



(19)  
Bundesrepublik Deutschland  
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) DE 694 34 424 T2 2006.04.20

(12)

## Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) EP 0 698 099 B1

(21) Deutsches Aktenzeichen: 694 34 424.9

(86) PCT-Aktenzeichen: PCT/FR94/00577

(96) Europäisches Aktenzeichen: 94 916 287.9

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: WO 94/026899

(86) PCT-Anmeldetag: 13.05.1994

(87) Veröffentlichungstag

der PCT-Anmeldung: 24.11.1994

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: 28.02.1996

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: 13.07.2005

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: 20.04.2006

(51) Int Cl.<sup>8</sup>: C12N 15/30 (2006.01)

C12N 1/10 (2006.01)

A61K 39/008 (2006.01)

C12P 21/08 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

A61K 49/00 (2006.01)

G01N 33/60 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

9305779 13.05.1993 FR

(84) Benannte Vertragsstaaten:

CH, DE, ES, FR, GB, IT, LI, NL

(73) Patentinhaber:

Institut de Recherche pour le Développement  
(IRD), Paris, FR

(72) Erfinder:

LEMESRE, Jean-Loup, F-34380  
Saint-Martin-De-Londres, FR

(74) Vertreter:

BOEHMERT & BOEHMERT, 80336 München

(54) Bezeichnung: IN VITRO KULTURPROZESS FÜR VERSCHIEDENE STADIEN VON GEWEBEPARASITEN

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelebt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

## Beschreibung

**[0001]** Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur in vitro-Kultur verschiedener Stadien des Entwicklungszyklus eines Parasiten. Sie zielt auch auf die erhaltenen parasitären Formen und deren biologische Anwendungen.

**[0002]** Unter Kultur wird in der folgenden Beschreibung und den Ansprüchen sowohl die Adaptation der parasitären Form durch aufeinanderfolgende Passagen in einem gegebenen Medium, wie die vollständige Differenzierung, wenn sie zur Adaptation stattgefunden hat, und die eigentliche Kultur der parasitären Form verstanden.

**[0003]** Bekanntlich stellen die Parasiten eine regelrechte Plage dar, die mittels von Vektoren die Infektion von Millionen Menschen und Tieren verursachen.

**[0004]** So werden die in der ganzen Welt verbreiteten Leishmaniosen hervorgerufen durch Protozoen der Art Leishmania, die ganz allgemein durch eine Mücke, das Phlebotom übertragen werden. Man unterscheidet in klassischer Weise nach ihrer geographischen Ausbreitung die Leishmaniosen der alten Welt und die der neuen Welt. Sie zeigen sehr verschiedene klinische Formen, welche sich durch ihre Schwere und ihre Wirkung auf die Gesundheit wesentlich unterscheiden. Man unterscheidet demnach bei den Leishmaniosen die kutanen, muko-kutanen (welche die nasalen und buccalen Schleimhäute und die der Ohren angreifen) und die viszeralen Leishmaniosen.

**[0005]** Als ein anderer Parasit der eine vernichtende Wirkung hat, sei auch genannt Trypanosoma cruzi das für die Chagas-Krankheit verantwortlich ist. In Südamerika bewirkt er die Infektion von Millionen Menschen. Man zählt bis zu mehr als 150 Spezies von Wild- oder Haustieren, die dem Wirt als Parasit dienen können, der auf den Menschen durch eine Wanze übertragen wird, nämlich ein Triatom, das sich von Blut nährt.

**[0006]** Die Infektion kann mehrere Jahre lang unbemerkt verlaufen, bis daß die Trypanosomen das Nervensystem, das Herz oder den Verdauungsapparat angreifen.

**[0007]** Der Entwicklungszyklus einer großen Zahl von Parasiten weist verschiedene parasitäre Stadien auf. Beispielsweise umfaßt der der Leishmanien zwei Stadien, die erhebliche Unterschiede sowohl auf der Ebene der Struktur, Morphologie, Biochemie, Immunologie und Physiologie zeigen, nämlich

- beim Insektenvektor eine Geisselform, Promastigote genannt, die sich durch Zellteilung vermehrt, bevor sie ihre für den Säugetierwirt infektiöse Form, auch metazyklische genannt, erreicht.
- beim Säugetierwirt ein geisselloses Stadium, Amastigote genannt, das ausschließlich als Parasit in den einkernigen Phagocytenzellen lebt.

**[0008]** Die Differenzierung zu Amastigoten tritt ein nachdem die Promastigoten sich an die Monocyten angelagert haben und in sie eingedrungen sind. Jedoch halten sich nur die Amastigotenformen und vermehren sich im Inneren des Phagolyosoms der Macrophagen des infizierten Wirts.

**[0009]** Bei T. cruzi weist dieser Zyklus drei verschiedene parasitäre Stadien auf, eine Epimastigotenform, eine Form der Vermehrung des Insektenvektors, und die Amastigotenform und Trypomastigotenform, die beim infizierten Wirt vorhanden sind.

**[0010]** Gegenwärtig werden die meisten Untersuchungen zur Diagnose dieser Parasitosen und Entwicklung von Vaccinen an der Promastigotenform durchgeführt, deren Gewinnung in Kultur einfach und schnell ist.

**[0011]** Nun ist aber die einzige beim infizierten Wirt vorhandene Form die Amastigotenform, die, indem sie während der gesamten Infektion vorhanden ist, die Immunantwort hervorruft und an der Entwicklung der Pathologie teilhat. Es läßt sich also die Gefahr ermessen, wenn systematisch experimentelle Ergebnisse extrapoliert werden, die mit den Promastigotenformen in Kultur erhalten wurden, mit dem Ziel von immunoprophylaktischen, diagnostischen oder therapeutischen Untersuchungen, die auf die Amastigotenformen gerichtet sind.

**[0012]** Um sich diesem Problem zu stellen, haben sich verschiedene Autoren für die Gewinnung von Amastigotenformen interessiert. Man hat so die Gewinnung von Amastigoten aus Geweben von experimentell infizierten Versuchstieren oder aus Kulturen von infizierten Makrophagen berichtet. Es handelt sich aber um lange und schwierige Isolierungsmethoden, die im übrigen zur Gewinnung einer begrenzten Zahl von oft degradier-

ten Parasiten führen, die auch unfähig sind, sich zu vermehren und mehr als zwei bis drei Tage zu überleben.

**[0013]** Außerdem sind solche Amastigotenformen durch Zellen, Fragmente und Moleküle kontaminiert, die von Makrophagen, Geweben oder dem Plasma des Wirts stammen, hiernach als „zelluläre Kontaminierungen“ bezeichnet, welche die Durchführung einer erheblichen Zahl von Untersuchungen begrenzen oder unmöglich machen.

**[0014]** Verfahren zur Kultur unter axenischen Bedingungen, das heißt in Abwesenheit jeder zellulären Verunreinigung, wurden für einige Spezies von Leishmanien und für *T. cruzi* vorgeschlagen, bieten jedoch nicht eine reichliche kontinuierliche Quelle von Amastigotenformen und sind anscheinend nicht allgemein anwendbar bei einer großen Zahl von Spezien und verschiedenen Keimen.

**[0015]** Die Erfindung hat zum Ziel, diese oben erwähnten Nachteile zu beheben und befriedigendere Versuchsmodelle zu liefern, indem die gewünschten parasitären Stadien in spezifischen Kulturmedien mit einfacher vollkommen definierter Zusammensetzung produziert werden.

**[0016]** Die Erfindung zielt besonders darauf, ein Verfahren zu schaffen, das für eine große Zahl von Spezien eines gegebenen Parasiten verallgemeinert werden kann und die kontinuierliche Produktion unbegrenzter Quantitäten von homogenen Populationen eines gegebenen parasitären Stadiums ermöglicht.

**[0017]** Sie sieht besonders ein Verfahren vor, das es ermöglicht, diese Stadien in einer von allen zellulären und Serum-Verunreinigungen freien Form zu halten, welche die Besonderheit aufweist, daß sie keinerlei Makromolekül enthält. Unter Makromolekül werden in der folgenden Beschreibung und den Ansprüchen nicht dialysierbare Moleküle mit einer Schnittgrenze von 3 kDa verstanden, das heißt die ein scheinbares Molekulargewicht über 3 kDa haben (beispielsweise Serumprotein, wie Albumin).

**[0018]** Sie sieht auch vor, in vitro den vollständigen Entwicklungszyklus der Parasiten unter axenischen und aserischen Bedingungen zu realisieren.

**[0019]** In einer anderen Hinsicht bezweckt die Erfindung die neuen erhaltenen parasitären Formen, die den verschiedenen Stadien des Zyklus des Parasiten und für jedes Stadium den verschiedenen Phasen ihres Wachstums entsprechen.

**[0020]** In noch einer anderen Hinsicht bezweckt die Erfindung die Anwendungen der erhaltenen parasitären Stadien und der aus diesen Stadien erzeugten oder isolierten Produkte insbesondere im Gebiet der Diagnostik von Parasitosen, der Immunoprophylaxe und des Screenings medikamentöser Aktivitäten.

**[0021]** Das erfindungsgemäße Verfahren zur in vitro-Kultur verschiedener Stadien von Gewebeparasiten wie den Leishmanien, *T. cruzi* oder auch den Hämatoprozoen ist dadurch gekennzeichnet, daß es in einem einphasigen flüssigen axenischen und aserischen Medium, das frei von Makromolekülen (bei einer Schnittgrenze von 3 kDa nicht dialysierbar) durchgeführt wird und dass zur Gewinnung der Amastigotenformen dieses Medium auf einen pH von 5,5 bis 6,5 gepuffert wird und eine Osmolarität von mindestens 400 Milliosmole/kg Flüssigkeit und besonders von 400 bis 550 Milliosmole/kg Flüssigkeit aufweist oder daß zur Gewinnung von Promastigotenformen dieses Medium auf einen pH von 7 bis 7,5 gepuffert wird und eine Osmolarität von mindestens 300 Milliosmole/kg Flüssigkeit und besonders 300 bis 380 Milliosmole/kg Flüssigkeit aufweist.

**[0022]** Der pH-Wert dieser Medien gewährleistet im oben angegebenen Intervall eine strenge Kontrolle der Kulturbedingungen.

**[0023]** Im Fall der Kultur von Amastigoten bemerkt man, wenn der pH über 6,5 beträgt, eine Neigung zur Rücktransformierung der Amastigoten in Promastigoten, und wenn er unter 5,5 ist, beobachtet man ein schlechtes Wachstum.

**[0024]** Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung zur Gewinnung von Amastigotenformen verwendet man ein Kulturmedium, das ein Basismedium aufweist, das im wesentlichen zusammengesetzt ist ausgehend von

- mindestens einem Kulturmedium für Insektenzellen mit Zusatz von anorganischen Salzen vom Typ Hanks-Salze,
- Ausgangsprodukte, Aminosäuren, wie das L-Glutamin und Sojakornextrakte,
- Zucker, besonders D-Glucose.

**[0025]** Als Sojakornextrakt verwendet man vorteilhafterweise den unter der Bezeichnung Trypto-Casein-Soja® im Handel verfügbaren.

**[0026]** Das Kulturmedium der Insektenzellen ist vorteilhafterweise das Medium 199H, vertrieben von GIBCO.

**[0027]** Verschiedene Zusammensetzungen dieses Mediums 199H® sind im Katalog GIBCO BRL, Seite 48, Ausgabe 1992 angegeben.

**[0028]** Eine besonders bevorzugte Zusammensetzung für die Zubereitung des Basismediums trägt die Referenz 042-01181 auf der Seite 48 dieses Katalogs, Ausgabe 1992. Man verwendet besonders das Medium 199H M, dem NaHCO<sub>3</sub> und L-Glutamin zugesetzt werden.

**[0029]** Dieses Medium, dem die oben angegebenen Verbindungen zugesetzt werden, wird vorzugsweise gepuffert, beispielsweise mit einem Puffer wie HEPES.

**[0030]** Eine bevorzugte Zusammensetzung des Basismediums umfaßt mehrere Medien von Insektenzellkulturen.

**[0031]** Ein Basismedium dieses Typs erhält man dadurch, daß man dem Medium 199H wie von Gibco vertrieben, dem man die oben erwähnten Verbindungen zugesetzt hat, ein anderes Medium wie das modifizierte Medium 199H zusetzt, wie es von Flow vertrieben wird. Eine Zusammensetzung dieses Mediums ist im Katalog Flow Laboratories, 1992 unter der Referenz 14230-54 angegeben. Vor dem Zusatz zur anfänglichen Zubereitung wird dieses letztgenannte modifizierte Medium 199H einer Wärmebehandlung unterworfen.

**[0032]** Die oben definierten Basismedien sind neu und bilden als solche ebenfalls einen Teil der Erfindung. Sie können mehrere Monate bei -20°C gelagert werden.

**[0033]** Um die Oxidation der parasitären Stadien zu vermeiden, werden diesem Basismedium zum Zeitpunkt der Verwendung Antioxidantien wie Haemin, das auch den Vorteil aufweist, eine Eisenquelle zu bilden, und Reduktionsmittel, wie das reduzierte Glutathion zugesetzt. Vorteilhafterweise setzt man auch Vitamine zu. Zu einem Gemisch von geeigneten Vitaminen gehören Biotin, Calciumpanthotenat, Cholinchlorid, Folsäure, i-Inositol, Nicotinamid, P-Aminobenzoësäure, Pyridoxinchlorhydrat, Riboflavin, Thiaminchlorhydrat, Vitamin B12, die teilweise und vorteilhafterweise alle zusammen verwendet werden.

**[0034]** Die erhaltenen Kulturmedien sind vorteilhafterweise dadurch charakterisiert, daß sie hinsichtlich Additiven frei von Nucleotiden sind. Sie können bei +4°C während etwa zwei Wochen ohne Veränderung ihrer Eigenschaften gelagert werden.

**[0035]** Die Verwendung der erhaltenen Kulturmedien ermöglicht, wie die folgenden Beispiele zeigen, die Erzeugung von Amastigotenformen, die sich *in vitro* massiv vermehren, in kontinuierlicher Weise.

**[0036]** Diese axenischen und aserischen Medien zeigen den Vorteil, daß sie frei von allen Makromolekülen und besonders den im fötalen Kalbserum enthaltenen und/oder von Wirtszellen stammenden sind, welche andere Komponenten (Serumproteine und zellulare Proteine) maskieren können.

**[0037]** Diese Medien sind besonders geeignet für die Amastigotenformen von Gewebeprotzoen wie die kutanen oder kutano-mukosen oder viszeralen Leishmanien oder verschiedene Klone von *T. cruzi* oder auch *Plasmodium* oder *Babesia*.

**[0038]** Als *Leishmania*-Spezies seien erwähnt *L. mexicana*, *L. amazonensis*, *L. braziliensis* oder auch *L. major*, *L. guyanensis* und *L. panamensis*.

**[0039]** Andere bevorzugte Kulturmedien, die besonders geeignet sind für die Kultur von Amastigoten viszeraler Leishmanien, wie *L. donovani*, *L. infantum* und *L. chagasi*, umfassen außerdem Schwefelverbindungen. Es handelt sich besonders um schwefelhaltige Aminosäuren, wie Cystein und besonders die L-Form, und/oder Nährstoffe, wie Bathocuproinsulfonsäure.

**[0040]** Für die Differenzierung von Promastigotenformen zu Amastigotenformen bildet das Zellkulturmedium mit Bezug auf das endgültige Medium etwa 8 bis 15 (V/V) besonders in der Größenordnung von 10%, während die Aminosäuren oder die Ursprungsprodukte dieser Aminosäuren, wie das Trypto-Casein-Soja® und das

L-Glutamin in einem Verhältnis von etwa 4 bis 8% (G/V), besonders etwa 5 bis 6% vorliegen, die Zugabe von Zucker, besonders als Glucose, vorteilhafterweise im Verhältnis von etwa 2 bis 4% (G/V), besonders 2 bis 3% erfolgt, die Antioxidationsmittel, wie Haemin, im Verhältnis von 0,0002 bis 0,0015% (G/V), besonders in der Größenordnung von 0,0005% und das Glutathion von 0,01% bis 0,05%, besonders in der Größenordnung von 0,025% und die Lösung von Vitaminen (100×) im Verhältnis von 1 bis 5% (V/V), besonders in der Größenordnung von 2% vorliegen.

**[0041]** Wenn die Schwefelverbindungen, besonders das L-Cystein verwendet werden, so im Verhältnis von etwa 0,25 bis 0,50% (G/V), besonders in der Größenordnung von 0,3%, und die Bathocuproinsulfonsäure im Verhältnis von etwa 0,004 bis 0,008% (G/V), besonders in der Größenordnung von 0,005%.

**[0042]** Für die Kultur der Promastigotenstadien verwendet man vorteilhafterweise ein Kulturmedium, das ausgehend von einem für die Kultur von Zellen geeigneten Medium, wie dem Medium RPMI 1640, zubereitet wurde, dem man Aminosäuren, wie L-Glutamin und einen Puffer zusetzt, um den pH auf einen Wert von 7 bis 7,5 einzustellen, wobei diesem Kulturmedium auch ein anderes für die Kultur von Zellen geeignetes Medium speziell das Medium 199H M zugesetzt wird, das anorganische Salze wie Hanks-Salze und Antioxidationsmittel, wie Haemin, umfaßt.

**[0043]** Dieses Medium ist somit frei von jeder Serumverunreinigung und enthält keine Makromoleküle wie durch Analyse an 10% Polyacrylamidgel nachgewiesen.

**[0044]** Das Medium 199H M wird in einem Verhältnis von etwa mindestens 2% (V/V) besonders von etwa 2 bis 10% und das Rinderhaemin von 0,0001 bis 0,0015 (G/V) besonders in der Größenordnung von 0,0005% verwendet.

**[0045]** Bemerkenswert ist die Einfachheit der Herstellung eines solchen Mediums ausgehend von bereits im Handel verfügbaren Produkten. Die Abwesenheit von Serum führt außerdem vorteilhafterweise zu einem billigen Produkt.

**[0046]** Erfindungsgemäß werden diese Kulturmedien eingesetzt in einem Verfahren zur massiven und kontinuierlichen Produktion von parasitären Formen.

**[0047]** Zur Adaptation und kontinuierlichen in vitro-Kultur von Amastigotenformen impft man Promastigoten der exponentiellen Endphase in ein geeignetes Kulturmedium wie oben definiert im Verhältnis von  $10^6$  bis  $10^7$  Promastigoten/ml des Mediums.

**[0048]** Die Bedingungen der Realisierung und der Adaptation und der Kultur sind vorteilhafterweise so gewählt, daß eine vollständige Transformation der Parasiten in reproduzierbarer Weise gewährleistet ist.

**[0049]** Die Adaptation und dann die Kultur werden bei Temperaturen in einer Größenordnung von 28 bis 36°C und besonders um 32°C bei einem pH von 5,5 bis 6,5 durchgeführt. Man beobachtet im allgemeinen eine Transformation der Promastigotenformen zu Amastigotenformen welche 90% übersteigt in 6 bis 7 Tagen. Diese Transformation ist beispielsweise vollständig in 4 Tagen für die Leishmanien nach einer Anzahl von Passagen, die je nach der untersuchten Spezies verschieden ist und im allgemeinen 3 bis 9 Passagen entspricht und die abnimmt, wenn die Inkubationstemperatur steigt.

**[0050]** Zur Adaptation und kontinuierlichen in vitro-Kultur von Promastigotenformen, der sogenannten Primärkultur oder Kurzzeitkultur von Parasiten wie die Leishmanien, die direkt ausgehend von Amastigotenformen erhalten werden, impft man die Amastigotenformen wie oben erhalten im Verhältnis von  $10^6$  bis  $10^7$  Amastigotenformen/ml Medium. Man verwendet vorteilhafterweise Amastigotenformen am Ende der exponentiellen Phase. Die Kultur wird bei einer Temperatur in der Nähe der Umgebungstemperatur durchgeführt jedoch vorzugsweise nicht über 28°C bei einem pH von 7 bis 7,5 in einem Kulturmedium wie oben für die Entwicklung von Promastigotenformen definiert.

**[0051]** Wenn die für diese parasitären Stadien beabsichtigte Anwendung keinen Rückgriff auf gleichzeitig axenische und aserische Bedingungen ohne Gegenwart von Makromolekülen erfordert, kann man im Rahmen der Erfindung die Kultur in nur axenischem Medium und damit in Gegenwart von Serum und auch in Gegenwart von Makromolekülen durchführen. Man kann beispielsweise das Medium RPMI mit Zusatz von fötalem Kalbserum verwenden.

**[0052]** Die so erhaltenen kurzzeitigen Promastigotenformen können in der oben erwähnten Impfstufe zum Zweck der Differenzierung zu Amastigoten verwendet werden.

**[0053]** Die Transformation ist sehr rasch und total, beispielsweise für die Leishmanien in 4 Tagen nach 2 bis 5 Umimpfungen je nach der Spezies.

**[0054]** Die Ausführung der erfindungsgemäßen Maßnahmen ermöglicht es, standardisierte und reproduzierbare Kulturen verschiedener Formen zu erhalten, die den verschiedenen parasitären Stadien entsprechen, von jeder zellulären Verunreinigung und von Makromolekülen frei und in der Lage sind, sich *in vitro* zu vermehren.

**[0055]** Die obigen Maßnahmen wurden speziell mit bezug auf die Promastigotenformen und Amastigotenformen von Leishmanien beschrieben, ob es sich um kutane, kutano-mukose oder auch viszerale Leishmanien handelt, sie sind jedoch auch anwendbar auf die parasitären Stadien von *T. cruzi* oder anderen Hämatoprotzoen wie *Plasmodium* und *Babesia*.

**[0056]** Diese Kulturen können mehrere Monate unterhalten werden, selbst mehrere Jahre für zahlreiche Spezies, insbesondere für die Leishmanien, gleich ob sie kutane, kutano-mukose oder viszerale sind, oder für *T. cruzi*.

**[0057]** Die parasitären Stadien können über lange Zeit kultiviert werden, das heißt über mehr als 50 Passagen von *in vitro*- und Kurzzeit-Kulturen, das heißt kürzlich in weniger als 10 Passagen transformiert aus Promastigotenformen oder Amastigotenformen (vorhergehende Form des Zyklus).

**[0058]** Die Erfindung liefert auch die Mittel, um einen vollständigen parasitären Zyklus *in vitro* zu realisieren. Man bemerkt mit Vorteil, daß dieser vollständige Zyklus in weniger als 15 Tagen realisiert werden kann.

**[0059]** Eine Ausführungsform eines erfindungsgemäßen Verfahrens zur Herstellung von Stadien, die dem Evolutionsstadium eines Parasiten wie den Leishmanien entspricht, ist dadurch gekennzeichnet, daß sie unter axenischen und aserischen Bedingungen, wie oben definiert, in Abwesenheit von Makromolekülen durchgeführt wird und daß sie umfaßt:

- das Impfen von Kurzzeit- oder Langzeit-Promastigotenformen in einem geeigneten Kulturmedium wie oben definiert um die Differenzierung zu Amastigotenformen zu erhalten,
- die Rückgewinnung der erzeugten Amastigotenformen, ihre Impfung und ihre Kultur wie oben angegeben, um so die Differenzierung zu Promastigotenformen zu erhalten,

der Zyklus wird insgesamt oder teilweise nach Wunsch und gegebenenfalls endlos wiederholt.

**[0060]** In einer anderen Ausführungsform werden die Kurzzeit-Formen unter nur axenischen oder axenischen und aserischen Bedingungen in Gegenwart von Makromolekülen kultiviert.

**[0061]** Nach dem erfindungsgemäßen Verfahren ist es daher möglich, *in vitro* die verschiedenen parasitären Stadien viel rascher und leichter als durch die gegenwärtig verwendeten *in vivo*-Methoden zu erhalten, welche experimentelle Infektionen benutzen, die manchmal schwierig realisierbar sind. Diese parasitären Formen, Amastigoten oder Promastigoten, sind frei von jeder zellulären Verunreinigung und in der Lage, sich *in vitro* zu vermehren. Man verfügt so über Mittel, um in reichlichster Weise und selbst sogar unbegrenzt die parasitären Stadien, ob kürzlich entstanden oder nicht, differenziert vom vorangehenden Stadium besonders von Leishmanien und denen von *T. cruzi* (Epimastigoten, metazyklische und sanguikole Trypomastigoten und Amastigoten) zu erhalten.

**[0062]** Die Erfindung hat auch zum Gegenstand die parasitären Formen des Evolutionszyklus eines Gewebeprotozoen wie die Leishmanien oder *T. cruzi* wie sie durch Ausführung des oben definierten Kulturverfahrens erhalten werden.

**[0063]** Diese Formen sind dadurch gekennzeichnet, daß

- sie frei von allen zellulären Verunreinigungen, besonders makrophagischen und plasmatischen Geweben sind, welche die aus zellulären Kulturen oder Geweben von infizierten Versuchstieren isolierten intrazellulären parasitären Formen begleiten, und frei sind von jeder Serumverunreinigung, dabei aber *in vitro* und *in vivo* die Infektionsfähigkeit aufweisen, die man an den intrazellulären Formen beobachtet, wenn letztere gewöhnlich infektiös sind, und die charakteristischen morphologischen, biochemischen und immunologischen Eigenschaften derselben aufweisen,

– sie in Form einer in bezug auf das Alter in der Kultur und den Differenzierungszustand für ein gegebenes Stadium des Evolutionszyklus homogenen Population vorliegen, wobei diese Population, die von einer standardisierten Kultur stammt, sich *in vitro* kontinuierlich vermehren kann.

**[0064]** Die Amastigotenformen sind besonders bevorzugt, da sie den bei der Infektion beim Menschen oder Tier entwickelten Formen entsprechen.

**[0065]** Diese Amastigotenformen sind noch dadurch gekennzeichnet, daß sie eine enzymatische Aktivität aufweisen, speziell eine Peptidase-Aktivität, die qualitativ komplexer als die der Promastigoten und quantitativ davon verschieden ist, besonders auf dem Niveau der Cysteinproteaseaktivitäten, wie in den Beispielen dargelegt.

**[0066]** Die Erfindung sieht speziell Amastigotenformen von Leishmanien, und zwar sowohl von antrhoponotischen wie zoonotischen vor.

**[0067]** Es handelt sich um Amastigotenformen von kutanen oder kutano-mukosen Leishmanien. Von diesen seien erwähnt *L. mexicana*, *L. amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. guyanensis* und *L. panamensis*. Es handelt sich auch um Amastigoten von viszeralen Leishmanien wie *L. chagasi*, *L. donovani* oder *L. infantum*.

**[0068]** Andere Amastigotenformen gemäß der Erfindung sind diejenigen verschiedener Klone von *T. cruzi*.

**[0069]** Die Erfindung sieht auch die Promastigotenformen von kurzer Zeit vor, wie oben definiert.

**[0070]** Es handelt sich um Populationen, die direkt aus Amastigotenformen transformiert sind und eine Infektivität analog der von kürzlich aus einem infizierten Wirt isolierten Promastigoten haben.

**[0071]** Jedes der parasitären Stadien, Promastigote oder Amastigote, weist verschiedene Wachstumsphasen im Verlauf der Vermehrung *in vitro* auf, nämlich eine Latenzphase, eine exponentielle Phase und eine statioäre Phase, die jeweils der Vorbereitung der Teilung, einer intensiven Vermehrung, dann einem Stadium ohne Teilung entsprechen.

**[0072]** Die Erfindung ermöglicht mit Vorteil in gezielter Weise Formen zu erhalten, die einer dieser Phasen entsprechen, und ihre Eigenschaften und spezifischen biochemischen Charakteristika zu untersuchen.

**[0073]** Diese Formen sind dadurch charakterisiert, daß sie frei sind von zellulären und Serumverunreinigungen sowie von nicht dialysierbaren Molekülen mit einer Schnittgrenze von 3 kDa.

**[0074]** Es handelt sich also um definierte Populationen, die einer gut bestimmten Phase ihres Wachstums entsprechen.

**[0075]** Die Amastigotenformen oder entsprechende Kurzzeit-Promastigoten sind besonders bevorzugt.

**[0076]** Die Erfindung sieht auch Polypeptidgesamtextrakte dieser parasitären Formen vor, wie sie durch Lyse der Zellen und Gewinnung der löslichen oder unlöslichen Produkte erhalten werden. Diese Extrakte werden in den Beispielen auch antigenische Gesamtextrakte genannt. Mit diesen Ausdrücken „Polypeptid-Gesamtextrakte“ oder „Antigen-Gesamtextrakte“ werden Produkte bezeichnet, wie sie durch Lyse von parasitären Formen erhalten werden, gleich ob sie von Protein-, Lipid- oder Zuckerart sind.

**[0077]** Es handelt sich besonders um Polypeptid-Gesamtextrakte von Kurzzeit-Promastigotenformen und speziell von Polypeptid-Gesamtextrakten von Amastigotenformen zu verschiedenen Phasen ihres Wachstums *in vitro*.

**[0078]** Diese Extrakte sind charakterisiert durch ihr Peptidprofil, wie es sich in klassischer Weise am Polyacrylamidgel SDS-PAGE zeigt, unter reduzierender oder nicht reduzierender Bedingung oder an Polyacrylamidgel unter nicht denaturierender Bedingung, wie in den Beispielen für bestimmte Spezies von Leishmanien beschrieben.

**[0079]** Die Erfindung sieht auch die Fraktionen und Determinanten von Antigenen, Proteinen, Gluciden, oder Lipiden vor, die ausgehend von Fraktionen dieser Extrakte eluiert oder isoliert werden.

**[0080]** Die Fraktionen und Determinanten von Antigenen dieser Extrakte, die nach einer Reaktion vom Typ Antigen-Antikörper von Seren von Tieren erkannt werden, die mit den Polypeptid-Gesamtextrakten oder Seren von natürlichen oder experimentellen Infektionen immunisiert sind, sind besonders bevorzugt in bezug auf die immunologischen Anwendungen, die von der Erfindung beabsichtigt sind, und besonders die antigenischen Fraktionen und Determinanten, die spezifisch für die Basis sind.

**[0081]** Produkte dieses Typs entsprechen den an der Oberfläche von Amastigotenformen exprimierten Antigenen und den auf dem Niveau der Flagellatasche oder des vakuolen Typs vorhandenen somatischen Antigenen, wie durch Immunofluoreszenzmethoden nachgewiesen.

**[0082]** Die gereinigten oder halb-gereinigten Moleküle und die spezifisch an einem oder mehreren dieser Moleküle angereicherten Lösungen, die von natürlichen Lysen herrühren, gehören ebenfalls in den Rahmen der Erfindung.

**[0083]** Andere Produkte, die ein großes Interesse in bezug auf biologische Anwendungen gemäß der Erfindung haben, entsprechen den Exkretionsantigenen, wie sie ausgehend von den Überständen natürlicher Lysen von konditionierten Kulturen von unter den axenischen und aserischen Bedingungen der Erfindung kultivierten Promastigotenformen oder Amastigotenformen erhalten werden.

**[0084]** Das gleiche gilt für Antigene der Differenzierung, die während der Differenzierung beim erfindungsgemäßen Verfahren von Promastigotenformen zu Amastigotenformen und der von Amastigotenformen zu Promastigotenformen (im Verlauf der Realisierung des Zyklus in vitro) ausgeschieden werden.

**[0085]** Diese Antigenprodukte werden aus den Überständen durch einfache Konzentration und Dialyse gewonnen. Diese Überstände bilden also eine gereinigte und vorangereicherte Quelle für Antigenprodukte.

**[0086]** Die Erfindung bezweckt auch Immunisierungsseren, wie sie nach Verabreichung von Extrakten, Fraktionen und antigenischen Molekülen wie oben definiert nach üblichen Methoden erhalten werden, und die aus diesen Seren gewonnenen Antikörper.

**[0087]** Sie bezweckt auch die durch Infektion von Tieren mit den infektiösen Amastigotenformen erhaltenen Infektionsseren.

**[0088]** Die Gehalte dieser Seren an Antikörpern sind verschieden, je nach der Phase des parasitären Stadiums, und sind höher gegen die stationäre Phase der Amastigotenformen.

**[0089]** Die erfindungsgemäßen Antikörper sind dadurch charakterisiert, daß sie die spezifischen Peptide von parasitären Amastigoten oder Promastigoten erkennen, indem sie eine Reaktion vom Typ Antigen-Antikörper herbeiführen.

**[0090]** Zu diesen Antikörpern gehören solche, die nur spezifisch die Antigene einer parasitären Form Amastigote oder Promastigote, erkennen, die zu einer homologen Spezies gehören, das heißt zur gleichen Spezies wie die zu ihrer Gewinnung verwendete, wobei die erkannte Form diejenige ist, gegen die sie gebildet wurden.

**[0091]** Es handelt sich beispielsweise um Antikörper, die gegen eine Amastigotenform von *Leishmania* einer gegebenen Spezies gebildet wurden und die spezifisch nur die Antigenpeptide von Amastigotenformen dieser Spezies von *Leishmania* erkennen.

**[0092]** Zu den Antikörpern der Erfindung gehören auch jene, welche außerdem eine andere parasitäre Form der betrachteten Spezies schwach erkennen.

**[0093]** Beispielsweise seien erwähnt die Anti-Amastigoten-Antikörper, die in geringerem Maß Antigene der Promastigotenformen der gleichen Spezies erkennen.

**[0094]** Noch andere Antikörper der Erfindung sind außerdem in der Lage, jedoch in geringerem Maß, die parasitäre Form einer heterologen Spezies oder einer anderen Art wie *T. cruzi* zu erkennen. Antikörper dieses Typs entsprechen beispielsweise Anti-Amastigoten-Antikörpern einer Spezies von *Leishmania*, welche die Amastigotenpeptide einer anderen Spezies von Leishmanien erkennen.

**[0095]** Gemäß einem anderen Aspekt zielt die Erfindung auf monoklonale Antikörper, wie sie vorteilhafterwei-

se nach üblichen Methoden der Fusion einer Zelllinie mit den Lymphocyten der Milz oder der Ganglien eines Tiers erhalten werden, das durch Injektion eines Gesamtpeptidextrakts, einer Fraktion oder eines Antigenmoleküls, wie oben definiert durch Screening der erhaltenen Überstände von Hybridomen immunisiert ist, beispielsweise nach der Methode Elisa oder IFI, um die Antikörper aufzuzeigen, die spezifisch gegen eine parasitäre Form einer Spezies gerichtet sind, sowie die diese monoklonalen Antikörper abscheidenden Hybridomklone.

**[0096]** Diese Antikörper bilden Werkzeuge, um spezifische Antigene der Spezies oder Stadien aus einem sie enthaltenden Medium abzutrennen oder zu isolieren und besonders mittels Immunoaffinitätsmethoden aus den oben erwähnten Polypeptid-Gesamtextrakten.

**[0097]** Die Reaktion der obigen Immunoseren mit Antigenfraktionen und -molekülen, die von einer gegebenen Entwicklungsphase der parasitären Form herrühren, ermöglichen die Identifizierung und Isolierung der spezifischen Antigene dieses Stadiums.

**[0098]** Die Möglichkeit, dank der Erfindung massiv Amastigotenformen in Kultur zu erzeugen, ermöglicht die Extraktion der Gesamt-RNA und Boten-RNA und davon ausgehend die Realisierung einer DNAc-Bank.

**[0099]** Gemäß noch einem weiteren Aspekt bezweckt die Erfindung daher die Gesamt-RNAs, wie sie ausgehend von parasitären Kulturen von Amastigoten oder Promastigoten gewonnen werden, sowie die entsprechenden RNA-m und DNAc.

**[0100]** Durch Vergleich mit einer DNAc-Bank von entsprechenden Promastigotenformen weist man also spezifische Peptide eines gegebenen parasitären Stadiums nach und synthetisiert sie gegebenenfalls durch Genteknik.

**[0101]** Die erfindungsgemäße Gewinnung von extrazellulären infizierenden Amastigotenformen in vitro und in vivo mit morphologischen, biologischen und biochemischen Eigenschaften analog zu denen der intrazellulären Amastigotenformen eröffnet neue und zahlreiche Anwendungen in Gebieten der Forschung und Industrie.

**[0102]** Die erfindungsgemäßen parasitären Formen sind so besonders nützlich als Versuchsmodelle für ein erstes Screening in vitro von Produkten, die in deren Hinsicht in vivo aktiv sein können.

**[0103]** Das erfindungsgemäße Screening-Verfahren umfaßt folgende Möglichkeiten:

- es werden die zu testenden Produkte in Berührung gebracht mit parasitären Formen, speziell Amastigotenformen, wie sie unter axenischen und besonders aserischen Bedingungen kultiviert wurden, und Promastigotenformen, wie sie in vollständig definiertem Medium kultiviert wurden,
- es werden mit einer radioaktiven Gruppe markierte Nucleotide oder Aminosäuren, beispielsweise Tritium-thymidin eingebaut, um die Aktivität der zu testenden Produkte zu bestimmen, oder es werden unter Verwendung von beispielsweise einem Tetrazoliumsalz wie MTT Lebensfähigkeitstests realisiert.

**[0104]** In der Stufe des Kontaktierens werden die parasitären Formen mit Konzentrationen von 106 Parasiten/ml verwendet, und die Aktivität der Medikamente wird bei wachsenden Konzentrationen untersucht.

**[0105]** Die zu testenden Produkte können vorteilhafterweise markiert sein, beispielsweise durch eine radioaktive Gruppe, um die Wirkungsmechanismen und den Fluß der Drogen zu bestimmen.

**[0106]** Die Erfindung liefert so ein Modell, mit dem man falls gewünscht die in vitro-Aktivität von Medikamenten für die Promastigotenform und die Amastigotenform in verschiedenen Phasen ihres Wachstums eines bestimmten Parasiten vergleichen und diese Aktivität an der Form selbst testen kann, die sich beim Wirt findet.

**[0107]** Sie ermöglicht es, die medikamentöse Aktivität besser zu charakterisieren indem entweder ein Lyse-Effekt (leishmanicid oder trypanocid) oder ein Inhibitoreffekt der Vermehrung (leishmanostatisch oder trypanostatisch) des Produkts nachgewiesen wird.

**[0108]** Die Verwendung dieser parasitären Formen als Versuchsmodelle ermöglicht auch die Untersuchung der Chemoresistenz der Parasiten.

**[0109]** Bekanntlich bildet die Resistenz gegen Medikamente gegenwärtig ein erhebliches Problem. Die Un-

tersuchung der zu dieser Resistenz führenden Mechanismen, die unter Verwendung der Modelle der Erfindung leicht möglich ist, hat also ein großes Interesse.

**[0110]** Die Erfindung sieht auch einen Kit zum Screening von Produkten vor, die für die Behandlung von Parasitosen, speziell von Leishmanien oder der Chagas-Krankheit verwendet werden können.

**[0111]** Dieser Kit weist einen Träger auf, wie eine Mehrlochkarte, welche die parasitären Formen umfaßt, an denen man die Aktivität oder das zu untersuchende Produkt testen will, wobei bestimmte dieser Formen als Vergleiche verwendet werden und Reagenzien zum Bestimmen der medikamentösen Aktivität des Produkts gegen die parasitären Formen vorgesehen sind.

**[0112]** Wie oben angegeben konnten durch die bisher vorgenommenen Arbeiten die Parasitosen nicht in befriedigender Weise identifiziert werden.

**[0113]** Beim Menschen oder bei Tieren und besonders beim Hund hat man zumeist die Diagnose beispielsweise von Leishmaniose festgestellt, indem entweder der Parasit isoliert und identifiziert wurde (parasitologische Untersuchung) oder indem im Serum Antikörper (spezifische zirkulierende) nachgewiesen wurden (immunoserologische Tests).

**[0114]** Die gewerbliche Kultur von Amastigotenformen unter axenischer und aserischer Bedingung und in Abwesenheit von Makromolekülen kann eine reichliche Quelle von diagnostischen Werkzeugen von großem Interesse liefern.

**[0115]** Diese ermöglichen so, frühzeitig mit einer großen Empfindlichkeit und hochspezifisch zirkulierende Antikörper nachzuweisen, die gegen die Parasiten gerichtet sind.

**[0116]** Die Erfindung sieht daher eine Methode der Diagnose einer Parasitose beim Menschen oder Tier vor, besonders einer Infektion, die auf Leishmanien oder T. cruzi zurückgeht, oder deren Nachweis und Identifizierung beim Insektenvektor, die dadurch gekennzeichnet ist, daß sie folgende Schritte aufweist:

- Kontaktieren einer von dem zu untersuchenden Patienten oder Tier stammenden biologischen Probe mit einer Amastigotenform aus axenischer und aserischer Kultur oder einer Promastigotenform aus aserischer Kultur, wie oben definiert, oder eines Gesamt-Polypeptidextrakts dieser Amastigoten- oder Promastigotenformen oder einem oder mehreren spezifischen Antigenen dieses Extrakts, gereinigt oder ungereinigt,
- Nachweis des immunologischen Komplexes.

**[0117]** Die biologische Probe ist spezieller ein biologisches Fluid, wie Blut, Serum oder Urin.

**[0118]** Wenn man ein figuriertes gereinigtes oder halb-gereinigtes Antigen verwendet, ist dieses auf einem Träger immobilisiert.

**[0119]** Man verwendet beispielsweise Latexkugeln, Elisa-Platten oder Fluoreszenz-Objekträger.

**[0120]** Der Nachweis der Reaktion kann entweder direkt durch makroskopische Agglutination in den direkten Agglutinationstests erfolgen oder indirekt, indem man einen konjugierten Antikörper mit Fluorescein reagieren läßt (Methode der indirekten Immunofluoreszenz) oder mit einem Enzym wie der Peroxidase oder der alkalischen Phosphatase (Elisa-Tests).

**[0121]** Eine positive Reaktion ermöglicht so die Diagnose des Vorhandenseins zirkulierender Antikörper beim untersuchten Patient oder Tier.

**[0122]** Die Erfindung sieht auch einen Kit zur Durchführung einer Diagnosemethode einer Parasitose wie oben definiert beim Menschen oder Tier vor.

**[0123]** Dieser Kit ist dadurch gekennzeichnet, daß er folgende Mittel aufweist:

- die Antigen-Reagenzien in immobilisierter Form, das heißt die Amastigotenformen von axenischer oder axenischer und aserischer Kultur oder die Promastigotenformen von definierter Kultur, die aus diesen Formen erhaltenen Gesamt-Polypeptidextrakte oder die spezifischen Antigene dieser Extrakte mit, je nach dem Fall,
- einem positiven Vergleich, bestehend aus einem Serum mit bekanntem Titer,
- einem negativen Vergleich, sowie

– die Puffer und Reagenzien, die für den Nachweis der immunologischen Reaktion verwendbar sind.

**[0124]** Der Nachweis der bei einem Patienten oder Tier zirkulierenden Anti-Parasiten-Antikörper kann durchgeführt werden, indem man die Antikörper der Probe in Konkurrenz mit einem spezifischen Antikörper des Antigens, besonders einem monoklonalen Antikörper bringt. Diese Antikörper weisen vorteilhafterweise eine Markierung auf, beispielsweise eine radioaktive oder enzymatische Gruppe.

**[0125]** Als Variante beruht die Diagnosemethode auf dem Nachweis der Gegenwart antigenischer Determinanten der parasitären Formen (Nachweis von zirkulierenden Antigenen).

**[0126]** In dieser Variante wird die vom Menschen oder Tier stammende biologische Probe kontaktiert mit spezifischen Antikörpern, die gegen die Antigene der parasitären Form gerichtet sind, oder mit Fragmenten dieser Antikörper.

**[0127]** Der Nachweis der immunologischen Reaktion erfolgt beispielsweise unter Verwendung des gleichen jedoch markierten Antikörpers.

**[0128]** Man bemerkt mit Interesse die durch die Erfindung geschaffene Möglichkeit, zirkulierende Antigene nachzuweisen, das heißt diejenigen, die beim infizierten Subjekt rasch erscheinen, was eine frühzeitige Diagnose der Krankheit ermöglicht.

**[0129]** Man verwendet die gegen die Promastigoten- oder Amastigotenformen gerichteten Antikörper, besonders monoklonale Antikörper, wobei diese Formen von Parasiten verschiedener Spezies von Leishmanien stammen, wie *L. infantum* oder *T. cruzi*.

**[0130]** Ein entsprechender Diagnosekit umfaßt:

- eine geeignete feste Phase, die als Träger für die immunologische Reaktion dient, wie eine Mikrotitrationsplatte,
- ein erfindungsgemäßes Präparat von Antikörpern, wie oben definiert, oder Fragmenten derselben, die auf einem Träger immobilisiert sind,
- einen positiven Vergleich, der aus einem Serum mit bekanntem Titer besteht,
- einen negativen Vergleich, sowie
- die Puffer und Reagenzien, die zur Realisierung der immunologischen Reaktion verwendbar sind, und besonders den markierten homologen Antikörper.

**[0131]** Gemäß einem anderen Aspekt ermöglichen die erfindungsgemäßen Diagnosewerkzeuge eine Differentialdiagnose zwischen mehreren Parasitosen.

**[0132]** Man beobachtet tatsächlich sowohl beim Menschen wie beim Tier, beispielsweise Nagetieren, Kreuzreaktionen zwischen *T. cruzi*, *T. rangeli* (beim Menschen nicht pathogenes Trypanosom) und den viszeralen oder kutanen Leishmanien.

**[0133]** Die Untersuchung der erfindungsgemäßen parasitären Formen, der Polypeptid-Gesamtextrakte und spezifischen Antigene wie oben definiert hat ihre starken immunogenen Eigenschaften nachgewiesen.

**[0134]** Die Erfindung sieht daher auch deren Verwendung als Schutzmittel gegenüber Parasitosen vor, speziell gegen Leishmaniosen und die Chagas-Krankheit.

**[0135]** Die erfindungsgemäßen Vaccin-Zusammensetzungen sind dadurch gekennzeichnet, daß sie gewonnen sind ausgehend von Amastigoten- oder Promastigotenformen aus axenischer und aserischer Kultur in Abwesenheit von Makromolekülen, wie oben definiert, in verschiedenen Phasen ihres Wachstums oder ihren Bestandteilen in Gemeinschaft mit einem Vehikel und/oder einem Verabreichungshilfsmittel.

**[0136]** Zu den Bestandteilen der fraglichen Amastigoten- oder Promastigotenformen gehören die durch Lyse dieser parasitären Formen erhaltenen Polypeptid-Gesamtextrakte. Sie umfassen auch die Antigenfraktion und die spezifischen Schutzantigene, die aus parasitären Formen isoliert wurden, jedoch auch aus Überständen von durch die Parasiten konditionierten Kulturen, wenn sie in vollständig definierten Medien kultiviert wurden.

**[0137]** Die Verabreichung dieser Schutzmittel an den Menschen oder das Tier ermöglicht, ihnen eine globale Immunität gegen die Parasitosen zu verleihen, in denen sie in den natürlichen Infektionsprozeß eingreifen.

**[0138]** Ihre vorteilhafte Wirkung wurde speziell auf dem Niveau der Immunantwort bei zellulärer Mediation nachgewiesen, welche die Stimulation von T-Lymphozyten begünstigt, welche Interleukin 2 und Gamma Interferon (TH<sub>1</sub>) ausscheiden oder die Aktivierung der die Interleukine 4 und 5 ausscheidenden T-Zellen (TH<sub>2</sub>) inhibieren.

**[0139]** Diese Schutzmittel liegen vorteilhafterweise in lyophilisierter Form vor.

**[0140]** Im Fall von Polypeptidgesamtextrakten werden die Vaccin-Zusammensetzungen subkutan in einem Verhältnis von 100 bis 1.000 µg beim Menschen und von 100 bis 500 µg beim Hund in Gegenwart von Hilfsmitteln wie Muramyldipeptid oder Saponin oder in Gegenwart von Cytokin wie Gamma-Interferon verabreicht.

**[0141]** Die Exkretions-Sekretions-Antigene von Überständen der Kultur, die durch die Amastigotenformen der Erfindung metabolisiert sind, bieten eine originale Strategie in der Entwicklung von Vaccin gegen die parasitären Krankheiten.

**[0142]** Hervorgehoben sei besonders ihr Interesse zur Gewinnung von Vaccinen gegen die viszeralen Leishmaniosen des Hundes oder des Menschen (L. infantum und L. chagasi). Sie entsprechen vorteilhafterweise den beim infizierten Wirt vorhandenen Formen.

**[0143]** Die verschiedenen durchgeführten Versuche konnten deren immunogene Eigenschaften und deren Schutzeffekt beim Menschen oder Tier nachweisen.

**[0144]** Zur Herstellung der Vaccine ausgehend von den genannten Antikörpern oder Exoantigenen verwendet man die konzentrierten dialysierten Überstände von Amastigotenkulturen oder die Kulturen selbst, welche die Parasiten und ihre Überstände enthalten, wobei die Parasiten beispielsweise durch Wärmebehandlung abgetötet wurden, oder Extrakte dieser Lösungen.

**[0145]** Diese Produkte werden mit Hilfsmitteln wie MDP oder Cytokinen, wie Gamma-Interferon verwendet.

**[0146]** Man verwendet ein Langzeit- oder Kurzzeit-Immunisationsprotokoll. Das Langzeitprotokoll wird beispielsweise realisiert durch Injektion der Vaccin-Präparation alle drei Wochen zu den Tagen j = 0, j = 21 und j = 42. Für ein Kurzzeitprotokoll nimmt man beispielsweise zwei Injektionen mit 15 Tagen Intervall vor.

**[0147]** Vor der virulenten Probe verifiziert man beim Tier, ob die Hypersensibilität der Immunität bei zellulärer Mediation zur Aktivierung der Interleukin 2 und Gamma-Interferon abscheidenden TH<sub>1</sub>-Zellen induziert wurde.

**[0148]** Diese Analysen können auch beim Menschen bei der Immunisierung realisiert werden.

**[0149]** Weitere Eigenschaften und Vorteile der Erfindung sind in den folgenden Beispielen angegeben.

**[0150]** In diesen Beispielen bezieht man sich auf die **Fig. 1** bis **Fig. 13**, die jeweils zeigen:

**[0151]** [Fig. 1a](#) und [Fig. 1b](#) die Differenzierungskurven von Promastigotenformen zu Amastigotenformen und des Wachstums der Parasiten für L. amazonensis.

**[0152]** [Fig. 2](#) den Prozentsatz Amastigotenform von L. mexicana bei verschiedenen Temperaturen der Kultur,

**[0153]** die [Fig. 3a](#) und [Fig. 3b](#) die Kinetik der Kultur von Amastigotenformen verschiedener kutaner und kutanomukoser Leishmanien (3a) und einer viszeralen Leishmania (3b),

**[0154]** die [Fig. 4a](#) bis [Fig. 4c](#) die Kinetik der Kultur von Promastigotenformen von kutanen und kutanomukosen Leishmanien von viszeralen Leishmanien und T. cruzi,

**[0155]** [Fig. 5a](#) die zytologischen Charakteristika und [Fig. 5b](#) die ultrastrukturellen Charakteristika von Amastigotenformen der Leishmanienkultur,

**[0156]** die [Fig. 6a](#) und [Fig. 6b](#) die elektrophoretischen Analysen an Polyacrylamidgel SDS-PAGE von Gesamt-Polypeptidprofilen von Läsions-Amastigotenformen und der erfindungsgemäßen Kultur und von Promastigotenformen verschiedener Leishmanien,

[0157] die [Fig. 6c](#) und [Fig. 6d](#) Gel-Elektrophoreseanalysen des Abdrucks der Proteaseaktivitäten dieser Formen,

[0158] die [Fig. 7a](#) bis [Fig. 7d](#) die oben angegebenen Analysen jedoch betreffend viszerale Leishmanien,

[0159] die [Fig. 8a](#) und [Fig. 8b](#) die Analyse von Antigenprofilen von Leishmanien mittels der Immunoblotting-methode mit Hilfe von Immunisierungsseren des homologen Kaninchens,

[0160] die [Fig. 9](#) und [Fig. 10](#) die Kinetik der Differenzierung der erfindungsgemäß erhaltenen Amastigoten-formen zu Promastigotenformen jeweils für die kutanen und kutano-mukosen Leishmanien und für die viszeralen Leishmanien,

[0161] die [Fig. 11](#) und [Fig. 12](#) die Kinetik des Einbaus von  $[^{35}\text{S}]$  Methionin durch die Gesamtproteine oder Exkretions-Sekretionsproteine von *L. infantum* und *L. amazonensis* und

[0162] [Fig. 13](#) den Grad der Widerstandsfähigkeit von parasitären Formen von *L. mexicana* gegen Pentamidin.

[0163] Die Beispiele 1 bis 3 beziehen sich auf axenische oder axenische und aserische Kulturmedien, die jedoch Makromoleküle enthalten. Diese Medien sind für alle Fälle beschrieben, wenn sie bei der Adaptation einer parasitären Form in einem gegebenen Medium brauchbar sind, und werden anschließend vorteilhafterweise im Verlauf der aufeinanderfolgenden Passagen durch axenische und aserische Medien ersetzt, die von nicht dialysierbaren Molekülen mit einer Schnittgrenze von 3 kDa frei sind. Je nach der für die parasitären Formen in Aussicht genommenen Anwendung können sie in einer oder mehreren Stufen der Realisierung eines Entwicklungszyklus einer parasitären Form eingesetzt werden.

Beispiel 1: Herstellung eines azellularen Kulturmediums für Amastigotenformen der kutanen oder muko-kutanen Leishmaniasen oder von *T. cruzi*

[0164] In der folgenden Tabelle 1 ist die Formulierung eines Kulturmediums angegeben, das unter axenischen Bedingungen das Wachstum von Amastigotenformen verschiedener Spezies von *Leishmania* unterhält, die für kutane und muko-kutane Leishmaniasen verantwortlich sind und von verschiedenen Stämmen von *T. cruzi*.

Tabelle 1

Bestandteile	Menge pro 1 Liter	
<b>Basismedium</b>		
- Medium 199H R (x10) (mit Hanks-Salzen)*	100 ml	
- Trypto-Casein-Soja <sup>R</sup>	5 g	
- NaHCO <sub>3</sub>	0,35 g	
- L-Glutamin	0,75 g	
- HEPES	5,95 g	
- D(+) Glucose	2,50 g	
- H <sub>2</sub> O	Q.S. 800 ml	
<b>Zusätze</b>		
- Rinderhaemin	0,015 g	
- Fötale Kalbsserum	200 ml	

\* Medium 199H vertrieben von Gibco BRL, Ref. 042-01181 des Katalogs von 1994.

[0165] Dieses Medium, das in der Folge der Beispiele M1 genannt ist, wird wie folgt hergestellt:

Zu 100 ml des Mediums 199H (mit Hanks-Salzen), 10-mal konzentriert werden nacheinander in den in der Tabelle angegebenen Mengen das Trypto-Casein-Soja®, das Natriumbicarbonat, das L-Glutamin, das HEPES und die D(+)-Glucose gegeben. Das Volumen des Mediums wird dann mit entionisiertem destilliertem Wasser auf 800 ml gebracht. Dieses Basismedium hält sich mehrere Monate bei -20°C. Bei seiner Verwendung werden zu 500 ml des Basismediums Rinderhaemin (0,023 mM) und fötales Kalbsserum (200 ml) zugesetzt, das zuvor dekomplementiert wurde (56°C während 30 Minuten). Das erhaltene Medium M1 wird bei 4°C aufbewahrt und kann während drei Wochen ohne Veränderung seiner Eigenschaften verwendet werden. Der pH des Mediums beträgt  $6,5 \pm 0,1$  und die Osmolarität wurde bestimmt mit  $443,3 \pm 2,3$  Milliosmole pro kg Wasser.

**[0166]** Es sei daran erinnert, daß die Hanks-Salze der folgenden Zusammensetzung entsprechen:  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (1,8 g/l),  $\text{KCl}$  (4 g/l),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0,6 g/l),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (2 g/l),  $\text{NaCl}$  (80 g/l) und  $\text{NaHPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0,48 g/l). Die angegebenen Konzentrationen entsprechen dem Medium 199H 10×.

Beispiel 2: Herstellung eines azellularen Kulturmediums für Amastigotenformen von viszeralen Leishmanien

**[0167]** Zum oben beschriebenen Medium M1 gibt man L-Cystein (3 mM) und Bathocuproin-disulfonsäure (0,01 mM). Die Zusammensetzung des erhaltenen Mediums, hiernach Medium M2 genannt, ist in der folgenden Tabelle 2 angegeben:

Tabelle 2

Bestandteile	Mengen
- Medium M1	1000 ml
- L-Cystein	3 mM
- Bathocuproin-disulfonsäure	0,01 mM

Beispiel 3: Herstellung von axenischen und axenischen Kulturmedien für Amastigotenformen von Leishmanien

**[0168]** Es wurden vollständig definierte Medien hergestellt, welche das Wachstum von Amastigotenformen von Leishmanias unter axenischen und aserischen Bedingungen unterhalten. Für die Amastigotenformen wird das fötale Kalbsserum des Mediums M1 oder M2 ersetzt durch einen Albumin-Komplex von Rinderse-  
rum(BSA)-Linolsäure im Verhältnis von 20 µg Linolsäure pro ml des Mediums M1 oder M2. Der pH des Medi-  
ums beträgt  $6,5 \pm 0,1$  und die Osmolarität wurde bestimmt mit  $467 \pm 2,9$  Milliosmole pro kg Wasser.

**[0169]** In der folgenden Tabelle 3 ist die entsprechend Zusammensetzung des erhaltenen Mediums angege-  
ben, das M3 genannt wird.

Tabelle 3

Bestandteile	Mengen
- M1 oder M2 ohne SVF	100 ml
- BSA-Linolsäure	0,002 % (G Linolsäure/V)

Beispiel 4: Herstellung eines azellularen und aserischen, von Makromolekülen (Molekülverbindungen, die bis zu einer Schnittgrenze von 3 kDa dialysierbar sind), befreiten Kulturmediums für Amastigotenformen

**[0170]** In der Tabelle 4 ist die Formulierung eines erfindungsgemäßen Mediums zur Differenzierung und Kul-  
tur von Amastigotenformen von kutanen, muko-kutanen und viszeralen Leishmanias und verschiedenen Stä-  
mmen von *T. cruzi* angegeben.

Tabelle 4

Bestandteile	Menge pro etwa 800 ml	
Basismedium		
- Medium 199H R (x10) (mit Hanks-Salzen)*	100 ml	
- Trypto-Casein-Soja <sup>R</sup>	5 g	
- NaHCO <sub>3</sub>	0,35 g	
- L-Glutamin	0,75 g	
- HEPES	5,95 g	
- D(+)-Glucose	2,50 g	
- H <sub>2</sub> O	Q.S.	800 ml

\* Medium 199H vertrieben von Gibco BRL, Ref. 042-01181 des Katalogs von 1992.

Tabelle 4 (Fortsetzung)

Bestandteile	Menge pro etwa 800 ml
Basismedium	
- Medium 199H Modifiziert <sup>R</sup> **	4 ml (5 %)
Zusätze	
- Rinderhaemin	0,009 mM
- reduziertes Glutathion	0,08 mM
- Lösung von Vitaminen (x 100)	2 %

\*\* Medium 199H modifiziert vertrieben von Flow Laboratories, Ref. 14230-54 des Katalogs von 1992.

**[0171]** Dieses Medium, das in den folgenden Beispielen MA1 genannt wird, wird wie folgt hergestellt: Zunächst stellt man das folgende Basismedium her:

Zu 100 ml des Mediums 199H (mit Hanks-Salzen), 10-mal (oder 10×) konzentriert, wie von Gibco BRL vertrieben, werden nacheinander die in der Tabelle angegebenen Mengen von Soja-Trypto-Casein<sup>R</sup>, Natriumbicarbonat, L-Glutamin, HEPES und D(+)-Glucose zugesetzt. Das Volumen des Mediums wird dann mit entionisiertem destilliertem Wasser auf 800 ml eingestellt. Man fügt dann dem Medium 10× konzentriertes 199H zu, wie es von Flow Laboratories vertrieben wird, das zuvor 45 Minuten lang auf 56°C erwärmt wurde.

**[0172]** Dieses Basismedium hält sich mehrere Monate bei -20°C. Bei seiner Verwendung fügt man zu 800 ml des Basismediums Rinderhaemin (0,09 mM), reduziertes Glutathion (0,08 mM), wie von Boehringer Mannheim unter der Referenz 127744 vertrieben, und eine Lösung von Vitaminen (2%) 100-fach konzentriert, wie von Gibco BRL, Ref. 12414-017 vertrieben, zu. Diese Lösung weist die folgenden Vitamine mit den in Klammern angegebenen Konzentrationen auf: Biotin (0,4 mg/l), Calcium-D-Pantothenat (0,5 mg/l), Cholinchlorid (6 mg/l), Folsäure (2 mg/l), i-Inositol (70 mg), Nikotinamid (2 mg/l), p-Aminobenzoësäure (2 mg/l), Pyridoxin-HCl (2 mg), Riboflavin (0,4 mg/l), Thiamin-HCl (2 mg/l) und Vitamin B12 (0,01).

**[0173]** Das erhaltene Medium MA1, bei 4°C gelagert, kann während drei Wochen ohne Veränderung seiner Eigenschaften verwendet werden. Der pH des Mediums beträgt  $6,5 \pm 1$  und die Osmolarität wurde bestimmt mit  $412,3 \pm 3,1$  Milliosmole pro kg Wasser.

Beispiel 5: Herstellung eines Kulturmediums nach Beispiel 4, das für Amastigotenformen von viszeralen Leishmanien geeignet ist

**[0174]** Man fügt falls notwendig zu 1000 ml des Mediums MA1 des Beispiels 4 L-Cystein (3 mM) und Bathocuproindisulfonsäure (0,01 mM) zu.

Beispiel 6: Herstellung von axenischen und aserischen, von Makromolekülen befreiten Kulturmedien für die Promastigotenformen

**[0175]** Das für die Kultur von Promastigotenformen vorgesehene aserische Medium besteht aus einem Gemisch von im Handel verfügbaren Kulturmedien. Zu einem Liter des Mediums RPMI 1640, 1,1-fach konzentriert mit einem Gehalt von 5,95 g HEPES gibt man 20 ml des modifizierten Mediums 199H (mit Hanks-Salzen) und 0,5 mg Rinderhaemin. Dieses Medium hält sich 15 Tage bei +4°C ohne Veränderung seiner Eigenschaften. Der pH des Mediums beträgt  $7,2 \pm 0,1$  und die Osmolarität wurde bestimmt mit  $353 \pm 3$  Milliosmole pro kg Wasser.

**[0176]** Die Rezeptur für ein Liter Kulturmedium, das das Wachstum von Promastigotenformen von Leishmanien unter aserischer Bedingung unterhält, ist in der folgenden Tabelle 5 angegeben und wird MP genannt.

Tabelle 5

Bestandteile	Mengen
RPMI 1640 (1,1 X)	1000 ml
Mit L-Glutamin und HEPES Medium 199H modifiziert* (10 X)	2 % (G/V)
Rinderhaemin	0,0005 % (G/V)

\* Medium 199H von Gibco BRL, oben erwähnt

Beispiel 7: Adaptation und Kultur von Amastigotenformen von Leishmanien unter axenischer Bedingung

**[0177]** Die Promastigotenformen verschiedener Spezies von Leishmanien werden kultiviert und dann zu Amastigotenformen differenziert.

**[0178]** Im folgenden sind die Ergebnisse von Arbeiten angegeben, die an 19 Stämmen von Leishmanien durchgeführt wurden.

a. Leishmanienstämme

**[0179]** Die Hauptmerkmale (Land, Wirte, Jahr der Isolierung und Spezies) sind in der folgenden Tabelle 6 zusammengefaßt. Die subspezifische Charakterisierung der verschiedenen Spezies von Leishmanien wurde durch genetische Typisierung mittels Analyse von mehr als 10 variablen isoenzymatischen Orten vorgenommen.

Tabelle 6

Bezeichnung & Quelle	Spezies	Anzahl Passagen	Anzahl Amastigoten (x 10 <sup>7</sup> /ml)
MHOM/BR/79/LI-01	<u>L. chagasi</u>	75	7,2
MHOM/MA/67/JTMAP	<u>L. infantum</u>	39	7,3
Klon 1 263			
MHOM/MA/27/JTMAP	<u>L. infantum</u>	48	6,9
Klon 7 263			
MHOM/IN(--62/L-13	<u>L. donovani</u>	64	5,9
MHOM/---/IT-2217	<u>L. donovani</u>	56	6,1
MHOM/IN/80/Ldd 8 Cl <sub>2</sub>	<u>L. donovani</u>	44	5,9
MHOM/IN/80/Ldd 8 Cl <sub>2</sub>	<u>L. donovani</u>	41	4,8
R60			
MNYC/BZ/62/M-379	<u>L. mexicana</u>	167	7,5
MHOM/BO/83/LPZ-155	<u>L. mexicana</u>	97	6,2
MHOM/BR/76/LTB-012	<u>L. amazonensis</u>	149	7,2
MHOM/BR/73/M-2269	<u>L. amazonensis</u>	89	5,1
MHOM/BR/75/M-2904	<u>L. braziliensis</u>	145	6,3
MHOM/BO/90/CS	<u>L. braziliensis</u>	64	6,2
MHOM/BO/90/AN	<u>L. braziliensis</u>	37	5,9
MHOM/BR/75/M-4147	<u>L. guyanensis</u>	94	6,6
MHOM/BR/78/M-5378	<u>L. guyanensis</u>	42	5,4
MCHO/PA/00/M-4039	<u>L. panamensis</u>	85	5,9
MHOM/PA/71/LS-94	<u>L. panamensis</u>	74	5,2
MHOM/EQ/91/A-8044	<u>L. panamensis</u>	39	4,8

## b. Kultur der Promastigotenformen

**[0180]** Die Promastigotenformen dieser verschiedenen Stämme von Leishmanien werden zum Zweck der Adaptation bei  $26 \pm 1^\circ\text{C}$  in einem flüssigen einphasigen synthetischen Medium, dem RPMI 1640, kultiviert, dem 10% fötales Kalbsserum (abgekürzt SVF) zugesetzt wurde, das zuvor bei  $56^\circ\text{C}$  während 30 Minuten dekomplementiert wurde.

**[0181]** Die Zusammensetzung des Mediums ist wie folgt:

– RPMI 1640	10,40 g
– HEPES	5,95 g
– NaHCO <sub>3</sub>	2,20 g
– H <sub>2</sub> O	900,00 ml

**[0182]** Der pH wird mit 1 N Natriumcarbonat auf 7,2 eingestellt, das Medium wird sterilisiert durch Filtrieren durch eine Millipore® Membran von 0,22 µm Porosität und kann einen Monat lang bei  $4^\circ\text{C}$  aufbewahrt werden. Bei seiner Verwendung werden 100 ml dekomplementiertes SVF zugesetzt.

**[0183]** Die Leishmanienstämme werden in Routinekultur durch zwei wöchentliche Passagen kultiviert, die darin bestehen, Promastigotenformen der exponentiellen Phase ( $5 \times 105$  Parasiten pro ml) in 5 ml Medium in 50 ml Kulturkolben zu impfen. Die verschiedenen Stämme werden durch Tiefgefrieren bei  $-180^{\circ}\text{C}$  in Gegenwart von 5% DMSO konserviert.

c. In vitro-Differenzierung von Promastigotenformen zu Amastigotenformen:

**[0184]**  $5 \times 10^7$  Promastigotenformen von Leishmanien am Ende der exponentiellen Phase, die wie oben angegeben erhalten wurden, werden in 10 ml des Kulturmediums M1 für die Promastigotenformen von kutanen oder muko-kutanen Leishmanien und des Mediums M2 für die von viszeralen Leishmanien geimpft.

**[0185]** Zu verschiedenen Tagen der Differenzierungskinetik werden 20  $\mu\text{l}$  der parasitären Suspension auf einen Objektträger aufgebracht, sehr rasch getrocknet und dann mit absolutem Methanol fixiert und nach der Giemsa-Methode gefärbt. Der Prozentanteil an Amastigotenformen wird durch Zählen der Anzahl von Amastigotenformen in bezug auf die Gesamtzahl von Parasiten durch Photonenspektroskopie ( $\times 400$ ) in 20 aufeinanderfolgenden Feldern bestimmt.

**[0186]** Diese Kulturen werden bei einer Temperatur zwischen 28 und  $36^{\circ}\text{C}$  durchgeführt.

**[0187]** Indem man wie oben angegeben arbeitet, wurden Doppelversuche bei 28, 32, 34 und  $36^{\circ}\text{C}$  mit *L. mexicana* und *L. amazonensis* und bei 28 und  $32^{\circ}\text{C}$  mit *L. braziliensis*, *L. guyanensis* und *L. panamensis* durchgeführt.

**[0188]** Die verschiedenen Kurven der in Abhängigkeit von der Temperatur erhaltenen Differenzierung bei einer ersten Passage im Medium M1 zeigen, daß allgemein gesehen unter den Bedingungen dieser Untersuchungen,

- das in vitro-Wachstum (Anzahl Parasiten pro ml) der untersuchten Organismen anscheinend nicht wirklich geändert wird durch die Erhöhung der Inkubationstemperatur der Kultur. Nur die Kinetik der Vermehrung von *L. amazonensis* bei  $36^{\circ}\text{C}$  ist stark verlangsamt;
- die Geschwindigkeit der Differenzierung (% der Amastigotenformen im Verlauf der Zeit) sowie die Prozentsanteile an Amastigotenformen bestimmt am achten Tag der Kultur steigen signifikant und in einer mit der Erhöhung der Temperatur der Inkubation korrelierten Weise;
- mehr als 90% der Promastigotenformen werden nach den verschiedenen Differenzierungskinetiken in Amastigotenformen transformiert, und das bei Inkubationstemperaturen über oder gleich  $32^{\circ}\text{C}$ .

**[0189]** Um die erhaltenen Ergebnisse darzustellen ist in den [Fig. 1a](#) und [Fig. 1b](#) die Anzahl Parasiten pro ml (0) und der Prozentsatz amastigoter Formen (•) in Abhängigkeit von der Zeit (in Tagen) für *L. mexicana* bei 34 und  $36^{\circ}\text{C}$  gezeigt. Man stellt eine hohe Differenzierung zu Amastigotenformen fest, die mit der Temperatur ansteigt.

**[0190]** Unter den gleichen Bedingungen jedoch unter Verwendung eines Mediums M2 wurde die Differenzierung von viszeralen Leishmanien wie *L. chagasi* und *L. donovani* untersucht. Man erhält analoge Prozentsanteile an Amastigotenformen.

**[0191]** Es sei bemerkt, daß bei Temperaturen über oder gleich  $32^{\circ}\text{C}$  die Transformation von Promastigotenformen in Amastigotenformen in 4 Tagen vollständig ist nach einer Anzahl von Passagen, die je nach den Spezies der untersuchten Leishmanien verschieden ist und abnimmt, wenn die Inkubationstemperatur steigt. Bei  $32^{\circ}\text{C}$  sind 3 oder 4, 6 bis 8 und 8 oder 9 Passagen jeweils notwendig für die kutanen, muko-kutanen und viszeralen Leishmaniosen, dagegen 2 oder 3 und 7 Passagen bei  $36^{\circ}\text{C}$  für die untersuchten kutanen und viszeralen Leishmaniosen wie in [Fig. 2](#) dargestellt, welche den Prozentsatz der Amastigotenformen in Abhängigkeit von der Anzahl von Passagen für *L. mexicana* bei  $34^{\circ}\text{C}$  und  $36^{\circ}\text{C}$  zeigt.

d. Kinetik des Wachstums von Amastigotenformen

**[0192]** Kurven der Kinetik der Kultur von Amastigotenformen verschiedener Spezies von Leishmanien wurden bei verschiedenen Temperaturen aufgenommen. In den [Fig. 3a](#) und [Fig. 3b](#) sind die Ergebnisse aufgeführt, die nach mindestens 25 Passagen von  $5 \times 10^6$  Amastigotenformen in 10 ml des Mediums M1 bei  $32^{\circ}\text{C}$  für *L. braziliensis* (•), *L. guyanensis* (--) und *L. panamensis* (-O-) und bei  $32^{\circ}\text{C}$  und  $36^{\circ}\text{C}$  für *L. chagasi* erhalten wurden.

**[0193]** Die drei charakteristischen Phasen des Zellwachstumszyklus, die klassisch im Verlauf der Kultur von Promastigotenformen beobachtet werden, wurden wieder gefunden:

- eine Latenzphase (2 Tage),
- eine exponentielle Phase, während der die Parasiten sich rasch vermehren (4 bis 5 Tage, je nach den Spezien von Leishmanien),
- eine stationäre Phase, die einem Stadium ohne Teilung entspricht (ab dem 6. oder 7. Tag).

**[0194]** Man beobachtet eine Vermehrungsgeschwindigkeit berechnet im Verlauf der exponentiellen Phase (entsprechend der Zeit der realen Verdoppelung), die im wesentlichen die gleiche ist für die verschiedenen Kinetiken der Kultur, jedoch ist die Zeit der Verdoppelung der Amastigotenformen signifikant verschieden. Sie schwankt von 27 bis 32 Stunden je nach der untersuchten Spezies (dagegen beträgt sie nur 16 bis 21 Stunden für die entsprechenden Promastigotenformen unter den gleichen Bedingungen des Inokulums, des Volumens des Mediums und der Belüftung). Schließlich schwanken die parasitären Konzentrationen beim Zusammenfließen von Kulturen von Amastigotenformen von Leishmanien unter den Bedingungen dieser Untersuchungen von 4,8 bis  $7,5 \times 10^7$  Amastigotenformen pro ml Kultur in 6 oder 7 Tagen je nach der untersuchten Spezies (siehe Tabelle 6).

**[0195]** Es ist möglich, die Amastigotenformen von viszeralen Leishmaniasen bei 34°C und selbst 36°C zu kultivieren. Die Wachstumskurven sind ähnlich den bei 32°C erhaltenen.

Beispiel 8:

**[0196]** Etwa  $10^7$  Amastigotenformen am Ende der exponentiellen Phase von Hauptspezies von Leishmanien, im Medium M3 kultiviert, werden in 5 ml des Medium des Mediums MA1 bei verschiedenen Temperaturen geimpft. Dreifachversuche bei 32°C wurden mit *L. mexicana* und *L. amazonensis* und *L. donovani* und bei 36°C mit *L. infantum* durchgeführt.

**[0197]** Wenn die Vitamine im Medium weggelassen sind, tritt Lyse der Amastigotenformen am Ende der fünften Passage ein. In Abwesenheit von reduziertem Glutathion erhalten sich die Kulturen während 15 Passagen. Das Medium MA1 unterhält das kontinuierliche Wachstum (mehr als 40 Passagen) von Amastigotenformen unter axenischen und aserischen Bedingungen von verschiedenen Spezies von kutanen und mukokutanen und viszeralen Leishmaniasen.

**[0198]** Die Kinetikkurven der Kultur von Amastigotenformen verschiedener Spezies von Leishmanien wurden bei verschiedenen Temperaturen nach mindestens 10 Passagen von  $5 \times 10^5$  Amastigotenformen pro ml in 5 ml des Mediums MA1 festgestellt. Im allgemeinen zeigen sie eine gute Analogie mit denen die im Serummedium M3 erhalten wurden.

**[0199]** Massive Kulturen, die eine erhebliche Produktion von Amastigotenformen ermöglichen, wurden auch in Kulturgefäßen von 600 ml (mit 200 bis 300 ml Nutzvolumen) nach einer Zwischenpassage in einer 200 ml Flasche (mit 50 bis 75 ml Nutzvolumen) erhalten. Allgemein werden etwa  $10^9$  dreimal gewaschene Parasiten bei 75 ml Kultur erhalten.

**[0200]** Allgemein behalten die unter axenischer und aserischer Bedingung und in Abwesenheit von Makromolekülen kultivierten Amastigotenformen ihre Infektionsfähigkeit in vitro und in vivo. Die Polypeptid- und Proteaseprofile sind analog denen, welche die unter axenischer Bedingung kultivierten Amastigotenformen zeigen (siehe die für *L. amazonensis* und *L. infantum* angegebenen Ergebnisse).

**[0201]** In der Tabelle 7 sind die Hauptmerkmale von Stämmen von Leishmanien angegeben, die unter axenischen und aserischen Bedingungen ohne Makromoleküle in Amastigotenformen kultiviert wurden.

Tabelle 7

Bezeichnung & Quelle	Spezies	Anzahl Passagen	Mittleres Wachstum ( $\times 10^7/\text{ml}$ )
MHOM/MA(BE)67/IT-263	<u>L. infantum</u>	68	6,1
MHOM/MA/67/IT-263	<u>L. infantum</u>	42	6,4
Klon 2			
MHOM/MA/67/IT-263	<u>L. infantum</u>	49	7,0
Klon 7			
MHOM/.../IT-2217	<u>L. donovani</u>	49	7,3
MHOM/IN/80D8	<u>L. donovani</u>	26	6,5
Klon 2			
MHYC/BZ/62/M-379	<u>L. mexicana</u>	72	7,6
MHOM/VE/76/JAP-78	<u>L. amazonensis</u>	76	6,9
MHOM/BR/76/LTB-012	<u>L. amazonensis</u>	42	6,9
MHOM/BR/73/M-2269	<u>L. amazonensis</u>	85	5,9
MHOM/BO/90/CS	<u>L. braziliensis</u>	16	5,8

Beispiel 9: Adaptation und kontinuierliche Kultur von Promastigotenformen in vollständig definierten Medien

**[0202]** Im folgenden sind die Ergebnisse von Arbeiten aufgeführt, die an 25 Stämmen von Leishmanien und einem Stamm von *T. cruzi* durchgeführt wurden.

**[0203]** Die Hauptmerkmale (Land, Wirte, Jahr der Isolierung und Spezies) dieser Stämme sind in der folgenden Tabelle 8 zusammengefaßt. Die subspezifische Charakterisierung der verschiedenen Spezies von Leishmanien und *T. cruzi* wurde durch genetische Typisierung mittels Analyse von mehr als 10 variablen isoenzytischen Orten durchgeführt.

Tabelle 8

Bezeichnung & Quelle	Spezies	Anzahl Passeagen	Anzahl Promastigoten (x 10 <sup>7</sup> /ml)
MHOM/BR/79/LI-01	<u>L. chagasi</u>	249	6,6
MHOM/MA(BE)/67/IT-263	<u>L. infantum</u>	89	5,6
MHOM/MA/67/IT-263 Klon 2	<u>L. infantum</u>	59	6,5
MHOM/MA/67/IT-263 Klon 7	<u>L. infantum</u>	61	7,1
MHOM/IN/83H 570	<u>L. donovani</u>	161	6,9
MHOM/IN(--)61/L-13	<u>L. donovani</u>	149	7,8
MHOM/---/IT-2217	<u>L. donovani</u>	126	7,2
MHOM/IN/80/DD8 Klon 2	<u>L. donovani</u>	129	7,3
MHYC/BZ/62/M-379	<u>L. mexicana</u>	229	7,9
MHOM/BO/83/LPZ-155	<u>L. mexicana</u>	102	5,6
MHOM/VE/76/JAP-78	<u>L. amazonensis</u>	176	6,5
MHOM/BR/76/LTB-012	<u>L. amazonensis</u>	142	6,9
MHOM/BR/73/M-2269	<u>L. amazonensis</u>	85	7,7
MHOM/BR/72/1670	<u>L. braziliensis</u>	111	6,5
MHOM/BR/75/M-2904	<u>L. braziliensis</u>	99	7,1
MHOM/BO/90/CS	<u>L. braziliensis</u>	86	5,8
MHOM/BO/90/AN	<u>L. braziliensis</u>	59	6,1
MCHO/PA/OO/M-4039	<u>L. panamensis</u>	107	6,6
MHOM/PA/71/LS-94	<u>L. panamensis</u>	136	5,3
MHOM/91/EQ/A8044	<u>L. panamensis</u>	98	6,8
MHOM/BR/78/M-5378	<u>L. guyanensis</u>	76	5,3
MHOM/BR/75/M-4147	<u>L. guyanensis</u>	113	6,2
MHOM/PE/85/FR-6	<u>L. peruviana</u>	79	5,5
Schnur strain	<u>L. major</u>	85	5,0
LTD	<u>L. tropica</u>	80	6,8
Stamm TEHUANTEPEC	<u>T. cruzi</u>	36	5,1

a. Kultur von Promastigotenformen in vollständig definierten Medien

**[0204]** Die Promastigotenform verschiedener Stämme von Leishmanien wurden in klassischer Weise bei 26°C im Medium RPMI 1640 mit Zusatz von 10% fötalem Kalbsserum (zuvor dekomplementiert) kultiviert wie es im obigen Beispiel 7b angegeben ist. Der Stamm von *T. cruzi* wird im gleichen Medium kultiviert, jedoch bei einer Inkubationstemperatur von 28°C.

**[0205]** Eine progressive Adaptation der Promastigotenformen, die in klassischer Weise im Medium RPMI 1640 mit 10% Gehalt an fötalem Kalbsserum kultiviert wurden, wird im Medium M4 realisiert. Alle Versuche wurden als Doppel bei 26 ± 1°C für die Leishmanien und bei 28 ± 1°C für *T. cruzi* in einem Volumen von 5 ml

Medium in Kolben von  $25 \text{ cm}^2$  (50 ml) vorgenommen. Die Kulturen wurden zunächst im Medium M4 auf die Hälfte verdünnt während mindestens zwei Passagen die alle 4 bis 5 Tage stattfanden, danach auf 1/5 oder 1/10 und auf 1/20 während einer Anzahl Passagen, die nach den untersuchten Spezies verschieden war, von 2 bis 7 für jede neue Konzentration, um schließlich Passagen zu realisieren, die einer Impfung von  $5 \times 10^5$  Parasiten pro ml des Mediums M4 entsprachen.

b. Kinetik des Wachstums von Promastigotenformen im Medium M4

**[0206]** Die Kurven der Kinetik der Kultur von Promastigotenformen von Spezies von Leishmanien und *T. cruzi* sind in den [Fig. 4a](#) bis [Fig. 4c](#) dargestellt. Sie wurden nach mindestens 30 Passagen von  $5 \times 10^6$  Parasiten in 10 ml des Mediums M4 erhalten.

**[0207]** [Fig. 4a](#) zeigt die Ergebnisse, die erhalten wurden mit *L. braziliensis braziliensis* (-□-), *L. braziliensis guyanensis* (-●-), *L. braziliensis panamensis* (-■-) und *L. peruviana* (-○-), [Fig. 4b](#) mit *L. donovani infantum* (-○--), *L. donovani donovani* (-●-) und *L. donovani chagasi* (-■--), [Fig. 4c](#) mit *L. mexicana mexicana* (-□--), *L. mexicana amazonensis* (-●--), *L. major* (-■--) und *T. cruzi* (-○--).

**[0208]** Die drei charakteristischen Phasen des Zyklus des Zellwachstums, die klassisch im Verlauf der Kultur von Promastigotenformen beobachtet werden, werden wieder gefunden: eine Latenzphase (2 Tage), eine exponentielle Phase (6 Tage) und eine stationäre Phase (ab dem 7. Tag).

**[0209]** Die Zeiten der realen Verdoppelung, berechnet im Verlauf der exponentiellen Phase, sind im wesentlichen die gleichen für die verschiedenen Kinetiken der Kultur. Sie sind unterschiedlich von 23 bis 30 Stunden je nach der Spezies der Leishmanien während sie von 16 bis 21 Stunden schwanken für die entsprechenden Promastigotenformen, die in Gegenwart von fötalem Kalbsserum unter den gleichen Bedingungen von Inokulum, Mediumvolumen und Belüftung kultiviert wurden.

**[0210]** Schließlich schwanken die unter den Bedingungen dieser Untersuchungen bestimmten parasitären Konzentrationen bei der Konfluenz der aserischen Kulturen (etwa 7 Tage) von Promastigotenformen von 5,0 bis  $7,9 \times 10^7$  pro ml des Mediums M4. Bestimmte Spezien von Leishmanien werden routinemäßig erhalten durch eine wöchentliche Passage seit mehr als 3 Jahren.

c. Untersuchung der Infektivität in vitro und in vivo von Promastigotenformen aus aserischer Kultur

**[0211]** Die Promastigotenformen aus aserischer Kultur wurden bei  $4^\circ\text{C}$  durch Zentrifugieren bei 2500 g gewonnen. Der Bodensatz von Parasiten wird dann drei Waschungen unter den gleichen Zentrifugierungsbedingungen im Puffer PBS pH 7,2 unterworfen. Die Parasitenkonzentration wird durch Zählen in der Thoma-Zelle bestimmt.

– Infektivität in vitro.

**[0212]** Es werden die Ergebnisse angegeben, die mit *L. chagasi*, *L. donovani*, *L. amazonensis*, *L. mexicana* und *L. braziliensis* erhalten wurden.

**[0213]** Nach dem im Beispiel 7 angegebenen Protokoll werden die peritonealen Makrophagen von Mäusen Balb/C mit den Promastigotenformen der stationären Phase im Verhältnis von 10 Parasiten pro Makrophage infiziert.

**[0214]** Die Analyse der Kinetik der Infektivität in vitro zeigt, daß nach 4 Stunden Inkubation von 24 bis 70% der Makrophagen je nach der untersuchten Spezies an ihrer Oberfläche haftende Promastigotenformen zeigen. Im Verlauf der Kinetik steigt der Prozentsatz an infizierten Makrophagen von 96 auf 100% bei 48 Stunden je nach der Spezies der Leishmanien.

**[0215]** Diese Ergebnisse zeigen, daß die erfindungsgemäß erhaltenen Promastigotenformen fähig sind, die Makrophagen in vitro zu infizieren.

Infektivität in vivo

**[0216]** Es werden die Ergebnisse berichtet, welche mit *L. mexicana* und *L. amazonensis* erhalten wurden.

**[0217]** Chargen von 12 Mäusen Balb/C wurden jeweils subkutan auf der Höhe des Fußballens der rechten Hinterpfote mit  $5 \times 10^7$  Promastigotenformen (in stationärer Phase) gemäß der Erfindung von *L. mexicana* und *L. amazonensis* subkutan infiziert (die linke Pfote diente als Vergleich). Die Größe der am Impfpunkt im Verlauf der Zeit entwickelten Wunde wird bestimmt.

**[0218]** Charakteristische Wunden erscheinen ab der fünften Woche der Infektion. Ihre Größe erreicht jeweils etwa 5 und 6 mm in der vierzehnten Woche bei *L. mexicana* und *L. amazonensis*.

Beispiel 10: Vergleich der extrazellularen Amastigotenformen nach Beispiel 7 mit intrazellularen Amastigotenformen

**[0219]** In diesem Beispiel werden die Ergebnisse berichtet, die mit *L. amazonensis*, *L. mexicana*, *L. braziliensis*, *L. chagasi* und *L. donovani* erhalten wurden.

#### Gewinnung der extrazellularen Form

**[0220]** Die Amastigotenformen aus axenischer Kultur verschiedener Spezien von Leishmanien wurden durch Zentrifugieren bei 2500 g gewonnen. Der parasitäre Bodensatz wird dann drei aufeinanderfolgenden Waschungen mit Zentrifugieren (unter gleichen Bedingungen) im Puffer PBS, pH 7,2 unterworfen. Für bestimmte Untersuchungen und besonders die Agglutinationstests mittels einer Lectins ist eine mechanische Trennung erforderlich, um die natürlicherweise agglutinierten Parasiten zu trennen. Die Parasitenkonzentration wird durch Zählen in einer Thoma-Zelle bestimmt.

#### Gewinnung von intrazellularen Formen

**[0221]** Die intrazellularen Amastigotenformen von *L. amazonensis* und *L. mexicana* werden aus Wunden isoliert, die sich am Impfpunkt bei den Mäusen der BALB/C entwickelt hatten, welche eine subkutane Injektion auf der Höhe des Fußballens der rechten Hinterpfote von  $5 \times 10^7$  Promastigotenformen in stationärer Phase erhalten hatten. Die Wunden werden abgenommen und steril im Puffer PBS, pH 7,2 mit 2% Glucosegehalt zerkleinert. Ein erstes Zentrifugieren mit geringer Geschwindigkeit (400 g) ermöglicht die Abtrennung von zerkleinertem Gewebe. Die Parasitensuspension wird dann dreimal in PBS gewaschen und bei 2500 g zentifugiert. Die intrazellularen Amastigotenformen werden in der Thoma-Zelle gezählt.

**[0222]** Die intrazellularen Amastigoten von *L. chagasi* und *L. donovani* werden ausgehend von einem Zerkleinerungsprodukt der Milz von Hamstern erhalten, die mit  $5 \times 10^7$  entsprechenden Promastigotenformen infiziert wurden, die intraperitoneal geimpft wurden. Diese Formen werden wie oben beschrieben isoliert.

#### Morphologische Untersuchung

**[0223]** Die zytologischen Charakteristika der Amastigotenformen der erfindungsgemäßen Kultur wurden verglichen mit intrazellularen Amastigotenformen durch optische Mikroskopie nach Fixierung und Giemsa-Färbung der Parasiten. Zur Illustration sind die mit *L. amazonensis* beobachteten Ergebnisse in [Fig. 5a](#) dargestellt. Bei der Überprüfung dieser Figur bestätigt sich, daß die Amastigoten der Kultur die allgemeinen morphologischen Eigenschaften von Leishmanien zeigen:

Kern und Kinetoplast gut individualisiert, jedoch auch spezifische Kriterien der Amastigotenformen: runde oder eirunde Formen von 2 bis 5  $\mu\text{m}$  über die große Achse und Fehlen der Geißel. Der in der Figur eingezeichnete Pfeil weist auf Amastigotenformen hin, die auf dem Weg der Teilung sind.

**[0224]** Eine Ultrastrukturuntersuchung durch Elektronenmikroskopie mit Überstrecken und Transmission ermöglichte die Bestätigung der Ultrastruktur analogie zwischen den intrazellularen Amastigotenformen und denen der Kultur ([Fig. 5b](#)).

#### Untersuchung der in vitro-Infektivität von Amastigotenformen von erfindungsgemäßer axenischer Kultur

**[0225]** Peritoneale Makrophagen von Mäusen BALB/C wurden durch Waschen der Bauchhöhle gewonnen. Sie wurden verteilt auf Kulturplatten mit 24 Vertiefungen an deren Boden ein Glasobjektträger von 12 mm Durchmesser eingelegt war, im Verhältnis von  $2,5 \times 10^5$  Makrophagen pro Vertiefung in 500  $\mu\text{l}$  RPMI 10% SVF. Die Platten wurden anschließend bei  $36 \pm 1^\circ\text{C}$  in einer auf 5%  $\text{CO}_2$  angereicherten Atmosphäre 14 Stunden gehalten. Am Tag darauf wurde eine Waschung vorgenommen, um die Makrophagen zu beseitigen, die nicht am Objektträger hafteten. Die Vertiefungen wurden anschließend mit den Amastigotenformen der exponenti-

ellen Phase oder der stationären Phase im Verhältnis von 5 Parasiten pro Makrophage infiziert.

**[0226]** Nach 4 Stunden Inkubation bei  $36 \pm 1^\circ\text{C}$  wurden alle Vertiefungen dreimal mit dem Medium RPMI mit Zusatz von 10% SVF gewaschen, um alle nicht an den Makrophagen haftenden Parasiten zu entfernen. Zwei Objektträger wurden entnommen, in sterilem PBS gewaschen und dann rasch getrocknet, fixiert und nach der Giemsa-Methode gefärbt, um den Prozentanteil infizierter Makrophagen und für bestimmte Spezien von Leishmanien die Anzahl von Parasiten pro Makrophage zu bestimmen. Diese Maßnahme wurde nach 24, 48 und 72 Stunden Inkubation wiederholt. Die Abstandstypen wurden über zwei Werte berechnet, die jeder drei Ableseungen von 500 Zellen entsprachen.

**[0227]** Die Untersuchung der Kinetik der in vitro-Infektivität zeigt, daß nach 4 Stunden Inkubation 35 bis 75,4% der Makrophagen je nach den Spezies Amastigotenformen an ihrer Oberfläche haftend zeigten. Nach 24 Stunden stieg der Prozentsatz der infizierten Makrophagen (welche Amastigotenformen enthielten) und erreichte für die Mehrzahl der Leishmanien bei 72 Stunden 100%.

**[0228]** Diese Ergebnisse zeigen, daß die erfundungsgemäß erhaltenen Amastigotenformen fähig sind, sich an die Makrophagen anzuheften, dort zu penetrieren und sich dort zu vermehren und andere Makrophagen zu befallen.

**[0229]** Die vergleichende Untersuchung der Kinetik der in vitro-Infektion bei intrazellulären Amastigotenformen von kutanen und viszeralen Leishmanien zeigt, daß die Prozentanteile von Makrophagen, die an ihre Oberfläche haftende Amastigotenformen aufweisen (4 h), sowie die Prozentanteile der infizierten Makrophagen im Zeitverlauf (24, 48 und 72 h) sehr ähnlich sind.

#### Untersuchung der in vivo-Infektivität

**[0230]** Die Versuchsbedingungen (Protokolle) der experimentellen Infektion sind verschieden je nachdem es sich um kutane oder viszrale Leishmaniose handelt. Es werden die Ergebnisse angegeben, die einerseits mit *L. mexicana* und *L. amazonensis* und andererseits mit *L. chagasi* und *L. donovani* erhalten wurden.

#### Kutane Leishmaniose

**[0231]**  $5 \times 10^6$  intrazelluläre Amastigotenformen und solche aus Kultur (in der exponentiellen Phase oder stationären Phase gemäß der Erfindung) von *L. mexicana* und *L. amazonensis*, die in 25  $\mu\text{l}$  Puffer PBS enthalten waren, wurden jeweils 12 Mäusen BALB/C subkutan auf der Höhe des Fußballens der hinteren Pfote injiziert, wobei die linke Pfote als Vergleich diente. Die Kinetik der Infektion wurde verfolgt, indem man mit Hilfe einer Präzisionslehre die Größe der am Ort der Impfung entwickelten Wunde maß.

**[0232]** Charakteristische Läsionen erscheinen am Punkt der Impfung zwischen der vierten und fünften Woche der Infektion. Ihre Größe steigt im Verlauf der Zeit rasch an und erreicht 6 bis 7 mm in der neunten Woche. Bei den mit *L. amazonensis* infizierten Mäusen werden ab der 7. Woche der Infektion Geschwürläsionen beobachtet.

**[0233]** Eine vergleichende Untersuchung der Kurven der experimentellen Infektion mit Amastigotenformen der Kultur gemäß der Erfindung und von intrazellulären Formen zeigt eine sehr gute Ähnlichkeit.

#### Viszrale Leishmaniose

**[0234]** Gruppen von 12 Goldhamstern wurden jeweils durch eine intraperitoneale Infektion (200  $\mu\text{l}$ ) von  $5 \times 10^6$  intrazellulären Amastigotenformen und aus erfundungsgemäßer Kultur (aus der exponentiellen und stationären Phase) von *L. chagasi* und *L. donovani* infiziert. Alle 21 Tage wurden 2 Hamster pro Gruppe geopfert. Die Milz sowie ein Lappen der Leber wurden entnommen und steril in 2 ml Puffer PBS zerkleinert. 500  $\mu\text{l}$  der Suspension wurden in zwei Typen von Kulturmedien (5 ml) kultiviert, dem Medium RPMI mit Zusatz von 10% SVF bei  $26^\circ\text{C}$  und dem Medium M1 nach dem Beispiel 1 bei  $32^\circ\text{C}$ . Passagen (Verdünnung auf ein Drittel) wurden alle 4 Tage vorgenommen. Das Auftreten von Promastigoten- und Amastigotenformen wird über die Zeit verfolgt und die Parasitenkonzentration wird mit Photonenmikroskopie bestimmt.

**[0235]** Die Kultivierung der dem 21. Tag der Infektion entsprechenden Milzzerkleinerungen zeigt, daß ab der zweiten Subkultur im obigen Medium RPMI zwei bis fünf Promastigotenformen von *L. chagasi* pro Feld bei der optischen Mikroskopie beobachtet werden. Bei *L. donovani* erscheinen die ersten Promastigotenformen nach

vier vier Passagen. Am 42. Tag der Infektion werden von zwei bis fünf Promastigotenformen pro Feld ab der ersten Passage bei *L. chagasi* und ab der zweiten Passage bei *L. donovani* beobachtet. Am 63. Tag werden mehr als 10 Parasiten pro Feld ab der ersten Passage für die zwei Spezies von *Leishmania* gezählt. Die Kultivierung der Milzzerkleinerungen der zwei Spezies von viszeraler Leishmaniose im Medium M1 bei 32°C führt zum Überleben und dann zur Vermehrung von Amastigotenformen nach 4 bis 5 Passagen in diesem Medium.

**[0236]** Diese Ergebnisse zeigen zweifelsfrei, daß die Amastigotenformen der Kultur von kutanen und viszeralen Leishmaniosen wie sie erfindungsgemäß erhalten werden, *in vivo* infektiös sind. Diese Ergebnisse werden bestätigt, indem man unter aserischen Bedingungen und in Abwesenheit von Makromolekülen arbeitet.

Modulierung der Infektivität *in vitro* und *in vivo* von kultivierten Amastigotenformen in Abhängigkeit vom Alter der Parasiten in der Kultur

**[0237]** Zahlreiche Arbeiten weisen eine Modifizierung der Infektivität *in vitro* (gegenüber peritonealen Makrophagen) und/oder *in vivo* (in einem experimentellen Modell) von Promastigotenformen im Verlauf ihrer Reifung in Kultur nach. Die aufeinanderfolgende Entwicklung von einem wenig infektiösen Stadium zu einem sehr infektiösen Stadium wurde für zahlreiche Spezies von Leishmanien gezeigt.

**[0238]** Es wurde daher die Infektivität *in vitro* (gegenüber peritonealen Makrophagen der Maus) und *in vivo* (in einem experimentellen Modell) von Amastigotenformen aus erfindungsgemäßer axenischer Kultur in verschiedenen Phasen ihres Wachstums verglichen.

#### Untersuchung *in vitro*

**[0239]** Es wurde die Infektivität *in vitro* von Amastigotenformen der exponentiellen Phase und der stationären Phase verschiedener Leishmanien, wie nach Beispiel erhalten, verglichen.

**[0240]** Die Amastigotenformen der exponentiellen Phase sind viel weniger infektiös als die der stationären Phase. Ab der vierten Stunde der Inkubation sind die Makrophagen, welche an ihrer Oberfläche Amastigotenformen der stationären Phase haftend zeigen, etwa zweifach zahlreicher. Die Bestimmung der Prozentanteile von infizierten Makrophagen im Verlauf der Kinetik der Infektion zeigt Unterschiede der gleichen Größenordnung zugunsten von Amastigotenformen der stationären Phase.

#### Untersuchung *in vivo*

**[0241]** Ebenso zeigt der Vergleich der Infektionskinetik *in vivo* der Amastigotenformen der Kultur in exponentieller Phase mit denen der stationären Phase, daß die Amastigotenformen der stationären Phase virulenter sind als die der exponentiellen Phase.

**[0242]** Es wurde so gezeigt, daß die Erhöhung der Infektivität von Amastigotenformen der Kultur von *L. amazonensis*, *L. chagasi* und *L. donovani* im Verlauf ihres Wachstums begleitet ist von einem Verlust der Aggenlation durch das Lectin PNA (peanuts agglutinin).

Beispiel 11: Polypeptid-Gesamtextrakte von Amastigoten der erfindungsgemäßen Kultur und Vergleich mit denen von intrazellulären Amastigoten

#### Dosierung der Proteine

**[0243]** Zentrifugenniederschläge von  $10^9$  Amastigotenformen aus erfindungsgemäßer Kultur und intrazelluläre (stationäre Phase) die zuvor gewaschen waren, wurden jeweils in 500 µl Extraktionslösung (NaCl 0,1% (G/V), 0,1% Triton X100 (V/V) wieder suspendiert und eine Reihe von Ultraschallbehandlungen (Sonikation) in der Kälte von 3 Pulsen von 10 Sekunden im Abstand von 30 Sekunden unterworfen. Der nach Zentrifugieren bei 14.000 g erhaltene Überstand bildet den Polypeptid-Gesamtextract.

**[0244]** Dieser Extract wird einer Messung der Proteine nach der Bradford-Methode (BioRad Protein Assay Kit II) unterworfen.

#### Elektrophoretische Analyse

**[0245]** Die elektrophoretische Analyse an Polyacrylamidgel SDS-PAGE (nicht reduzierende Bedingungen)

wurde nach dem von Laemmli U. K. et al., 1970, Nature, 227, 680 beschriebenen Protokoll durchgeführt. Die Proteine werden in einem 5%-igen Acrylamidgel konzentriert und dann an einem 10%-igen Elektrophoresegel getrennt. Pro Vertiefung werden 50 µg Proteine aufgegeben. Proteine mit bekannten Molekulargewichten (Kit Low Weight, Biorad) dienen als Indikatoren. Die Wanderung erfolgt unter 85 Volt während 2 Stunden bei 4°C in einem Puffer Tris/Glycin pH 8,3 mit 0,1% (G/V) Gehalt an SDS.

**[0246]** Die Färbung mit Coomassie-Blau ermöglicht die Sichtbarmachung der Polypeptidprofile. Die freien oder komplex gebundenen Polysaccharide werden durch das Schiff-Reagenz aufgezeigt.

**[0247]** Photos der erhaltenen Gele sind in [Fig. 6a](#) und [Fig. 6b](#) gezeigt.

**[0248]** In [Fig. 6a](#) sind die Profile 1, 2 und 3 jeweils Gesamtpeptidprofile der Promastigotenformen, der Amastigotenformen der Kultur und der Amastigotenformen der Läsion von *L. mexicana*.

**[0249]** In [Fig. 6b](#) sind die Profile 1, 2 und 3 jeweils zwei der Amastigotenformen der Kultur, der Promastigotenform und der Amastigotenformen der Läsion von *L. amazonensis*.

**[0250]** Man findet eine sehr gute Analogie zwischen den Profilen der Gesamtpeptide der Amastigotenformen der axenischen Kultur und denen der Amastigotenformen der entsprechenden Läsion (Profile 3).

#### Beispiel 12: Analyse von Proteaseaktivitäten an „Abdruckgel“

**[0251]** 5 mg Gelatine werden der obigen 10%-igen Acrylamidlösung zugesetzt. Es werden dann zwei Arten von Nachweisen durchgeführt: das Gel wird 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert

- in einer Lösung von PBS 0,01 M, pH 7,2 mit Gehalt von 2,5% (V/V) Triton X 100® (zum Beseitigen des SDS), dann die ganze Nacht allein im Puffer PBS
- in einem Acetatpuffer, pH 5,5, mit Gehalt von 2,5% (V/V) Triton X 100®, dann 14 Stunden im Acetatpuffer mit Gehalt an Dithiotreitol (DTT) (49 mM).

**[0252]** Die Proteaseaktivitäten werden nachgewiesen durch eine Färbung des Gels mit Coomassie-Blau. Sie erscheinen dann weiß auf blauem Grund.

**[0253]** Die [Fig. 6c](#) und [Fig. 6d](#) zeigen die Photos der Abdruckgele. Diese Figuren zeigen Proteaseaktivitäten von Amastigoten der Kultur (Profile 1), von Promastigoten (Profile 2) und Amastigoten der Läsion (Profile 3), die jeweils ausgehend von Stämmen von *L. mexicana* und *L. amazonensis* des Beispiels 7 erhalten wurden.

**[0254]** Wie bei den entsprechenden Gesamt-Polypeptidprofilen beobachtet man eine sehr gute Analogie zwischen den Profilen der Peptidaseaktivitäten der Amastigotenformen der Kultur und der intrazellulären Formen für die zwei Spezies von Leishmanien.

Beispiel 13: Vergleich zwischen Promastigotenformen und Amastigotenformen der erfindungsgemäßen axenischen Kultur

#### Proteinkonzentration

**[0255]** Die Bestimmung der Proteinkonzentrationen wurde durch Spektrophotometrie bei 595 nm nach der Methode von Bradford durchgeführt ausgehend von einem Extrakt von löslichem Gesamt-Polypeptid entsprechend der Extraktion eines Zentrifugenrückstands von Parasiten mit  $10^9$  Parasiten.

**[0256]** Unabhängig von den untersuchten Spezies von Leishmanien enthalten die Promastigotenformen etwa zweimal mehr Proteine als die entsprechenden Amastigotenformen ( $4,9 \pm 0,7$  mg gegenüber  $2,1 \pm 0,3$  mg pro ml).

#### Vergleich der Gesamt-Polypeptidprofile

– von kutanen Leishmanien

**[0257]** Man führt eine elektrophoretische Analyse dieser Extrakte an Polyacrylamidgel SDS-PAGE durch. Die Photos der mit *L. mexicana* und *L. amazonensis* erhaltenen Elektrophoresegelle sind in den [Fig. 6a](#) und [Fig. 6b](#) gezeigt.

[0258] Wie [Fig. 6a](#) zeigt, läßt die vergleichende Analyse der Polypeptidprofile der Promastigotenformen (Profil 1) und der Amastigotenformen von *L. mexicana* (Profile 2 und 3) erhebliche quantitative und qualitative Unterschiede erkennen.

[0259] Man findet:

- ein vorherrschendes Protein mit einem scheinbaren Molekulargewicht von etwa 65 Kilodalton (abgekürzt Kd), das sich spezifisch bei den Promastigotenformen zeigt;
- drei Hauptpolypeptide mit Molekulargewichten zwischen 55 und 90 Kd, die von den Amastigotenformen gezeigt werden, jedoch anscheinend nicht vorhanden sind in dem Gesamt-Polypeptidextrakt der Promastigotenformen.

[0260] Gewisse Unterschiede werden auch gefunden bei *L. amazonensis*:

- eine Bande entsprechend einem Molekulargewicht von etwa 58 Kd,
- mehrere Polypeptide, die in Molekulargewichtszenen zwischen 30 und 55 Kd liegen, sowie
- Banden, welche Molekulargewichte über 90 Kd darstellen, die anscheinend spezifisch sind für Amastigotenformen ([Fig. 6b](#)).

[0261] Die Analyse der gleichen Parasitenextrakte in einem Polyacrylamidgel gefärbt mit Schiff-Reagenz zeigt, daß die erfindungsgemäße Kultur von Amastigotenformen begleitet ist von einer wachsenden Expression eines glycosylierten Moleküls mit einem Molekulargewicht von etwa 130 Kd.

[0262] Dieses Molekül scheint kaum oder nicht vorhanden zu sein in den entsprechenden Profilen von Promastigotenformen.

[0263] Diese Promastigotenformen zeigen dagegen das Vorhandensein eines glycolysierten Moleküls mit einem Molekulargewicht in der Nähe von 50 Kd.

#### Viszerale Leishmanien

[0264] Gesamt-Polypeptidextrakte von *L. donovani* und *L. chagasi* wurden einer elektrophoretischen Analyse an Polyacrylamidgel SDS-PAGE unterworfen.

[0265] Die Photos der jeweils erhaltenen Profile der Gesamtpolypeptide sind in den [Fig. 8a](#) und [Fig. 8b](#) wiedergegeben.

[0266] In [Fig. 7a](#) entsprechen die Profile 1 und 2 jeweils den Promastigotenformen und Amastigotenformen der Kultur von *L. donovani* und in [Fig. 7b](#) die Profile 1 und 2 den Promastigotenformen und 3 und 4 den Amastigotenformen der Kultur von *L. chagasi*.

[0267] Man findet bei *L. donovani* ([Fig. 7a](#)) ein Hauptprotein, das sich bei den Amastigotenformen (Profil 2) entsprechend einem Molekulargewicht von etwa 85 Kd findet, und eine Bande von etwa 105 Kd, die bei den Promastigotenformen (Profil 1) nicht auftreten, welche für *L. mexicana* eine spezifische Hauptbande von etwa 65 Kd zeigen.

[0268] Die Amastigotenformen der exponentiellen Phase (Profil 4) und stationären Phase (Profil 3) von *L. chagasi* ([Fig. 7b](#)) zeigen zwei Hauptpolypeptide entsprechend Molekulargewichten von etwa 55 und 60 Kd, die in den Gesamt-Polypeptidprofilen der entsprechenden Promastigotenformen der exponentiellen Phase (Profil 1) und der stationären Phase (Profil 2) fehlen.

#### Vergleich der Proteaseaktivitäten

[0269] Die vergleichende Untersuchung der Proteaseaktivitäten der Amastigotenformen und entsprechenden Promastigotenformen zeigt allgemein Aktivitätsprofile, die komplexer und quantitativ stärker sind bei den Amastigotenformen von Leishmanien und läßt spezifische Proteaseaktivitäten des Amastigotenstadiums aufscheinen.

#### Von kutanen Leishmanien

[0270] Wie [Fig. 6c](#) zeigt, exprimieren die Promastigotenformen (Profil 2) von *L. mexicana* eine Hauptaktivität mit einem Molekulargewicht von etwa 65 Kd entsprechend der Oberflächenmetalloprotease während die

Amastigotenformen (Profile 1 und 3) zeigen:

- einen Komplex von Banden, welche dieses Molekulargewicht einrahmen (von 60 bis 85 Kd),
- Aktivitäten mit höheren Molekulargewichten (über 110 Kd) mit Wanderungsabständen, die je nach dem parasitären Stadium verschieden sind,
- drei Proteaseaktivitäten mit Molekulargewichten zwischen 17 und 35 Kd, die spezifisch von den Amastigotenformen gezeigt werden.

**[0271]** Eine geringere Bande eines Molekulargewichts von etwa 25 Kd sollte einer Cysteinproteaseaktivität entsprechen und wird nur bei den Promastigotenformen nachgewiesen.

**[0272]** Solche Unterschiede werden auch nachgewiesen für *L. amazonensis* ([Fig. 6d](#)). Die hauptsächlichen Proteaseaktivitäten der Promastigotenformen (Profil 2) mit Molekulargewichten von etwa 65 Kd und 115 Kd zeigen bei den Amastigotenformen (Profile 1 und 3) deutlich raschere elektrophoretische Wanderungen. Mindestens drei Proteaseaktivitäten mit Molekulargewichten zwischen 24 und 36 Kd werden spezifisch von den Amastigotenformen gezeigt; nur ein kleineres Band eines Molekulargewichts von etwa 24 Kd, was einer Cysteinproteaseaktivität entsprechen sollte, wird bei den Promastigotenformen der stationären Phase gefunden.

#### Von viszeralen Leishmanien

**[0273]** Bei *L. donovani* ([Fig. 7c](#)) ist die Proteasehauptaktivität der Amastigotenformen der Kultur (Profil 2) entsprechend einem Molekulargewicht von etwa 105 Kd, bei den Promastigotenformen (Profil 1) nicht ausgeprägt. Letztere zeigen eine kleinere Bande von etwa 65 Kd, die auch schwach bei den Amastigotenformen auftritt.

**[0274]** Bei *L. chagasi* ([Fig. 7d](#)) sind zwei Proteaseaktivitäten mit Molekulargewichten von etwa 28 und 110 Kd sowohl bei den Amastigotenformen der Exponentialphase (Profil 1) und stationären Phase (Profil 2) wie bei den entsprechenden Promastigotenformen (Profile 3 und 4) vorhanden. Diese zwei Aktivitäten sind jedoch intensiver bei den Amastigotenformen der stationären Phase. Die Amastigotenformen der Exponentialphase und stationären Phase zeigen komplexere Metalloprotease-Aktivitäten als die von den entsprechenden Promastigotenformen exprimierten. Schließlich sind zwei Aktivitäten mit Molekulargewichten von etwa 35 und 48 Kd spezifisch für die Amastigotenformen.

#### Antigenanalyse

**[0275]** Die vergleichende Untersuchung von Antigenprofilen von Promastigotenformen und Amastigotenformen wurde mit der Methode des Immunoblotting mit Hilfe von Seren von Kaninchen vorgenommen, die mit Gesamt-Polypeptidextrakten von Amastigotenformen der Kultur gemäß der Erfindung immunisiert waren.

**[0276]** Die Gesamt-Polypeptidextrakte der Promastigotenformen und Amastigotenformen werden an Polyacrylamidgel SDS-PAGE getrennt, auf eine Nitrocellulosemembran übertragen, die in Gegenwart der entsprechenden Immunisierungsserien inkubiert wird. Die Antigen/Antikörperkomplexe werden durch einen Antikörper aufgezeigt, der mit der Peroxidase konjugiert und gegen die ersten Antikörper gerichtet ist.

**[0277]** [Fig. 8](#) zeigt die Ergebnisse, die erhalten werden, wenn man Amastigotenformen aus axenischer Kultur und Promastigotenformen von *L. amazonensis* mit einem Kaninchen-Immunserum in Kontakt bringt, das gegen die Amastigotenformen von *L. amazonensis* gerichtet ist. Man stellt fest, daß vier Antigene spezifisch bei den Amastigotenformen erkannt werden:

- ein Hauptantigen mit einem scheinbaren Molekulargewicht von etwa 62 Kd dessen Wanderung langsam ist bei den Promastigotenformen (65 Kd)
- drei andere Moleküle entsprechend jeweils Molekulargewichten von etwa 81, 58 und 35 Kd, die bei den Promastigotenformen nicht auftreten,
- zwei Antigene von Promastigotenformen mit Molekulargewichten von etwa 45 und 50 Kd, die durch dieses gleiche Immunserum besser erkannt werden.

**[0278]** [Fig. 8b](#) entspricht den Amastigoten und Promastigoten von *L. mexicana* gegenüber dem gegen die Amastigotenformen von *L. mexicana* gerichteten Kaninchen-Immunserum. Die Untersuchung dieser Figur zeigt, daß vier Antigene entsprechend Molekulargewichten von etwa 98, 90, 53 und 35 Kd nur bei den Amastigotenformen aufgezeigt werden.

Vergleich der humoralen Antwort gegenüber Amastigotenformen der erfindungsgemäßen axenischen Kultur und entsprechenden Promastigotenformen

**[0279]** Die Intensität der Antikörperantwort wird bewertet nach der Methode der indirekten Immunofluoreszenz (IFI). Letztere besteht darin, halbquantitativ die zirkulierenden Antikörper nachzuweisen, und weist die Besonderheit auf, daß als Antigensubstrat vollständige Parasiten verwendet werden, die mit Glutaraldehyd 0,1% fixiert sind.

Untersuchung mit Immunisierungsseren

**[0280]** Die Kaninchen-Immunseren anti-*L. mexicana* und anti-*L. amazonensis* werden in Verdünnung an Promastigotenformen und Amastigotenformen der stationären Phase von *L. mexicana* und *L. amazonensis* getestet.

**[0281]** Die Kaninchenserien, die vor der Immunisierung abgenommen wurden, dienten zur Bestimmung der Positiv-Schwellen der Tests. Sie sind 1/2 für *L. amazonensis* und 1/10 für *L. mexicana*.

**[0282]** Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle 9 angegeben, wo das Kaninchen-Antiserum anti-*L. mexicana* mit IS anti-Lma und das Kaninchen-Antiserum anti-*L. amazonensis* mit IS anti-Lmm bezeichnet sind. Die Buchstaben A und P bedeuten jeweils die Amastigoten- und Promastigotenformen.

Tabelle 9

SEREN/OBJEKTTRÄGER	Lma P	Lma A	Lmm P	Lmm A
IS anti-Lma A	-	+ 1/5	-	+ 1/40
IS anti-Lmm A	-	+ 1/80	-	+ 1/40

**[0283]** Das Studium dieser Tabelle zeigt, daß die zwei Kaninchen-Immunseren positive Reaktionen allein mit den Amastigotenformen der Kultur der zwei Spezies von Leishmanien zeigen. Die Fluoreszenz wird an der Oberfläche der Amastigotenformen in Form einer Borte und auf der Höhe der Geißeltasche beobachtet. Diese Ergebnisse zeigen klar, daß die Amastigotenformen von Leishmanien an ihrer Oberfläche und auf dem Niveau der Geißeltasche spezifische Antigene von Stadien exprimieren, die beiden untersuchten Spezies gemeinsam sind.

Untersuchung mit experimentellen Infektionsseren

**[0284]** Seren von Hamstern, die jeweils mit Promastigotenformen von *L. mexicana* und *L. amazonensis* infiziert waren, wurden zu verschiedenen Zeitpunkten der experimentellen Infektion abgenommen, nämlich 30 (D30), 50 (D50) und 221 (D221) Tage für *L. amazonensis* und 30 (D30), 90 (D90) und 180 (D180) Tage für *L. mexicana*. Diese verschiedenen Seren wurden in Verdünnung an den Promastigotenformen und Amastigotenformen der stationären Phase von *L. mexicana* und *L. amazonensis* getestet. Die Positiv-Schwellen wurden bestimmt mit Hilfe von Seren gesunder Hamster. Sie betragen 1/20 unabhängig von der Spezies und dem parasitären Stadium, die analysiert wurden.

**[0285]** Die erhaltenen Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle 10 zusammengefaßt, wo SIE anti-Lma und SIE anti-Lmm jeweils die experimentellen Infektionsseren anti-*L. mexicana* und anti-*L. amazonensis* bedeuten.

Tabelle 10

SEREN/OBJEKTTRÄGER	Lma P	Lma A	Lmm P	Lmm A
SIE anti-Lma D30	-	1/40	-	-
SIE anti-Lma D50	1/20	1/160	-	-
SIE anti-Lma D221	1/20	1/160	-	1/20
SIE anti-Lmm D30	-	-	-	1/40
SIE anti-Lmm D90	-	1/20	1/40	1/80
SIE anti-Lmm D180	-	1/40	1/40	1/160

**[0286]** Die Seren der frühzeitigen Infektion (D30) reagieren spezifisch und einzig mit den Amastigotenformen der homologen Spezies. Allgemein steigen die erhaltenen Antikörpertiter gegenüber Amastigotenformen im Verlauf der zwei Kinetiken der Infektion. Die Seren D50 und D221 von *L. amazonensis* und D90 und D180 von *L. mexicana* zeigen auch schwach positive Reaktion (1/20 bzw. 1/40) mit den entsprechenden Promastigotenformen. Die erhaltenen Antikörpertiter sind stets geringer als die mit den Amastigotenformen erhaltenen. Schließlich erkennen die Seren D221 von *L. amazonensis* und D90, D180 von *L. mexicana* schwach und einzig die Amastigotenformen der heterologen Spezies.

**[0287]** Diese Ergebnisse bestätigen die Existenz spezifischer Antigene des Amastigotenstadiums. Sie zeigen auch, daß die im Verlauf von experimentellen Infektionen erzeugte humorale Antwort spezifischer gegen die von den Amastigotenformen exprimierten Epitope gerichtet ist. Schließlich zeigen sie, daß die Antigene von Amastigotenformen eher geeignet sind, eine frühzeitige Infektion aufzuzeigen.

#### Untersuchung der humoralen Antwort im Verlauf der Leishmaniose beim Hund

**[0288]** Die Untersuchung der humoralen Antwort wird mit indirekter Immunofluoreszenz an 39 Seren von Leishmaniose-kranken Hunden durchgeführt. Sie besteht darin, die Antikörperantwort gegenüber zwei Antigenenstraten zu vergleichen, nämlich den Promastigotenformen und Amastigotenformen der stationären Phase von *L. chagasi*. Es werden zwei Gruppen von Seren verwendet: 20 Seren zeigen Antikörpertiter kleiner oder gleich 1/160 ("schwach positive") und entsprechen wahrscheinlich frühen Infektionen und 19 Seren zeigen Titer über oder gleich 1/1280 (stark positiv) und zeigen damit gut ausgebildete Infektionen an.

**[0289]** Die Positivitäts-Schwelle wird mit Hilfe von 12 Seren von Hunden bestimmt, die frei von Leishmaniose waren (diese überstanden hatten). Unter den verwendeten experimentellen Bedingungen der Verdünnungen des fluoreszierenden Konjugats und von Evans-Blau liegt die Positivitäts-Schwelle bei 1140 unabhängig vom verwendeten figurierten Antigen.

**[0290]** Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in den folgenden Tabellen 11A und 11B dargestellt, wo *Ldc* = *L. chagasi*, wobei die Tabelle 11A den schwach positiven und die Tabelle 11B den stark positiven Seren entspricht.

Tabelle 11A

		Unterschiede ausgedrückt in Antikörpertitern, die an den zwei antigenen Substraten erhalten wurden		
Verglichene figurierte Antigene	Anzahl Seren	Mittl. Abstand	Mindestabstand	Höchstabstand
<i>Ldc A &gt; Ldc P</i>	12	2,0 ± 1,2	1	4
<i>Ldc A = Ldc P</i>	3	0	0	0
<i>Ldc A &lt; Ldc P</i>	5	2,2 ± 1,3	1	4

**[0291]** Von den 20 "schwach positiven" Seren zeigen 12 höhere Antikörpertiter, 3 äquivalente Titer und 5 niedrigere Titer gegenüber Amastigotenformen von *L. chagasi* (Tabelle 11A). Die Abstände ausgedrückt in Anzahl größerer oder geringerer Antikörpertiter sind sehr erheblich und schwanken von 1 bis 4 Titern.

Tabelle 11B

		Unterschiede ausgedrückt in Antikörpertitern, die an den zwei antigenen Substraten erhalten wurden		
Verglichene figurierte Antigene	Anzahl Seren	Mittl. Abstand	Mindestabstand	Höchstabstand
Ldc A > Ldc P	17	2,5 ± 1,6	1	6
Ldc A = Ldc P	2	0	0	0
Ldc A < Ldc P	0	/	/	/

**[0292]** Wie Tabelle 11B zeigt, ist die vergleichende Analyse der „stark positiven“ Seren noch überzeugender. Tatsächlich zeigen alle Seren intensivere Reaktionen mit den Amastigotenformen von *L. chagasi* mit Abständen der Anzahl an höheren Antikörpertitern von 1 bis 6.

**[0293]** Dieses neue experimentelle Modell ermöglicht eine bessere Empfindlichkeit der Methode der indirekten Immunfluoreszenz zu erhalten, wobei als Antigensubstrat die Amastigotenformen von axenischer Kultur im Vergleich mit den entsprechenden Promastigotenformen verwendet werden.

Beispiel 14: Adaptation der Amastigotenformen aus Kultur in vollständig definierten Medien

**[0294]** Die Amastigotenformen verschiedener Leishmanien wurden im Medium M3 nach Beispiel 3 adaptiert, darunter die von *L. mexicana*, *L. amazonensis*, *L. braziliensis* und *L. chagasi*.

**[0295]** Eine progressive Adaptation im Medium wird wie folgt durchgeführt: etwa  $10^7$  Amastigotenformen der Kultur nach Beispiel 7 werden in 5 ml des Mediums geimpft, das 25%, dann 50%, dann 75% und schließlich 100% des Mediums M3 enthielt.

**[0296]** Bei jeder Konzentration wurden 4 bis 5 Passagen im Verhältnis von einer, dann zwei Passagen pro Woche durchgeführt.

**[0297]** Die Kinetik der Kultur der Amastigotenformen der axenischen und aserischen Kultur verschiedener untersuchter Spezies von Leishmanien nach mehr als 20 Passagen im Medium M3 ist analog zu der die im Medium M1 bestimmt wurde.

Beispiel 15: Realisierung des parasitären Zyklus in vitro

a. Unter axenischer Bedingung:

**[0298]**  $10^7$  Amastigotenformen der Exponentialphase, wie nach Beispiel 7 erhalten, werden in 10 ml des Mediums RPMI mit Zusatz von 10% SVF bei 26°C geimpft. Zu den verschiedenen Tagen der Kultur werden 20 µl der Parasitensuspension auf einen Objektträger gebracht, rasch getrocknet, dann mit absolutem Methanol während 2 Minuten fixiert und nach der Giemsa-Methode während 10 Minuten gefärbt. Der Prozentanteil der Promastigotenformen wird durch Zählung unter dem optischen Mikroskop ( $\times 400$ ) in 20 aufeinanderfolgenden Feldern bestimmt. Aufeinanderfolgende Passagen werden alle 4 Tage im Verhältnis von  $10^6$  Parasiten pro ml durchgeführt, bevor die Kurven der Kinetik der Differenzierung festgestellt werden.

**[0299]** In den [Fig. 9](#) und [Fig. 10](#) sind der Prozentsatz der erhaltenen Promastigoten in Abhängigkeit von der Zeit (in Stunden) dargestellt für *L. braziliensis* , *L. guyanensis* , *L. panamensis*  ([Fig. 9](#)) und *L. chagasi*  und *L. donovani* ([Fig. 10](#)) .

**[0300]** Die Prüfung dieser Figuren zeigt, daß die Transformation der Amastigotenformen der Kultur in Promastigotenformen für alle untersuchten Spezies von Leishmanien bei 26°C in 4 Tagen vollständig ist.

**[0301]** Diese Promastigotenformen, die noch Promastigotenformen der Primärkultur oder Kurzzeit genannt sind und in das Medium M1 im Verhältnis von  $10^6$  Parasiten pro ml geimpft wurden, differenzieren sich bei  $32^\circ\text{C}$  sehr rasch (3 bis 4 Tage) zu Amastigotenformen. Die Transformation ist je nach den untersuchten Spezies von Leishmanien nach 2 bis 5 aufeinanderfolgenden Passagen vollständig.

**[0302]** Durch dieses Verfahren kann man daher *in vitro* die verschiedenen parasitären Stadien von Leishmanien erhalten und zwar viel rascher und leichter als durch die gegenwärtig verwendeten Methoden *in vivo* (experimentelle Infektion). Außerdem werden die parasitären Formen ohne jede zelluläre Verunreinigung produziert und sind in der Lage, sich *in vitro* zu vermehren (die aus infizierten Geweben isolierten Amastigotenformen überleben 2 bis 3 Tage), wodurch man über eine reichliche Quelle der zwei parasitären Stadien der hauptsächlichen Spezies von Leishmanien verfügt.

**[0303]** Es wurden die Kinetik der experimentellen Infektion bei der Maus Balb/C der Promastigotenformen der Exponentialphase von kurzer Dauer und der stationären Phase über lange Zeit und kurze Zeit untersucht. Die an *L. amazonensis* erhaltenen Ergebnisse zeigen, daß es möglich ist, die Infektivität von „Langzeit“-Promastigotenformen wieder herzustellen, indem man den parasitären Zyklus *in vitro* durchführt. Der gleiche Nachweis wurde für die viszeralen Leishmanien sowohl *in vitro* wie *in vivo* realisiert.

**[0304]** Die Infektivität *in vivo* der Amastigotenform der Kultur wurde auch im Verlauf der verschiedenen aufeinanderfolgenden Passagen (17, 59 und 143 Passagen) untersucht. Die erhaltene Kinetik der Infektivität ist nicht wesentlich verschieden in Abhängigkeit von der Anzahl der Passagen bei der Kultur. Diese Ergebnisse zeigen, daß im Gegensatz zu den entsprechenden Promastigotenformen die „Langzeit“-Kultur von Amastigotenformen in Kultur nicht zu einem Verlust ihrer Infektivität *in vivo* führt.

#### b. Unter axenischer und aserischer Bedingung

**[0305]** Es werden die Ergebnisse berichtet, die mit *L. chagasi* und *L. amazonensis* erhalten wurden.  $10^7$  Promastigotenformen aus aserischer Kultur am Ende der Exponentialphase/Beginn der stationären Phase wurden in 10 ml des Mediums M3 nach der Erfindung geimpft und bei  $32 \pm 1^\circ\text{C}$  inkubiert. Der Prozentsatz der erhaltenen Amastigotenformen in Abhängigkeit von der Zeit wird nach dem oben beschriebenen Protokoll bestimmt. Die Differenzierung der Promastigotenform zu Amastigotenform ist für die zwei untersuchten Spezies innerhalb 48 Stunden vollständig. Es ist also möglich, die Amastigotenformen unter axenischen und aserischen Bedingungen zu kultivieren, wie im Beispiel 14 angegeben.

**[0306]**  $10^7$  Amastigotenformen aus Kultur, die kürzlich in Promastigotenform in aserischer Kultur transformiert wurden, wurden bei  $26 \pm 1^\circ\text{C}$  in 10 ml des Mediums M4 nach der Erfindung geimpft. Die Transformation der Amastigotenformen zu Promastigotenformen ist dann nach 3 bis 5 Tagen vollständig. Die so erhaltenen Promastigotenformen, die noch Promastigotenformen der Erstkultur oder Kurzzeit genannt werden, werden im Medium M4 für eine wöchentliche Passage in Kultur gehalten, wie im Beispiel 9, a angegeben.

**[0307]** Die Verfahren der Adaptation und des in Kultur Haltens, die für die hauptsächlichen Spezies von Leishmanien geschaffen wurden, wurden angewandt auf die Kultur der Amastigotenformen von Stämmen von *T. cruzi*, dem Verursacher der Chagas-Krankheit.

**[0308]** Im folgenden sind die Ergebnisse wiedergegeben, die mit den Stämmen SO 34 cl 1, Gamba cl 1 und SO 3 cl 1 erhalten wurden, die durch Analyse von mehr als 15 Orten (Loci) als isoenzymatisch typisiert wurden. Diese Stämme wurden im Medium M1 bei  $32^\circ\text{C}$  ausgehend von entsprechenden metazyklischen Trypomastigotenformen (infektiöse Formen des Insektenvektors) rasch adaptiert und kultiviert. Die Trypomastigotenformen werden ausgehend von Epimastigotenformen (Formen der Vermehrung des Insektenvektors) erhalten, die im Medium LIT mit 10% Gehalt an SVF kultiviert wurden, gemäß einem von Contreras et al. beschriebenen Arbeitsgang (Protokoll) (1985, Mol. Biochem. Parasitol., 16, 315).  $5 \times 10^7$  Epimastigotenformen werden während 2 Stunden in einem Synchronisationsmedium TAU (Phosphatpuffer 8 mM, NaCl 190 mM, KCl 17 mM,  $\text{CaCl}_2$  2 mM, pH 6) während 2 Stunden inkubiert, dann in einem Differenzierungsmedium TAUP (TAU + L-Prolin 10 mM, L-Asparaginsäure 2 mM, L-Glutamin 50 mM und D-Glucose 10 mM) bis zu einer vollständigen Transformation der Epimastigotenformen in Trypomastigotenformen. Etwa  $5 \times 10^7$  metazyklische Trypomastigoten werden in 10 ml des Mediums M1 bei  $32^\circ\text{C}$  geimpft. Die Differenzierung zu Amastigotenformen ist vollständig nach 4 aufeinanderfolgenden Passagen bei den Stämmen SO 34 und Gamba und 11 Passagen beim Stamm S 03. Stämme dieses Typs werden unter axenischer Bedingung kontinuierlich durch eine wöchentliche Passage kultiviert und wurden mehr als 25 Passagen im Medium M1 unterworfen.

**[0309]** Unter dem optischen Mikroskop zeigen die Amastigoten der Kultur von *T. cruzi* allgemeine morphologische Charakteristika der intrazellulären Amastigotenformen. Eine massive Kultur (200 ml) des Stamms SO 34 Cl 1 wurde realisiert. Etwa  $10^9$  gewaschene Parasiten (3 Waschungen im Puffer PBS pH 7,2) wurden ausgehend von 50 ml der Kultur erhalten.

**[0310]** Es wurden auch verschiedene Untersuchungen der Differenzierung von Amastigotenformen der Kultur von Stämmen SO 34 und Gamba in Epimastigotenformen (Multiplikationsform des Insektenvektors) oder in sanguikole Trypomastigotenformen (infektiöse Form des Wirts) durchgeführt. Wenn  $5 \times 10^6$  Amastigotenformen der Kultur in 10 ml des Mediums M1 mit 10% Kalbsserum geimpft und dann bei 26°C oder bei Raumtemperatur während 48 Stunden inkubiert werden, enthält die Kultur mehr als 90% Epimastigotenformen. Wenn dagegen eine Kultur von Amastigotenformen am Ende der Exponentialphase bei 37°C in Gegenwart von 5% CO<sub>2</sub> in einem Medium M1 mit 30% und mehr an fötalem Kalbsserum während 4 Tagen bei 37°C inkubiert wird, werden 30 bis 40% der Amastigotenformen in Trypomastigotenformen transformiert. Es ist daher möglich, indem man die Bedingungen der Inkubationstemperatur und die Konzentration an fötalem Kalbsserum verschiedenen einstellt, den Zyklus von *Trypanosoma cruzi* (Epimastigotenformen, metazyklische Trypomastigotenformen, Amastigotenformen und sanguikole Trypomastigotenformen) unter axenischen Bedingungen *in vitro* zu realisieren.

Beispiel 16: Untersuchung der direkten leishmaniziden Wirkung von Stickstoffoxid, dem wirksamen Molekül der Makrophagenaktivierung, auf die Amastigotenformen der Kultur

**[0311]** Kürzlich wurden antimikrobielle Aktivitäten des Stickstoffoxids beschrieben, das von aktivierten Makrophagen auf einem neuen metabolischen Weg synthetisiert wird, der dazu führt, daß vom aktivierten Makrophagen ausgehend vom L-Arginin Derivate des Stickstoffoxids (NO, NO<sub>2</sub><sup>-</sup> und NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) synthetisiert werden. Dieses nicht spezifische Immunität bewirkende Molekül ist auch verantwortlich für antiparasitäre Aktivitäten (trypanostatische Wirkung bei den afrikanischen Trypanosomen und bei *Toxoplasma gondii* und lytische Wirkung bei *Schistosoma mansoni* und *Leishmania major*).

**[0312]** Dank des neuen experimentellen Modells der Erfindung konnte eine leishmanizide Wirkung, die direkt gegen die Amastigotenform der Kultur von verschiedenen Spezies von Leishmanien gerichtet ist, gezeigt werden. Ebenso wurde einer der Mechanismen aufgeklärt, die zur Lyse von Amastigotenformen führen. Die durchgeführten Arbeiten haben gezeigt, daß die Inhibition der cis-Aconitase (Enzym des Krebs-Zyklus) in Folge der Wechselwirkung des NO mit der prosthetischen Gruppe FeS (Eisen-Schwefel) dieses Systems die parasitäre Lyse induziert. Diese Ergebnisse wurden erhalten, indem man während 15 Minuten gasförmiges NO (1%) getragen von Stickstoff (99%) frei von Sauerstoff direkt auf die Amastigotenformen der Kultur von *L. mexicana*, *L. amazonensis*, *L. braziliensis* und *L. chagasi* leitete.

**[0313]** Die Kinetik der Kultur sowie die Differenzierung der Amastigotenformen zu Promastigotenformen wurden nach dieser Behandlung verfolgt. In bestimmten Untersuchungen stellten Medien, die 100 µm FeSO<sub>4</sub> (Eisenquelle) oder α-Ketoglutarsäure (3 mM) und cis-Aconitat (3 mM) enthielten und sofort den mit dem NO behandelten Parasiten zugesetzt wurden, das Wachstum der Amastigotenform wieder her.

**[0314]** Die vergleichten Untersuchungen der verschiedenen enzymatischen Aktivitäten und besonders derjenigen des Krebs-Zyklus bei den mit NO behandelten oder nicht-behandelten Amastigotenformen ermöglichte den Nachweis einer Inhibition der cis-Aconitase durch das NO.

Beispiel 17: Verwendung von Exoantigenen von Leishmanien in einer ELISA-Methode zur Detektierung von zirkulierenden Antikörpern in der viszeralen Leishmaniose

a) Versuchsanordnung (Protokoll)

Sensibilisierung der Platten

**[0315]** Die Überstände von axenischen und aserischen Kulturen von Promastigotenformen von *L. infantum* (6, 15 und 21 Tage) wurden durch Zentrifugieren gesammelt und über Membrane Millipore® 0,22 µm filtriert. Sie wurden auf die Hälfte in Carbonatpuffer verdünnt, um jeweils Konzentrationen von 3,5, 4,6 und 7,0 µg/ml (Proteinäquivalente) zu erhalten.

**[0316]** 100 µl dieser Lösungen wurden in jede Vertiefung von Mikrotitrationsplatten gebracht. Die Sensibilisierung dauert 2 Stunden bei 37°C, dann eine Nacht bei 4°C.

## Waschungen

**[0317]** Man nimmt 3 Waschungen von 5 Minuten durch Umkehren auf Filterpapier in Waschpuffer (PBS 0,1 M, pH 7,2 mit Gehalt an 0,05% Tween 80) vor.

## Sättigung der unspezifischen Fixierungsstellen

**[0318]** 100 µl von Blockierungspuffer (Waschpuffer mit Gehalt an 0,25% Gelatine) werden in jeder Vertiefung verteilt, dann unterwirft man die Mischung 30 Minuten Inkubation bei 37°C.

## Waschungen

**[0319]** Man wäscht dreimal 5 Minuten in Waschpuffer.

## Verteilung der Seren

**[0320]** Die Seren von Hund oder Mensch werden im blockierenden Puffer auf 1/200 verdünnt. 100 µl Serum werden pro Schälchen eingefüllt. Die Inkubation wird während 30 Minuten bei 37°C durchgeführt.

## Waschungen

**[0321]** Man wäscht dreimal 5 Minuten in Waschpuffer.

## Abscheidung des entsprechenden markierten Anti-Immunoglobins an der Peroxidase.

**[0322]** Dieses Reagenz, verdünnt auf 1/500, wird im Verhältnis von 100 µl pro Alveole aufgebracht. Das Gemisch wird 30 Minuten bei 37°C inkubiert.

## Waschungen

**[0323]** Man wäscht fünfmal 5 Minuten in Waschpuffer.

## Nachweis der Peroxidaseaktivität

**[0324]** 200 µl Reagenz (1 mg ABTS in 12 ml Citratpuffer 50 mM, pH 4 mit Zusatz von 5 µl Wasserstoffperoxid 30%-ig) werden pro Schälchen abgefüllt und die Zubereitungen werden 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

## Ablesung

**[0325]** Man verwendet ein Spektrophotometer bei 414 nm (grüne Färbung).

## b) Ergebnisse

**[0326]** Die Unterschiede, die zwischen den Mittelwerten der optischen Dichte der negativen und positiven Seren erhalten werden (bei indirekter Immunofluoreszenz) ermöglichen den Nachweis der Infektion mit L. infantum (siehe Tabelle 12).

Tabelle 12

	Negative Seren	Positive Seren
Überstand 6 Tage	0,128 + 0,025	0,313 + 0,035
Überstand 15 Tage	0,080 + 0,012	0,293 + 0,020
Überstand 21 Tage	0,062 + 0,010	0,257 = 0,039

Beispiel 18: Herstellung von Exkretions-/Sekretions-Antigenen ausgehend von Überständen der Kultur, die durch die verschiedenen parasitären Stadien von Leishmanien metabolisiert sind

**[0327]** Die durch die Parasiten in aserischer Kultur metabolisierten Überstände, die zu verschiedenen Zeiten der Kultur erhalten wurden, werden von den Promastigotenformen oder Amastigotenformen durch Zentrifugieren und dann Filtrieren über eine Millipore-Membran von 0,22 µm getrennt, die zuvor mit Bacitracin (1 mg/ml) behandelt wurde. Die Probe wird dann durch Ultrafiltration über Mini Ultrasette (Filtron, Schnittschwelle: 3 kDa) konzentriert, eine Nacht gegen destilliertes Wasser dialysiert und schließlich lyophilisiert. Dieses Verfahren ermöglicht es, die Überstände der Kultur mehr als 400-fach zu konzentrieren.

**[0328]** Die Proteindosierungen werden durch Spektrophotometrie bei 595 nm nach der Methode von Bradford (Biorad Protein Assay Kit II) vorgenommen. Je nach der Spezies der Leishmanien werden so 1 bis 4 µg Antigenprotein-Äquivalent pro ml des nicht konzentrierten Überstands erhalten.

Biochemische und immunologische Charakterisierung der Exkretions-/Sekretions-Antigene von *L. infantum* und *L. amazonensis*:

**[0329]** Die parasitären Exoantigene sind lösliche Moleküle, die natürlich im Blut der infizierten Wirte und in den Überständen der Kulturen *in vitro* dieser Parasiten freigesetzt werden. Man muß unterscheiden zwischen den echten Exoantigenen (AES), die aus dem Metabolismus der Parasiten stammen, und den Antigenen, die aus ihrer natürlichen oder künstlichen Lyse stammen.

**[0330]** Erfindungsgemäß erfolgt ein Einbau von Methionin  $^{35}\text{S}$  (1,85 MBq) ab dem dritten Tag (Beginn der Exponentialphase) der Kultur von Promastigotenformen von *L. amazonensis* (MHOM/FE/16/JAP-78: diffus kutane Leishmaniose) und von *L. infantum* (MOHM/MA/67/IT-263 Klon 2: humane viszrale Leishmaniose) geimpft im Verhältnis von  $5 \times 10^5$  Parasiten/ml in ein von Makromolekülen freies synthetisches Medium. Die AES und die parasitären Gesamt-Polypeptidextrakte (EPT) werden an SDS-PAGE (Polyacrylamid 10%) unter nicht-reduzierenden Bedingungen analysiert.

**[0331]** Die Kinetik des Einbaus von  $^{35}\text{S}$ -Methionin durch die Gesamtproteine oder Exkretion-/Sekretionsproteine von *L. infantum* und *L. amazonensis* ist jeweils in den [Fig. 11](#) und [Fig. 12](#) angegeben.

**[0332]** In [Fig. 11](#) entsprechen A bis D den Gesamtproteinen, die 24 h (A), 48 h (B), 72 h (C) und 96 h (D) nach Zugabe von  $^{35}\text{S}$ -Methionin extrahiert wurden; E bis H den Exkretions-/Sekretions-Proteinen, die 24 h (E), 48 h (F), 72 h (G) und 96 h (H) nach Zugabe von  $^{35}\text{S}$ -Methionin abgenommen wurden.

**[0333]** In [Fig. 12](#) entsprechen A bis D den Gesamtproteinen, die 24 h (A), 48 h (B), 72 h (C) und 96 h (D) nach Zugabe von  $^{35}\text{S}$ -Methionin extrahiert wurden, E bis H den Exkretions-/Sekretionsproteinen, die 24 h (E), 48 h (F), 72 h (G) und 96 h (H) nach Zugabe von  $^{35}\text{S}$ -Methionin abgenommen wurden.

**[0334]** Die radiomarkierten Profile der AES sind viel weniger komplex als die der EPT unabhängig von der untersuchten Spezies. Es werden nur 16 Exkretions-/Sekretionsproteine nachgewiesen, sowohl für *L. infantum* wie für *L. amazonensis*.

**[0335]** Immunofällungen (IP) wurden durchgeführt:

- mit den natürlichen Infektionsseren vom Menschen oder Hund gegenüber den AES und den EPT (6 Tage Kultur) von *L. infantum*
- mit Seren der experimentellen Infizierung beim Hamster gegenüber den AES und EPT (6 Tage Kultur) von *L. amazonensis*
- mit Immunisationsseren beim Kaninchen gegenüber AES und EPT (6 Tage Kultur) von *L. amazonensis*.

**[0336]** Die Ergebnisse zeigen eine Immunogenizität der AES im Verlauf von natürlichen oder experimentellen Infektionen. Für die zwei Parasiten sind bestimmte Antigene nur auf dem Niveau der EPT bekannt, während andere den AES eigen sind. Für *L. infantum* wird eine Ähnlichkeit der humoralen Antwort bei 5 der 6 untersuchten humanen Seren (2 Dubletten mit etwa 70 kDa und etwa 45 kDa) gegenüber den AES und den EP beobachtet. Das Hundeserum erkennt verschiedene Antigene (Hauptantigene mit etwa 90 und 66 kDa). Beim Hamster besteht eine Entwicklung der humoralen Antwort gegenüber den AES von *L. amazonensis* im Verlauf der experimentellen Infektion. Die bei einer experimentellen oder natürlichen Infektion erkannten Antigene sind verschieden von denen, die durch ein Anti-EPT-Immunisationsserum beim Kaninchen als Immunopräzipitat gefällt werden.

**[0337]** Diese Ergebnisse zeigen, daß die AES im Verlauf der Infektion durch *L. amazonensis* und *L. infantum* eine Antikörperantwort induzieren können. Unter Berücksichtigung ihrer Immunogenität bilden die AES Werkzeuge von großem Interesse für die Leishmaniosen in den Gebieten der Diagnostik und der Impfung.

Beispiel 19: Gewinnung von monoklonalen Antikörpern gegen die Exkretions-/Sekretionsantigene von *L. amazonensis*

Angewandte Arbeitsweise (Protokoll)

Immunisierung

**[0338]** 2 µg Antigen (Überstand von aserischer Kultur metabolisiert durch Promastigotenformen am Ende der Exponentialphase von *L. amazonensis*, 200-fach konzentriert und dialysiert) werden subkutan auf dem Niveau des Ballens der Hinterpfote subkutan injiziert. Das injizierte Antigenpräparat wird hiernach „Ag“ genannt.

**[0339]** Eine Arbeitsweise (Protokoll) der raschen Immunisierung bei der Maus BALB/e wird wie folgt durchgeführt:  $J_{-10}$ : Ag + vollständiges Freund-Adjuvans (ACF) (V/V);  $J_{-7}$  und  $J_{-4}$ : Ag + ALF;  $J_0$ : Gewinnung von Zellen der poplytisierten Ganglien, welche die Hinterpfote drainieren.

Fusion

**[0340]** Die myelomatösen Zellen (X 63) werden dazu gebracht ( $J_0$ ), mit den lymphocytären Zellen in einem Verhältnis 1/2 in Gegenwart von Polyethylenglycol 4000 (PEG 50%) zu fusionieren.

Screening

**[0341]** Bei  $J_{+7}$  zeigten 442 Vertiefungen (38%) mindestens einen zellulären Klon in der Entwicklung und 66 (5,7%) Zellen bei Konfluenz. Die Überstände der Zellen bei Konfluenz wurden entweder mit indirekter Immunofluoreszenz (IFI) oder mit dem ELISA-Test getestet. Dabei zeigten sich 19 von ihnen positiv bei IFI, 9 bei ELISA und 7 in den beiden Tests. Insgesamt wurden mehr als 1000 Vertiefungen gescreent. In Kästen von 96 Vertiefungen, in Kästen von 24 Vertiefungen und in Kästen von  $25 \text{ cm}^2$  zeigten sich jeweils 120, 47 und 36 Hybridome als sekretierend (nachgewiesen durch IFI).

Klonierung

**[0342]** Die charakteristischen sekretierenden Hybridome wurden durch Grenzverdünnung kloniert, 4 Klone waren Gegenstand einer besonderen Untersuchung (B3, C7, D9 und F5).

**[0343]** Die erhaltenen Ergebnisse sind in Tabelle 13 angegeben.

Tabelle 13

Stämme/Ascites	IB5/B3	IIAIC7	IVD4/D9	IVD6/F5
<i>L.infantum</i> Promastigoten	-	±	-	+
<i>L. amazonensis</i> Promastigoten	++ (1/10)	+ (1/100)	+ (1/1000)	+++ (1/1000)
<i>L. amazonensis</i> Amastigoten	+	-	+	+
<i>T. cruzi</i>	+/-	-	-	-
Molekulare Ziele bei Immuno-fällung oder Blotting	32 und 50 kDa	32 und 50 kDa	Zwischen 30 und 36 kDa	60 kDa und 45 kDa

Beispiel 20: Gewinnung von gegenüber einem Medikament resistenten Amastigotenformen

**[0344]** Gegen Pentamidin resiente Promastigotenformen von *L. mexicana* werden durch medikamentösen Druck in vitro erhalten und zeigen ein Resistenzindex von etwa 30. Sie werden anschließend nach dem bereits beschriebenen Kulturverfahren in entsprechende Amastigotenformen der Kultur transformiert, die nach Bestimmung des IC 50 ihre bei den Promastigotenformen induzierte Resistenz gegen Pentamidin beibehalten.

**[0345]** Fig. 13 zeigt die Veränderung des Prozentanteils Wachstum bezüglich einem Vergleich ohne Medikament in Abhängigkeit von der Konzentration des Pentamidins in  $\mu\text{mol/l}$  (die Kurve -□- entspricht den wilden Promastigoten von *L. mexicana*, die Kurve -●- den resistenten Promastigotenformen und die Kurve -□-- den resistenten Amastigotenformen (IC 50: Konzentration des Pentamidins, bei der eine Hemmung des Wachstums von 50% beobachtet wird, IC 50 Wild  $1,2 \pm 0,05 \mu\text{M}$ , IC 50 resistente Amastigote  $32 \pm 1 \mu\text{M}$  und IC 50 resistente Promastigote  $33 \pm 1 \mu\text{M}$ . Der Resistenzindex ist gleich IC 50 des resistenten Stamms/IC 50 des wilden Stamms. Für die Promastigoten ist der Wert 27 und für die Amastigoten 26.

**[0346]** Dank der Realisierung des Entwicklungszyklus *in vitro* liefert die Erfindung Amastigotenformen von Leishmanien, die gegen ein Medikament resistent sind. Dieses neue experimentelle Modell ermöglicht eine sehr genaue Untersuchung des Mechanismus oder der Mechanismen, die eine Rolle spielen bei der Induktion der Chemoresistenz bei dem beim infizierten Wirt vorliegenden parasitären Stadium.

### Patentansprüche

1. Verfahren zur *in vitro*-Kultur von verschiedenen Stadien von Gewebeparasiten ausgewählte aus den Leishmanien und *T. cruzi*, dadurch gekennzeichnet, daß es kontinuierlich in einem vollständig definierten einphasigen flüssigen axenischen und aserischen Kulturmedium durchgeführt wird, das frei von Makromolekülen, das heißt bei einer Schnittschwelle von 3 kDa nicht dialysierbaren Molekülen durchgeführt wird, wobei dieses Kulturmedium ein Medium für die Kultur von Insektenzellen umfaßt, mit Zusatz von anorganischen Salzen vom Typ Hanks-Salze, Aminosäuren wie L-Glutamin, und Zucker umfaßt, das zur Gewinnung von Amastigoten-Formen auf einen pH von 5,5 bis 6,5 mit einer Osmolarität von mindestens 400 Milliosmolen/kg Flüssigkeit und besonders 400 bis 550 Milliosmolen/kg Flüssigkeit oder zur Gewinnung von Promastigoten-Formen auf einen pH von 7 bis 7,5 mit einer Osmolarität von mindestens 300 Milliosmolen/kg Flüssigkeit und besonders 300 bis 380 Milliosmolen/kg Flüssigkeit gepuffert ist.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß für die Kultur der Amastigoten-Stadien ein Medium 199H M verwendet wird.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß zum Zeitpunkt der Verwendung dem Basismedium Antioxidantien, wie Hämin, Reduktionsmittel, wie reduziertes Glutathion, L-Cystein, sowie Vitamine oder Bathocuproinsulfonsäure zugesetzt werden.

4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß bezogen auf das Endmedium das Zellkulturmedium etwa 8 bis 15% (V/V) bildet, die Aminosäuren im Verhältnis von 4 bis 8% (G/V), die Zucker im Verhältnis von etwa 2 bis 4% (G/V), die Antioxidantien, wie Hämin, im Verhältnis von 0,0002 bis 0,0015% (G/V), das Glutathion im Verhältnis von 0,01 bis 0,05% (G/V) und das L-Cystein im Verhältnis von 0,25 bis 0,50% (G/V), die Bathocuproinsulfonsäure im Verhältnis von etwa 0,004 bis 0,008% (V/V) vorliegen, wobei die Vitamine 1 bis 5% (V/V) bilden.

5. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß das Kulturmedium 10% (V/V), die Aminosäuren 5 bis 6% (G/V), die Zucker 2 bis 3% (G/V), die Antioxidantien, wie Hämin, 0,0005% (G/V), das Glutathion 0,025% (G/V), das L-Cystein 3% (G/V), die Bathocuproinsulfonsäure 0,005% (V/V), die Vitamine 2% (V/V) bilden.

6. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß für die Kultur von Promastigoten-Stadien ein Kulturmedium verwendet wird, das hergestellt ist ausgehend von einem Zellkulturmedium, wie dem Medium RPMI 1640, den Aminosäuren, wie L-Glutamin zugesetzt sind, wobei dieses Medium auf einen pH-Wert von 7 bis 7,5 gepuffert ist und ihm außerdem ein anderes, für die Kultur von Insektenzellen geeignetes Kulturmedium, speziell das Medium 199H M zugesetzt ist, das anorganische Salze, wie Hanks-Salze, und Antioxidantien, wie Hämin, enthält.

7. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß das Medium 199H M im Verhältnis von etwa mindestens 2% (V/V) und das Rinderhämin von 0,0001 bis 0,0015% (G/V) verwendet werden.

8. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß das Medium 199H M im Verhältnis von 2% bis 10% (V/V) und das Rinderhämin mit 0,0005% (G/V) verwendet werden.

9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß Promastigoten-Formen der exponentialen Endphase in das Kulturmedium im Verhältnis von  $10^7$  bis  $10^7$  Promastigoten-Formen/ml des Me-

diums geimpft werden, die Adaptation und Kultur bei einer Temperatur in der Größenordnung von 28 bis 36°C und besonders um 32°C herum bei einem pH von 5,5 bis 6,5 durchgeführt werden, um eine vollständige Transformation der Promastigoten in Amastigoten zu erhalten.

10. Verfahren nach Anspruch 9 zur massiven und kontinuierlichen *in vitro*-Gewinnung von Promastigoten-Formen von Parasiten, dadurch gekennzeichnet, daß erhaltene Amastigoten-Formen im Verhältnis von  $10^6$  bis  $10^7$  Amastigoten/ml des Mediums geimpft werden und ihre Kultur bei einem pH von 7 bis 7,5 in einem klassischen Kulturmedium für die Entwicklung von Promastigoten-Formen aus Amastigoten erfolgt.

11. Verfahren nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß man Amastigoten-Formen am Ende des Exponentialphase verwendet.

12. Verfahren nach Anspruch 10 oder 11, dadurch gekennzeichnet, daß die erhaltenen Promastigoten-Formen für die Stufe des Impfens in ein Kulturmedium verwendet werden, um Amastigoten nach Anspruch 9 zu erzeugen.

13. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Amastigoten solche von *T. cruzi* sind und man Trypomastigoten-Formen an Stelle von Promastigoten-Formen benutzt.

14. Exkretions/Sekretions-Polypeptide, die direkt durch Konzentration und Dialyse ausgehend von Überständen von Kulturmedien von Amastigoten oder Promastigoten von Leishmanien oder *T. cruzi* erhalten wurden, die nach dem Verfahren eines der Ansprüche 1 bis 13 gewonnen wurden.

15. Exkretions/Sekretions-Polypeptide nach Anspruch 14, gekennzeichnet durch Molekulargewichte (MG) in den Bereichen von 40 bis 60 kDa und 65 bis 90 kDa wie sie identifiziert werden durch Methionin-Markierung und Analyse der markierten Extrakte gemäß SDS-PAGE, jeweils für *L. infantum* und *L. amazonensis*.

16. Polyklonale Antikörper, die gegen Exkretions/Sekretions-Polypeptid-Antigene des Anspruchs 14 oder 15 gerichtet sind, die direkt ausgehend von den Überständen von Kulturmedien von Amastigoten oder Promastigoten von Leishmanien oder *T. cruzi* erhalten werden, die gemäß dem Verfahren eines der Ansprüche 1 bis 13 mit MG von 32 bis 50 kDa, 30 bis 36 kDa, 45 bis 60 kDa gewonnen wurden.

17. Monoklonale Antikörper, wie sie durch Fusion von myelomatösen Zellen mit Lymphozyten besonders der Milz oder Ganglien eines zuvor durch Injektion von Polypeptiden nach Anspruch 14 oder 15 immunisierten Tiers erhalten werden, Screening der Überstände der erhaltenen Hybridome, beispielsweise gemäß der E. L. I. S. A.- oder I. F. I.-Technik, um die spezifisch gegen eine parasitäre Form einer Spezies gerichteten Antikörper nachzuweisen, und Hybridomstämme, welche diese monoklonalen Antikörper sekretieren.

18. Monoklonale Antikörper, die bei der Maus gegen die Exkretions/Sekretions-Peptide von Amastigoten von *L. infantum*, *L. amazonensis* oder *T. cruzi* nach Anspruch 15 gebildet werden.

19. Verwendung als experimentelles Modell von parasitären Formen von Leishmanien und *T. cruzi*, die im infizierten Wirt vorhanden sind, besonders für das *in vitro*-Screening von Medikamenten und zum Testen der Empfindlichkeit gegen Medikamente, wobei das Screeningverfahren vorteilhafterweise umfaßt:

– das Inkontaktbringen von parasitären Formen, wie sie nach dem Verfahren eines der Ansprüche 1 bis 13 kultiviert wurden, mit den zu testenden Produkten;  
– den Einbau von Nukleotiden oder Aminosäuren, die mit einer radioaktiven Gruppe, beispielsweise tritiumhaltigem Thymidin markiert sind, zum Bestimmen der Aktivität der zu testenden Produkte oder zur Realisierung von Brauchbarkeitstests.

20. Kit zum Screenen von Produkten, die zur Behandlung von Parasitosen, besonders Leishmanien oder der Chagas-Krankheit verwendbar sein könnten, dadurch gekennzeichnet, daß er aufweist:

– einen Träger, wie eine Mehrlochplatte, welche parasitäre Formen umfaßt, wie sie nach dem Verfahren eines der Ansprüche 1 bis 13 erhalten werden,  
– Reagenzien, um die Arzneimittelaktivität der getesteten Produkte an den parasitären Formen zu bestimmen.

21. Methode zum Nachweis *in vitro* einer Parasitose, besonders einer Leishmaniose oder der Chagas-Krankheit beim Menschen oder Tier oder ihr Nachweis und ihre Identifizierung beim Vektor-Insekt, durch Nachweis zirkulierender Antikörper, dadurch gekennzeichnet, daß die Methode umfaßt:

– Inkontaktbringen einer von dem zu untersuchenden Menschen oder Tier stammenden biologischen Probe

mit einer parasitären Form, wie sie nach dem Verfahren eines der Ansprüche 1 bis 13 erhalten wurde, einem Exkretions/Sekretions-Polypeptid nach einem der Ansprüche 14 oder 15,  
– Nachweis des gegebenenfalls gebildeten Immunkomplexes.

22. Kit zum Nachweis in vitro von Parasitosen nach Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, daß er aufweist:

- die Antigen-Reagenzien in immobilisierter Form, daß heißt die parasitären Formen, wie sie nach einem der Ansprüche 1 bis 13 erhalten werden, die Exkretions/Sekretions-Polypeptide nach Anspruch 14 oder 15,
- eine positive Kontrolle, die aus einem Serum mit bekanntem Titer besteht,
- eine negative Kontrolle, sowie
- Puffer und Reagenzien, die für die Entwicklung der Immunreaktion brauchbar sind.

23. Methode zum Nachweis in vitro einer Parasitose beim Menschen oder Tier besonders einer Infektion durch Leishmanien oder *T. cruzi* durch Nachweis von zirkulierenden Antigenen, dadurch gekennzeichnet, daß sie umfaßt:

- das Inkontaktbringen einer von dem zu untersuchenden Menschen oder Tier stammenden biologischen Probe mit Antikörpern nach einem der Ansprüche 16 oder 18 oder Fragmenten dieser Antikörper, die auf einem nicht immunogenen Träger immobilisiert sind, unter Bedingungen, die zur Bildung eines Antigen-Antikörperkomplexes geeignet sind,
- den Nachweis der Bildung des Komplexes.

24. Kit zum Nachweis in vitro einer Parasitose nach Anspruch 23, dadurch gekennzeichnet, daß er umfaßt:

- eine feste Phase, die als Träger für die Immunreaktion geeignet ist, wie eine Mikrotitrationsplatte,
- ein Antikörper-Präparat nach einem der Ansprüche 16 bis 18 oder von Fragmenten dieser Antikörper, die auf einem Träger immobilisiert sind, mit gegebenenfalls
- einer positiven Kontrolle, die aus einem Serum mit bekanntem Titer besteht,
- eine negative Kontrolle, sowie
- Puffer und Reagenzien, die für die Realisierung der Immunreaktion brauchbar sind und besonders der markierte homologe Antikörper.

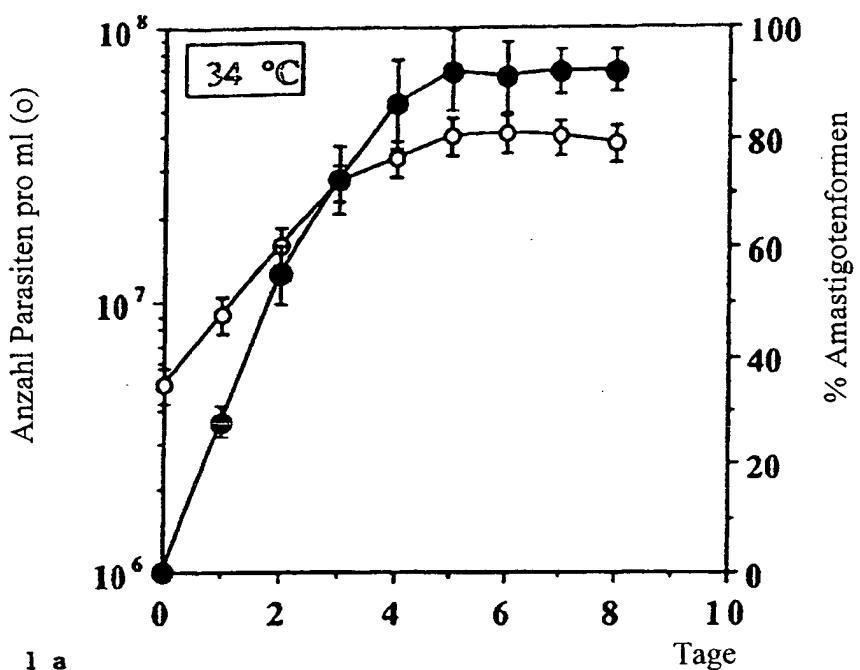
25. Vakzin-Zusammensetzungen gegen Parasitosen, besonders Infektionen durch Leishmanien oder *T. cruzi*, dadurch gekennzeichnet, daß sie hergestellt sind ausgehend von Exkretions/Sekretions-Polypeptiden nach Anspruch 14 oder 15, Promastigoten-Formen, wie sie nach dem Verfahren eines der Ansprüche 1, 8 bis 10 erhalten werden, Amastigoten-Formen, wie sie nach dem Verfahren eines der Ansprüche 1 bis 9 und 11 oder 12 erhalten werden, in Kombination mit einem Vehikel und/oder einem Verabreichungshilfsstoff.

26. Vakzin-Zusammensetzungen nach Anspruch 25, dadurch gekennzeichnet, daß sie hergestellt sind ausgehend von Amastigoten von *L. infantum* oder *L. chagasi*.

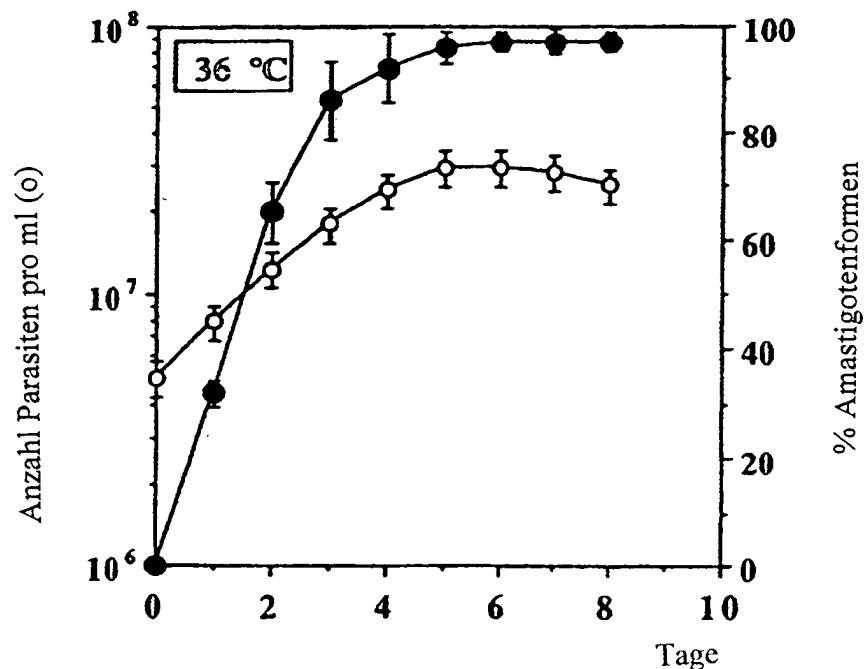
27. Vakzin-Zusammensetzungen nach Anspruch 25 oder 26 für immunprophylaktische oder immuntherapeutische Zwecke.

Es folgen 12 Blatt Zeichnungen

## Anhängende Zeichnungen



Figur 1 a



Figur 1 b

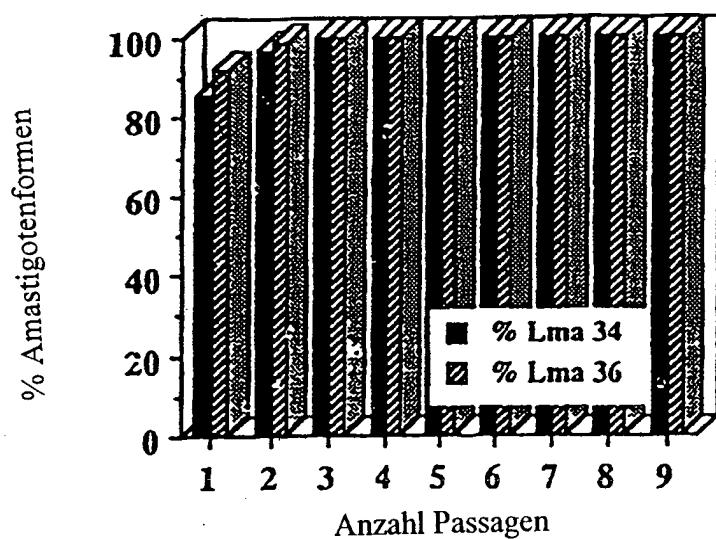


Figure 2

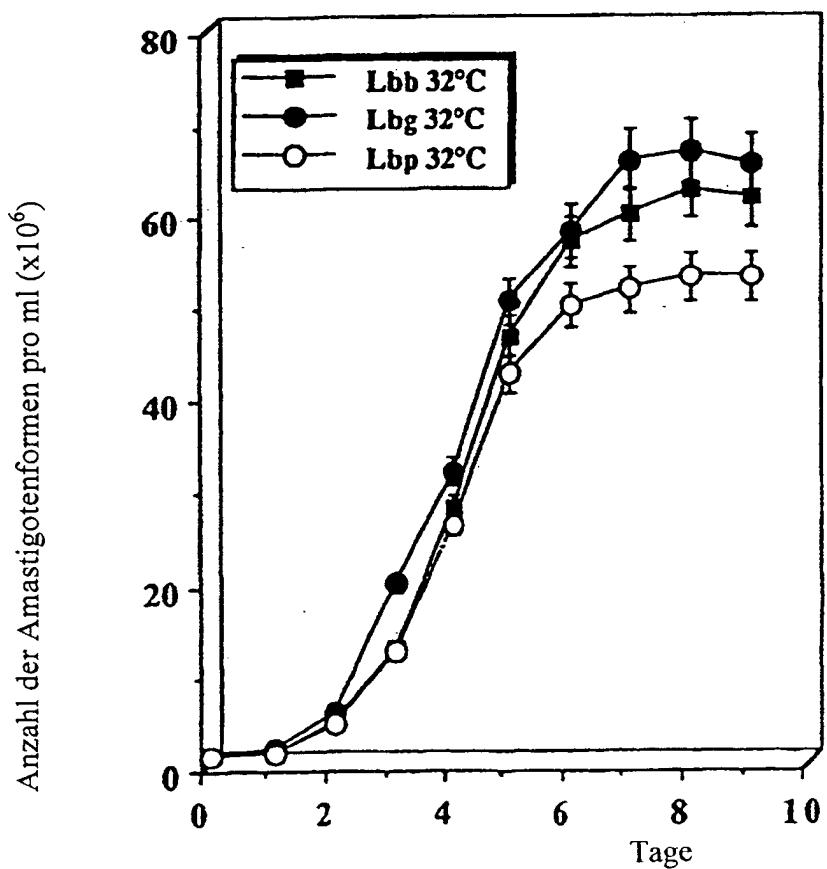


Figure 3 a

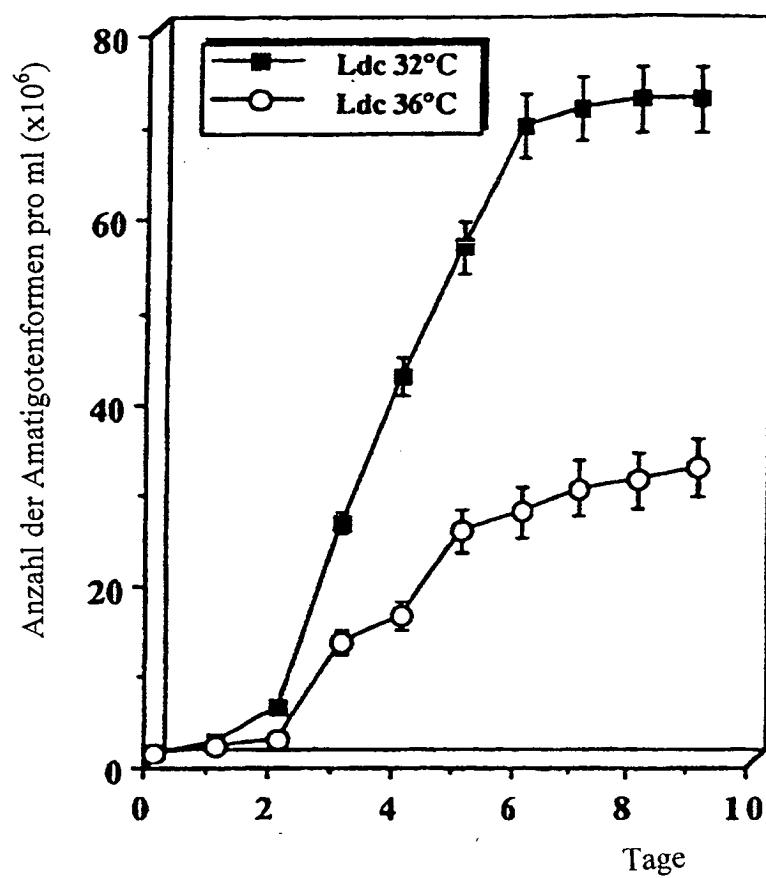
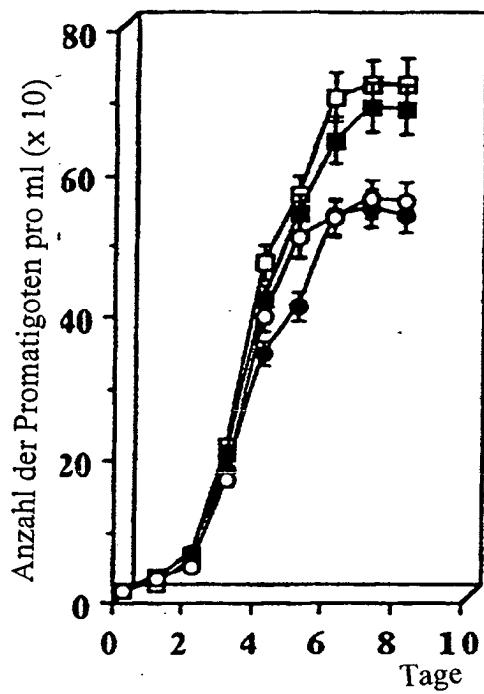
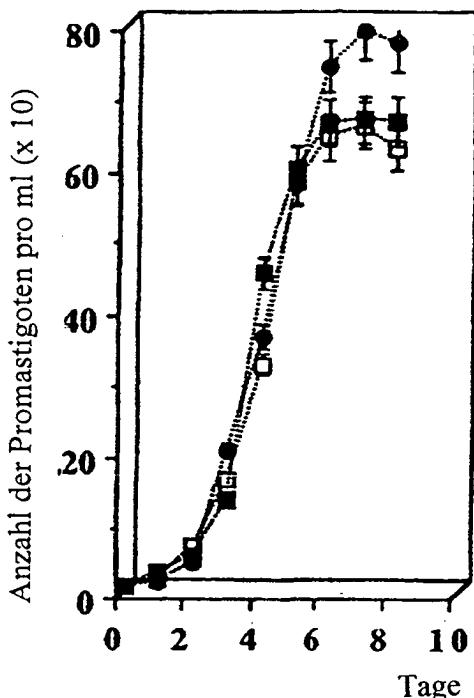


Figure. 3 b

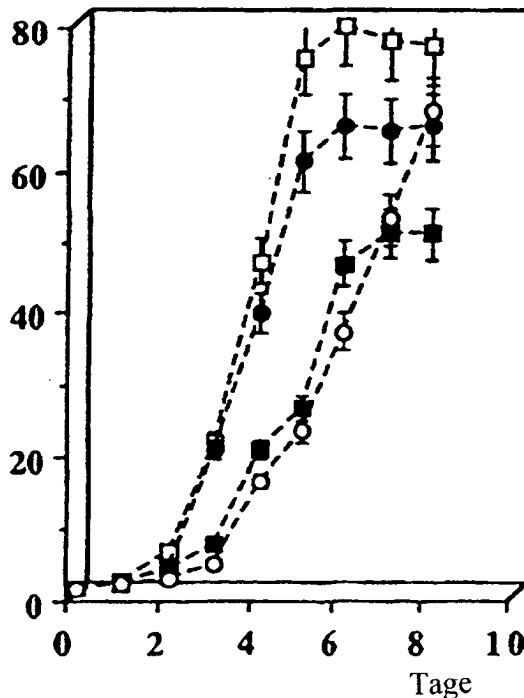
Figur 4 a



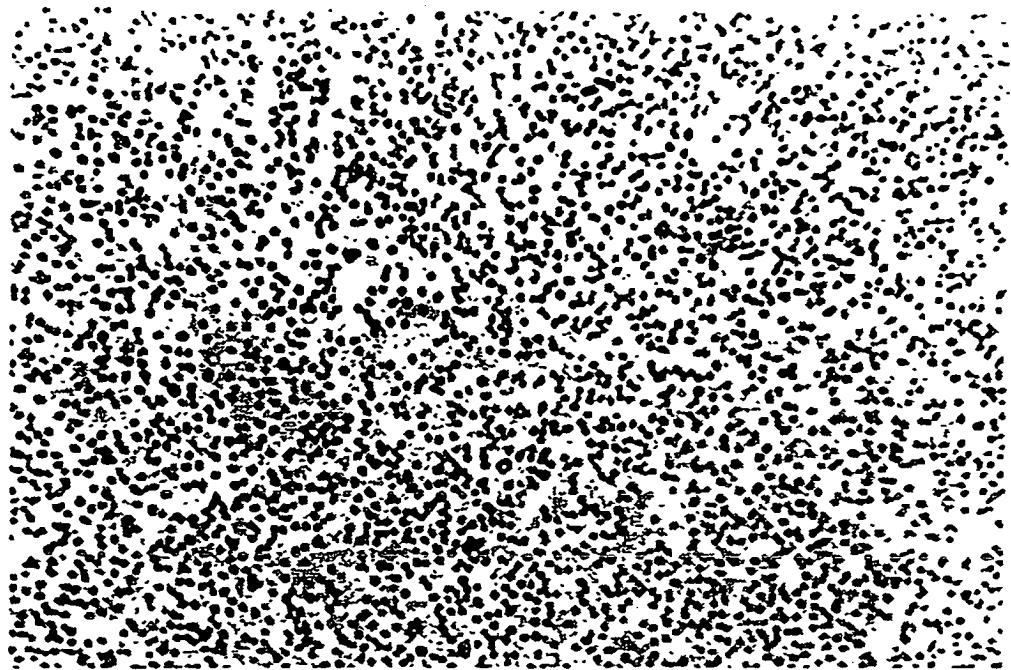
Figur 4 b



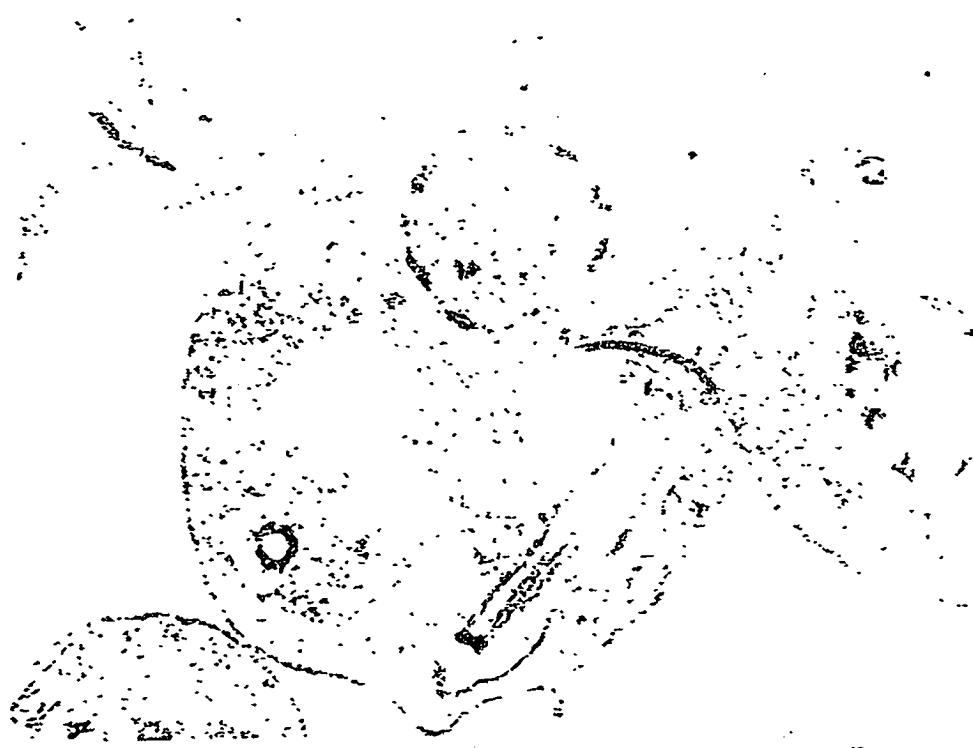
Anzahl der Promastigoten pro ml (x 10)



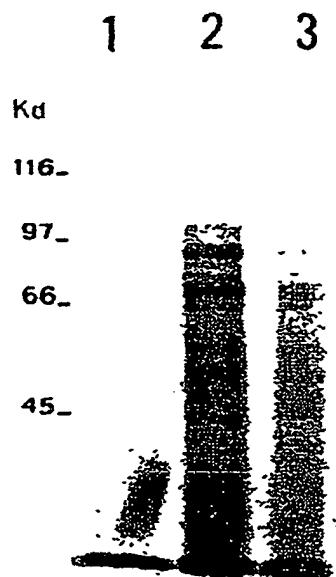
Figur 4 c



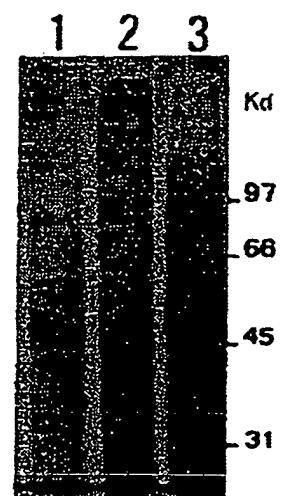
Figur 5 a



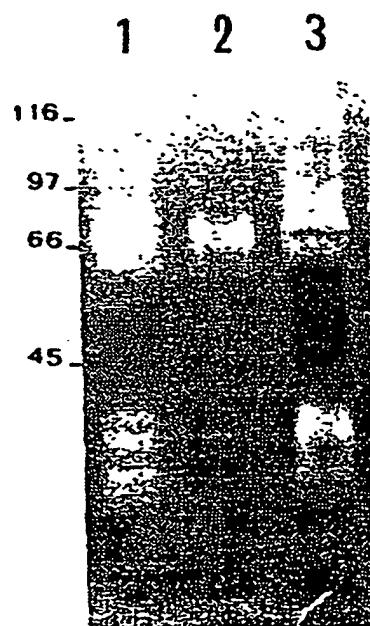
Figur 5 b



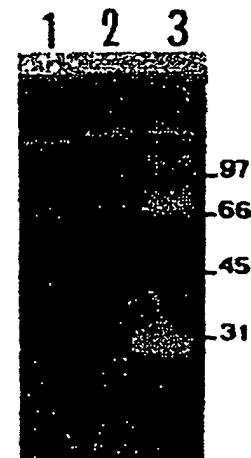
Figur 6 a



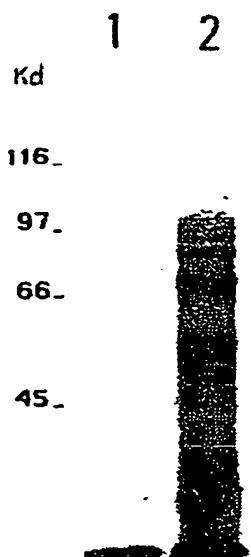
Figur 6 b



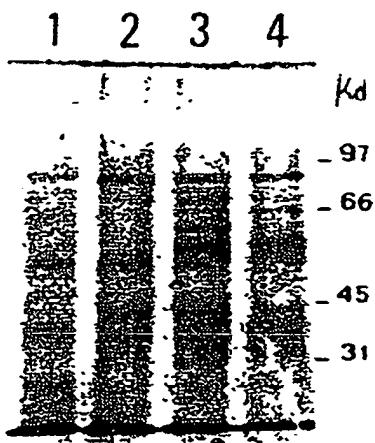
Figur 6 c



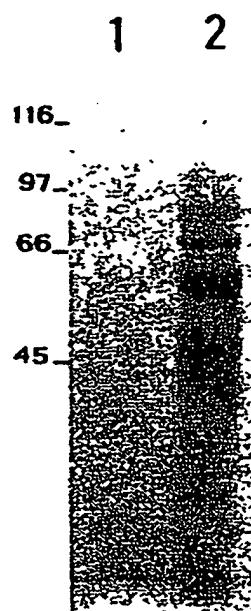
Figur 6 d



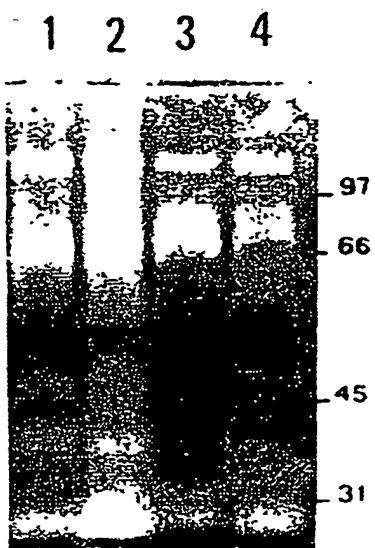
Figur 7 a



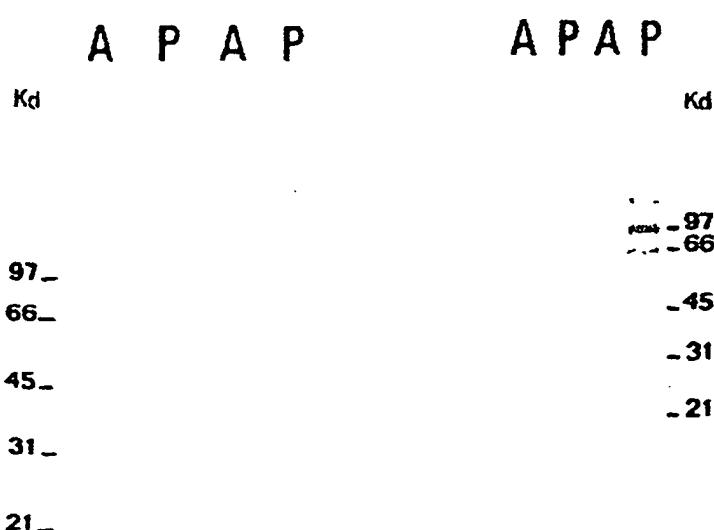
Figur 7 b



Figur 7 c

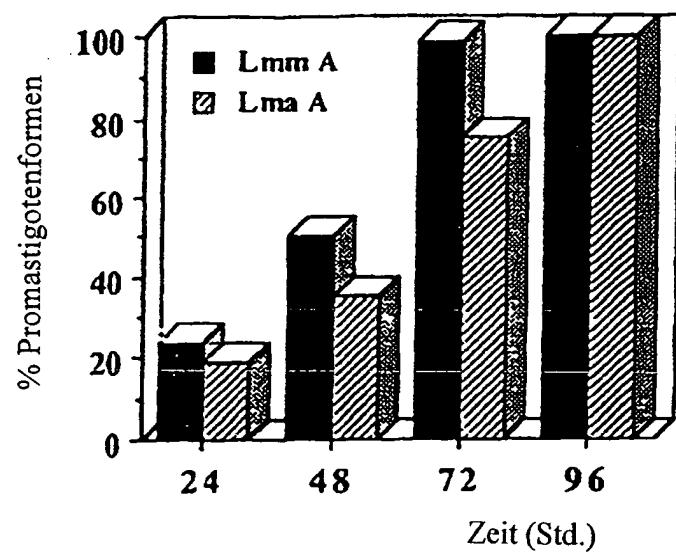


Figur 7 d

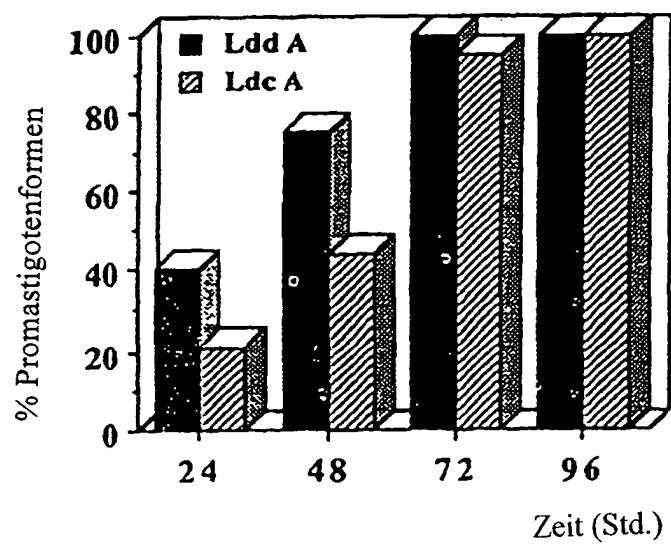


Figur 8 a

Figur 8 b



Figur 9



Figur 10

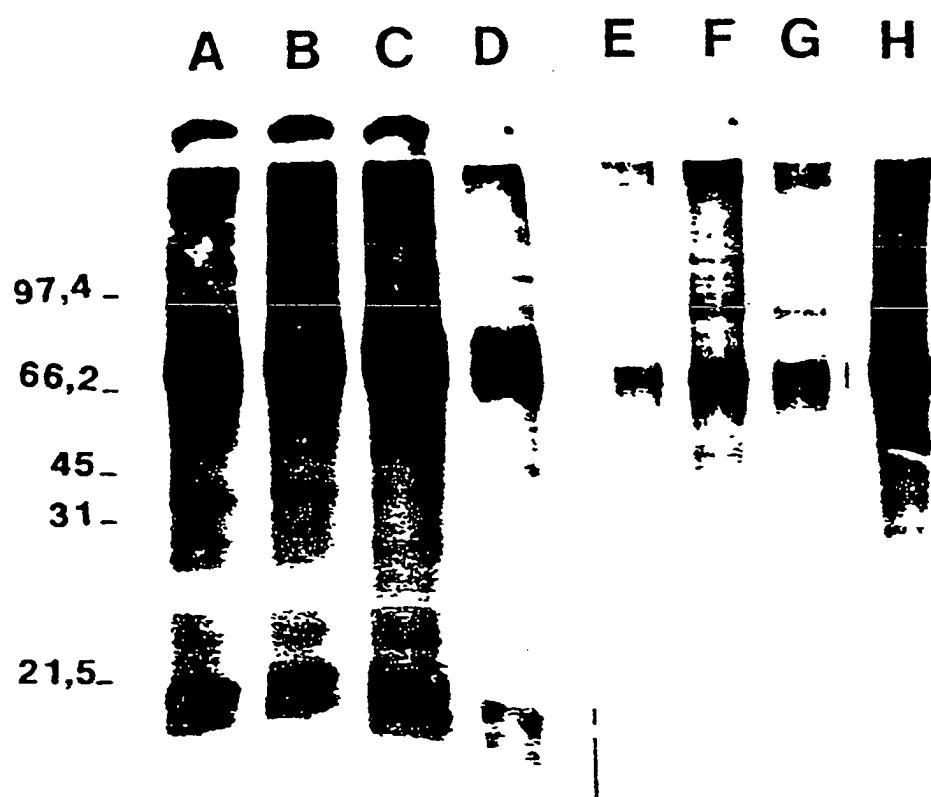
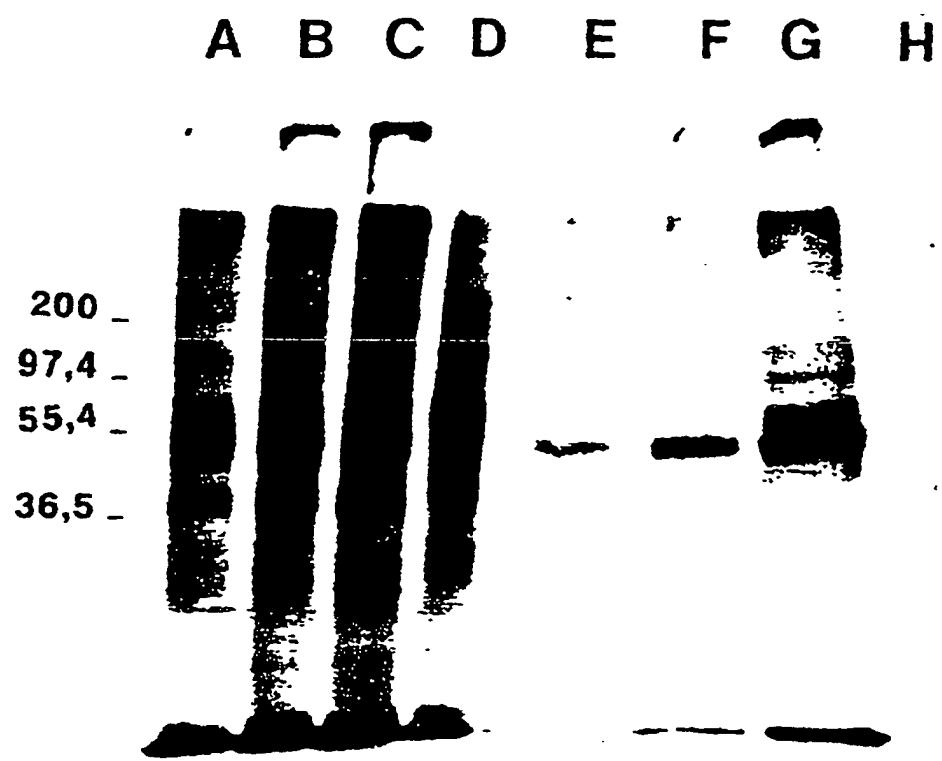
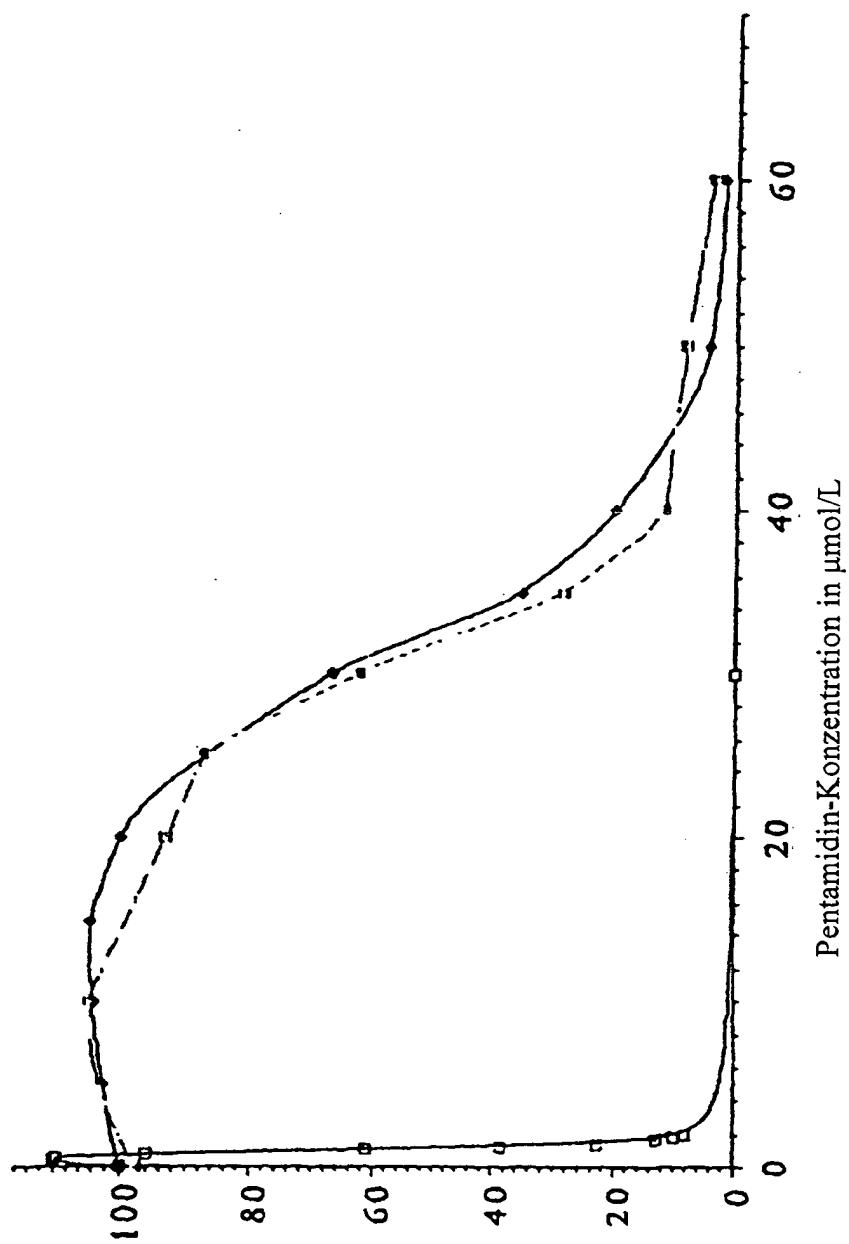


Figure 11



Figur 12



Prozent Wachstum bezogen auf eine Blindprobe ohne Arzneimittel

Figure 13