*, produced in *Escherichia coli*, in the recombinant protein (or antigen) form. The qualitative and quantitative formulas contain:

|                                       |                     |
|---------------------------------------|---------------------|
| Recombinant A2-HIS (rA2) protein..... | 50 a 200,00 µg/mL   |
| Saponin .....                         | 0,125 a 0,500 mg/mL |
| q.s.p tamponed saline solution.....   | 1,00 mL             |
| Thimerosal.....                       | 0,01 mL             |

[022] For the production of the recombinant A2 protein the coding sequence of this antigen was cloned in the pET protein expression vector. The BL21 *Escherichia coli* strain was transformed, and thereby the A2 protein was expressed with a tail of six Histidine amino acids, which allows the purification of the recombinant protein through affinity chromatography for nickel. Electrophoresis tests in SDS-PAGE systems, Western-Blot tests and DNA sequencing confirmed the identity of the A2 protein cloned in *E. coli*. The expression of the Recombinant A2 protein (rA2) was obtained after the induction of the bacterial cultivation with 1,0 mM of IPTG (isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside). The rA2 protein was purified through affinity chromatography in a column containing nickel ions. After being purified, the integrity and purity of the protein were assessed through the Immuno Blot technique. The adjustment of the protein's concentration per mL is done using the tamponed saline solution containing 0,5 mg saponin and thimerosal.

[023] The main innovation of the formulation of this vaccine is its capacity to induce cellular immune response in dogs, characterised by the induction in high levels of IFN- $\gamma$ , and humoral immune response, characterised by the production of specific antibodies against the vaccine antigen that, yet, do not react to the non-soluble (brute) or soluble extract of the promastigote forms of *Leishmania* in the ELISA tests or in the immunofluorescence reaction.

[024] This way, the dogs vaccinated with the vaccine formulation remain seronegative after each of the vaccine doses necessary to the immunisation process, allowing for the serologic distinction between animals vaccinated with A2 and those infected, which are seropositive in the ELISA tests, by means of the non-soluble (brute) or soluble extract of the parasites.

[025] This way, dogs vaccinated with this vaccine formulation remain seronegative after each of the vaccine doses necessary to the immunisation process. It is thus possible to perform the serologic distinction between only vaccinated with A2 from those infected, which are seropositive in ELISA tests or in reaction with the brute or soluble parasite extract.

[026] The results described above can be demonstrated by the following examples:

[027] **Example 1: protection levels induced against the infection by *L. amazonensis* in BALB/c mice immunised with the A2 antigen**

[028] The immunisation with the A2 antigen, in the Recombinant A2 protein (rA2) form associated to rIL-12 as an adjuvant, or in the A2 DNA form, was effective in granting protection to BALB/c mice against the challenge-infection by *L. amazonensis*. In the assessment of the immunised and challenged animals a significant reduction of the average size of the wounds was observed, as well as a reduction in the parasite load in the infected paws (images 1 and 2).

[029] Figure 1 presents the evaluation of the average size of the wounds on the infected paws of BALB/c mice immunised with the Recombinant A2 protein (rA2), associated or not to rIL-12, to rIL-13, to A2 DNA or to pCDNA3 DNA and challenged with *L. amazonensis*. BALB/c mice groups (n=6, for example) were immunised with A2 DNA, in the left tibial muscle, in intervals of 21 days. Control groups received only PBS or were immunised with the empty plasmid (pCDNA3 DNA). As an adjuvant control, mice were also subcutaneously immunised with the rA2 protein, associated or not to rIL-12 or only with rIL-12. The mice were challenged with  $1 \times 10^6$  *L. amazonensis* promastigotes in stationary growth phase, in the plantar fascia. The evolution of the

wounds' size was monitored through weekly measurement of the width of the infected and the not infected paw. Each point represents the average, with the standard deviation added to or subtracted from it (in mm), obtained by the difference between the width of the infected and the not infected paw.

[030] Figure 2 represents the Evaluation of the parasite load in the infected paws of BALB/c mice immunised with the recombinant A2 protein (rA2), associated or not to rIL-12, to rIL-13, to A2 DNA or to pCDNA3 DNA and challenged with *L. amazonensis*. BALB/c mice groups (n=6, for example) were immunised with 2 100 µg doses of A2 DNA, in the left tibial muscle, in intervals of 21 days. Control groups received only PBS or were immunised with the empty plasmid (pCDNA3 DNA). As an adjuvant control, mice were also subcutaneously immunised with the rA2 protein, associated or not to rIL-12 or only with rIL-12. 28 days after the last dose, the mice were challenged with  $1 \times 10^8$  *L. amazonensis* promastigotes in stationary growth phase, in the plantar fascia. About eight weeks after the challenge-infection, the parasite load in the animals (n=4 per group) was determined by the limiting dilution technique, as described in the Material and Methods Section. Each bar represents the average, with the standard deviation added to or subtracted from it, corresponding to the logarithm of the number of parasites obtained by mg of tissue. Differences between the averages were verified by the Student-*t* test, being considered significant for p below 0,05.

[031] **Example 2: cellular and humoral immune response in BALB/c mice immunised with the A2 antigen and challenged with *L. amazonensis***

Animals immunised with A2 DNA or with rA2/rIL-12 and challenged with *L. (L.) amazonensis* presented significant production of IFN-γ after the *in vitro* stimulation of splenocytes with the rA2 protein or with the total extract of *L. (L.) amazonensis* promastigotes (SLA) (Image 3). In addition to this, low levels of IL-4 and IL-10 were observed in these groups, as compared to the control groups, after stimulation of the cells with the rA2 protein or with SLA of *L. (L.) amazonensis* (Figures 4 and 5).

[032] Figure 3 is a graph that represents the IFN-γ production by splenocytes of BALB/c mice immunised with the Recombinant A2 protein (rA2), associated or not to rIL-12, with rIL-12, A2 DNA or pCDNA3 DNA and challenged with *L. (L.) amazonensis*. Spleen cells of BALB/c mice were collected before the challenge-infection, or approximately eight to nine weeks after the challenge in the case of those immunised with *L. (L.) amazonensis*. As controls, non-stimulated cells or cells stimulated with concanavalin A (5 µg/ml) were assessed, in order to assess cellular viability. The cultivations were incubated for 48 hours in an oven at 37°C, with the presence of CO<sub>2</sub>

at 5%. After this, the overflow was collected and the IFN- $\gamma$  production was determined by capture ELISA. The axis of abscissas indicates the stimulus used in cellular cultivation, and also the moment when the cells were collected: before or after the challenge-infection. The axis of ordinates indicates the concentration, in pg/ml, of IFN- $\gamma$ . Each bar represents the average production of IFN- $\gamma$ , with the standard deviation of each group added to or subtracted from it.

[033] Figure 4 represents the IL-4 production by splenocytes of BALB/c mice immunised with the Recombinant A2 protein (rA2), associated or not to rIL-12, with rIL-12, A2 DNA or pCDNA3 DNA and challenged with *L. (L.) amazonensis*. Spleen cells of BALB/c mice were collected before the challenge-infection, or approximately eight to nine weeks after the challenge in the case of those immunised with *L. (L.) amazonensis*. The cells were cultivated ( $1 \times 10^6$ /ml) in 1 ml complete DMEM medium and stimulated with the rA2 protein (10  $\mu$ g/ml) and with SLA of *L. (L.) amazonensis* (50  $\mu$ g/ml). As controls, non-stimulated cells or cells stimulated with concanavalin A (5  $\mu$ g/ml) were assessed, in order to assess cellular viability. The cultivations were incubated for 48 hours in an oven at 37°C, with the presence of CO<sub>2</sub> at 5%. After this, the overflow was collected and the IL-4 production was determined by capture ELISA. The axis of abscissas indicates the stimulus used in cellular cultivation, and the moment when the cells were collected: before or after the challenge-infection. The axis of ordinates indicates the concentration, in pg/ml, of IL-4. Each bar represents the average production of IL-4, with the standard deviation of each group added to or subtracted from it.

[034] Figure 5 shows the graph representing the production of IL-1 by splenocytes of BALB/c mice immunised with the Recombinant A2 protein (rA2), associated or not to rIL-12, with rIL-12, A2 DNA or pCDNA3 DNA and challenged with *L. (L.) amazonensis*. Spleen cells of BALB/c mice were collected before the challenge-infection, or approximately eight to nine weeks after the challenge in the case of those immunised with *L. (L.) amazonensis*. The cells were cultivated ( $1 \times 10^6$ /ml) in 1 ml of complete DMEM medium and stimulated with the rA2 protein (10  $\mu$ g/ml) and with SLA of *L. (L.) amazonensis* (50  $\mu$ g/ml). As controls, non-stimulated cells or cells stimulated with concanavalin A (5  $\mu$ g/ml) were assessed, in order to assess cellular viability. The cultivations were incubated for 48 hours in an oven at 37°C, with the presence of CO<sub>2</sub> at 5%. After this, the overflow was collected and the IL-10 production was determined by capture ELISA. The axis of abscissas indicates the stimulus used in cellular cultivation, and the moment when the cells were collected: before or after the

challenge-infection. The axis of ordinates indicates the concentration, in pg/ml, of IL-10. Each bar represents the average production of IL-10, with the standard deviation of each group added to or subtracted from it.

[035] In the assessment of humoral immune response (Image 6), serum samples collected from animal immunised with rA2/rIL-12 or with A2 DNA and challenged with *L. amazonensis* showed high production of IgG2a antibodies specific to the rA2 protein (anti-rA2) and low production of antibodies specific to the parasite (anti-SLA), as opposed to what was observed in control groups (COELHO et al. *Infect. Immun.*: 71, 2003; COELHO. TESE, PhD in Immunology. Belo Horizonte: Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, 2004).

[036] Picture 6 shows the production of total IgG in serum samples of BALB/c mice immunised with the Recombinant A2 protein (rA2), associated or not to rIL-12, with rIL-12, A2 DNA or pCDNA3 DNA and challenged with *L. (L.) amazonensis*. Serum samples of BALB/c mice were collected before the challenge-infection, or approximately eight to nine weeks after the challenge in the case of those immunised with *L. (L.) amazonensis*. The plates were sensitised with the rA2 protein (250 ng/well) or with *L. amazonensis* SLA. The production of total IgG was determined by capture ELISA. On the axis of abscissas is the total IgG class specific to the rA2 protein or to the *L. amazonensis* SLA, and the moment when the samples were collected: before or after the challenge-infection. The axis of the ordinates shows the absorbency at wavelength of 492 nm. Each bar represents the average production of total IgG, with the standard deviation of each group added to or subtracted from it.

[037] In the assessment of the sub-classes IgG1 and IgG2a specific to the rA2 protein or specific to antigens of the parasite (SLA), it can be observed (Image 7) that serum samples collected from animals immunised with rA2/rIL-12 or with A2 DNA and challenged with *L. amazonensis* were predominant in the production of IgG2a antibodies specific to the rA2 protein (anti-rA2), when compared to the levels of IgG1 anti-rA2 antibodies obtained. Animals immunised with A2 remained, however, seronegative in tests using antigens of promastigote form of *Leishmania* (SLA) (Coelho et al., 2003; Coelho, 2004).

[038] Picture 7 describes the production of IgG1 and IgG2a in serum samples of BALB/c mice immunised with the Recombinant A2 protein (rA2), associated or not to rIL-12, with rIL-12, A2 DNA or pCDNA3 DNA and challenged with *L. (L.) amazonensis*. Serum samples of BALB/c mice were collected before the challenge-infection, or approximately eight to nine weeks after the challenge in the case of those immunised

with *L. (L.) amazonensis*. The plates were sensitised with the rA2 protein (250 ng/well) or with *L. amazonensis* SLA. The production of IgG1 and IgG2a was determined by capture ELISA. The axis of abscissas shows indications of the IgG1 and IgG2a sub-classes specific to the rA2 protein or specific to the *L. amazonensis* SLA, and the moment when the samples were collected: before or after the challenge-infection. The axis of the ordinates shows the absorbency at wavelength of 492 nm. Each bar represents the average production of IgG1 or IgG2a, with the standard deviation of each group added to or subtracted from it.

[039] **Example 3: protection levels induced against the infection by *L. chagasi* in BALB/c mice immunised with the A2 antigen**

[040] The A2 antigen, when administered in the A2 DNA form, also proved to be effective in granting protection to BALB/c mice against the challenge-infection with *L. chagasi*, the main etiologic agent of Visceral Leishmaniasis in South American countries. The immunised and challenged animals displayed expressive reduction in the parasite load in the liver (Image 8) and in the spleen (Image 9).

[041] Picture 8: Assessment of the parasite load in the liver of BALB/c mice immunised with A2 DNA and challenged with *L. chagasi*. Groups of BALB/c mice (n=6 per group), after the immunisation protocols, were challenged with  $1 \times 10^7$  *L. chagasi* promastigotes in stationary growth phase, by endovenous method, as described in the Material and Methods Section. Thirty-five days after the challenge the animals (n=4 per group) were sacrificed and the liver was recovered, in order to determine the parasite load. The bars represent the average log of the number of parasites per organ, with the standard deviation of each group added to or subtracted from it. The average log of the total number of parasites per organ was compared through a Student-*t* test. Statistical differences were considered significant for p lower than 0,05. There was a significant difference between the hepatic parasite load of animals from the A2 DNA group and those from the PBS group (p is lower than 0,0005) and from the pCI group (p is lower than 0,005).

[042] Picture 9 shows the result of the assessment of the parasite load in the spleen of BALB/c mice immunised with A2 DNA and challenged with *L. chagasi*. Groups of BALB/c mice (n=6 per group), after the immunisation protocols, were challenged with  $1 \times 10^7$  *L. chagasi* promastigotes in stationary growth phase, by endovenous method, as described in the Material and Methods Section. Thirty-five days after the challenge, the animals (n=4 per group) were sacrificed and the spleen was recovered, in order to determine the parasite load. The bars represent the average

log of the number of parasites per organ, with the standard deviation of each group added to or subtracted from it. The average log of the total number of parasites per organ was compared through a Student-*t* test. Statistical differences were considered significant for *p* lower than 0,05. There was a significant difference between the spleen parasite load of animals from the A2 DNA group and those from the PBS and pCI groups (*p* is lower than 0,005 and 0,05, respectively).

[043] **Example 4: cellular immune response in BALB/c mice immunised with the A2 antigen and challenged with *L. amazonensis***

[044] BALB/c mice immunised with the A2 antigen, in the DNA form, and challenged with *L. chagasi* produced significantly higher levels of IFN- $\gamma$  (Figure 10) and significantly lower levels of IL-10 (Figure 11) after the stimulus of the splenocytes with the rA2 protein or with the total extract of *L. chagasi* proteins (LcPA), as compared to the animals from the control group.

[045] Figure 10: graph of the production of IFN- $\gamma$  by splenocytes of BALB/c mice immunised with A2 DNA before and after the challenge with *L. chagasi*. Spleen cells of immunised BALB/c mice were collected four weeks after immunisation or approximately nine weeks after infection with *L. chagasi*. The cells ( $2 \times 10^5$  cells per ml) were cultivated in full DMEM and stimulated with the rNH, rA2 or rLACK recombinant proteins (concentrations of 10  $\mu\text{g/mL}$ ) or with the protein extract from *L. chagasi* (50  $\mu\text{g/mL}$ ). The overflows were collected 48 hours after the cultivation and stimulation of the cells. The production of IFN- $\gamma$  was determined by capture ELISA. The axis of the abscissas indicates the stimuli used in cellular cultivation, and the axis of the ordinates indicates the concentration of IFN- $\gamma$  (pg/mL). Each bar represents the average, with the standard deviation of each group's IFN- $\gamma$  production added to or subtracted from it. The IFN- $\gamma$  base production is 428,0, to which is added or subtracted 66,45 pg/mL. (\*) indicates significant difference in relation to the PBS and DNA control groups, evaluated by the Student-*t* test. The values are considered significant for *p* lower than 0,05.

[046] Picture 11 shows the production of IL-10 by splenocytes of BALB/c mice immunised with plasmids of AH DNA, A2 DNA, LACK DNA or their associations before and after the challenge with *L. chagasi*. Groups of BALB/c mice (*n*=6 per group), after the immunisation protocols, were challenged with  $1 \times 10^7$  *L. chagasi* promastigotes in stationary growth phase, by endovenous method, as described in the Material and Methods Section. Twenty-eight days after the immunisation or thirty-five days after the challenge-infection the spleen cells were cultivated in complete DMEM medium and

stimulated with the rNH, rA2 or rLACK recombinant proteins (of 10 µg/mL) or with the soluble extract from *L. chagasi* (LcPA, 50 µg/mL). The overflows were collected 48 hours after the cultivation and stimulation of the cells. The production of IFN-γ was determined by capture ELISA. The axis of the abscissas indicates the stimuli used in cellular cultivation, and the axis of the ordinates indicates the concentration of IL-10 (pg/mL). Each bar represents the average IL-10 production, with each group's standard deviation added to or subtracted from it. The IL-10 base production is 653,5, to which is added or subtracted 59,6 pg/mL. (\*) indicates significant difference in relation to the PBS group and (\*\*) indicates that there is significant difference in relation to both the PBS and DNA groups. The statistical analysis is done by the Student-*t* test. The values are considered significant for p lower than 0,05.

[047]            **Example 5: cellular and humoral immune response induced by immunisation with the A2 antigen in Beagle dogs**

[048]            Beagle dogs were divided in groups and immunised with three doses of the A2/saponin vaccine formulation in intervals of 21 days, by subcutaneous method, according to the immunisation protocol described below. As controls, groups of animals were immunised with an adjuvant (saponin), or received only PBS.

| GROUPS                  | IMMUNISATION METHOD             |
|-------------------------|---------------------------------|
| GROUP 1 (n=17)          | A2 antigen                      |
| GROUP 2 (n=7)           | Saponin                         |
| GROUP 3 (control) (n=7) | Phosphate Buffered Saline (PBS) |

[049]            After the administration of each dose, the humoral response was assessed by determination of the total IgG antibodies level through the ELISA method. It was also assessed by the determination of the IgG1 and IgG2 isotypes, which are indirect markers of the induction of Th2 and Th1 cellular response, respectively. The level of antibodies produced against the vaccine antigen and against the total extract of antigens of total promastigote forms (classic VL diagnosis method) was assessed.

[050]            As it can be seen in figures 12 and 13, animals vaccinated with the vaccine formulation present serologic reaction against the vaccine antigen, but remain seronegative in the reaction with the total parasite extract. As a result, it is possible to perform serologic distinction between the animals only vaccinated with A2 and those infected, which are seropositive in ELISA tests, in a reaction with the non-soluble (brute) or soluble extract of the parasites.

[051] Therefore, the main innovation of this vaccine formulation is its capacity to induce humoral immune response in dogs. This is characterised by the production of antibodies specifically against the vaccine antigen, which, however, do not react with the non-soluble (brute) or soluble extract of the promastigote forms of *Leishmania* in the ELISA tests or in the immunofluorescence reaction (data not presented).

[052] Figure 12 presents a graph with the levels of total IgG, IgG1 and IgG2 antibodies in serum samples from dogs, before and after each dose of the immunisations as well as before and after the challenge-infection with *L. chagasi*. The ELISA plates were sensitised with the Recombinant A2 protein (250 ng) or with *L. chagasi* LcPA (1 µg/well). Total IgG production was determined by direct ELISA; IgG1 and IgG2 production was determined by indirect ELISA. The axis of the ordinates represents absorbency at wavelength of 492nm. On the axis of the abscissas, each bar indicates the average production of total IgG and of the IgG1 and IgG2 sub-classes, with each group's standard deviation added to or subtracted from it.

[053] The part of the invention herein described refers to the production of IFN in response to the vaccine antigen. The cellular immune response was assessed by means of the IFN-γ dosage through the capture ELISA, after collecting and cultivating the peripheral blood mononuclear cells (PBMC) *in vitro* and stimulating them with the recombinant A2-HIS protein or with the *L. chagasi* soluble extract (LcPA). The cells were also stimulated with concanavalin A (ConA), as a control for cellular viability. In addition to this, a basal control was made, in which the cells were not stimulated.

[054] As can be seen in Figure 13, the animals immunised with the A2 antigen/saponin vaccine composition produced significantly higher levels of IFN-γ in cellular cultivations stimulated with the recombinant A2 protein, as compared to the groups "Control" ( $p=0,003926799$ ) and "Adjuvant" ( $p=0,018896129$ ), under the same stimulus. Comparing the IFN-γ production of the dog groups assessed in the non-stimulated cellular cultivations and in the cultivations stimulated with LcPA and with ConA, statistically significant differences were not found. In addition to this, the production was significantly higher in the cells stimulated with the A2-HIS protein, as compared to the non-stimulated ones ( $p=0,001374901$ ), to the ones stimulated with ConA ( $p=0,00199055$ ) or to the ones stimulated with LcPa ( $p=0,015277637$ ) – assessing the group immunised with the A2 antigen/saponin vaccine composition. Statistically significant differences were not found inside the "Adjuvant" and "Control" groups under the same stimulus (Figure 13).

[055] The animals of the "Vaccinated" group displayed significantly higher production of IgG2, specific to the rA2, as compared to IgG1, before and after the challenge infection with *L. chagasi* ( $p=0,0000000004$  and  $p=0,0000000615$ , respectively). This was also observed in the "Control" group, after the challenge infection ( $p=0,0341668528$ ). Dogs of the "Vaccinated" group, before and after the challenge-infection, displayed a IgG1/IgG2 ratio smaller than 1, which is an indicative of Th1 response (0,12224007 and 0,1085985, respectively) (Table 1). The dogs of the "Adjuvant" and "Control" groups, on the other hand, produced really low quantities of these antibodies (Figure 12). The IgG1/IgG2 ratios, before and after the infection, are 2,1096344 and 0,52443 for the "Adjuvant" group, and 0,9171905 and 0,4106352 for the "Control" group (Table 1).

| Sensitising Agent |                      |                     |
|-------------------|----------------------|---------------------|
| A2-HIS PROTEIN    |                      |                     |
| Assessed group    | Before the challenge | After the challenge |
| Vaccinated        | 0,122241             | 0,108599            |
| Adjuvant          | 2,109744             | 0,52443             |
| Control           | 0,917787             | 0,410635            |

Table 1: Ratio of the IgG1/IgG2 sub-classes in serum samples of dogs immunised with the rA2 protein (vaccinated) and of dogs from the Adjuvant and Control groups (PBS), before and after the challenge-infection (period of one month) with *L. chagasi*. The plates were sensitised with the recombinant A2-HIS protein (250 ng) or with *L. chagasi* LcPA (1µg/well). The production of the IgG1 and IgG2 sub-classes was determined by indirect ELISA.

[056] These results show that the vaccine formulation induces the development of Th1 response, which relates to the profile observed in asymptomatic or infection-resistant dogs (Pinelli *et al.*, 1994; Quinnell *et al.*, 2001; Santos-Gomes *et al.*, 2002).

[057] Figure 13 displays a graph representing the production of IFN-γ by peripheral blood mononucleated cells (PBMC) from Beagle dogs immunised with the A2 antigen/saponin vaccine formulation, before the challenge-infection with *L. chagasi*. The cells were cultivated ( $1 \times 10^6$ /ml) in one ml of complete DEMEM medium and stimulated with the recombinant A2 protein (10 µg/mL) and with *L. chagasi* LcPA, at 50 µg/mL concentration. As the control, non-stimulated cells (Middle) were assessed. Concanavalin A (2,5 ), a mitogen, was also used as a control to assess cellular

viability. The cultivations were incubated in an oven at 37°C, with 5% CO<sub>2</sub>. After 48 hours the overflow was collected and the IFN- $\gamma$  production was determined by capture ELISA. The axis of the ordinates represents the concentration, in pg/ml, of IFN- $\gamma$ . The axis of the abscissas shows the dog groups, where "Vaccinated" corresponds to the group of dogs which received the A2 antigen/saponin vaccine formulation, "Adjuvant" corresponds to the group which received only the adjuvant, and "Control" to the group that received PBS. Each bar represents the average IFN- $\gamma$  production and each group's standard deviation. \* indicates significant difference between the Vaccinated and Adjuvant (A2-HIS) groups,  $p=0,018896129$ . \*\* indicates significant difference between the Vaccinated and Control (A2-HIS) groups,  $p=0,003926799$ ; Student- $t$  test (Excel).

**What is claimed is:**

1. A recombinant vaccine for leishmaniasis that allows the serologic distinction between vaccinated and infected canine species with *Leishmania*.
2. A recombinant vaccine for leishmaniasis according to claim 1, wherein said vaccine contains recombinant A2 antigen of promastigote forms of *Leishmania*.
3. A recombinant vaccine for leishmaniasis, according to claims 1 and 2, characterised by inducing humoral immune response in canine species through the production of specific antibodies against A2 antigen.
4. A recombinant vaccine for leishmaniasis, according to claim 1-3, characterised by inducing cellular immune response in canine species through elevated levels of IFN- $\gamma$ .
5. A recombinant vaccine for leishmaniasis according to claims 1-4, characterised by the maintenance of negative results to the conventional serologic tests for leishmaniasis in canine species.
6. A recombinant vaccine for leishmaniasis according to claims 1-5, which comprises one or more of a pharmaceutically acceptable excipient, carrier, buffer, stabiliser, isotonicizing agent, preservative or anti-oxidant.
7. A method to enhance immune response against leishmaniasis which allows the serologic distinction between vaccinated and infected canine species with *Leishmania*.
8. A method to enhance immune response against leishmaniasis according to claim 7, characterised by the maintenance of negative results to the conventional serologic tests for leishmaniasis in canine species.
9. A method to enhance immune response against leishmaniasis according to claim 7 and 8, wherein said method comprises the use of recombinant A2 antigen of promastigote forms of *Leishmania*.
10. A method to enhance immune response against leishmaniasis according to claim 7-9, which induces an humoral immune response in canine species through the production of specific antibodies against A2 antigen.

11. A method to enhance immune response against leishmaniasis according to claim 7-10, which induces a cellular immune response in canine species through elevated levels of IFN- $\gamma$ .

Figure 1

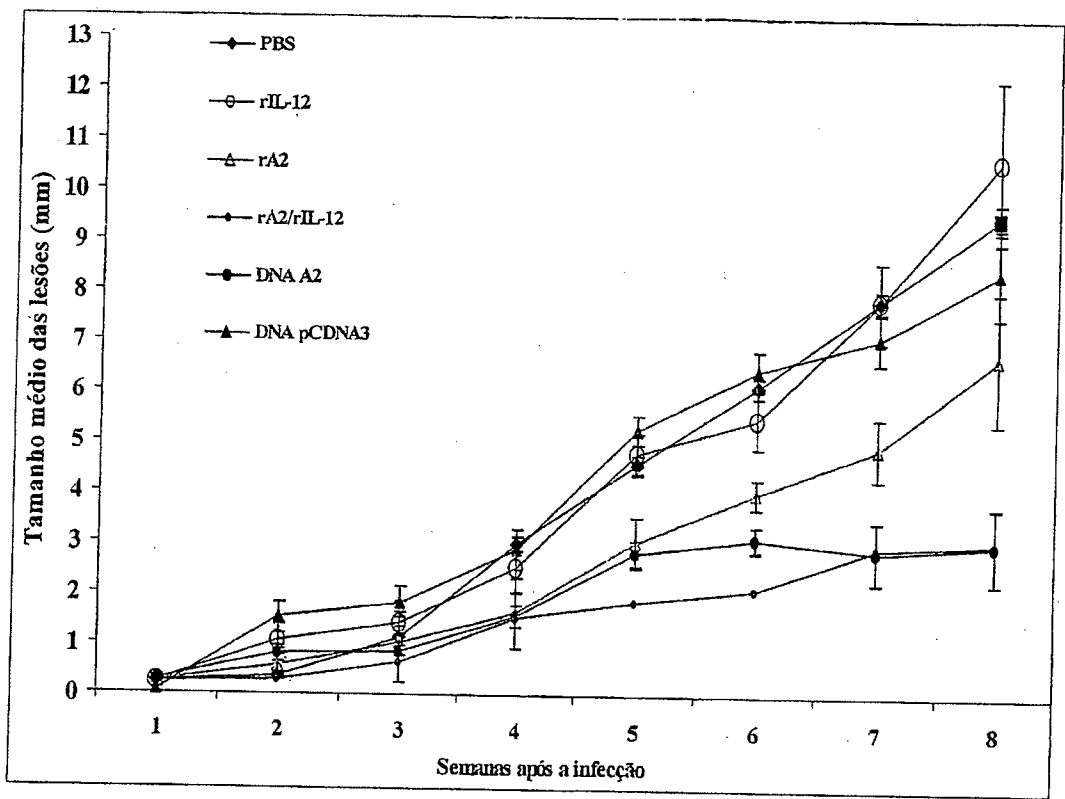


Figure 2

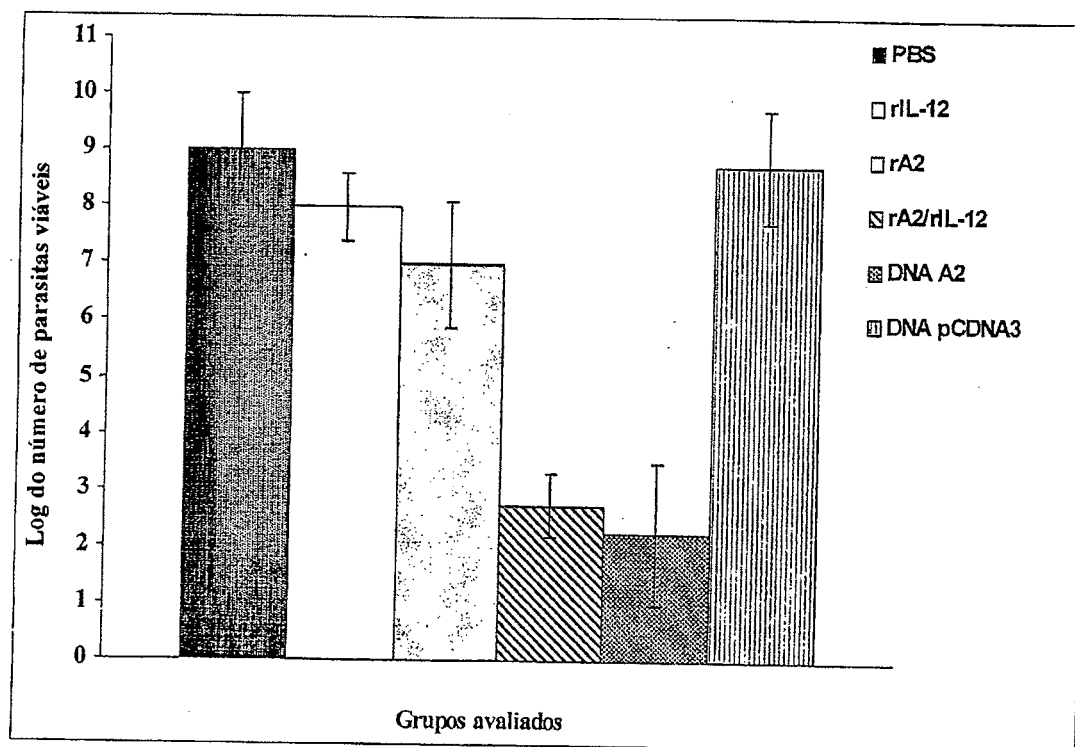


Figure 3

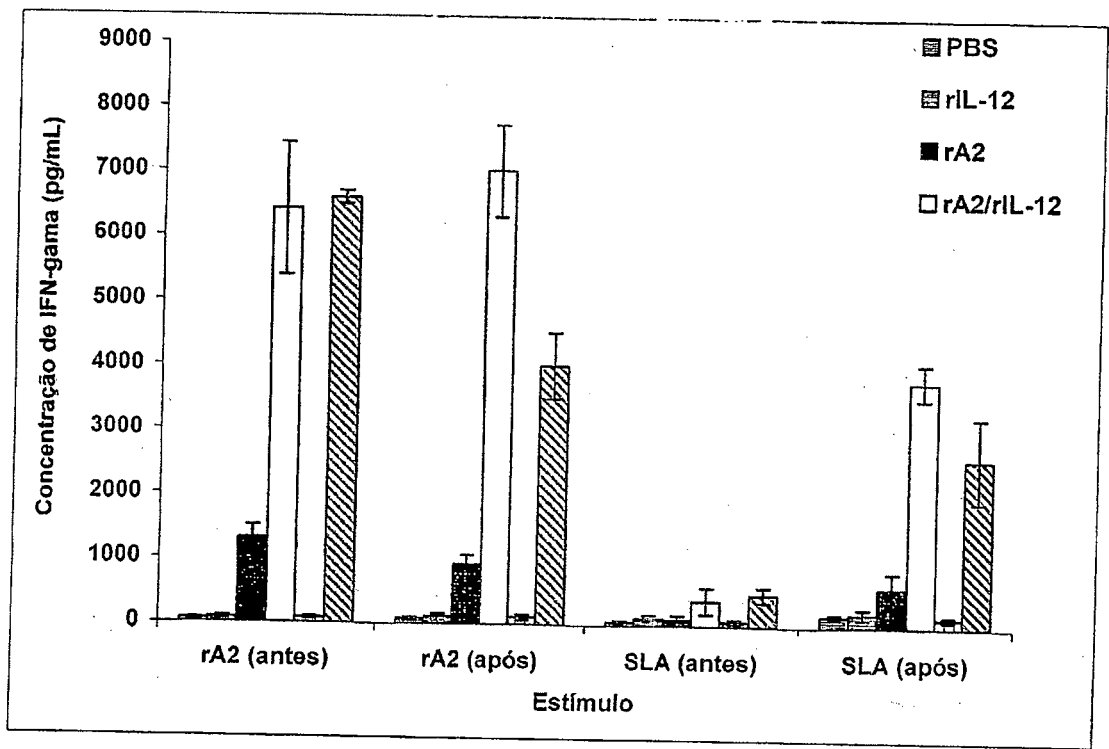


Figure 4

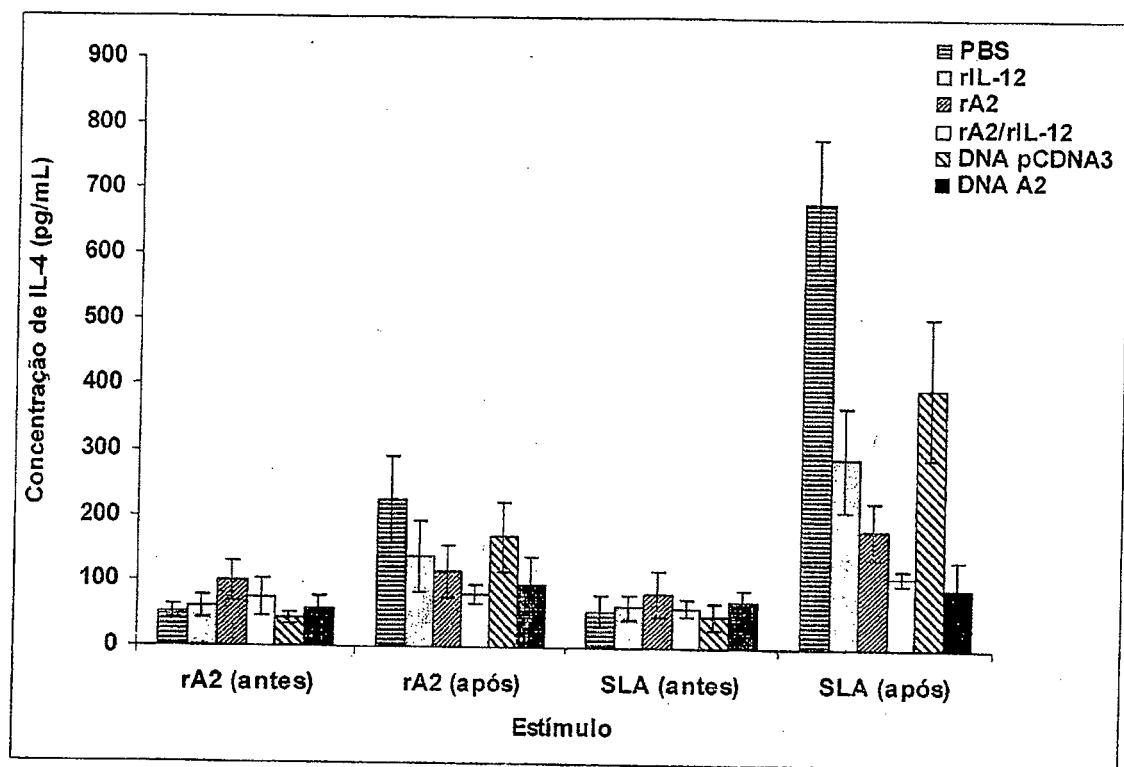


Figure 5

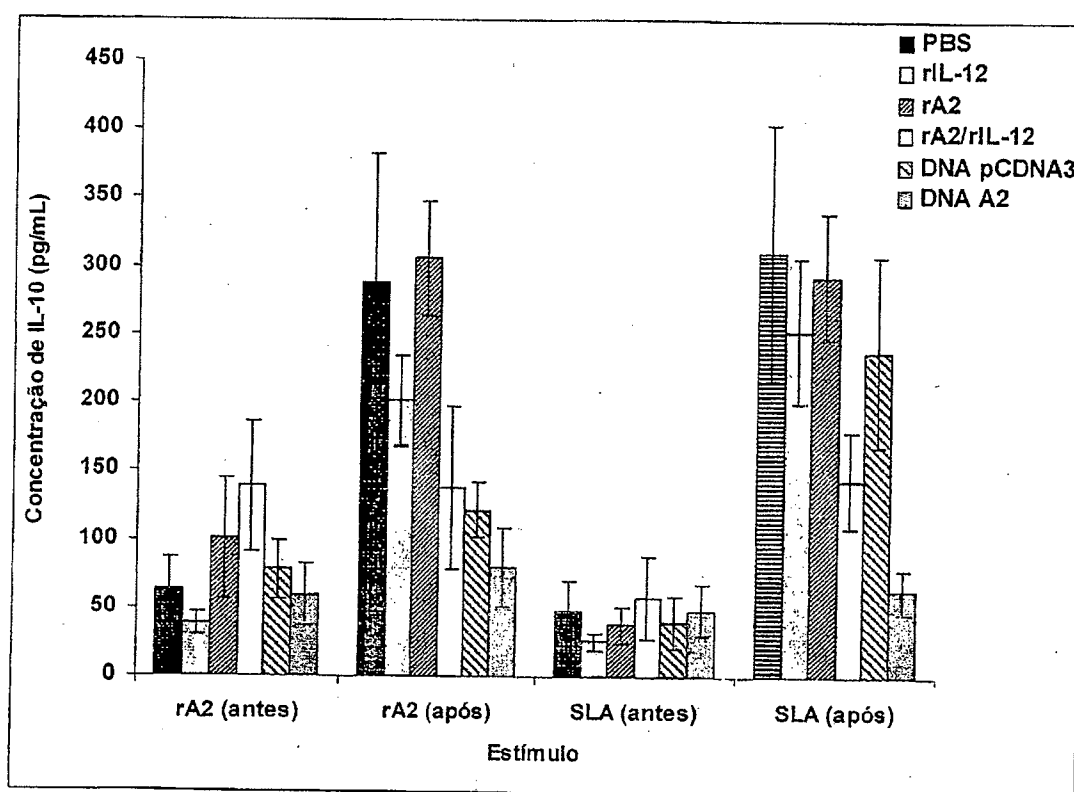


Figure 6

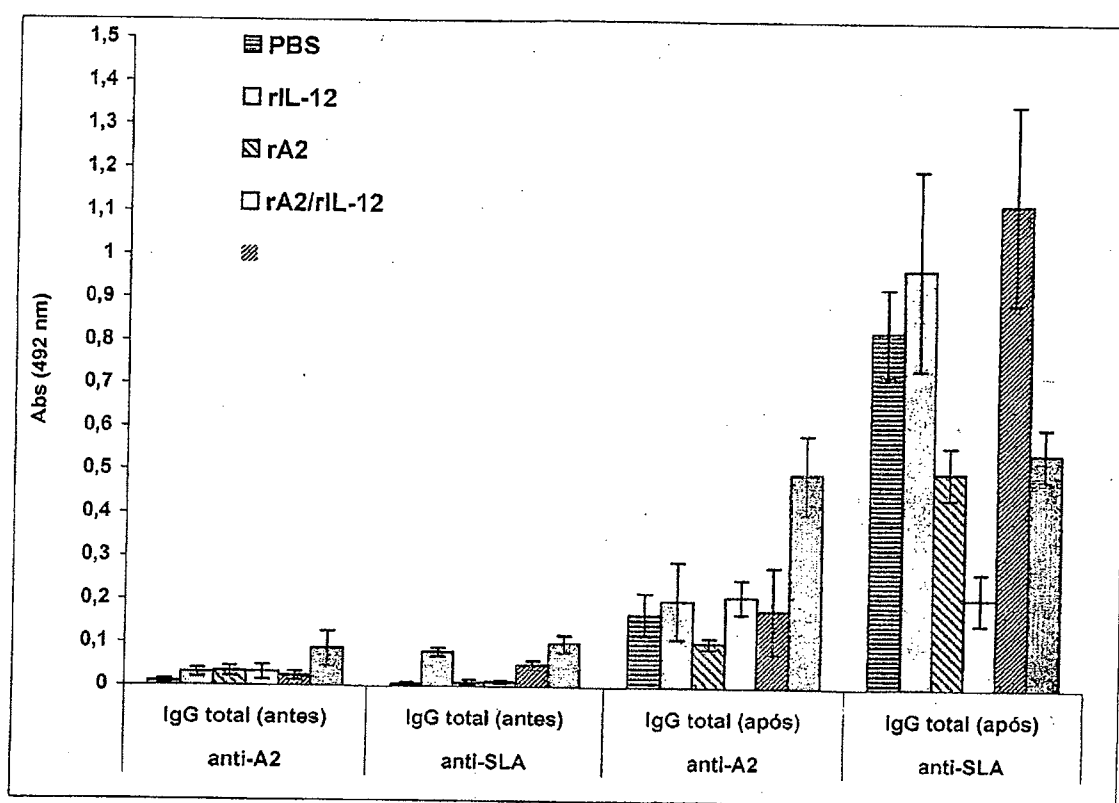


Figure 7

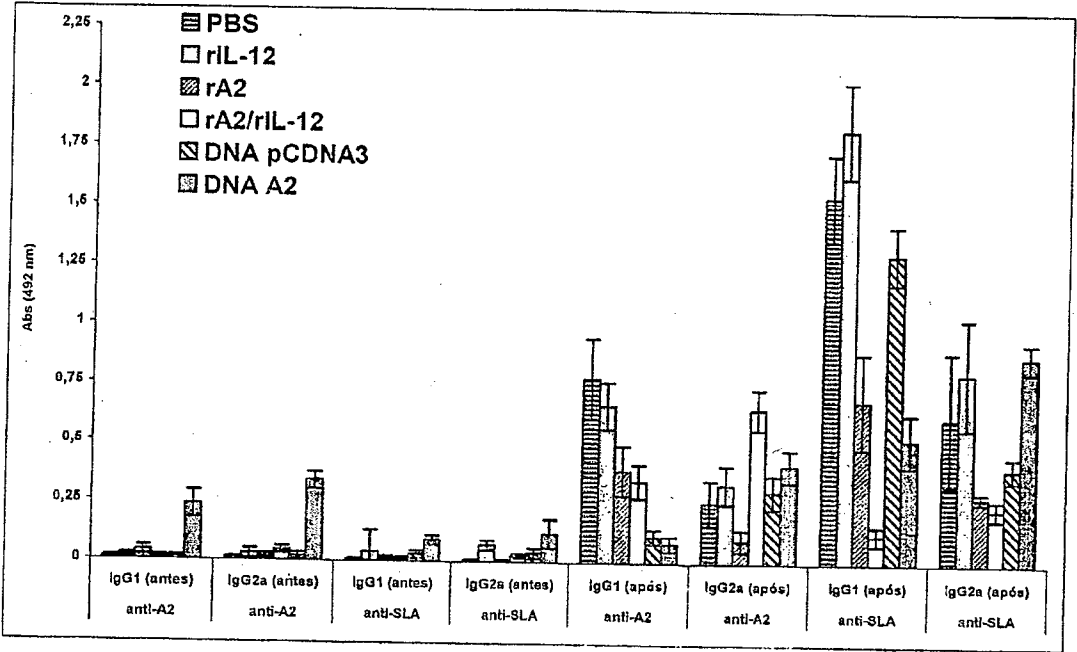


Figure 8

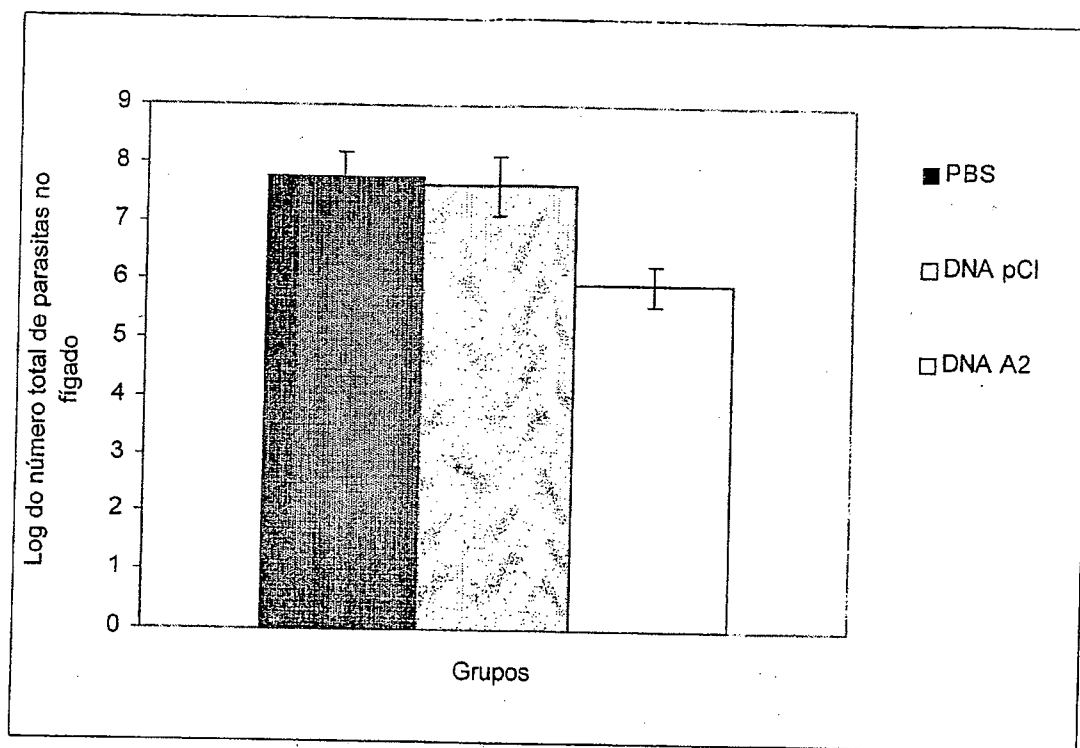


Figure 9

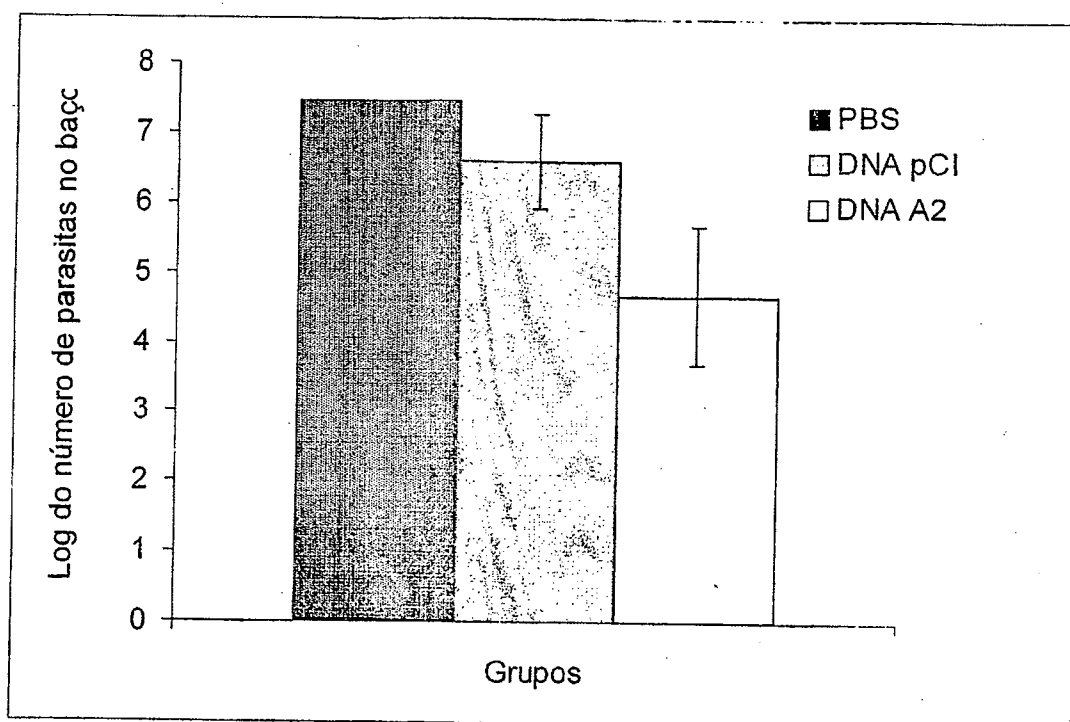


Figure 10

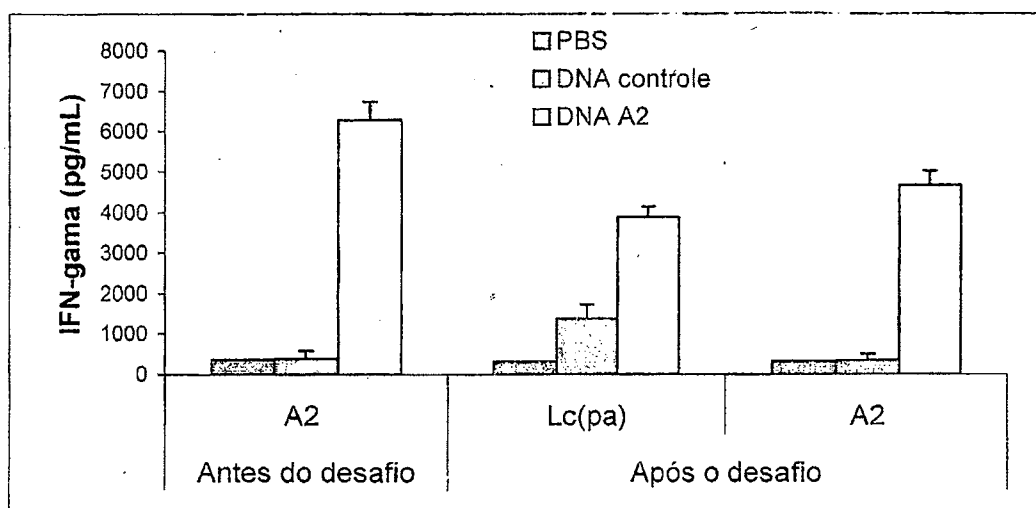


Figure 11

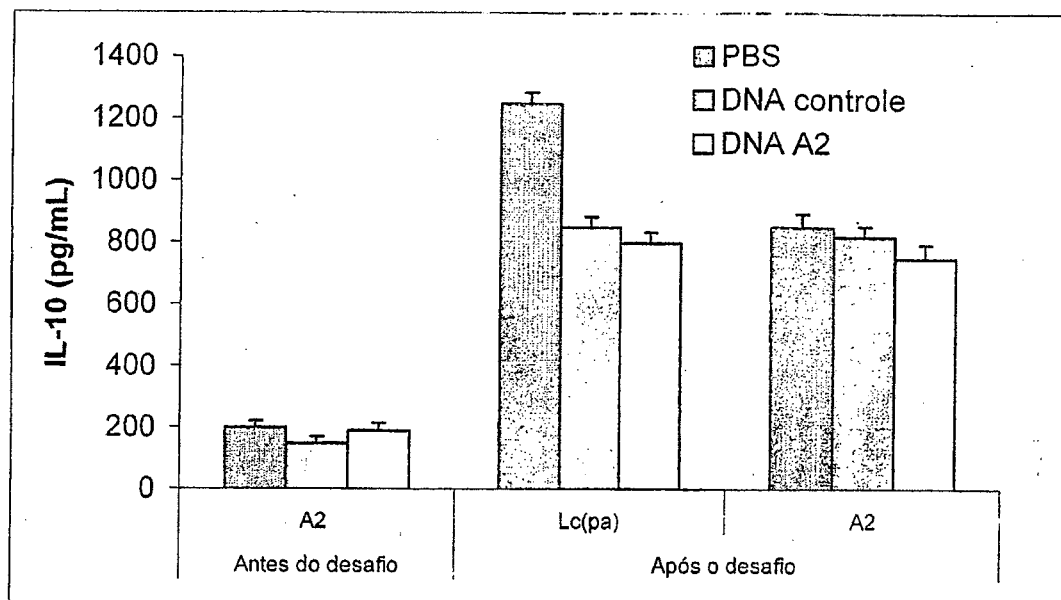


Figure 12

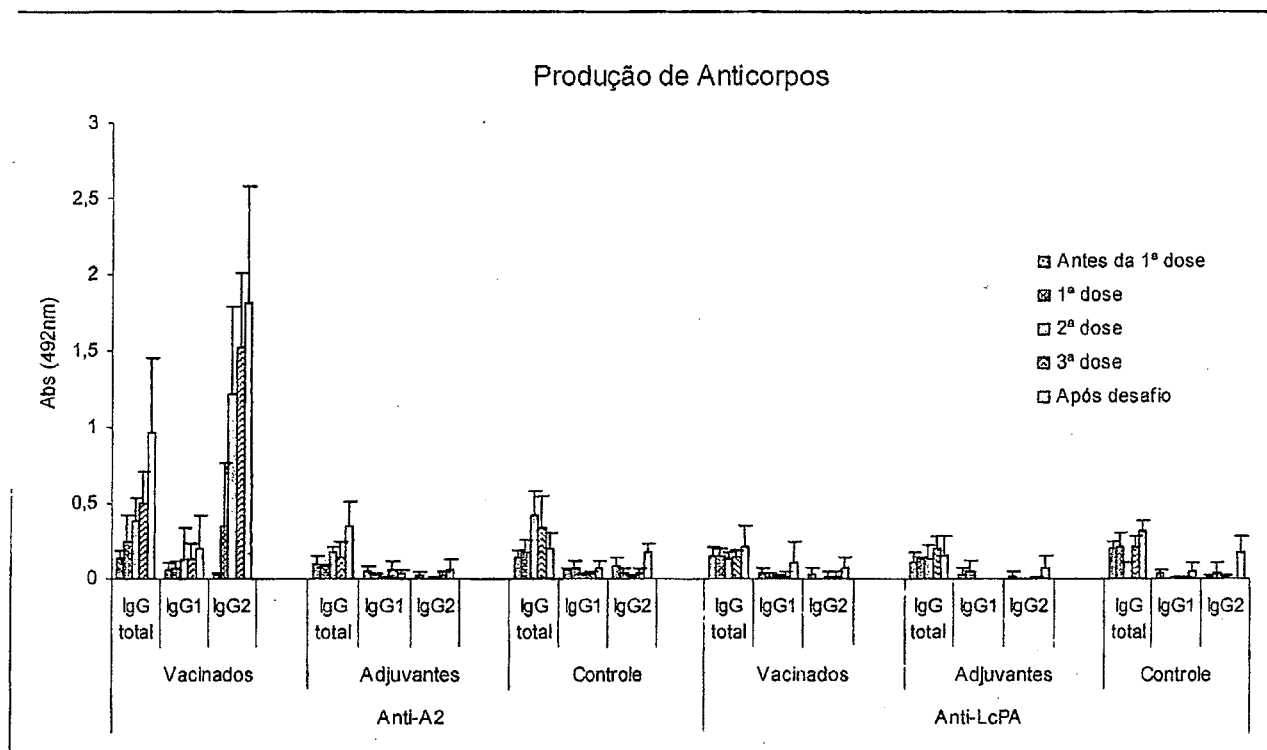
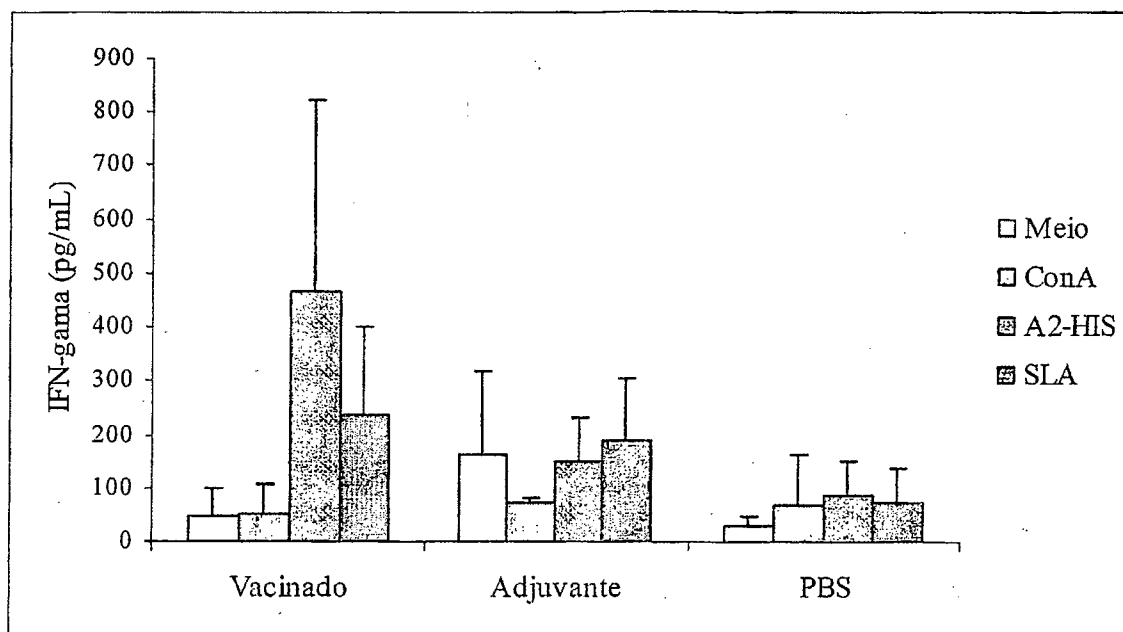


Figure 13



## COMPOSICIÓN DE VACUNA Y MÉTODO DE INMUNIZACIÓN

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 inmunofluorescencia 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).

5

*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).

15

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).

20

25

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- $\gamma$ ) 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

43

evalúan la efectividad de la vacuna contra la infección por *Leishmania*, se utilizan los anticuerpos IFN- $\gamma$  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  
5 utilizan como marcadores de susceptibilidad y respuesta Th2.

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,  
10 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  
15 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).

La principal característica del Leishmune® es la inducción de respuesta  
20 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  
25 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.

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 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 si 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* (Ghedin 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= "AAB30592.1"  
/db\_xref= "GI:546454"

## ORIGEN

1 gagctcccc agcgacctc tcggcaacgc gagcgcccca gtccccccac gcacaacttt  
61 gaccgagcac aatgaagatc cgcagcgtgc gtccgcttgt ggtgttgcgtg gtgtgcgtcg  
121 cggcgggtgct cgcactcagc gcctccgctg agccgcacaa ggccggccggt gacgtcggcc  
181 cgctctccgt tggcccgag tccgtcggcc cgctctctgt tggcccgag gctgttgcc  
241 cgctctccgt tggcccgag tccgtcggcc cgctctctgt tggcccgag gctgttgcc  
301 cgctctctgt tggcccgag tccgttgcc cgctctccgt tggcccgctc tccgttgcc  
361 cgcagtctgt tggcccgctc tccgttggt cgcagtccgt cggcccgctc tctgttggtc  
421 cgcagtccgt cggcccgctc tccgttgcc cgcaggctgt tggcccgctc tccgttgcc  
481 cgcagtccgt cggcccgctc tctgttgcc cgcaggctgt tggcccgctc tctgttgcc  
541 cgcagtccgt tggcccgctc tccgttgcc cgcagtctgt tggcccgctc tccgttgcc  
601 cgcagtccgt cggcccgctc tctgttggt cgcagtccgt cggcccgctc tccgttgcc  
661 cgcagtctgt cggcccgctc tccgttgcc cgcagtccgt cggcccgctc tccgttggtc  
721 cgcagtccgt tggcccgctc tccgttgcc cgcagtccgt tgacgtttct ccggtgtctt  
781 aaggctcggc gtccgcttc cggtgtcgt aaagtatatg ccatgaggca tggtagcag  
841 gcaaacttg tcagcaatgt ggcattatcg taccgtgca agagcaacag cagagctgag  
901 tgttcagggt gccacagcac cagctcctg 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 ctttccccg gccacgacgc cgcgtgagg cgggccccac agcgcagaac tgcgagcgcg  
1201 gtgcgcgggc gctgtgacgc acagccggca cgcagcgtac cgcacgcaga cagtgcattg  
1261 ggaggccgga ggagcaagag cggtaggacg gaacggcgcg aagcatgcg cagccctcg

1321 atgtgcctgt gtgggctgat gaggcgcgga tgccggaagc gtggcgaggg catcccgagt  
1381 tgcaccgtcg agtcctccag gcccgaaatgt ggcgagcctg cggggagcag attatgggat  
1441 gcggctgtc gaagcgaccg agggcgctga ccggaagggtg gccacttcc tctcggggcc  
1501 tgtgcggcat ccgccctcga tcgggagccc gaatggtggc cgcgcgggtg aaggcgtgcc  
1561 gccacccgc gtctccgtgt ggcgccgtg ggggcagggtg cgctgtggct gtgtatgtgc  
1621 gctgatgtgc tgactgttc gtggtgggt atgggcacgg tgaggggcca cgttggccct  
1681 tgctgacttc ctctgcttc ttattattct cagtgccttc gctggattgg gctgcatcgg  
1741 cggctgtat cgcgctgtc tctctcatt gacggctgcg cgctcccgc cctccact  
1801 cgtgctgtgg gatggaggca cggccgggt ctgtgttg tgaccgcgt gcaagaattc  
1861 agatgaggga ctgccgagc agcagacaaa gcagcagcag caacaggaag gcaggcctga  
1921 gcacgtttc tttctctt tgagactgcg gactacggga atcagagacg tcgtcagaga  
1981 cgcgcacccg caccgcgcg ctatgcttc tcttcttc tccgccccca ttctgtgcg  
2041 ctgcctgtct gcgtgtcgc agcgcggtg ccggcggtct ctctcccct ccttcgcttc  
2101 tctctgcaa gcgttcctt ttcacagcc gaacgttgct gctgcctgg aggccgttc  
2161 cctcttatc atctctcat ttattttac acgtgcttt gcttggctt cctgacgatg  
2221 ccggccacct caccgcggtg tcagggccca gcgccactc tttgtgggca ggccaagtag  
2281 cctgcagcct gccatgagc acggctgtg actcttggtg ccagcggaca ggtgtgggt  
2341 ggcgtgtgc cgtgacacc aacggtcatg atgacgctg gaccagctca ctgcgatca  
2401 tgccgacgat tcaacgaatg cgcgcacca cctactgcct ttctgcctt gctgcgtgc  
2461 ggtggtgtg agcgtgtcc cggggcctag cctgcgtgt acgcagcggc attgcggtg  
2521 gctgagcggc gccaggcggg gctggccggc cctgctgct ggcatagccg tggcgtgcag  
2581 cagatgcgga tgggtgtg gtgcgcgtg gtgtgtcgt tgactgttc gtggtgggc  
2641 ggcacgtaaa cggcaaatg cgcttggcg ttccggcgcc acgctccggc gctggtgcg  
2701 tattcgaata cgcgcctgaa gaggtggcga ggaaaatggc acgaggcgca gagggaaaaa  
2761 acgaaaagtg caaagtgcg aaaccgcgca gaaaatgcg gaaaaacgaa aagtgc

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  
5 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:

5 MKIRSVRPLVLLVCVAAVLALSASAEPHKAADVGLSVGPQSVGPLSVGPQAV  
GPLSVGPQSVGPLSVGPQAVGPLSVGPQSVGPLSVGPLSVGPQSVGPLSVGSQ  
SVGPLSVGPQSVGPLSVGPQAVGPLSVGPQSVGPLSVGPQAVGPLSVGPQSVG  
PLSVGPQSVGPLSVGSQSVGPLSVGPQSVGPLSVGPQSVGPLSVGPQSVGPLS  
5 VGPQSVGPLSVGPQSVGVSPVS.

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  
10 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  
15 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  
20 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  
25 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),

50

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

5 reducción significativa de la carga parasitaria en el hígado y una alta producción de los anticuerpos INF- $\gamma$  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

10 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,

15 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](http://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

20 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

25 adopción de una vacuna como una nueva medida de control no debe interferir con las medidas de control habituales.

51

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  
5 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.

10 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.....     | 1,00 mL             |
| Timerosal .....                          | 0,01 mL             |

15 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  
20 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

57

(isopropil- $\beta$ -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  
5 utilizando una solución salina tamponada 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  
10 altos niveles de INF- $\gamma$ , 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.

15 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  
20 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  
25 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.

54

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

5           **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  
10   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).

15

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 rIL-13, con aDN A2 o con ADN pCDNA3 y expuestos a *L. amazonensis*. Se inmunizaron los grupos de  
20   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  
25   a  $1 \times 10^5$  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.

5 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 rIL-13, 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 µg de ADN A2, en el músculo tibial izquierdo, a 10 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  $1 \times 10^6$  promastigotos de *L. amazonensis* en 15 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 20 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**  
25 **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- $\gamma$  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) (Imagen 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- $\gamma$  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  $\mu$ g/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 CO<sub>2</sub> al 5%. Después de esto, se recolectó el sobreflotante y se determinó la producción de IFN- $\gamma$  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- $\gamma$ . Cada barra representa la producción promedio del IFN- $\gamma$ , 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

5 cultivaron ( $1 \times 10^6$ /ml) en 1 ml de medio DMEM completo y estimulado con la proteína rA2 ( $10 \mu\text{g/ml}$ ) y con el SLA de *L. (L.) amazonensis* ( $50 \mu\text{g/ml}$ ). Como controles se evaluaron células no estimuladas o células estimuladas con concavalina A ( $5\mu\text{g/ml}$ ), con el fin de evaluar la viabilidad celular. Los cultivos se incubaron durante 48 horas en un horno a  $37^\circ\text{C}$ , con la presencia de  $\text{CO}_2$  al 5%.

10 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

15 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 ( $1 \times 10^6$ /ml) en 1 ml de medio DMEM completo y estimulado con la proteína rA2 ( $10 \mu\text{g/ml}$ ) y con el SLA de *L. (L.)*

20 *amazonensis* ( $50 \mu\text{g/ml}$ ). Como controles se evaluaron células no estimuladas o células estimuladas con concavalina A ( $5\mu\text{g/ml}$ ), con el fin de evaluar la viabilidad celular. Los cultivos se incubaron durante 48 horas en un horno a  $37^\circ\text{C}$ , con la

25

presencia de CO<sub>2</sub> 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 (Imagen 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 Fotografía 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.

5 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 (Imagen 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

10 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).

15 La Fotografía 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

20 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*,

25 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.***

**5 *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 (Imagen 8) y en el bazo (Imagen 9).

Fotografía 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  $1 \times 10^7$  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 fotografía 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  $1 \times 10^7$  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- $\gamma$  (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- $\gamma$  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 ( $2 \times 10^5$  células por ml) se cultivaron en DMEM completo y se estimularon con las proteínas recombinantes rNH, rA2 o rLACK (concentraciones de 10  $\mu\text{g/mL}$ ) o con el extracto de proteína de *L. chagasi* (50  $\mu\text{g/mL}$ ). Los sobreflotantes se recolectaron 48 horas después del cultivo y estímulo de las células. La producción del IFN- $\gamma$  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- $\gamma$  (pg/ml). Cada barra representa el promedio, con la desviación estándar de la producción de IFN- $\gamma$  de cada grupo agregada o sustraída de ésta. La producción base de IFN- $\gamma$  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 fotografía 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  $1 \times 10^7$  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).

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, 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 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 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 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 sub-clases IgG1 e IgG2, de cada una de las desviaciones estándar del grupo agregada o sustraída de ésta.

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 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).

5

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).

10

15

| 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              |

20

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* (1µg/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).

La Figura 13 muestra una gráfica que representa la producción de IFN- $\gamma$  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 ( $1 \times 10^6$ /ml) en un ml de medio DEMEM completo y se estimuló con la proteína A2 recombinante (10  $\mu$ g/mL) y con LcPA de *L. chagasi*, a una concentración de 50  $\mu$ 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<sub>2</sub>. Después de 48 horas se recolectó el sobreflotante y se determinó la producción de IFN- $\gamma$  mediante ELISA de captura. El eje de las ordenadas representa la concentración, en pg/ml, del IFN- $\gamma$ . 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- $\gamma$  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).

68

### REIVINDICACIONES

1. Una vacuna recombinante para leishmaniasis que permite la distinción serológica entre las especies caninas vacunadas e infectadas con *Leishmania*.  
5
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*.  
10
3. Una vacuna recombinante para leishmaniasis de acuerdo con la 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.  
15
4. Una vacuna recombinante para leishmaniasis de acuerdo con la reivindicaciones 1-3, caracterizada por inducir respuesta inmune celular en especies caninas a través de niveles elevados de IFN- $\gamma$ .  
20
5. Una vacuna recombinante para leishmaniasis de acuerdo con la reivindicaciones 1-4, caracterizada por el mantenimiento de resultados negativos para las pruebas serológicas convencionales para leishmaniasis en especies caninas.  
25
6. Una vacuna recombinante para leishmaniasis de acuerdo con la reivindicaciones 1-5, que comprenden uno o más de un excipiente,

portador, amortiguador, estabilizador, agente de isotonicidad, conservante o antioxidante farmacéuticamente aceptable.

7. Un método para mejorar la respuesta inmune contra leishmaniasis que permite la distinción serológica entre especies caninas vacunadas e infectadas con *Leishmania*.

8. Un método para mejorar la respuesta inmune contra leishmaniasis de acuerdo con la reivindicación 7, caracterizado por el mantenimiento de los resultados negativos para las pruebas serológicas convencionales para leishmaniasis en especies caninas.

9. Un método para mejorar la respuesta inmune contra leishmaniasis de acuerdo con la reivindicación 7 y 8, en donde dicho método comprende el uso del antígeno A2 recombinante de las formas promastigota de *Leishmania*.

10. Un método para mejorar la respuesta inmune contra leishmaniasis de acuerdo con la reivindicación 7-9, que induce una respuesta inmune humoral en las especies caninas a través de la producción de anticuerpos específicos contra el antígeno A2.

11. Un método para mejorar la respuesta inmune contra leishmaniasis de acuerdo con la reivindicación 7-10, que induce una respuesta inmune celular en especies caninas a través de niveles elevados de IFN- $\gamma$ .

20

## COMPOSICIÓN DE VACUNA Y MÉTODO DE INMUNIZACIÓN

### Resumen

- 5 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 inmunofluorescencia que emplean antígenos de las formas promastigota de *Leishmania*.

Figura 1

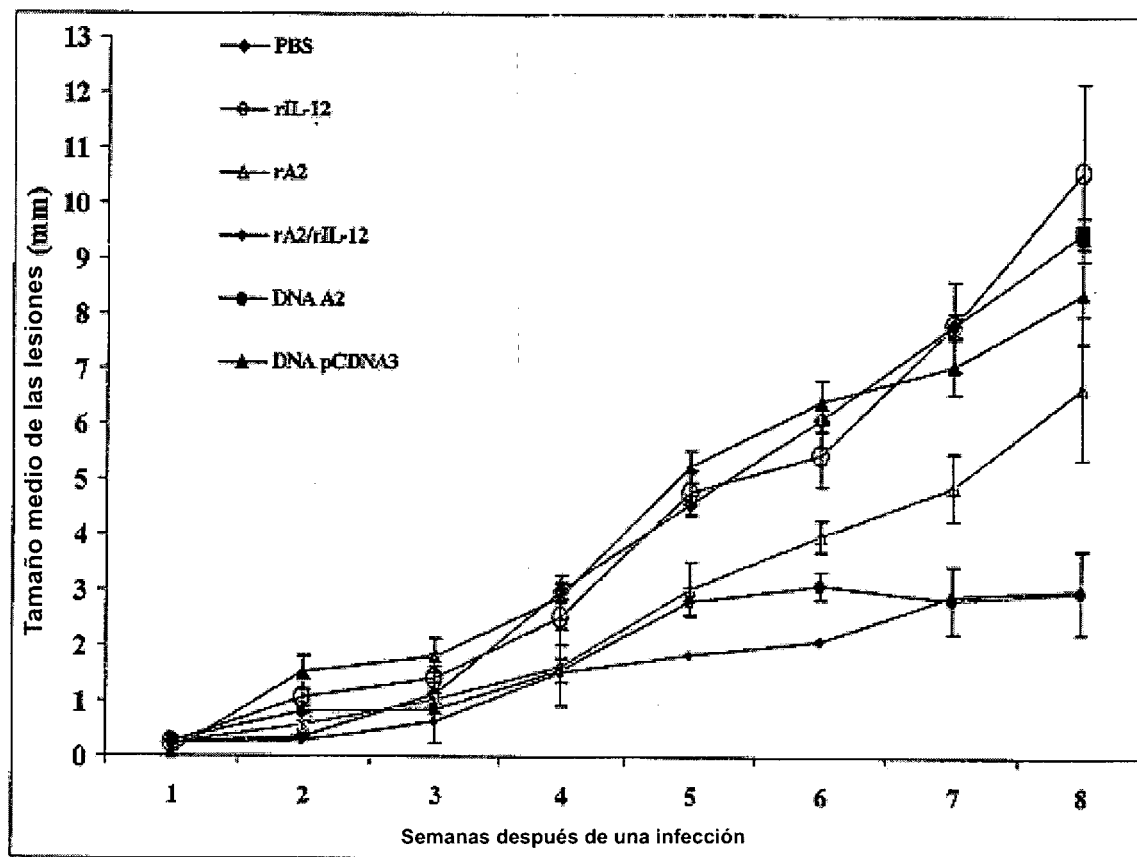


Figura 2

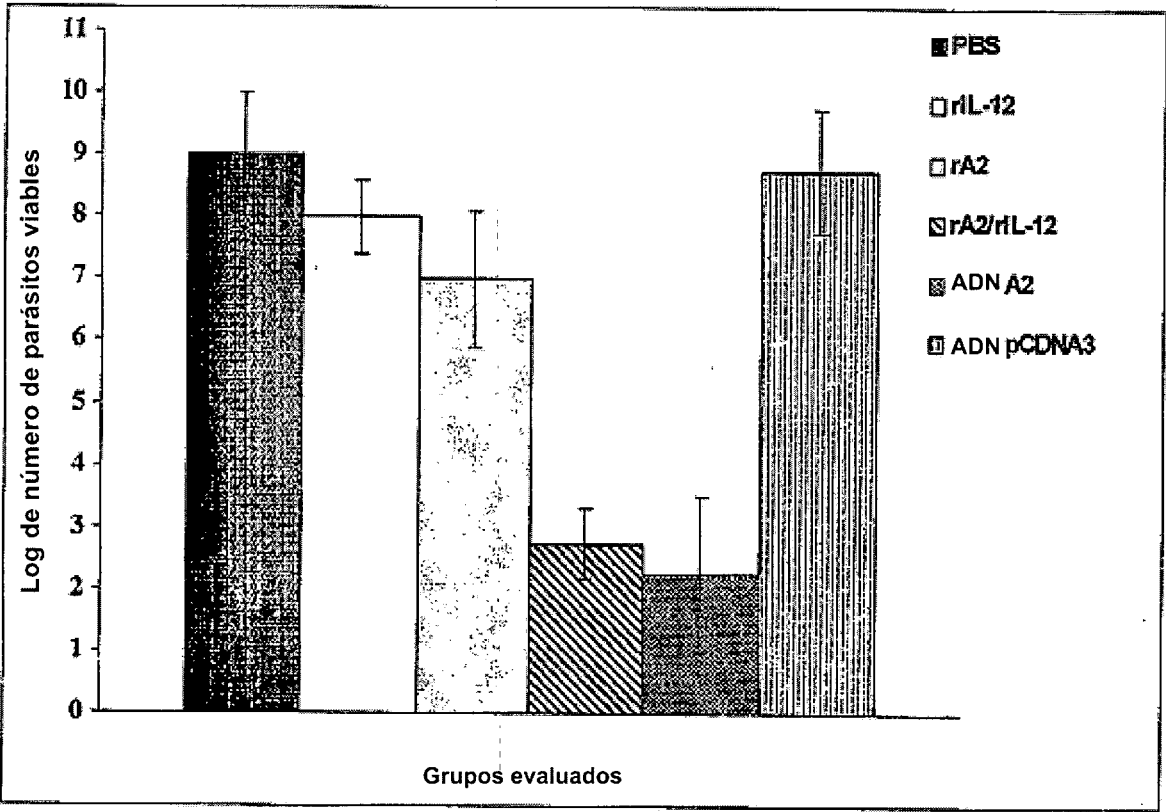


Figura 3

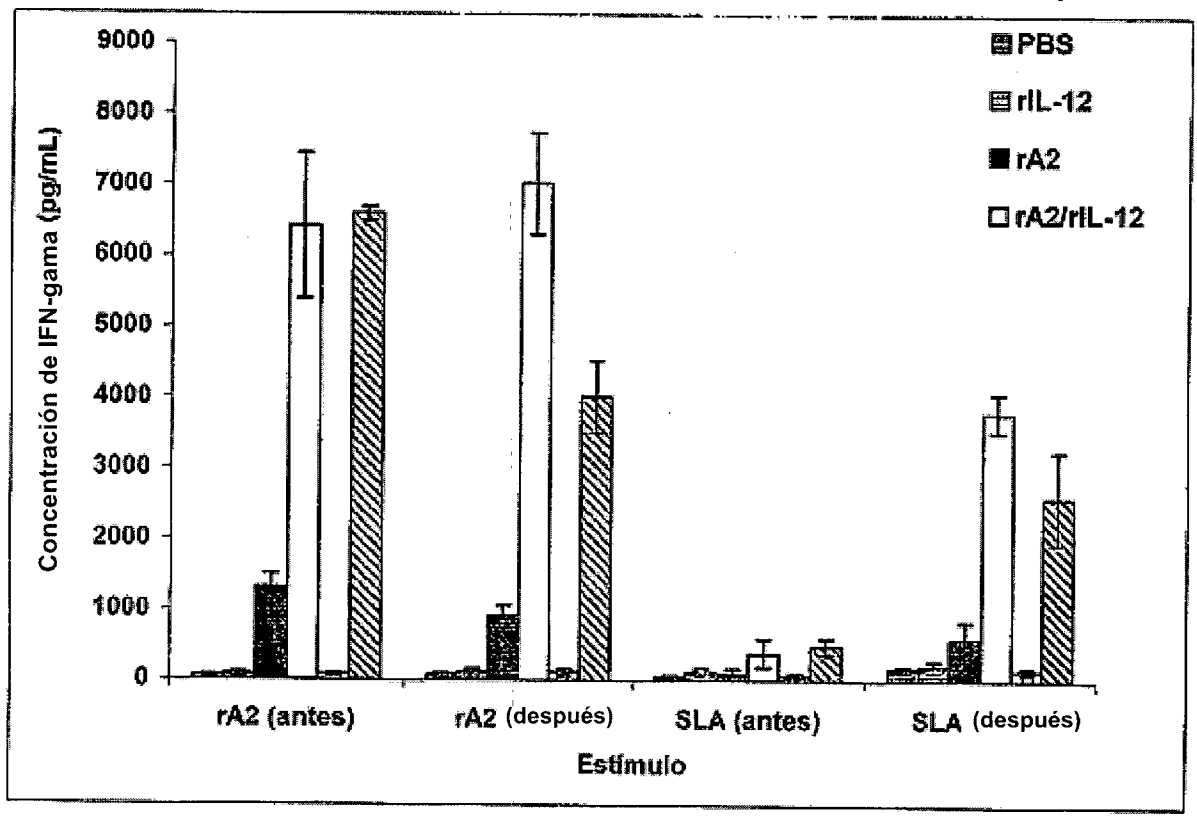


Figura 4

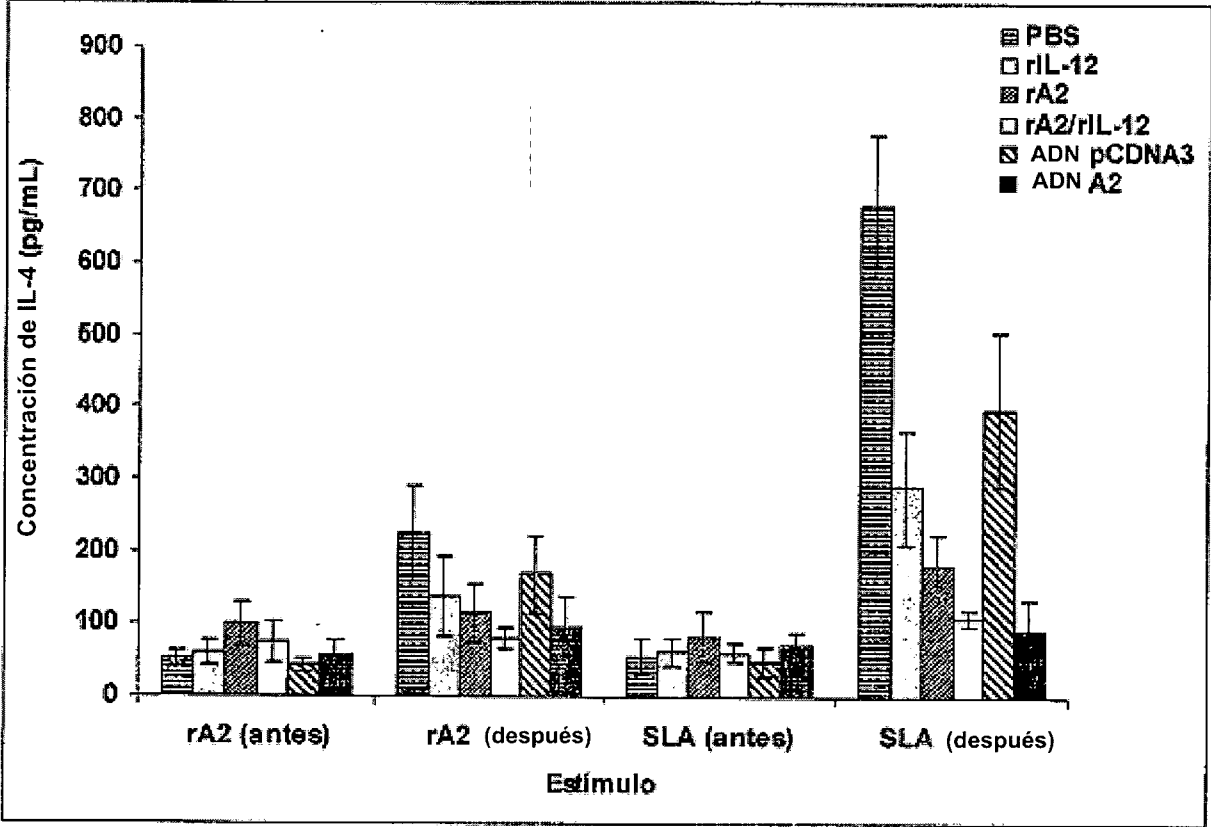


Figura 5

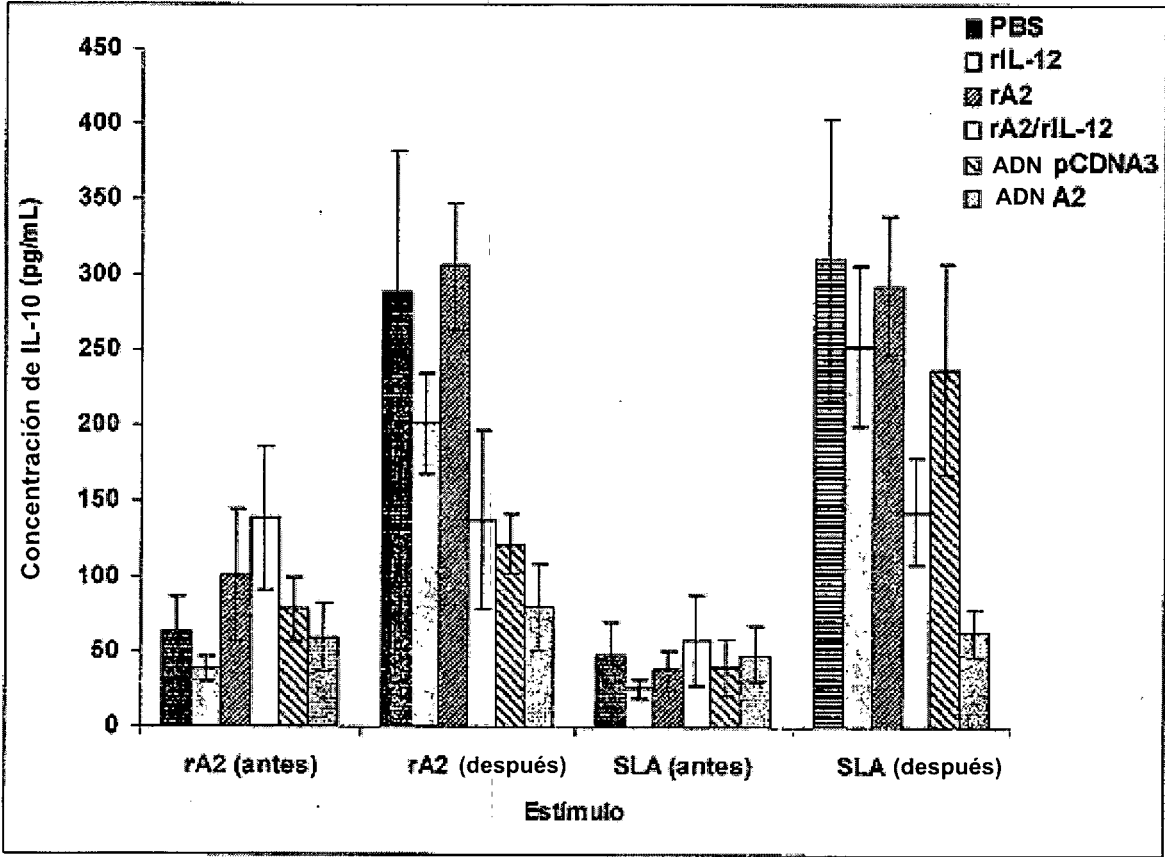


Figura 6

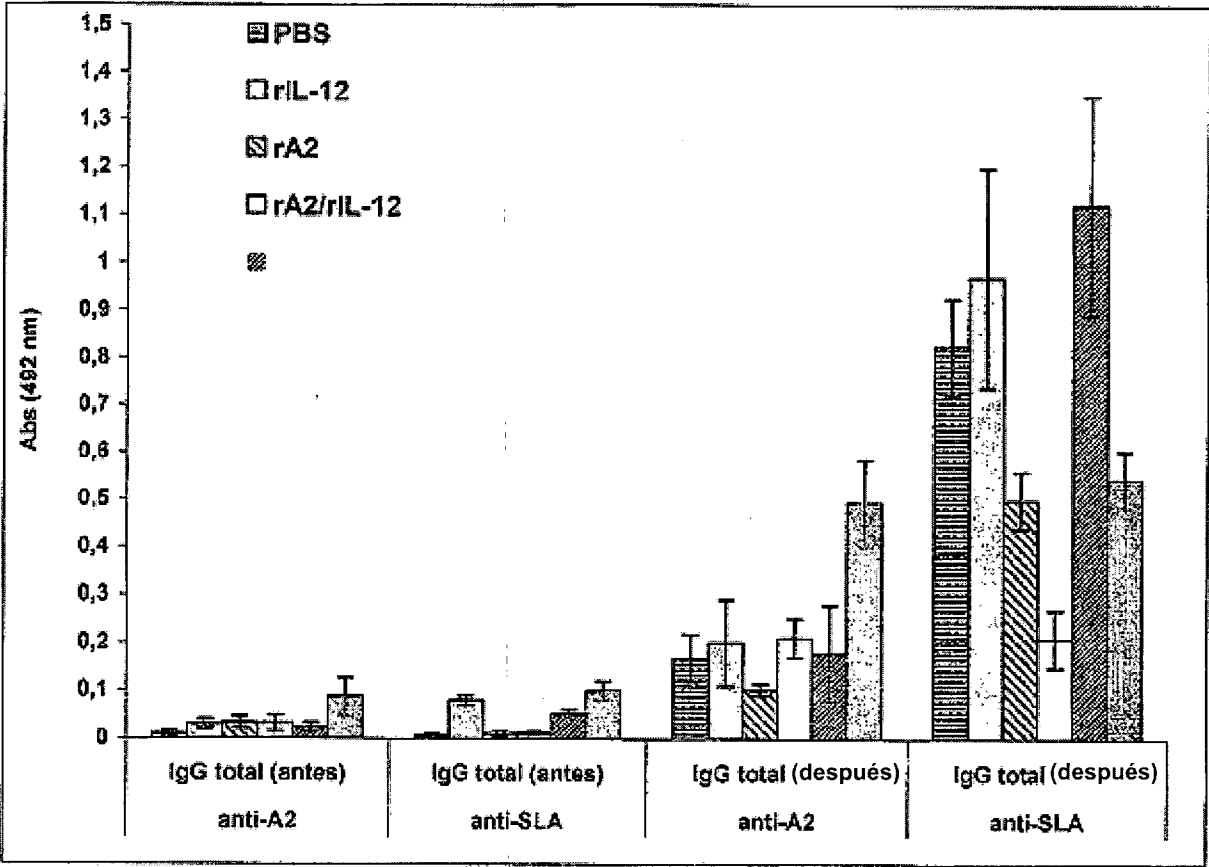


Figura 7

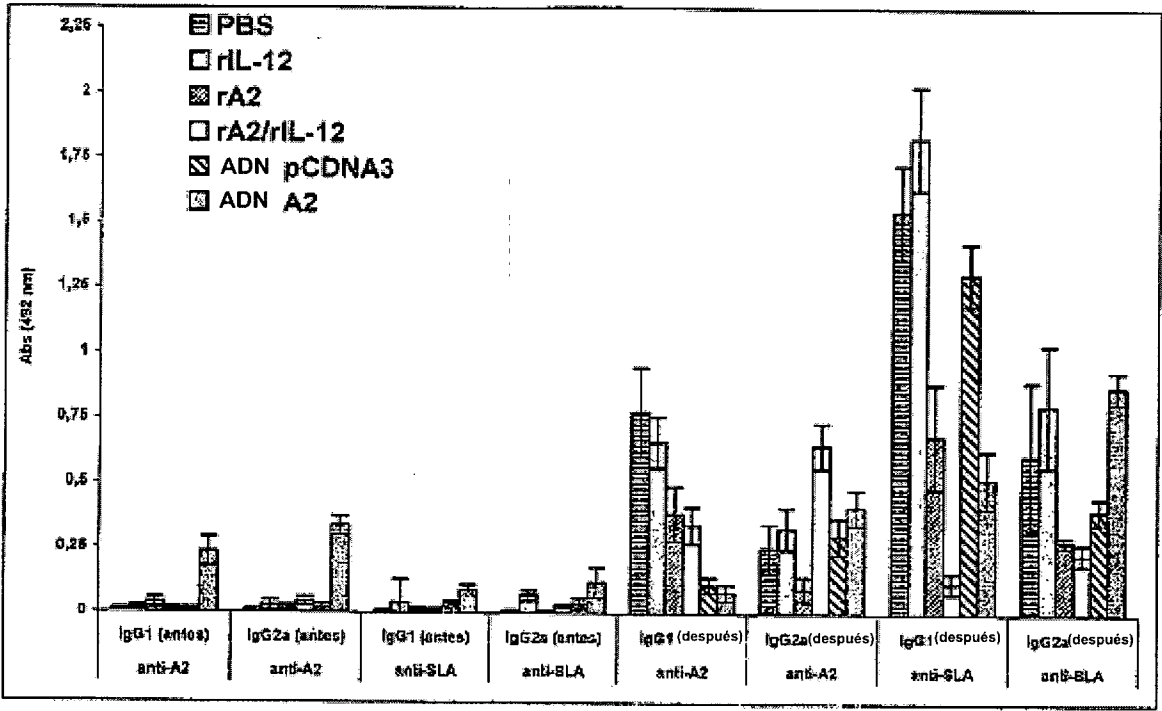


Figura 8

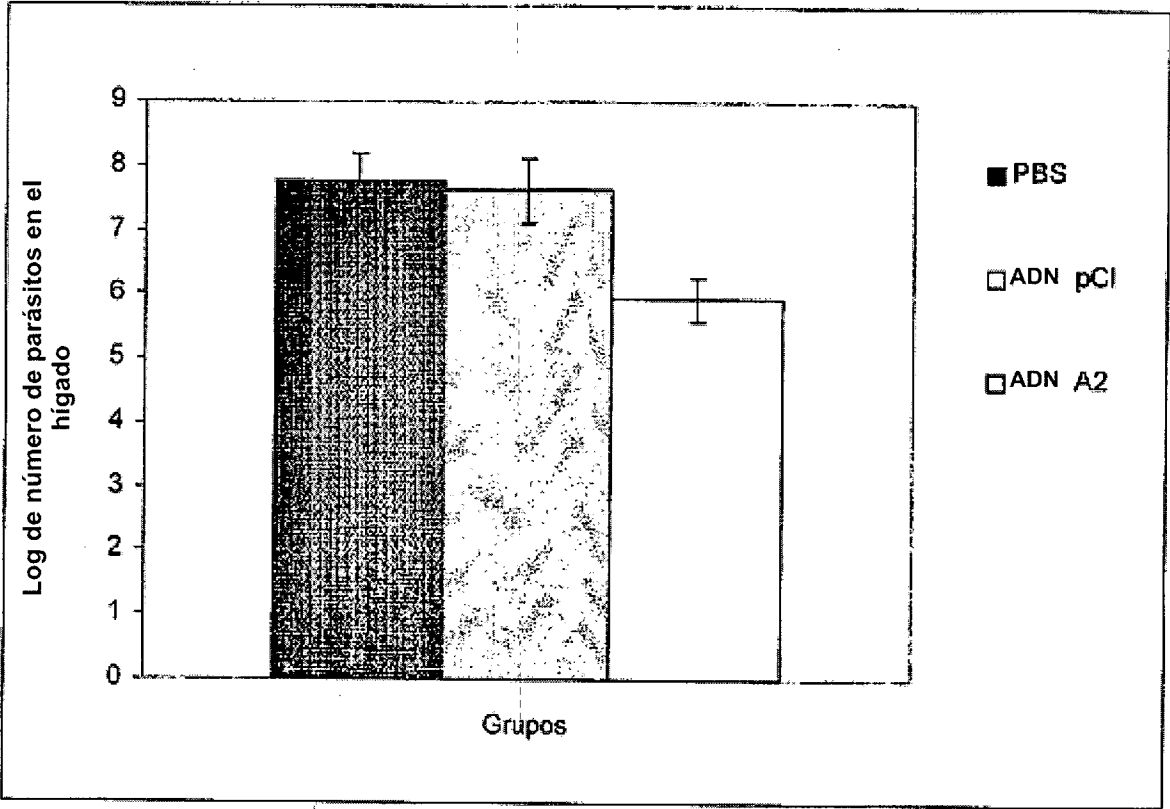


Figura 9

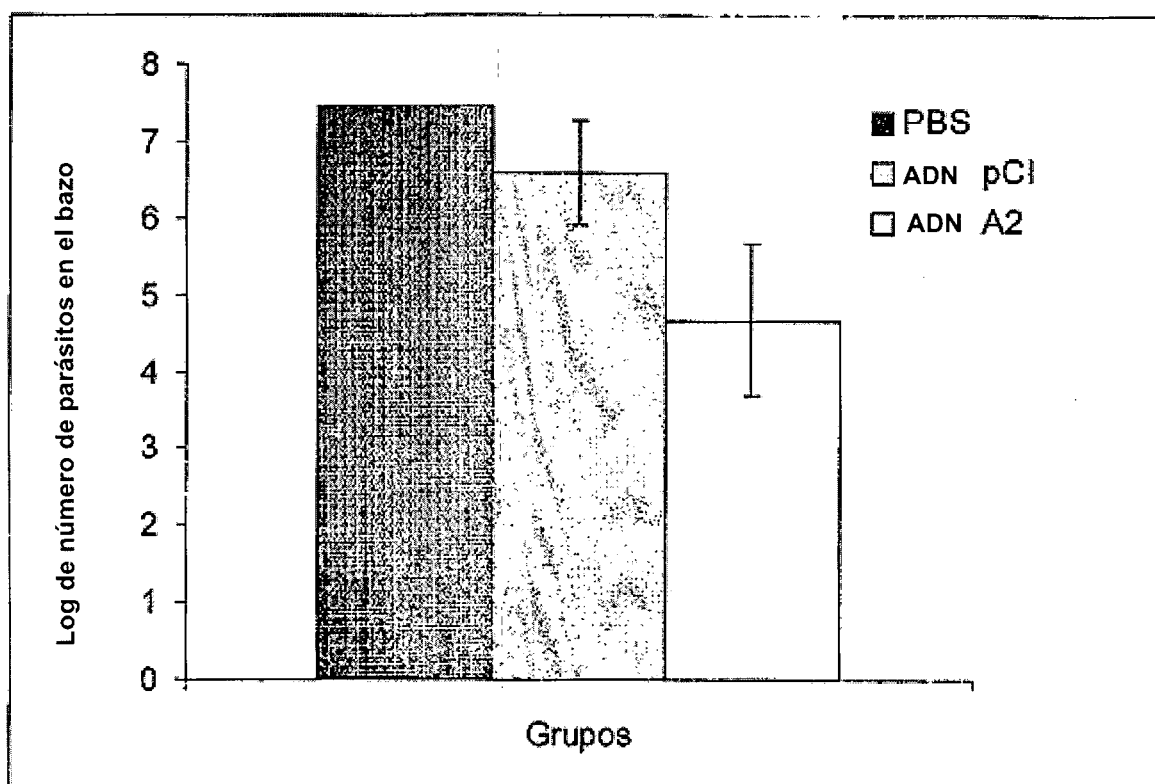


Figura 10

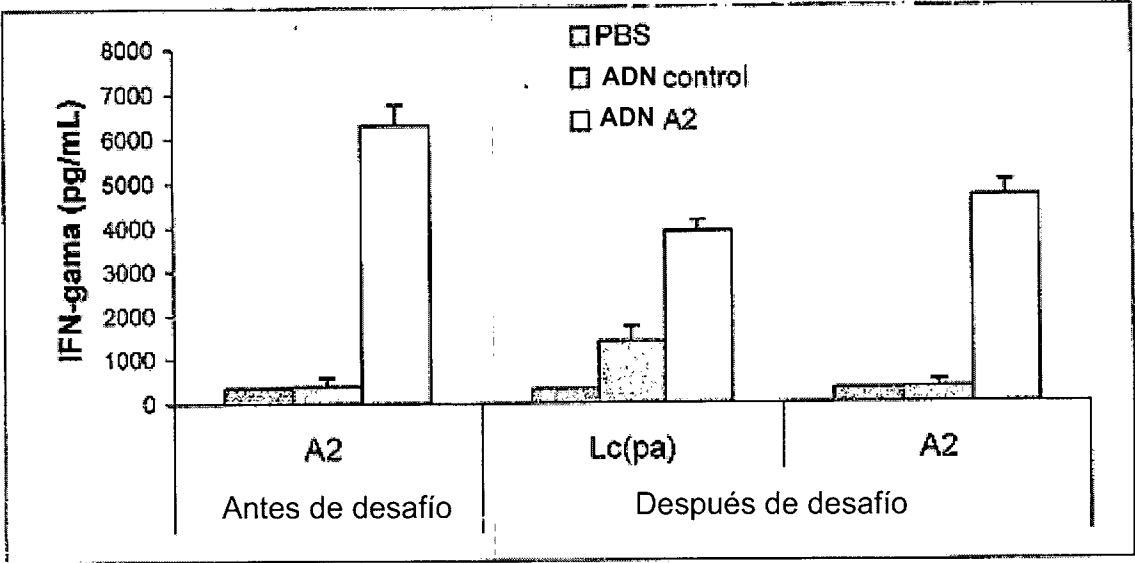


Figura 11

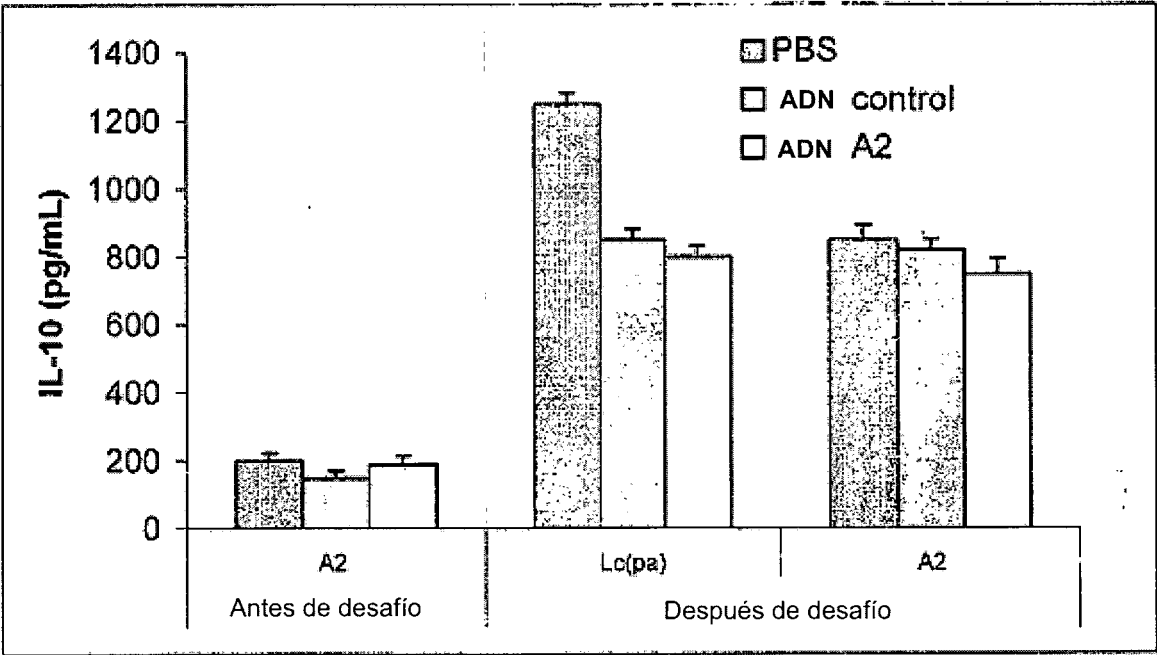


Figura 12

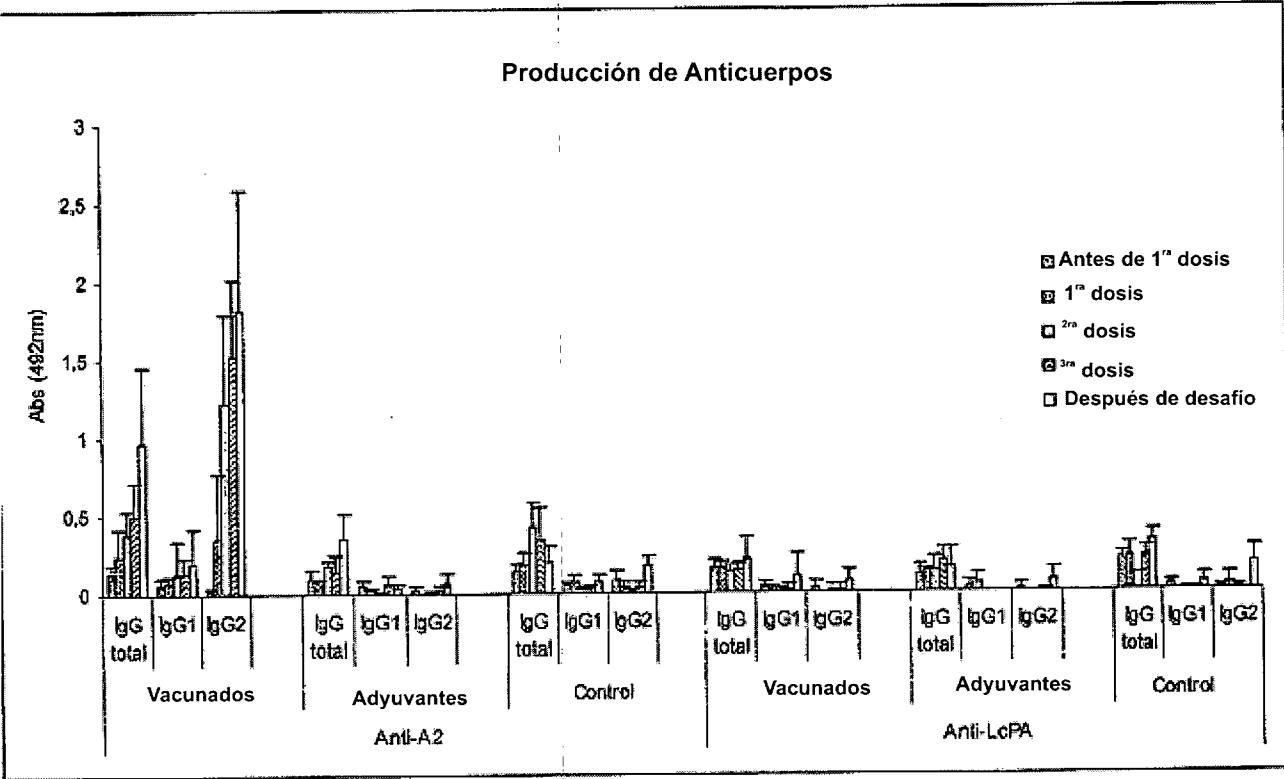
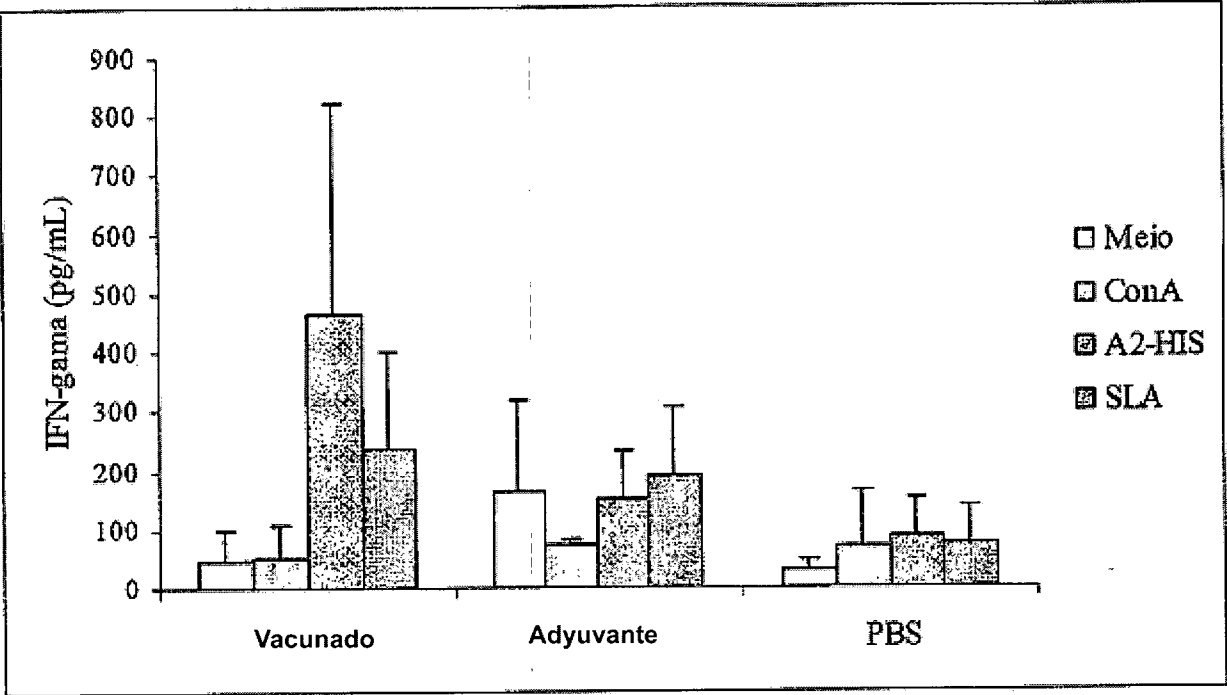


Figura 13



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/BR 2007/000248

| <b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b><br><b>IPC<sup>8</sup>: A61K 39/008 (2006.01)</b><br>According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |                                                                                                                                               |                                                                                         |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>B. FIELDS SEARCHED</b><br>Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)<br><b>IPC<sup>8</sup>: A61K</b><br>Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |                                                                                                                                               |                                                                                         |
| Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)<br><b>WPI, EPODOC, FullText Engl. + German, MedLine, Internet</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |                                                                                                                                               |                                                                                         |
| <b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |                                                                                                                                               |                                                                                         |
| Category*                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                            | Relevant to claim No.                                                                   |
| X                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | US 5733778 A (UNIV MCGILL) 31 March 1998 (31.03.1998)<br><i>entire document (esp. description column 2 lines 17-39, column 4 lines 55-63)</i> | 2, 6, 9                                                                                 |
| X                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | WO 2002/078735 A2 (UNIV MCGILL) 10 October 2002<br>(10.10.2002)<br><i>entire document, esp. claims 26-28</i>                                  | 2, 6, 9                                                                                 |
| X                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | US 2004/170636 A1 (MATLASHEWSKI) 2 September 2004<br>(02.09.2004)<br><i>entire document, esp. claims 26-28, description paragraph [0014]</i>  | 2, 6, 9                                                                                 |
| <input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |                                                                                                                                               |                                                                                         |
| * Special categories of cited documents:<br>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance<br>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date<br>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)<br>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means<br>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed<br>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention<br>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone<br>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art<br>"&" document member of the same patent family |                                                                                                                                               |                                                                                         |
| Date of the actual completion of the international search<br><b>21 February 2008 (21.02.2008)</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |                                                                                                                                               | Date of mailing of the international search report<br><b>14 March 2008 (14.03.2008)</b> |
| Name and mailing address of the ISA/ AT<br><b>Austrian Patent Office</b><br><b>Dresdner Straße 87, A-1200 Vienna</b><br>Facsimile No. +43 / 1 / 534 24 / 535                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                                                                                                                                               | Authorized officer<br><b>ETZ H.</b><br>Telephone No. +43 / 1 / 534 24 / 215             |

72  
85

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/BR2007/000248

| Patent document cited<br>in search report |   |            | Publication<br>date | Patent family<br>member(s) |    |            | Publication<br>date |
|-------------------------------------------|---|------------|---------------------|----------------------------|----|------------|---------------------|
| US                                        | A | 5733778    |                     | US                         | A  | 5780591    | 1998-07-14          |
|                                           |   |            |                     | US                         | A  | 5827671    | 1998-10-27          |
|                                           |   |            |                     | US                         | A  | 6133017    | 2000-10-17          |
|                                           |   |            |                     | US                         | A  | 5733778    | 1998-03-31          |
|                                           |   |            |                     | PT                         | T  | 716697T    | 2003-08-29          |
|                                           |   |            |                     | JP                         | T  | 9502091T   | 1997-03-04          |
| WO                                        | A | 2002078735 |                     | none                       |    |            |                     |
| US                                        | A | 2004170636 |                     | US                         | A1 | 2004170636 | 2004-09-02          |
|                                           |   |            |                     | MX                         | A  | PA03008832 | 2004-05-05          |
|                                           |   |            |                     | EP                         | A2 | 1372705    | 2004-01-02          |
|                                           |   |            |                     | WO                         | A2 | 02078735   | 2002-10-10          |
|                                           |   |            |                     | CA                         | A1 | 2442298    | 2002-10-10          |
|                                           |   |            |                     | BR                         | A  | 0208532    | 2005-01-18          |

23  
86

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING  
OF A CHANGE

(PCT Rule 92bis.1 and  
Administrative Instructions, Section 422)

|                                                                                                                                                 |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| To:                                                                                                                                             |
| DE MOURA, Adriana Cláudia<br>AV. ANTÔNIO CARLOS, 6627 REITORIA - SALA 7005<br>PAMPULHA - BELO HORIZONTE<br>MINAS GERAIS CEP:31270-901<br>BRÉSIL |

|                                                    |                                                                         |
|----------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------|
| Applicant's or agent's file reference              | IMPORTANT NOTIFICATION                                                  |
| International application No.<br>PCT/BR2007/000248 | International filing date (day/month/year)<br>20 July 2007 (20.07.2007) |

|                                                                |
|----------------------------------------------------------------|
| Date of mailing (day/month/year)<br>20 March 2008 (20.03.2008) |
| Applicant's or agent's file reference                          |
| International application No.<br>PCT/BR2007/000248             |

|                                                                                                                                                                                     |                                                                      |                                      |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------|--------------------------------------|
| 1. The following indications appeared on record concerning:                                                                                                                         |                                                                      |                                      |
| <input checked="" type="checkbox"/> the applicant                                                                                                                                   | <input type="checkbox"/> the inventor                                | <input type="checkbox"/> the agent   |
| <input type="checkbox"/> the common representative                                                                                                                                  |                                                                      |                                      |
| Name and Address<br>FEDERAL UNIVERSITY OF MINAS GERAIS - UFMG<br>AV. ANTÔNIO CARLOS, 6627 REITORIA - SALA 7005<br>PAMPULHA - BELO HORIZONTE<br>MINAS GERAIS CEP:31270-901<br>Brazil | State of Nationality<br>BR                                           | State of Residence<br>BR             |
| Telephone No.                                                                                                                                                                       |                                                                      |                                      |
| Facsimile No.                                                                                                                                                                       |                                                                      |                                      |
| Teleprinter No.                                                                                                                                                                     |                                                                      |                                      |
| 2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:                                                                   |                                                                      |                                      |
| <input checked="" type="checkbox"/> the person                                                                                                                                      | <input type="checkbox"/> the name                                    | <input type="checkbox"/> the address |
| <input type="checkbox"/> the nationality                                                                                                                                            | <input type="checkbox"/> the residence                               |                                      |
| Name and Address<br>UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS<br>Avenida Antônio Carlos, 6627<br>Reitoria 7° andar sala 7005<br>31270-901 Belo Horizonte, MG<br>Brazil                   | State of Nationality<br>BR                                           | State of Residence<br>BR             |
| Telephone No.                                                                                                                                                                       |                                                                      |                                      |
| Facsimile No.                                                                                                                                                                       |                                                                      |                                      |
| Teleprinter No.                                                                                                                                                                     |                                                                      |                                      |
| 3. Further observations, if necessary:                                                                                                                                              |                                                                      |                                      |
| 4. A copy of this notification has been sent to:                                                                                                                                    |                                                                      |                                      |
| <input type="checkbox"/> the receiving Office                                                                                                                                       | <input checked="" type="checkbox"/> the designated Offices concerned |                                      |
| <input type="checkbox"/> the International Searching Authority                                                                                                                      | <input type="checkbox"/> the elected Offices concerned               |                                      |
| <input type="checkbox"/> the International Preliminary Examining Authority                                                                                                          | <input type="checkbox"/> other:                                      |                                      |

|                                                                                               |                                                                                                          |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| The International Bureau of WIPO<br>34, chemin des Colombettes<br>1211 Geneva 20, Switzerland | Authorized officer<br><br>Perez Reina Luis<br>e-mail pt09.pct@wipo.int<br>Telephone No. +41 22 338 74 09 |
| Facsimile No. +41 22 338 71 30                                                                |                                                                                                          |

87-74

|                                                                                                                                      |                                                          |                                                                                                                                                                             |                                          |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------|
| <br><b>Industria y Comercio</b><br>SUPERINTENDENCIA |                                                          | <b>SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO</b><br><b>DIVISION DE NUEVAS CREACIONES</b><br><b>EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN</b><br><b>SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION PCT</b> |                                          |
| (21) N° de solicitud:                                                                                                                |                                                          | (51) Int Cl: <b>A61K 039/008</b>                                                                                                                                            |                                          |
| 22) Fecha de solicitud:                                                                                                              |                                                          | (71) Solicitante(s) <b>UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS</b>                                                                                                             |                                          |
| (30) Prioridad                                                                                                                       | (31) <b>Prioridad</b><br><b>PI0603490-0</b>              | (32) <b>Fecha</b><br><b>21/07/2006</b>                                                                                                                                      | (33) <b>País</b><br><b>BR</b>            |
|                                                                                                                                      |                                                          | (72) Inventor(es) <b>ANA PAULA SALLES MOURA FERNANDES Y OTROS</b>                                                                                                           |                                          |
|                                                                                                                                      |                                                          | (74) Apoderado: <b>EMILIO FERRERO</b>                                                                                                                                       |                                          |
| (85)                                                                                                                                 | Fecha limite inicio fase nacional: <b>21/02/2009</b>     |                                                                                                                                                                             | (87) Publicación internacional           |
| (86)                                                                                                                                 | Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT    |                                                                                                                                                                             | Fecha: <b>24/01/2008</b>                 |
|                                                                                                                                      | Fecha de presentación de la solicitud: <b>20/07/2007</b> |                                                                                                                                                                             | N° publicación: <b>WO 2008/009088 A2</b> |
|                                                                                                                                      | No. de solicitud PCT/BR2007/000248                       |                                                                                                                                                                             |                                          |
| (54) Titulo: <b>COMPOSICIÓN DE VACUNA Y MÉTODO DE INMUNIZACIÓN</b>                                                                   |                                                          |                                                                                                                                                                             |                                          |

Reivindicación(es):

1. Una vacuna recombinante para leishmaniasis que permite la distinción serológica entre las especies caninas vacunadas e infectadas con *Leishmania*.

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*.

3. Una vacuna recombinante para leishmaniasis de acuerdo con la 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.

4. Una vacuna recombinante para leishmaniasis de acuerdo con la reivindicaciones 1-3, caracterizada por inducir respuesta inmune celular en especies caninas a través de niveles elevados de IFN-γ.

5. Una vacuna recombinante para leishmaniasis de acuerdo con la 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 la reivindicaciones 1-5, que comprenden uno o más de un excipiente, portador, amortiguador, estabilizador, agente de isotonicidad, conservante o antioxidante farmacéuticamente aceptable.

7. Un método para mejorar la respuesta inmune contra leishmaniasis que permite la distinción serológica entre especies caninas vacunadas e infectadas con *Leishmania*.

8. Un método para mejorar la respuesta inmune contra leishmaniasis de acuerdo con la reivindicación 7, caracterizado por el mantenimiento de los resultados negativos para las pruebas serológicas convencionales para leishmaniasis en especies caninas.
9. Un método para mejorar la respuesta inmune contra leishmaniasis de acuerdo con la reivindicación 7 y 8, en donde dicho método comprende el uso del antígeno A2 recombinante de las formas promastigota de *Leishmania*.

10. Un método para mejorar la respuesta inmune contra leishmaniasis de acuerdo con la reivindicación 7-9, que induce una respuesta inmune humoral en las especies caninas a través de la producción de anticuerpos específicos contra el antígeno A2.

11. Un método para mejorar la respuesta inmune contra leishmaniasis de acuerdo con la reivindicación 7-10, que induce una respuesta inmune celular en especies caninas a través de niveles elevados de IFN-γ.

75  
88

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 09 - 2,997  
FECHA : ENERO 14 DE 2009

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-017840- -00000-0000

Fecha: 2009-02-23 16:26:45 Dep. 2020 NUECREACIONE  
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI  
Act. 411 PRESENTACION Folios: 89

\*\*\*\*\* CONSIGNACION \*\*\*\*\*

| DEPOSITANTE       | TIPO PAGO    | BANCO           | CUENTA    | No. PAGO  | FECHA PGO  | Vr. PAGO      |
|-------------------|--------------|-----------------|-----------|-----------|------------|---------------|
| CAVELIER ABOGADOS | CONSIGNACION | BANCO DE BOGOTA | 062754387 | 102218922 | 13/01/2009 | 61,689,000.00 |

\*\*\*\*\* CONCEPTO \*\*\*\*\*

| CANT. | RENTISTICO  | CONCEPTO                              | TOTAL CONCEPTO |
|-------|-------------|---------------------------------------|----------------|
| 1     | 50005-01-06 | REGISTRO DE CESION, CAMBIO NOM        |                |
|       |             | 13 NOMBRES Y ENSENAS COMERCIALES, MAR | 273,000.00     |
|       |             | TOTAL :                               | \$ 273,000.00  |

SON: DOSCIENTOS SETENTA Y TRES MIL PESOS

RESPONSABLE : \_\_\_\_\_

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. \_\_\_\_\_

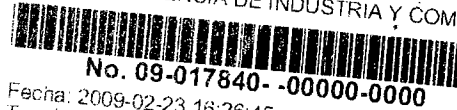
Qb 16936-841-001-8

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 09 - 2,998  
FECHA : ENERO 14 DE 2009

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-017840-00000-0000

Fecha: 2009-02-23 16:26:45  
Tra. 11 PATENTE IYII  
Act. 411 PRESENTACION

Dep. 2020 NUECREACION  
Eve: 378 FASENACIONAL  
Folios: 89

\*\*\*\*\* CONSIGNACION \*\*\*\*\*

| DEPOSITANTE       | TIPO PAGO    | BANCO           | CUENTA    | No. PAGO  | FECHA PAGO | Vr. PAGO      |
|-------------------|--------------|-----------------|-----------|-----------|------------|---------------|
| CAVELIER ABOGADOS | CONSIGNACION | BANCO DE BOGOTA | 062754387 | 102218922 | 13/01/2009 | 61,689,000.00 |

\*\*\*\*\* CONCEPTO \*\*\*\*\*

| CANT. | RENTISTICO  | CONCEPTO                              | TOTAL CONCEPTO |
|-------|-------------|---------------------------------------|----------------|
| 1     | 50005-01-06 | REGISTRO DE CESION, CAMBIO NOM        |                |
|       |             | 13 NOMBRES Y ENSENAS COMERCIALES, MAR | 273,000.00     |
|       |             | TOTAL :                               | \$ 273,000.00  |

SON: DOSCIENTOS SETENTA Y TRES MIL PESOS

RESPONSABLE :

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No.

Colo 16936-841-008-8



No. 09-017840-00000-0000

Fecha: 2009-02-23 16:26:45 Dep. 2020 NUECREACIONE  
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI  
Act. 411 PRESENTACION Folios: 89

**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 ☐

Sando B. B. B.  
Firma Responsable

Fecha Febre-23-08

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](mailto:info@sic.gov.co)  
[www.sic.gov.co](http://www.sic.gov.co)  
Bogotá, D.C., Colombia

**REPUBLICA DE COLOMBIA**  
**SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO**

Bogotá,  
2020

Doctor(a)  
FERRERO EMILIO

|            |                            |                   |
|------------|----------------------------|-------------------|
| REFERENCIA | Radicación No.             | 9 17840           |
|            | Solicitud internacional    | PCT/BR2007/000248 |
|            | Fecha inicio fase nacional | 21/02/2009        |
|            | Trámite                    | 11                |
|            | Evento                     | 378               |
|            | Actuación                  | 430               |
|            | Oficio No.                 | Nº 4424           |

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. La solicitud no contiene el poder debidamente otorgado, con el lleno de los requisitos exigidos por los artículos 63 y subsiguientes del Código de Procedimiento Civil. Adicionalmente, deberá presentar el documento que acredita la existencia y representación legal de la sociedad solicitante, cuando ésta fuere persona jurídica.

2. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante, conforme a lo establecido por el artículo 26 literal k) de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina. Cuando se trate de documentos otorgados en el extranjero, estos deberán legalizarse de conformidad con lo dispuesto por los artículos 259 y 260 del Código de Procedimiento Civil. Cuando se trate de las declaraciones a que hace referencia la Regla 4.17 ii) del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes PCT., el alcance de las tales declaraciones se determinará según indiquen claramente una cesión de derechos del inventor al solicitante o su causante, de conformidad con lo dispuesto en el numeral 5.2.15 del Capítulo Quinto, Título X de la Circular Única de Superintendencia de Industria y Comercio.

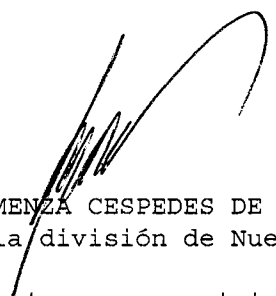
En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única No.10 de 2001.

Continúa en la página siguiente...

REPUBLICA DE COLOMBIA  
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Radicación No.: 9 17840



ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL  
Jefe de la división de Nuevas Creaciones

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de  
fecha \_\_\_\_\_ 17 ABR. 2009  
jfernand