(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad Intelectual
Oficina internacional

(43) Fecha de publicación internacional
31 de Diciembre de 2003 (31.12.2003)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 2004/000352 A1

(51) Clasificación Internacional de Patentes[7]:
A61K 39/395, 31/716, C07K 14/705, 16/28, A61P 33/02

(21) Número de la solicitud internacional:
PCT/ES2003/000306

(22) Fecha de presentación internacional:
20 de Junio de 2003 (20.06.2003)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:
P200201436 21 de Junio de 2002 (21.06.2002) ES

(71) Solicitante *(para todos los Estados designados salvo US)*: **CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS** [ES/ES]; C/ Serrano 117, 28006 MADRID (ES).

(72) Inventores; e

(75) Inventores/Solicitantes *(para US solamente)*: **CORBI LÓPEZ, Angel** [ES/ES]; CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS (CIB-CSIC), c/ Velázquez 144, 28006 MADRID (ES). **COLMENARES BRUNET, María** [ES/ES]; CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS (CIB-CSIC), c/ Velázquez 144, 28006 MADRID (ES). **RIVAS LÓPEZ, Luis, Ignacio** [ES/ES]; CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS (CIB-CSIC), c/ Velázquez 144, 28006 MADRID (ES). **RELLOSO CERCEDA, Miguel** [ES/ES]; CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS (CIB-CSIC), c/ Velázquez 144, 28006 MADRID (ES).

(74) Mandatario: **REPRESA SÁNCHEZ, Domingo**; CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS, C/ Serrano 117, 28006 MADRID (ES).

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

(84) Estados designados *(regional)*: patente ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), patente euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), patente europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), patente OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicada:
— *con informe de búsqueda internacional*

Para códigos de dos letras y otras abreviaturas, véase la sección "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" que aparece al principio de cada número regular de la Gaceta del PCT.

(54) **Title:** THERAPEUTIC COMPOUND AGAINST LEISHMANIA INFECTION AND USE THEREOF

(54) **Título:** COMPUESTO TERAPÉUTICO FRENTE A LA INFECCIÓN POR LEISHMANIA Y SU USO

(57) **Abstract:** The invention relates to a therapeutic compound against Leishmania infection and to the use thereof. Said invention has for the first time demonstrated the role of the DC-SIGN (Dendritic cell-specific ICAM 3 grabbing non-integrin) receptor, which is present on the surface of dendritic cells, in the process of binding the Leishmania parasite to human eukaryotic cells, among others, dendritic cells, macrophages and cells derived from monocytes. The invention relates to a novel therapeutic compound against Leishmania infection, which can block or cancel the binding of the infectious forms of the Leishmania parasite to the DC-SIGN receptor which is present in eukaryotic cells, among others, human dendritic cells and certain macrophage populations, and the subsequent inhibition of the internalisation of the parasite.

(57) **Resumen:** En la presente invención se ha demostrado por primera vez el papel del receptor DC-SIGN (Dendritic cell-specific ICAM 3 grabbing non-integrin), presente en la superficie de las células dendríticas, en el proceso de unión del parásito Leishmania a células eucarióticas humanas, entre otras células dendríticas, macrófagos y células derivadas de monocitos. La invención consiste en un nuevo compuesto terapéutico frente a la infección por Leishmania capaz de bloquear o anular el proceso de unión de las formas infecciosas del parásito Leishmania con el receptor DC-SIGN, presente en células eucarióticas, entre otras, en células dendríticas humanas y ciertas poblaciones de macrófagos, y la subsecuente inhibición de internalización del parásito.

WO 2004/000352 A1

COMPUESTO TERAPÉUTICO FRENTE A LA INFECCIÓN POR *Leishmania* Y SU USO.

SECTOR DE LA TÉCNICA

La presente invención se encuadra dentro del sector farmacéutico y describe un compuesto terapéutico para uso frente a la infección por *Leishmania*, capaz de bloquear o anular la unión de las formas infecciosas de *Leishmania* con el receptor DC-SIGN presente en células eucarióticas.

ESTADO DE LA TÉCNICA

La leishmaniasis es una enfermedad parasitaria transmitida por un vector con un amplio espectro de manifestaciones clínicas, desde lesiones cutáneas locales hasta formas viscerales de riesgo mortal, debido principalmente a las diferencias entre las especies de *Leishmania* y al estado inmunológico del hospedador.

Entre los eventos iniciales que tienen lugar en el sitio de inoculación de *Leishmania* se incluye la infección de células hospedadoras por parte de promastigotes metacíclicos seguido de su transformación intracelular en amastigote. Una vez liberados al medio extracelular, los amastigotes invaden nuevas células provocando la diseminación de la infección. Durante las primeras fases de este ciclo expansivo, están ausentes anticuerpos específicos, lo cual impide mecanismos opsonizantes.

El parásito *Leishmania* infecta fagocitos mononucleares, un factor clave de la respuesta inmune frente al parásito. Esta localización le permite al parásito subvertir desde dentro las funciones efectora y reguladora de estas células. Las células cutáneas presentadoras de antígeno (APC), específicamente las células epidérmicas de Langerhans (LC) y las células dendríticas (DC), están implicadas activamente en la vigilancia de su entorno (Banchereau, J., and R.M. Steinman. 1998. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392:245-252; Mellman, I., and R.M. Steinman. 2001. Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines. *Cell* **106**:255-258). En el caso de *Leishmania amazonensis* (complejo *L. mexicana*), ambos, amastigotes y promastigotes metacíclicos, infectan células DC murinas (Qi, H., V. Popov, and L. Soong. 2001. *Leishmania amazonensis*-dendritic cell interactions in vitro

and the priming of parasite-specific CD4(+) T cells in vivo. *J Immunol* **167**:4534-4542), aunque la capacidad de LC y DC de capturar otras especies de *Leishmania* sigue siendo un tema en debate (Konecny, P., A.J. Stagg, H. Jebbari, N. English, R.N. Davidson, and S.C. Knight. 1999. Murine dendritic cells internalize *Leishmania major* promastigotes, produce IL-12 p40 and stimulate primary T cell proliferation in vitro. *Eur J Immunol* **29**:1803-1811; von Stebut, E., Y. Belkaid, T. Jakob, D.L. Sacks, and M.C. Udey. 1998. Uptake of *Leishmania major* amastigotes results in activation and interleukin 12 release from murine skin-derived dendritic cells: implications for the initiation of anti-*Leishmania* immunity. *J Exp Med* **188**:1547-1552). La presencia en lesiones cutáneas de LC y DC parasitadas por *Leishmania in vivo* ha sido divulgada tanto en leishmaniasis cutánea humana (Ridley, M.J., and C.W. Wells. 1986. Macrophage-parasite interaction in the lesions of cutaneous leishmaniasis. An ultrastructural study. *Am J Pathol* **123**:79-85; Isaza, D.M., M. Restrepo, R. Restrepo, G. Caceres-Dittmar, and F.J. Tapia. 1996. Immunocytochemical and histopathologic characterization of lesions from patients with localized cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania panamensis*. *Am J Trop Med Hyg* **55**:365-369; el-Hassan, A.M., S.E. Meredith, H.I. Yagi, E.A. Khalil, H.W. Ghalib, K. Abbas, E.E. Zijlstra, C.C. Kroon, G.J. Schoone, and A. Ismail. 1995. Sudanese mucosal leishmaniasis: epidemiology, clinical features, diagnosis, immune responses and treatment. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **89**:647-652) como en leishmaniasis murina experimental (Blank, C., H. Fuchs, K. Rappersberger, M. Rollinghoff, and H. Moll. 1993. Parasitism of epidermal Langerhans cells in experimental cutaneous leishmaniasis with *Leishmania major*. *J Infect Dis* **167**:418-425 ; Williams, R.O. 1988. Invasion of murine dendritic cells *by Leishmania major* and *L. mexicana mexicana*. *J Parasitol* **74**:186-187). Debido a la proximidad de las células dendríticas inmaduras a los lugares en que el parásito *Leishmania* penetra en la dermis, tras la ingesta de sangre por el flebotomo, el papel de estas células es crítico para el inicio de la respuesta inmune específica de *Leishmania*. (Moll, H., H. Fuchs, C. Blank, and M. Rollinghoff. 1993. Langerhans cells transport *Leishmania major* from the infected skin to the draining lymph node for presentation to antigen-specific T cells. *Eur J Immunol* **23**:1595-1601).

Las células dendríticas son células presentadoras de antígeno (APC) que capturan antígenos en tejidos periféricos y migran por la linfa o la sangre hasta los ganglios linfáticos donde se encuentran las células T. En esta localización las células

dendríticas presentan los antígenos procesados a las células T inmaduras iniciando éstas respuestas primarias específicas de antígenos.

Las células dendríticas expresan varios receptores de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP), incluyendo numerosas lectinas de tipo C y receptores tipo lectina (Figdor CG, v.K.T., Adema G.J. 2002. C-type lectin receptors on dendritic cells and Langerhans cell. *Nat. Rev. Immun* **2**:77-84). Teniendo en cuenta que la superficie de *Leishmania* spp. presenta abundantes glicoconjugados ricos en manosa (Ilgoutz, S.C., and M.J. McConville. 2001. Function and assembly of the *Leishmania* surface coat. *Int J Parasitol* **31**:899-908), se postuló como hipótesis razonable pensar que las interacciones lectina-oligosacáridos están implicadas en el reconocimiento del parásito.

DC-SIGN (dendritic cell-specific ICAM-3 grabbing nonintegrin, CD209) es una lectina de tipo C de superficie celular expresada en células dendríticas e implicada en adhesión célula-célula debido a su capacidad para unir ICAM-3 e ICAM-2, que se encuentran en la superficie de las células T y endoteliales, respectivamente (Geijtenbeek, T.B., D.J. Krooshoop, D.A. Bleijs, S.J. van Vliet, G.C. van Duijnhoven, V. Grabovsky, R. Alon, C.G. Figdor, and Y. van Kooyk. 2000. DC-SIGN-ICAM-2 interaction mediates dendritic cell trafficking. *Nat Immunol* **1**:353-357; Geijtenbeek, T.B., R. Torensma, S.J. van Vliet, G.C. van Duijnhoven, G.J. Adema, Y. van Kooyk, and C.G. Figdor. 2000. Identification of DC-SIGN, a novel dendritic cell-specific ICAM-3 receptor that supports primary immune responses. *Cell* **100**:575-585). Fue también observado que DC-SIGN y su homólogo DC-SIGN-related (DC-SIGNR) son capaces de unirse a virus con actividad patógena, como es el caso de la interacción de DC-SIGN con la proteína gp 120 del HIV-1 (Geijtenbeek, T.B., D.S. Kwon, R. Torensma, S.J. van Vliet, G.C. van Duijnhoven, J. Middel, I.L. Cornelissen, H.S. Nottet, V.N. KewalRamani, D.R. Littman, C.G. Figdor, and Y. van Kooyk. 2000. DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1-binding protein that enhances trans-infection of T cells. *Cell* 100:587-597; WO0063251, 26 Octubre 2000, Universidad Nijmegen) y el virus del Ebola (Pohlmann, S., F. Baribaud, and R.W. Doms. 2001. DC-SIGN and DC-SIGNR: helping hands for HIV. *Trends Immunol* **22**:643-646; Alvarez, C.P., F. Lasala, J. Carrillo, O. Muñiz, A.L. Corbí, R. Delgado. 2002. C-Type Lectins DC-SIGN and L-SIGN Mediate Cellular Entry by Ebola Virus in cis and in trans. *J Virol.* **76**:6841-6844).

DC-SIGN es el principal receptor de las células dendríticas involucrado en la infección por virus VIH-1 y facilita su transmisión a las células T. De este modo tanto el virus VIH-1 como las células T en reposo presentan en su superficie un ligando con nivel de expresión elevado y que interactúa con las células dendríticas. El domínio activo del receptor DC-SIGN corresponde principalmente al domínio lectina de su molécula, y media las interacciones con el virus HIV-1 (mediante el reconocimiento de gp120), virus del Ebola, células T (mediante la interacción con ICAM-3) y células endoteliales (mediante la interacción con ICAM-2).

Sin embargo, los receptores utilizados por amastigotes de *Leishmania* para adherirse e infectar macrófagos, la diana final, no están totalmente establecidos y, según nuestro conocimiento, no se han caracterizado todavía receptores específicos para *Leishmania* en DCs.

Los inhibidores de lectinas de tipo C y/o anticuerpos específicos dirigidos contra el receptor de lectinas de tipo C DC-SIGN pueden modular, y más específicamente reducir, la adhesión de células T a las células dendríticas, y de este modo influenciar la respuesta inmune, especialmente en sus fases iniciales (Geijtenbeek, T.B., R. Torensma, S.J. van Vliet, G.C. van Duijnhoven, G.J. Adema, Y. van Kooyk, and C.G. Figdor. 2000. Identification of DC-SIGN, a novel dendritic cell-specific ICAM-3 receptor that supports primary immune responses. *Cell* **100**:575-585)

Actualmente, el único modo eficaz de tratamiento para la leishmaniasis se basa exclusivamente en la quimioterapia, ya que no existe una vacuna eficaz en humanos, y los programas de control del vector invertebrado o del reservorio vertebrado sólo han resultado con éxito en circunstancias muy especiales. Por otro lado, los fármacos utilizados contra la leishmaniasis, como los derivados orgánicos de antimonio pentavalente o la anfotericina, presentan con frecuencia efectos muy tóxicos y aparición de resistencias. Un fármaco que disminuya la carga parasitaria, además del beneficio intrínseco en la patología de la enfermedad, favorecería que los mecanismos inmunes de destrucción del parásito, inhibidos proporcionalmente a la carga parasitaria, sean eficaces, existiendo una sinergia clara del tratamiento farmacológico con la respuesta inmune protectiva (Murray, H.W. (2000) Treatment of visceral leishmaniasis (kala-azar): a decade of progress and future approaches *Int. J. Infect. Dis.* **4**:158-77).

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

Descripción breve

La presente invención tiene como objetivo buscar soluciones para el problema de infecciones por el parásito *Leishmania*.

Esta invención se basa en la observación por parte de los inventores de que las formas amastigotes infecciosas del parásito *Leishmania pifanoi* se unen específicamente y con gran afinidad al receptor DC-SIGN. El bloqueo de este tipo de receptor puede modular, y más específicamente reducir, la adhesión del parásito a las células eucarióticas, y de este modo puede influenciar la respuesta inmune.

Un objeto de la presente invención lo constituye un compuesto terapéutico capaz de bloquear o anular la unión de formas infecciosas del parásito *Leishmania* al receptor DC-SIGN en células eucarióticas en mamíferos, preferentemente humanos, y que permite una inhibición de la unión al receptor e internalización del parásito por estas células y el subsecuente desarrollo de la respuesta inmune.

Un objeto particular de la presente invención es un compuesto terapéutico de la presente invención que pertenece, entre otros, al siguiente grupo:

a) anticuerpo anti DC-SIGN,

b) manano soluble,

c) receptor DC-SIGN o el domínio lectina de DC-SIGN, recombinantes, y isoformas y proteínas homólogas de los mismos,

d) receptor recombinante presente en el parásito *Leishmania* responsable de la unión con el receptor DC-SIGN, y sus formas homólogas.

Un objeto particular de la presente invención lo constituye el anticuerpo monoclonal anti-DC-SIGN, MR-1.

Otro objeto de la presente invención lo constituye un procedimiento para la identificación y evaluación de compuestos capaces de bloquear o anular la unión de la forma infecciosa del parásito *Leishmania* al receptor DC-SIGN, caracterizado por los siguientes pasos:

a) adición del compuesto candidato,

b) determinación de la actividad bloqueadora del candidato mediante la valoración entre otros, de parámetros celulares: capacidad de unión o invasión *in vitro* en células K562-CD209 transfectadas con el receptor DC-SIGN, células dendríticas,

células derivadas de monocitos (MDDC), u otras células que presentan en su superficie el receptor DC-SIGN, y competición en el proceso de inhibición de la unión con un anticuerpo específico anti-DC-SIGN o con mananos,

c) identificación de un bloqueador de la unión de la forma infecciosa del parásito *Leishmania* al receptor DC-SIGN.

Un objeto adicional de la presente invención es un compuesto terapéutico de la presente invención identificado por el procedimiento anteriormente mencionado.

Un objeto adicional de la presente invención lo constituye una composición farmacéutica que contiene una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto terapéutico de la presente invención junto con al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.

Otro objeto adicional de la presente invención lo constituye el empleo de la composición farmacéutica en el tratamiento de infecciones provocadas por el parásito *Leishmania* en mamíferos, preferentemente en humanos.

Otro objeto adicional de la presente invención lo constituye el empleo del receptor DC-SIGN como diana para el diseño de compuestos terapéuticos, capaces de bloquear o anular la unión de las formas infecciosas del parásito *Leishmania* al receptor DC-SIGN, o a cualquiera de sus isoformas o proteínas homólogas.

Descripción detallada

Esta invención se basa en el descubrimiento que han hecho los inventores de que las formas amastigotes infecciosas del parásito *Leishmania pifanoi* se unen específicamente y con gran afinidad al receptor DC-SIGN, sugiriendo un papel de este receptor en el desarrollo de las respuestas inmunes frente a *Leishmania*. Esta es la primera vez que se describe la unión de un patógeno no viral, más específicamente un parásito, al receptor DC-SIGN.

La invención también se basa en el hecho de que el bloqueo de este tipo de receptor en las células dendríticas, por inhibidores de lectinas de tipo C y/o anticuerpos específicos dirigidos contra el receptor de lectina tipo C DC-SIGN, pueden modular, y más específicamente reducir, la adhesión del parásito a las células dendríticas, y de este modo pueden influenciar la respuesta inmune, en particular los estadios iniciales de la respuesta inmune tal como se ha visto en otros procesos infecciosos (Patente

"Composition and Method for modulating dendritic cell-T cell interaction" WO0063251, 26 Octubre 2000, Universidad Nijmegen).

La presente invención proporciona un compuesto terapéutico, en adelante compuesto terapéutico de la presente invención, capaz de bloquear o anular la unión de formas infecciosas del parásito *Leishmania* al receptor DC-SIGN en células eucarióticas en mamíferos, preferentemente humanos, y que permite una inhibición de la unión al receptor e internalización del parásito por estas células y el subsecuente desarrollo de la respuesta inmune.

Tal como se utiliza en la presente invención, el término "formas infecciosas del parásito *Leishmania*" se refiere a formas infecciosas de amastigotes y promastigotes, entre otras, pero no exclusivamente, de las especies de *L. amazonensis*, *L. major*, *L. pifanoi, L. infantum* (Herwaldt, B.L. 1999. Leishmaniasis. *Lancet.* **354**: 1191-1199; Croft, S.L., Yardley, V. 2002 Chemotherapy of leishmaniasis. *Current Pharmaceutical Design* **8**: 319-42; Murray, H.W. 2000 Treatment of visceral leishmaniasis (kala-azar): a decade of progress and future approaches. *Int J Infect Dis.* **4(3)**: 158-77; Handman, E. 1999 Cell biology of *Leishmania*. *Adv Parasitol.* **44**:1-39).

Tal como se utiliza en esta invención, el término "receptor DC-SIGN" se refiere a una lectina de tipo C que actúa como receptor en las células dendríticas u otras células que lo presenten e identificado por la patente "Composition and Method for modulating dendritic cell-T cell interaction" (WO0063251, 26 Octubre 2000, Universidad Nijmegen).

Tal como se utiliza en esta invención, el término "inhibición de la unión al receptor" se refiere al bloqueo de la unión del parásito *Leishmania* al receptor DC-SIGN en al menos un 20%, preferentemente en al menos un 85%, ó más preferentemente en un 100%.

El termino "célula eucariótica", tal como se utiliza en la presente invención, se refiere a cualquier tipo de célula humana o animal que presente en su superficie el receptor DC-SIGN, entre otras, células dendríticas, macrófagos y células derivadas de monocitos. (Soilleux, E.J., Morris, L.S., Leslie, G., Chehimi, J., Luo, Q., Levroney, E., Trowsdale, J., Montaner, L.J., Doms, R.W., Weissman, D., Coleman, N., Lee, B. 2002 Constitutive and induced expression of DC-SIGN on dendritic cell and macrophage subpopulations *in situ* and *in vitro*. *J Leukoc Biol.* **71(3)**:445-57).

Tal como se utiliza en la presente invención, el término "compuesto terapéutico" se refiere a cualquier sustancia capaz de bloquear o anular la unión de las formas infecciosas de *Leishmania* al receptor DC-SIGN presente en células eucarióticas.

Un objeto particular de la presente invención es un compuesto terapéutico de la presente invención que pertenece, entre otros, al siguiente grupo:

a) anticuerpo anti DC-SIGN,

b) manano soluble,

c) receptor DC-SIGN o el domínio lectina de DC-SIGN, recombinantes, y isoformas y proteínas homólogas de los mismos,

d) receptor recombinante presente en el parásito *Leishmania* responsable de la unión con el receptor DC-SIGN, y sus formas homólogas.

Como "manano soluble", se refiere en esta invención a cualquier polisacárido cuyos azúcares componentes sean mayoritariamente residuos de manosa, pudiendo presentar modificaciones adicionales y ramificaciones por otros residuos de azúcar, pero en los que la proporción de manosa es mayoritaria (Haworth WN *et al.* 1937. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **784**).

Tal como se utiliza en esta invención, el término "receptor DC-SIGN recombinante" se refiere a la forma recombinante del receptor DC-SIGN, en una forma soluble, y producido en células eucarióticas o procarióticas, que tiene la capacidad de unirse al receptor presente en el parásito *Leishmania*, recubriendo este parásito y saturando los puntos de unión a las células eucarióticas portadoras del receptor DC-SIGN.

Tal como se utiliza en esta invención, el término "receptor recombinante presente en el parásito *Leishmania*" se refiere a la forma recombinante del receptor presente en el parásito *Leishmania*, en una forma soluble, y producido en células eucarióticas o procarióticas, que tiene la capacidad de unirse al receptor DC-SIGN presente en células eucarióticas, recubriendo estas células y saturando los puntos de unión a las formas infecciosas del parásito *Leishmania* portadoras del receptor.

Como formas homólogas, se refiere a todas las proteínas que, con respecto al receptor DC-SIGN y al receptor presente en el parásito *Leishmania*, independientemente de su origen, presentan una homología de al menos, un 20% en la zona de reconocimiento del parásito y del receptor DC-SIGN.

Un objeto particular de la presente invención lo constituye el anticuerpo monoclonal anti-DC-SIGN, MR-1.

Otro objeto adicional de la presente invención lo constituye un procedimiento para la identificación y evaluación de compuestos capaces de bloquear o anular la unión de la forma infecciosa del parásito *Leishmania* al receptor DC-SIGN, caracterizado por los siguientes pasos:

a) adición al medio del compuesto candidato,
b) determinación de la actividad bloqueadora del candidato mediante la valoración entre otros, de parámetros celulares: capacidad de unión o invasión *in vitro* en células K562-CD209 transfectadas con el receptor DC-SIGN, células dendríticas, células derivadas de monocitos (MDDC), u otras células que presentan en su superficie el receptor DC-SIGN, y competición en el proceso de inhibición de la unión con un anticuerpo específico anti-DC-SIGN o con mananos,
c) identificación de un bloqueador de la unión de la forma infecciosa del parásito *Leishmania* al receptor DC-SIGN.

Un objeto particular de la presente invención es un compuesto terapéutico de la presente invención identificado por el procedimiento anteriormente mencionado.

Un objeto particular de la presente invención lo constituye una composición farmacéutica que contiene una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto terapéutico de la presente invención junto con al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable. Tal como se utiliza en esta invención el término "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a la cantidad de compuesto terapéutico de la presente invención suficiente para inhibir o reducir el proceso de unión entre el parásito *Leishmania* y el receptor DC-SIGN.

Por otro lado, un objeto adicional de la presente invención lo constituye el empleo de la composición farmacéutica en el tratamiento de infecciones provocadas por el parásito *Leishmania* en mamíferos, entre otros, en humanos.

Otro objeto adicional de la presente invención lo constituye el empleo del receptor DC-SIGN como diana para el diseño de compuestos terapéuticos, capaces de bloquear o anular la unión de las formas infecciosas del parásito *Leishmania* al receptor DC-SIGN, o a cualquiera de sus isoformas o proteínas homólogas.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1.- Amastigotes de *L. pifanoi* se unen a células K562 *establemente* transfectadas con DC-SIGN. Se incubaron células no transfectadas (K562) o células K562 transfectadas con DC-SIGN (K562-CD209) con amastigotes marcados con CFSE a distintas proporciones durante 2h a 37°C. Se cuantificó por citometría de flujo la proporción de células con amastigotes unidos mediante "gating" en K562 y determinación del porcentaje de células fluorescentes. Dos regiones al azar fueron establecidas: K562 con parásitos no unidos y K562 fluorescentes debido a la unión a las células de formas amastigotes marcadas con CFSE. Para efectos de comparación, las escalas fueron establecidas con relación al numero de células sin parásitos unidos.

Figura 2.- Amastigotes de *L. pifanoi* se unen específicamente a DC-SIGN en células transfectadas K562-CD209. Células K562 transfectadas con DC-SIGN (K562-CD209), previamente no tratadas (control), pre-tratadas durante 10 min a temperatura ambiente con un anticuerpo monoclonal anti-DC-SIGN (MR-1), manano soluble (300 μg/ml) o GIPLs de *Leishmania* purificados (5 μg/ml) (moléculas con alto contenido en manosa abundantemente presentes en la membrana plasmática de las formas promastigotes y amastigotes del parásito *Leishmania*), se incubaron a una proporción 1:5 célula:parásito, con amastigotes marcados con CFSE durante distintos tiempos a 37°C. Se cuantificó por citometría de flujo la proporción de células con amastigotes unidos mediante gating en K562 y determinación del porcentaje de células fluorescentes. Dos regiones al azar fueron establecidas: K562 con parásitos no unidos y K562 fluorescentes debido a la unión a las células de formas amastigotes marcadas con CFSE. Para efectos de comparación, las escalas fueron establecidas con relación al numero de células sin parásitos unidos.

Figura 3.- La unión de amastigotes de *L. pifanoi* a células dendríticas derivadas de monocitos (MDDC) se ve afectada por la presencia de un anticuerpo anti-DC-SIGN (MR-1). MDDC previamente no tratadas (control), pre-tratadas durante 10 min a temperatura ambiente con un anticuerpo monoclonal anti-DC-SIGN MR-1 (columna izquierda), otros anticuerpos irrelevantes (inmunoglobulinas humanas, anti-CD18), manano soluble o EGTA, fueron incubadas con formas amastigotes marcadas con CFSE en la proporción 1:5 célula:parásito, durante 2 horas a 37°C. El porcentaje de células DC con formas amastigotes unidas fue cuantificada por citometría de flujo mediante

gating en células MDDC. Dos regiones al azar fueron establecidas: células MDDC sin parásitos unidos (C) y células MDDC fluorescentes debido a la unión de formas amastigotes marcadas con CFSE (G). Para efectos de comparación, las escalas fueron establecidas con relación al numero de células sin parásitos unidos.

Figura 4.- Amastigotes de *L. pifanoi* se unen específicamente a DC-SIGN en células MDDC. (A) Células MDDC humanas inmaduras, previamente no tratadas (control), pre-tratadas durante 10 min a temperatura ambiente con un anticuerpo monoclonal anti-DC-SIGN (MR-1) o manano soluble, se incubaron a una proporción 1:5 con amastigotes marcados con CFSE durante 2h a 37°C. Se fotografío en un microscopio de epifluorescencia un campo representativo de cada muestra (1200x). (B) **Manano soluble inhibe la adhesión de MDDC a ICAM-3 inmovilizado.** Se tapizó placas de ELISA con ICAM-3 y se incubaron con MDDC marcadas con BCECF y anticuerpos anti-DC-SIGN (MR-1), CD18 (TS1/18) o manano a 100 μg/ml. Entonces se dejo que las células se adhiriesen durante 15 min a 37° C. Las células adheridas se cuantificaron en un analizador de fluorescencia.

Figura 5.- Unión de *Leishmania* a las células dendríticas inmaduras humanas. Las células fueron preincubadas (10 min , 25°C) o no, con el anticuerpo monoclonal bloqueante de DC-SIGN MR-1 (1.2 μg/ml), e incubadas posteriormente con parásitos marcados con CSFE (relación parásitos/célula= 5/1). El porcentaje de las células con parásitos unidos fue cuantificado por citometría de flujo.

Figura 6.-Unión de *Leishmania* a células K562 transfectadas con DC-SIGN. Células no transfectadas (K562) o transfectadas con DC-SIGN (K562-DC-SIGN), son preincubadas o no con manano soluble (500 μg/ml) y a continuación, son incubadas(35°C, 1h) con parásitos marcados con CFSE a una relación parásito/célula de 5/1. El porcentaje de células con parásitos unidos se cuantificó por citometría de flujo.

EJEMPLOS DE REALIZACIÓN DE LA INVENCIÓN

En la presente invención se ha demostrado por primera vez que el proceso de unión e internalización de las formas amastigotes del parásito *Leishmania* se realiza por medio del receptor DC-SIGN presente en las células dendríticas humanas. De este modo, se empezó por demostrar que los amastigotes axénicos se unen a células dendríticas de forma dependiente de DC-SIGN, tal como hemos demostrado utilizando

tanto células K562 transfectadas con DC-SIGN (K562-CD209) como células dendríticas derivadas de monocitos (MDDC) (Figuras 1-3). Los amastigotes axénicos de *Leishmania* son formas amastigotes del parásito que no están recubiertos de anticuerpos opsonizantes, no quedando de este modo enmascarada la participación de otros receptores distintos, y pudiendo analizarse la participación del receptor DC-SIGN en la unión e internalización de amastigotes de *Leishmania*. Esta unión es bloqueada por medio del anticuerpo monoclonal anti-DC-SIGN (MR-1) que inhibe la unión del parásito a las células dendríticas. El siguiente paso consistió en determinar si el bloqueo del receptor DC-SIGN con determinados compuestos, tales como el anticuerpo monoclonal MR-1, manano soluble o un anticuerpo anti CD18 (TS1/18) alteraba el número de células dendríticas infectadas con amastigotes. Se observó que el número de DCs con formas infecciosas del parásito unidas era menor en el grupo tratado con el anticuerpo MR-1. Este hecho sugiere un papel importante de este receptor en la infección inicial de células dendríticas por *Leishmania*. Contrariamente a la unión de MDDC a ICAM-3 (presente en las células T), los mananos bloquearon parcialmente la unión de amastigotes a células dendríticas, resultado que se asemeja a resultados previos sobre la incapacidad de compuestos constituidos por manano soluble de inhibir la interacción entre amastigotes de *Leishmania* y macrófagos (Kane, M.M., and D.M. Mosser. 2000. *Leishmania* parasites and their ploys to disrupt macrophage activation. *Curr Opin Hematol* **7**:26-31). El efecto inhibidor incompleto de manano sobre la interacción DC-SIGN-*Leishmania* puede deberse a diversas razones alternativas. En primer lugar, los sitios de unión de *Leishmania* en DC-SIGN pueden ser diferentes a los que están implicados en la unión de manano. En este sentido, experimentos de mutagénesis dirigida han indicado que los lugares de unión de HIV gp120 e ICAM-3 no son completamente idénticos, y de hecho, el reconocimiento de HIV gp120 no es dependiente de su glicosilación (Geijtenbeek, T.B., G.C. van Duijnhoven, S.J. van Vliet, E. Krieger, G. Vriend, C.G. Figdor, and Y. van Kooyk. 2002. Identification of different binding sites in the dendritic cell- specific receptor DC-sIGN for ICAM-3 and HIV-1. *J Biol Chem* **17**:17). En segundo lugar, la afinidad del/los ligando(s) de *Leishmania* por DC-SIGN puede ser superior a la del manano. De hecho, sutiles cambios en la estructura oligosacárida de moléculas relacionadas ricas en manano da lugar a diferencias sustanciales en la afinidad por DC-SIGN (Mitchell, D.A., A.J. Fadden, and

K. Drickamer. 2001. A novel mechanism of carbohydrate recognition by the C-type lectins DC- SIGN and DC-SIGNR. Subunit organization and binding to multivalent ligands. *J Biol Chem* **276**:28939-28945). En cualquier caso, no se puede descartar la posibilidad de un mecanismo cooperativo en la interacción entre *Leishmania* y DC-SIGN, ya que el parásito podría actuar como un ligando multivalente.

Puesto que la composición de la membrana del parásito varía a lo largo de su ciclo vital (Wright, E. P., and E. R. el Amin. 1989. *Leishmania* infection: surfaces and immunity. *Biochem Cell Biol 67:525*; Bahr, V., Y. D. Stierhof, T. Ilg, M. Demar, M. Quinten, and P. Overath. 1993. Expression of lipophosphoglycan, high-molecular weight phosphoglycan and glycoprotein 63 in promastigotes and amastigotes of *Leishmania mexicana. Mol Biochem Parasitol 58:107*), la implicación de DC-SIGN como receptor para las tres formas principales del ciclo vital del parásito (promastigotes logarítmicos y estacionarios , conjuntamente con amastigotes) fue analizada. Los amastigotes mostraron la interacción más fuerte, y dentro de los promastigotes, aquellos de fase estacionaria (metacíclicos e infectivos) poseen una mayor avidez por DC-SIGN que los promastigotes de fase logarítmica (procíclicos y no infectivos).

Ejemplo 1.- La unión de amastigotes a DC-SIGN es específica y de gran afinidad.

Los resultados preliminares indicaron que los amastigotes axénicos de *Leishmania pifanoi* eran eficazmente internalizados por MDDCs humanas. Con el objetivo de explorar si DC-SIGN estaba implicado en la unión de amastigotes, primero analizamos la interacción de amastigotes axénicos con células K562 transfectadas con DC-SIGN (K562-CD209). Los amastigotes axénicos de *L. pifanoi* fueron capaces de unirse de forma dosis dependiente a las células transfectadas, pero no a las no transfectadas, según se evaluó por citometría de flujo usando parásitos marcados con CSFE (Figura 1). Mediante el empleo de distintas proporciones de células K562-CD209:amastigotes (1:1, 1:5 y 1:10), se determinó que la unión era máxima dentro del rango 1:10-1:5. Consecuentemente, para evitar el exceso de ligandos del parásito, en los demás experimentos de cinética y competición, se empleó la proporción 1:5. La unión de amastigotes a K562-CD209 fue rápida y alcanzó la saturación en 1h (Figura 2). El anticuerpo monoclonal MR-1 bloqueó completamente la unión de amastigotes a células K562-CD209 (Figura 2), confirmándose la participación de DC-SIGN en esta

interacción específica. Con relación al manano soluble (300 μg/ml), este redujo en un 30% la unión de amastigotes al receptor DC-SIGN (Figura 2). No se observó inhibición empleando GIPLs de *Leishmania*, que son moléculas con un alto contenido en manosa presentes en elevado número en las membranas plasmáticas de las formas promastigotes y amastigotes, a una concentración de 5 μg/ml (aproximadamente equivalente a $2x10^7$ amastigotes/ml) (Zawadzki, J., C. Scholz, G. Currie, G.H. Coombs, and M.J. McConville. 1998. The glycoinositolphospholipids from *Leishmania panamensis* contain unusual glycan and lipid moieties. *J Mol Biol* 282:287-299) (Figura 2). Por lo tanto, DC-SIGN funciona como un receptor para amastigotes de *L. pifanoi*, cuya unión a DC-SIGN puede ser total o parcialmente desplazada por manano, dependiendo del tipo celular ensayado.

Ejemplo 2.- DC-SIGN está implicado en la unión de amastigotes a DC.

Para evaluar el papel desarrollado por el receptor DC-SIGN en el proceso de internalización de las formas amastigotes de *Leishmania* por DC, se pre-incubaron MDDC humanas inmaduras con un exceso de anticuerpo anti-DC-SIGN (MR-1), inmunoglobulinas humanas, anticuerpo anti-CD18 TS1/18, EGTA o manano soluble antes de la adición de amastigotes axénicos marcados con CFSE, en la proporción 1:5 DC:parásito, por 2 horas a 37°C. La incubación inicial de MDDC con el anticuerpo MR-1 reduce el número de parásitos unidos a las células en una forma dosis dependiente, observándose inhibición con diluciones inferiores a 1/40000 del fluido ascítico del hibridoma (figura 3). De este modo, el efecto inhibidor dependiente de la dosis del anticuerpo MR-1 demuestra la especificidad de la interacción entre DC-SIGN – *Leishmania*. La unión del parásito a las células eucarióticas fue completamente inhibida por EGTA, que es un inhibidor de las interacciones mediadas por lectinas de tipo C, pero no por las inmunoglobulinas humanas, ni por el anticuerpo anti-CD18 TS1/18 (Figura 3). La pre-incubación de MDDC humanas inmaduras con manano soluble tuvo poca influencia en el proceso de unión del parásito a las células.

Debido a la amplia diversidad de posibles receptores en DC para amastigotes, el papel de DC-SIGN se evaluó mediante la preincubación de MDDC humanas inmaduras con un anticuerpo anti-DC-SIGN o manano soluble, previamente a la adición de amastigotes axénicos marcados con CFSE (proporción 1:5, 2h, 37°C). El número de

amastigotes unidos a DC, determinado microscópicamente, fue 17.7 (± 4.9) y 7.25 (± 2.0) en el control y en las MDDC tratadas con MR-1 respectivamente. En contraste, el manano tuvo un efecto menor en la reducción del número de amastigotes unidos por DC (Figura 4A), pero en cambio suprimió la unión de MDDC dependiente de DC-SIGN a ICAM-3 inmovilizado (Figura 4B). Estos resultados se complementaron mediante análisis por citometría de flujo (Figura 3).

Para evaluar el significado fisiológico de la interacción DC-SIGN-amastigotes de *L. pifanoi*, se incubaron MDDC humanas inmaduras con amastigotes axénicos, en la proporción 1:5 DC:parásito, después de la previa incubación con el anticuerpo MR-1, anticuerpo TS1/18 o manano soluble (500μg/ml). Al cabo de 48h, la infección se evaluó mediante el examen de al menos 200 células teñidas con Giemsa. Como se resume en la Tabla I, los amastigotes axénicos de *L. pifanoi* fueron eficazmente internalizados por MDDC humanas inmaduras en ausencia de anticuerpos opsonizantes (anticuerpos específicos que recubren el parásito y que tienen un papel primordial entre los mecanismos desarrollados por este para sobrevivir). Se observó que en el control, el 82.5% de DC infectadas presentaba 2.3 parásitos internalizados por célula (Tabla I). Sin embargo, la pre-incubación de MDDC humanas inmaduras con el anticuerpo MR-1 reducía significativamente el numero de células infectadas (82.5% *vs.* 7.4%) (Tabla I). Como se observó en ensayos de unión, la pre-incubación con el anticuerpo anti-CD18 no produjo una reducción del porcentaje de células infectadas (91.0%). Una vez más, el manano soluble solo inhibió parcialmente la internalización del parásito *Leishmania* por las MDDC.

Tabla I.- El anticuerpo MR-1 inhibe la infección de MDDC humanas inmaduras por amastigotes axénicos de *L. pifanoi*.

	% DC infectadas *	**Número de parásitos/DC infectada ***
Control	82.5	2.3
MR-1	7.4	2.4
TS1/18	91.0	1.1
Manano soluble	34.0	2.3

* El porcentaje de DCs infectadas y el número de amastigotes internalizados por célula infectada se determinó por microscopía tras el examen (200 células) de preparaciones teñidas con Giemsa.

Ejemplo 3.- Los promastigotes y amastigotes de *Leishmania infantum* y *L.pifanoi* se unen vía DC-SIGN a las células dendríticas.

La metaciclogénesis es un proceso mediante el cual *Leishmania* se transforma de la fase procíclica del promastigote, con muy baja infectividad, a la fase metacíclica, muy infectiva . En la Naturaleza, dicho proceso tiene lugar dentro del tubo digestivo del insecto vector. Dicha transformación conlleva un incremento en la capacidad para infectar y sobrevivir dentro del huésped vertebrado, donde el parásito se enfrenta al sistema immune del hospedador .

Para identificar las formas infectivas del parásito reconocidas por DC-SIGN, los inventores analizaron la capacidad de las células dendríticas inmaduras humanas para unir promastigotes metacíclicos y amastigotes tanto de *L. pifanoi* como de *L.infantum.* Conforme a los gráficos de la figura 5, ambas especies se unen a células dendríticas(54.1% y 65.0% para los amastigotes de *L.pifanoi* y *L.infantum* respectivamente), independientemente de qué forma infectiva del parásito se ensaye. En todos los casos , la unión del parásito se inhibe drásticamente si las células de mamífero se preincuban con el anticuerpo monoclonal MR-1, que bloquea DC-SIGN (64% de reducción para ambas formas infectivas de *L. pifanoi* y de 55% para las formas de *L. infantum*). En las células dendríticas inmaduras humanas, el porcentaje de las mismas con parásitos unidos fue siempre inferior para promastigotes que para amastigotes, lo que sugiere una menor afinidad de unión de la forma flagelada del parásito hacia DC-SIGN . Por consiguiente, DC-SIGN une tanto promastigotes metacíclicos y amastigotes de *L. pifanoi* (causante de la leishmaniasis cutánea) como de *L. infantum* (agente de leishmaniasis visceral).

Con el fin de profundizar en el papel de DC-SIGN en la interacción de *Leishmania* con las células dendríticas, los experimentos fueron repetidos en células K562 DC-SIGN. Como sucedió con las células dendríticas inmaduras humana, el porcentaje de células con promastigotes metacíclicos unidos (58.9% y 34.1% para *L. pifanoi* y *L.infantum* respectivamente) son más bajos que los correspondientes para amastigotes de ambas especies (65.6% y 51.8% para *L. pifanoi* y *L. infantum,* respectivamente) (Figura 6). Estos resultados confirman las diferencias en la unión relativa a DC-SIGN para

promastigotes y amastigotes. Por otra parte, el efecto bloqueante del manano, que bloquea DC-SIGN , es mayor sobre promastigotes (reducción de 40.3% para *L. pifanoi* y 84.8% para *L. infantum*) que sobre los amastigotes (13.0% y 27.8% de reducción para *L. pifanoi* y *L.infantum*, respectivamente), independientemente de la especie de parásito (Figura 6). En conjunto, estos resultados avalan una diferente avidez de ambas formas infectivas hacia DC-SIGN, que es confirmada mediante los ensayos de desplazamiento, mediante utilización de un exceso de amastigotes sin marcar: La adición de amastigotes de *L. pifanoi* reduce la unión de promastigotes logarítmicos (30%) y de fase estacionaria (32%), con porcentajes muy similares, pero no desplazan los amastigotes previamente unidos a DC-SIG(6.2% de reducción).

En la siguiente sección de Materiales y Métodos se identifican los reactivos, anticuerpos, parásitos y células, así como una descripción detallada de los ensayos utilizados en dichos Ejemplos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos y anticuerpos. El anticuerpo monoclonal específico para DC-SIGN (MR-1) ha sido descrito anteriormente (Relloso, M., Puig-Kroger, A., Muniz Pello, O., Rodriguez-Fernandez, JL., de la Rosa, G., Longo, N., Navarro, J., Munoz-Fernandez, MA., Sanchez-Mateos, P., Corbi AL. 2002. DC-SIGN (CD209) expression is IL-4 dependent and is negatively regulated by IFN, TGF-ß, and anti-inflammatory agents. *J Immunol* **168**: In press). El manano soluble (de *Saccharomyces cerevisiae*, Sigma M-7504) se preparó a 2mg/ml como solución stock en PBS, se filtró esterilemente, y se usó a las concentraciones indicadas. Los GIPLs de amastigotes de *Leishmania pifanoi* se aislaron mediante sucesivas extracciones de parásitos enteros con solventes orgánicos, según descrito anteriormente (Piedrafita, D., L. Proudfoot, A.V. Nikolaev, D. Xu, W. Sands, G.J. Feng, E. Thomas, J. Brewer, M.A. Ferguson, J. Alexander, and F.Y. Liew. 1999. Regulation of macrophage IL-12 synthesis by *Leishmania* phosphoglycans. *Eur J Immunol* **29**:235-244), se analizaron por TLC y se guardaron como solución stock estéril a 10 mg/ml en PBS (1% DMSO). ICAM-3/Fc recombinante humana se obtuvo de R&D Systems (cat. 715-IC).

Parásitos. Los amastigotes axénicos de *Leishmania pifanoi* MHOM/VE/60Ltrod fueron cultivados a 31°C en medio F29 simplificado suplementado con 20% de suero bovino fetal inactivado por calor (HIFBS) (Pan, A.A. 1984. *Leishmania mexicana*: serial

cultivation of intracellular stages in a cell-free medium. *Exp Parasitol* 58:72-80). Los amastigotes axénicos de *Leishmania infantum* (MCAN/ES/89/IPZ229/1/89 son cultivados conforme a los protocolos descritos a 37ºC (Pan, A. A. 1984. *Leishmania mexicana*: serial cultivation of intracellular stages in a cell-free medium. *Exp Parasitol 58:72*; Armson, A., S. W. Kamau, F. Grimm, J. A. Reynoldson, W. M. Best, L. M. MacDonald, and R. C. Thompson. 1999. A comparison of the effects of a benzimidazole and the dinitroanilines against *Leishmania infantum*. *Acta Trop 73:303*). Los promastigotes de *L.pifanoi* y *L.infantum* son crecidos a 27ºC en medio RPMI 1640 suplementado con 20% de suero fetal bovino inactivado por calor. Los promastigotes de la fase de crecimiento logarítmica y estacionaria se obtienen a los 3 ó 7-8 días de crecimiento de un cultivo con un inóculo inicial de 10^6 células/ml. Para la localización de los parásitos en los experimentos de unión, se marcaron con el colorante fluorescente CFSE (Molecular Probes), según un procedimiento previamente descrito (Qi, H., V. Popov, and L. Soong. 2001. *Leishmania amazonensis*-dendritic cell interactions in vitro and the priming of parasite-specific CD4(+) T cells in vivo. *J Immunol* **167**:4534-4542)

Células. Las MDDC inmaduras se prepararon a partir de monocitos de sangre periférica mediante la utilización de IL-4 (1000 U/ml) y GM-CSF (1000 U/ml), según lo ya descrito (Relloso, M., Puig-Kroger, A., Muniz Pello, O., Rodriguez-Fernandez, JL., de la Rosa, G., Longo, N., Navarro, J., Munoz-Fernandez, MA., Sanchez-Mateos, P., Corbi AL. 2002. DC-SIGN (CD209) expression is IL-4 dependent and is negatively regulated by IFN, TGF-ß, and anti-inflammatory agents. *J Immunol* **168**: 2634-2643; Sallusto, F., and A. Lanzavecchia. 1994. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med* **179**:1109-1118). Las células K562 se cultivaron en RPMI 1640 suplementado con 10% suero de ternera fetal (FCS), 2 mM glutamina y 10 µg/ml gentamicina (medio completo). Las células K562 transfectadas con DC-SIGN (K562-CD209) (Relloso, M., Puig-Kroger, A., Muniz Pello, O., Rodriguez-Fernandez, JL., de la Rosa, G., Longo, N., Navarro, J., Munoz-Fernandez, MA., Sanchez-Mateos, P., Corbi AL. 2002. DC-SIGN (CD209) expression is IL-4 dependent and is negatively regulated by IFN, TGF-ß, and anti-inflammatory agents. *J Immunol* **168**: 2634-2643) se crecieron en medio completo suplementado con 300 µg/ml de G418.

Ensayos de unión del parásito. Se resuspendieron células MDDC inmaduras, K562 o K562-CD209 en medio completo y se alicuotaron en placas de 24 pocillos ($2x10^5$ células/pocillo). A las células se añadieron parásitos marcados con CFSE, en las proporciones indicadas, y se incubaron a 37°C durante en tiempo reseñado en cada experimento. Posteriormente, las células se fijaron (1% paraformaldehyde en PBS) durante 1h a temperatura ambiente, se montaron en Mowiol (Calbiochem, 475904) y se analizaron en un microscopio Nikon Eclipse E800 (Nikon, Melville, NY) equipado para epifluorescencia o mediante citometría de flujo en un EPICS-CS (Coulter Científica, Madrid, Spain). Los porcentajes de células sin o con parásitos unidos se resuelven en dos poblaciones de baja (B) y alta (C) fluorescencia. Para los ensayos de inhibición, las células se lavaron con PBS-1mM EDTA y antes de la adición de parásitos, se preincubaron durante 10 min a temperatura ambiente con el anticuerpo MR-1 (sobrenadante de hibridoma diluído 1/1000), anticuerpos irrelevantes (100 μg/ml de inmunoglobulinas humanas o sobrenadante del hibridoma anti-CD18 TS1/18, diluído 1/500), EGTA (5 mM), manano soluble (300 μg/ml) o GIPLs purificados de amastigotes de *L. pifanoi* amastigotes (5 μg/ml) en medio completo.

Para los ensayos de desplazamiento, las células K562 son primeramente incubadas durante 2 minutos con parásitos marcados con CSFE, y a continuación se añade un exceso (4:1) de amastigotes de *L. pifanoi* no marcados.

Ensayos de adhesión de DC-SIGN. La adhesión de MDDC dependiente de DC-SIGN fue evaluada mediante la utilización de ICAM-3-Fc. Placas EIA II-Linbro de 96 pocillos se recubrieron durante una noche con ICAM-3-Fc a 3 μg/ml en 100 mM $NaHCO_3$ pH 8,8 y a 4° C, y se bloquearon con albúmina sérica bovina (BSA) al 0.4 % en la misma solución durante 2h a 37°C. Las MDDC se marcaron en medio completo con el colorante fluorescente 2',7'-bis-(2-carboxyethyl)-5-(and-6)-carboxyfluorescein, acetoxymethyl ester (BCECF) (Molecular Probes, The Netherlands), y entonces se preincubaron durante 20 min a 37°C en RPMI + 0.4% BSA y con anticuerpos bloqueantes contra CD209 (MR-1), CD18 (TS1/18) o con manano a 100 μg/ml. Entonces se dejó que las células se adhiriesen a cada pocillo durante 15 min a 37° C. Se eliminaron las células no unidas mediante tres lavados con RPMI atemperado y las células adheridas se cuantificaron en un analizador de fluorescencia.

Infección de DC con *Leishmania.* Se ajustó la concentración de DC a 10^6 células/pocillo en placas de 24 pocillos y se incubaron con distintas proporciones de parásitos durante 1h a 37ºC. Para los ensayos de inhibición las células fueron lavadas con PBS-1mM EDTA, previamente a la adición del parásito, y pre-incubadas durante 10 min a temperatura ambiente con el anticuerpo MR-1, el anticuerpo TS1/18 o manano soluble en medio completo. Después de eliminar por lavado los parásitos no unidos, las muestras DC-*Leishmania* se incubaron durante 48h a 34ºC. Posteriormente se lavó con PBS, se fijó con metanol y se tiño con Giemsa para poder visualizar las DC infectadas con amastigotes. El porcentaje de DC infectadas y la relación de parásitos-DCs se determinó por microscopía tras el examen de al menos 200 células.

REIVINDICACIONES

1.- Compuesto terapéutico capaz de bloquear la unión de formas infecciosas del parásito *Leishmania* a células eucarióticas en mamíferos, entre otros, humanos, caracterizado porque permite bloquear o anular la unión del parásito *Leishmania* al receptor DC-SIGN presente en estas células y la internalización del parásito por las mismas.

2.- Compuesto terapéutico según la reivindicación 1 caracterizado porque las formas infecciosas de *Leishmania* son amastigotes y promastigotes, entre otras, de las especies de *L. amazonensis*, *L. major*, *L. pifanoi, L. infantum*.

3.- Compuesto terapeútico según las reivindicaciones 1 y 2 caracterizado porque la célula eucariótica pertenece, entre otras, al siguiente grupo: células dendríticas, macrófagos y células derivadas de monocitos.

4.- Compuesto terapéutico según reivindicaciones 1 a 3 caracterizado porque permite bloquear o anular la unión de las formas infecciosas del parásito *Leishmania* al receptor DC-SIGN en al menos un 20%, preferentemente en al menos un 85%, ó más preferentemente en un 100%.

5.- Compuesto terapéutico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a la 4 caracterizado porque pertenece, entre otros, al siguiente grupo:

a) anticuerpo anti DC-SIGN,
b) manano soluble,
c) receptor DC-SIGN o el domínio lectina de DC-SIGN, recombinantes, y isoformas y proteínas homólogas de los mismos,
d) receptor recombinante presente en el parásito *Leishmania* responsable de la unión con el receptor DC-SIGN, y sus formas homólogas.

6.- Compuesto terapéutico según la reivindicación 5 caracterizado porque las formas homólogas, independientemente de su origen, presentan una homología de al menos, un 20%, en la zona de reconocimiento del parásito y del receptor DC-SIGN.

7.– Compuesto terapéutico según la reivindicación 5 caracterizado porque el anticuerpo anti-DC-SIGN es el anticuerpo monoclonal MR-1.

8.- Procedimiento para la identificación y evaluación de compuestos según las reivindicaciones 1 a la 4 caracterizado porque engloba los siguientes pasos:

a) adición al medio del compuesto candidato,
b) determinación de la actividad bloqueadora del candidato mediante la valoración entre otros, de parámetros celulares: capacidad de unión o invasión *in vitro* en células K562-CD209 transfectadas con el receptor DC-SIGN, células dendríticas, células derivadas de monocitos (MDDC), u otras células que presentan en su superficie el receptor DC-SIGN, y competición en el proceso de inhibición de la unión con un anticuerpo específico anti-DC-SIGN o con mananos,
c) identificación de un bloqueador de la unión de la forma infecciosa del parásito *Leishmania* al receptor DC-SIGN.

9.- Composición farmacéutica caracterizada porque contiene una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto terapéutico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a la 7, junto con al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.

10.- Uso de la composición farmacéutica según la reivindicación 9 para el tratamiento de infecciones provocadas por el parásito *Leishmania* en mamíferos, preferentemente en humanos.

11.- Uso del receptor DC-SIGN como diana para el diseño de compuestos terapéuticos según las reivindicaciones 1 a la 7.

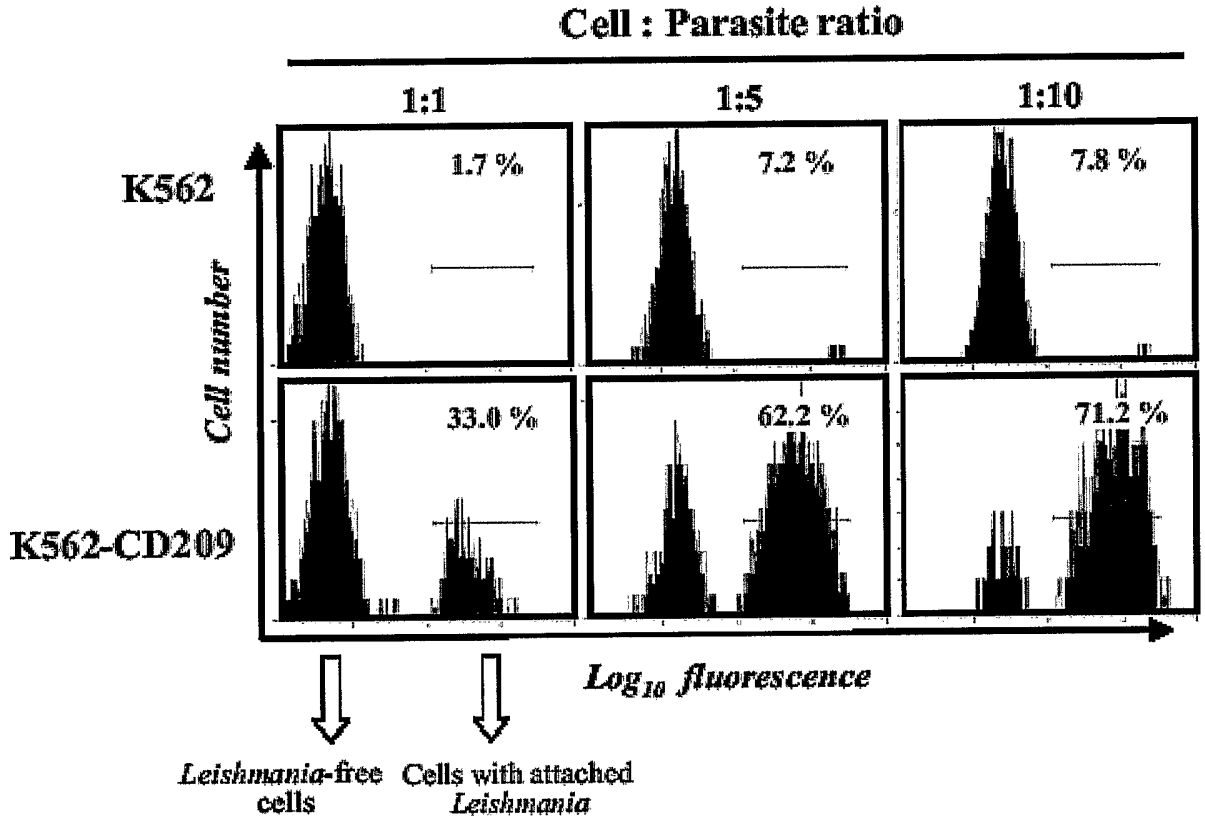

Cell : Parasite ratio
1:1
1:5
1:10
K562
K562-CD209
Cell number
1.7 %
7.2 %
7.8 %
33.0 %
62.2 %
71.2 %
Log10 fluorescence
Leishmania-free cells
Cells with attached Leishmania

Figura 1

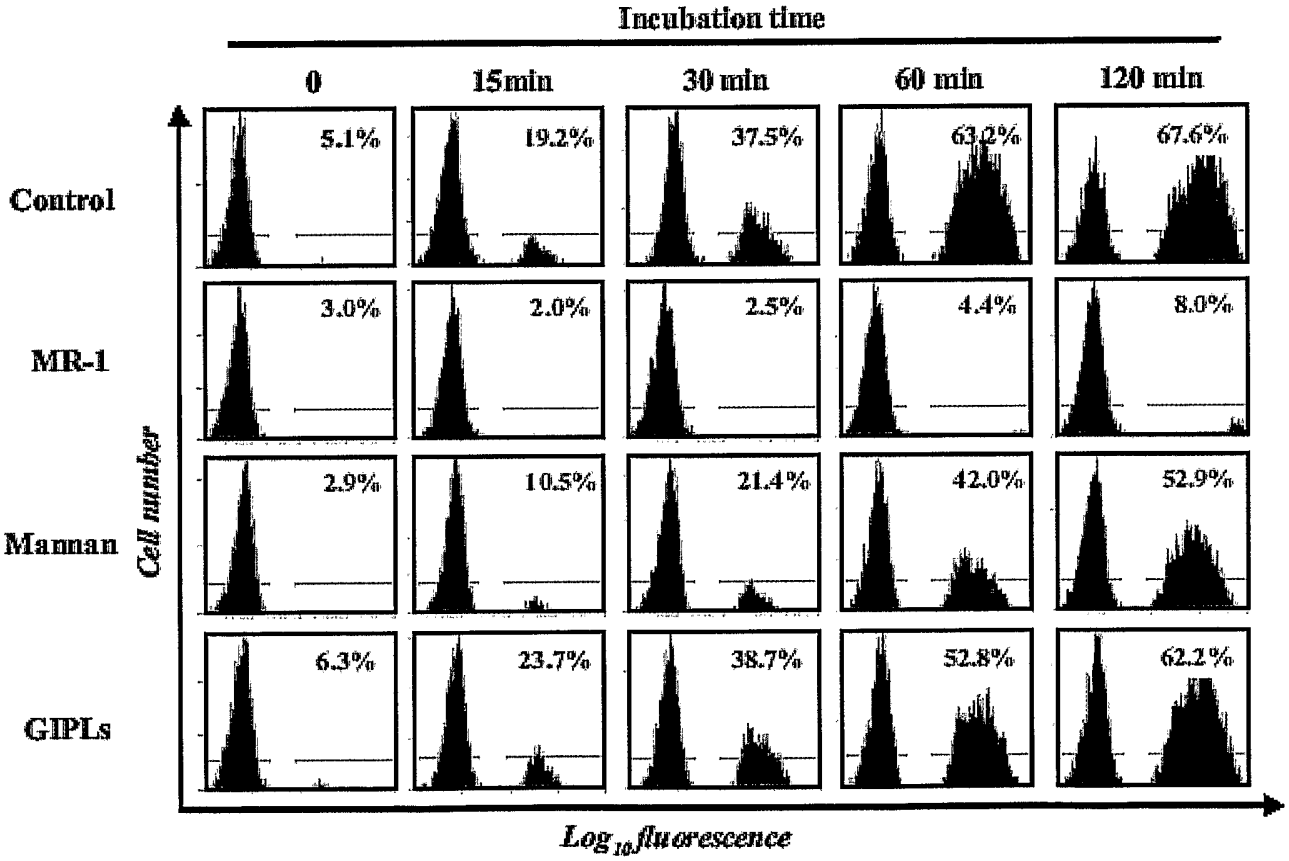

Incubation time
0
15min
30 min
60 min
120 min
Control
MR-1
Manan
GIPLs
5.1%
19.2%
37.5%
63.2%
67.6%
3.0%
2.0%
2.5%
4.4%
8.0%
2.9%
10.5%
21.4%
42.0%
52.9%
6.3%
23.7%
38.7%
52.8%
62.2%
Cell number
Log10 fluorescence

Figura 2

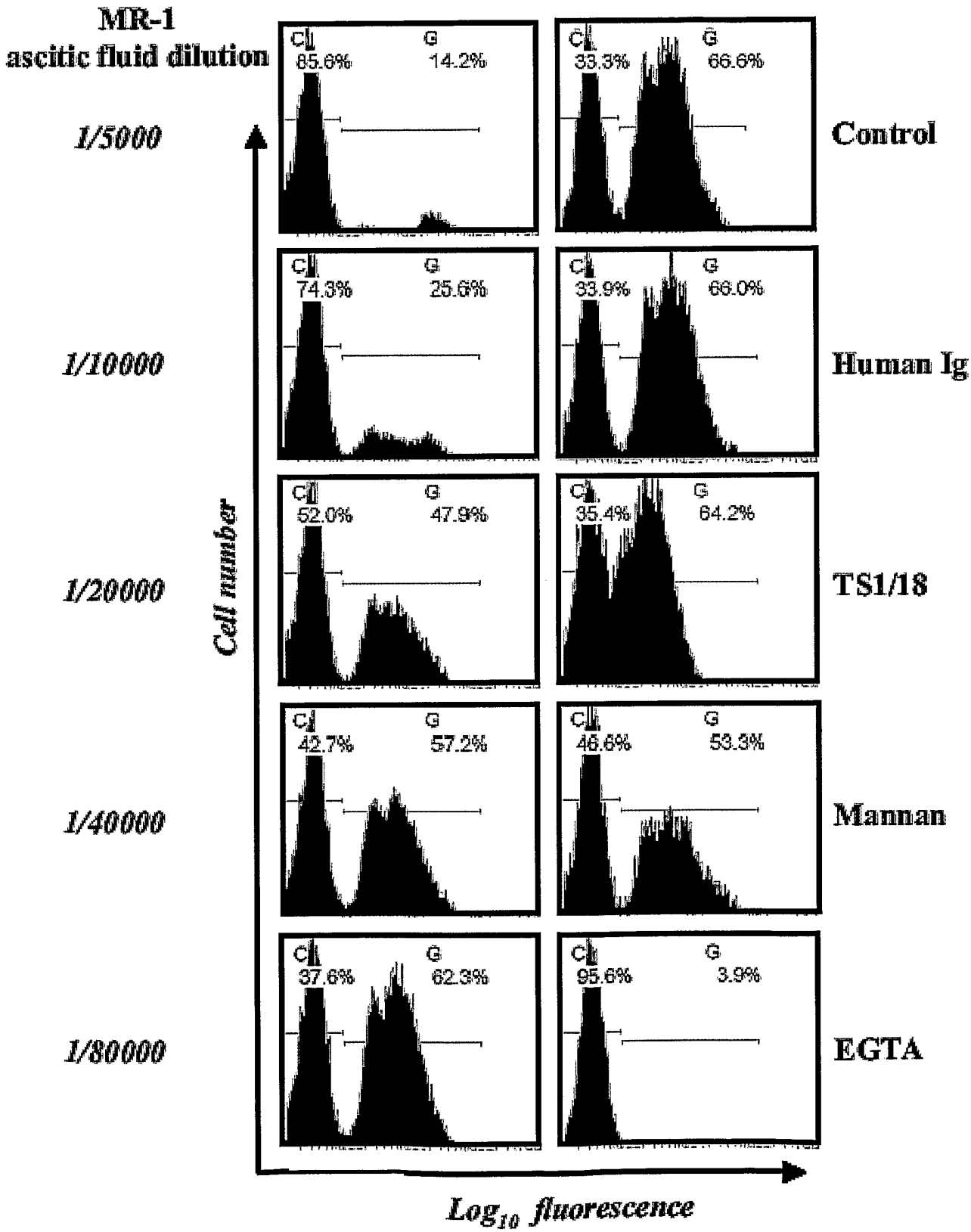

MR-1
ascitic fluid dilution
1/5000
1/10000
1/20000
1/40000
1/80000
Control
Human Ig
TS1/18
Mannan
EGTA
Cell number
Log10 fluorescence
85.6%
14.2%
33.3%
66.6%
74.3%
25.6%
33.9%
66.0%
52.0%
47.9%
35.4%
64.2%
42.7%
57.2%
46.6%
53.3%
37.6%
62.3%
95.6%
3.9%

Figura 3

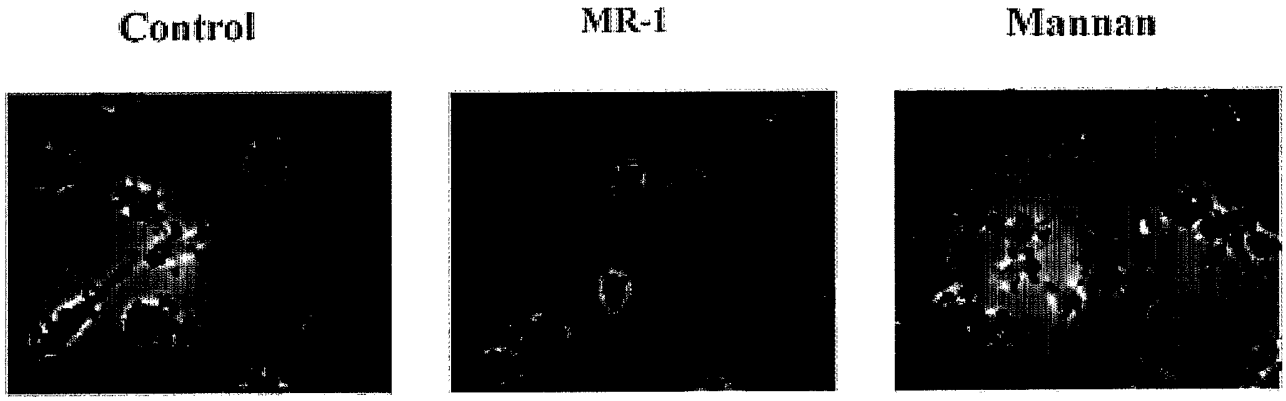


Figura 4A

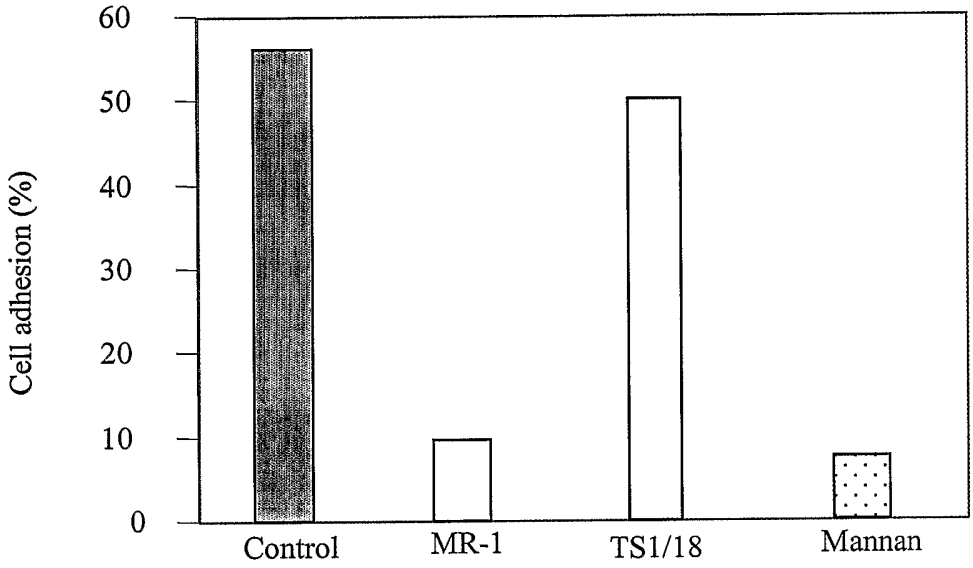


Figura 4B

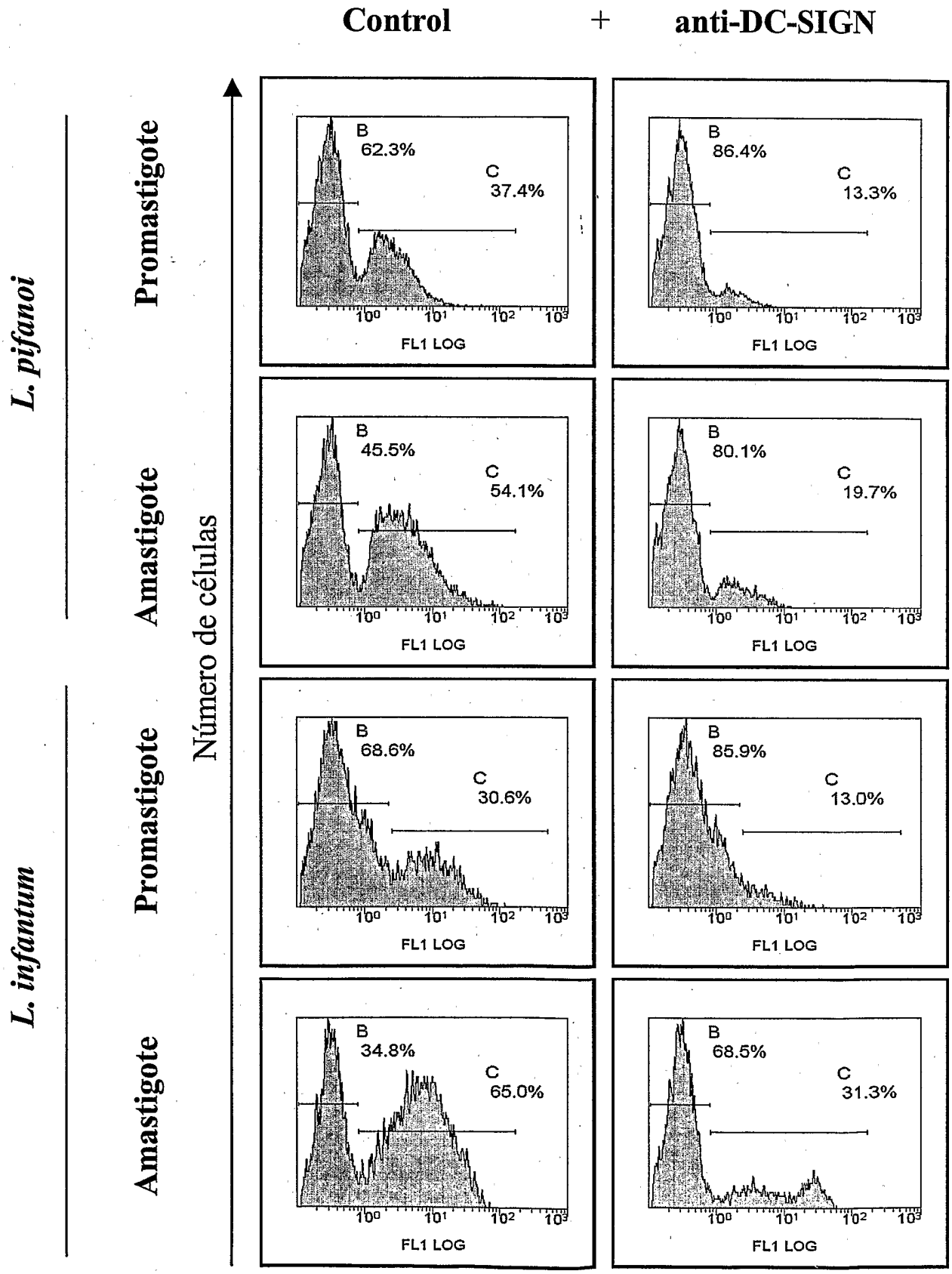

Control
+
anti-DC-SIGN
L. pifanoi
L. infantum
Promastigote
Amastigote
Promastigote
Amastigote
Número de células
B
62.3%
C
37.4%
B
86.4%
C
13.3%
B
45.5%
C
54.1%
B
80.1%
C
19.7%
B
68.6%
C
30.6%
B
85.9%
C
13.0%
B
34.8%
C
65.0%
B
68.5%
C
31.3%
FL1 LOG

Figura 5

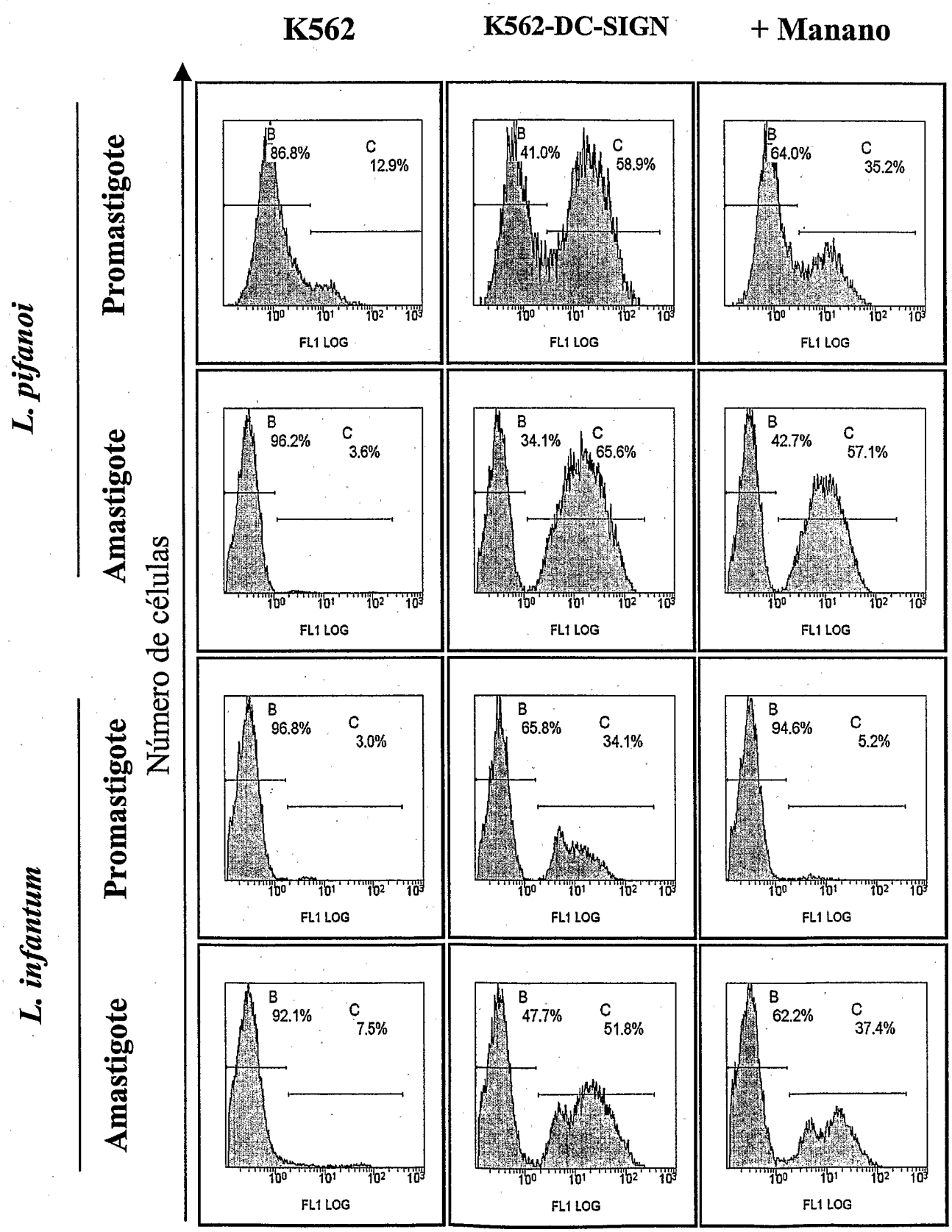

K562
K562-DC-SIGN
+ Manano
L. pifanoi
L. infantum
Promastigote
Amastigote
Promastigote
Amastigote
Número de células
B 86.8% C 12.9%
B 41.0% C 58.9%
B 64.0% C 35.2%
B 96.2% C 3.6%
B 34.1% C 65.6%
B 42.7% C 57.1%
B 96.8% C 3.0%
B 65.8% C 34.1%
B 94.6% C 5.2%
B 92.1% C 7.5%
B 47.7% C 51.8%
B 62.2% C 37.4%
FL1 LOG

Figura 6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/ ES 03/00306

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 A61K 39/395, 31/716, C07K 14/705, 16/28, A61P 33/02

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 A61K, C07K, A61P

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)

CIBEPAT,EPODOC, WPI, TXTE, MEDLINE, BIOSIS. NPL. XPESP

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 6391567 B1 (LITTMAN, D.R., KWON, D., VAN KOOYK, Y. & GEIJTENBEEK, T) 21.05.2002. **The whole document**	1, 3-9, 11
A	WO 0063251 A1 (KATHOLIEKE UNIVERSITEIT NIJMEGEN) 26.10.2000. **The whole document**	1, 3-5, 7-9, 11
A	RELLOSO, M. et al. DC - SIGN (CD 209) expression is IL - 4 dependent and is negatively regulated by IFN, TGF- beta, and anti-inflammatory agents. The journal of Immunology.**March** 2002. Vol. 168, **pages** 2634-2643.	7
P, X	COLMENARES, M. et al.Dendritic cell (DC)- specific intercellular adhesion molecule 3 (ICAM - 3) grabbing nonintegrin (DC-SIGN, CD 209), a C-type surface lectin in human DCs, is a receptor for Leihsmania amastigotes.	1-11

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"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)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"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

"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

"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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
17 SEP 2003 (17.09.03)	**29 SEP 2003 (29.09.03)**
Name and mailing address of the ISA/ **S.P.T.O.** Facsimile No.	Authorized officer Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/ ES 03/00306

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 10
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/ ES 03/00306

Patent document cited in search report	Publication date	Patent familiy member(s)	Publication date
US 6391567 B1	21.05.2002	WO 0164752 A2	07.09.2001
		AU 200139921 A	12.09.2001
WO 0063251 A1	26.10.2000	AU 200041526 A	02.11.2000
		KR 2001071530 A	28.07.2001
		JP 2003502283 T	21.01.2003

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

PCT/ ES 03/00306

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

CIP[7] A61K 39/395, 31/716, C07K 14/705, 16/28, A61P 33/02

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y la CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

CIP[7] A61K, C07K, A61P

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

CIBEPAT,EPODOC, WPI, TXTE, MEDLINE, BIOSIS, NPL, XPESP

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
A	US 6391567 B1 (LITTMAN, D.R., KWON, D., VAN KOOYK, Y. & GEIJTENBEEK, T) 21.05.2002. Todo el documento.	1, 3-9, 11
A	WO 0063251 A1 (KATHOLIEKE UNIVERSITEIT NIJMEGEN) 26.10.2000. Todo el documento.	1, 3-5, 7-9, 11
A	RELLOSO, M. et al. DC - SIGN (CD 209) expression is IL - 4 dependent and is negatively regulated by IFN, TGF- beta, and anti-inflammatory agents. The journal of Immunology. Marzo 2002. Vol. 168, páginas 2634-2643.	7
P, X	COLMENARES, M. et al.Dendritic cell (DC)- specific intercellular adhesion molecule 3 (ICAM - 3) grabbing nonintegrin (DC-SIGN, CD 209), a C-type surface lectin in human DCs, is a receptor for Leihsmania amastigotes.	1-11

☐ En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos

☒ Los documentos de familias de patentes se indican en el anexo

* Categorías especiales de documentos citados:

"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.

"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.

"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).

"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.

"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.

"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.

"X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.

"Y" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.

"&" documento que forma parte de la misma familia de patentes.

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.	Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional
17 Septiembre 2003 (17.09.2003)	29 SEP 2003 29.09.03
Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la Búsqueda internacional O.E.P.M. C/Panamá 1, 28071 Madrid, España. Nº de fax +34 91 3495304	Funcionario autorizado E. Relaño Reyes Nº de teléfono + 34 91 3493047

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

PCT/ ES 03/00306

Recuadro I Observaciones cuando se estime que algunas reivindicaciones no pueden ser objeto de búsqueda (Continuación del punto 2 de la primera hoja)

De conformidad con el artículo 17.2.a), algunas reivindicaciones no han podido ser objeto de búsqueda por los siguientes motivos:

1. ☒ Las reivindicaciones nºs: 10
se refieren a un objeto con respecto al cual esta Administración no está obligada a proceder a la búsqueda, a saber:
La reivindicación 10 se refiere a un método de tratamiento terapeútico del cuerpo humano. A pesar de ello, la búsqueda se ha realizado para esta reivindicación en base a los efectos atribuidos a los compuestos.

2. ☐ Las reivindicaciones nºs:
se refieren a elementos de la solicitud internacional que no cumplen con los requisitos establecidos, de tal modo que no pueda efectuarse una búsqueda provechosa, concretamente:

3. ☐ Las reivindicaciones nºs:
son reivindicaciones dependientes y no están redactadas de conformidad con los párrafos segundo y tercero de la regla 6.4.a).

Recuadro II Observaciones cuando falta unidad de invención (Continuación del punto 3 de la primera hoja)

La Administración encargada de la Búsqueda Internacional ha detectado varias invenciones en la presente solicitud internacional, a saber:

1. ☐ Dado que todas las tasas adicionales han sido satisfechas por el solicitante dentro del plazo, el presente informe de búsqueda internacional comprende todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda.

2. ☐ Dado que todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda pueden serlo sin un esfuerzo particular que justifique una tasa adicional, esta Administración no ha invitado al pago de ninguna tasa de esta naturaleza

3. ☐ Dado que tan sólo una parte de las tasas adicionales solicitadas ha sido satisfecha dentro del plazo por el solicitante, el presente informe de búsqueda internacional comprende solamente aquellas reivindicaciones respecto de las cuales han sido satisfechas las tasas, concretamente las reivindicaciones nºs:

4. ☐ Ninguna de las tasas adicionales solicitadas ha sido satisfecha por el solicitante dentro de plazo. En consecuencia, el presente informe de búsqueda internacional se limita a la invención mencionada en primer término en las reivindicaciones, cubierta por las reivindicaciones nºs:

Indicación en cuanto a la reserva

☐ Las tasas adicionales han sido acompañadas de una reserva por parte del solicitante.

☐ El pago de las tasas adicionales no ha sido acompañado de ninguna reserva.

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Información relativa a miembros de familias de patentes

Solicitud internacional nº

PCT/ ES 03/00306

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de publicación
US 6391567 B1	21.05.2002	WO 0164752 A2	07.09.2001
		AU 200139921 A	12.09.2001
WO 0063251 A1	26.10.2000	AU 200041526 A	02.11.2000
		KR 2001071530 A	28.07.2001
		JP 2003502283 T	21.01.2003