

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 383 324**

51 Int. Cl.:
C12N 15/863 (2006.01)
A61K 39/008 (2006.01)
A61P 33/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **06778475 .1**
96 Fecha de presentación: **28.07.2006**
97 Número de publicación de la solicitud: **1916306**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **30.04.2008**

54 Título: **Vectores recombinantes basados en el virus Vaccinia modificado de Ankara (MVA) como vacunas contra la leishmaniasis**

30 Prioridad:
30.07.2005 ES 200501886

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
20.06.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
20.06.2012

73 Titular/es:
**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS
CALLE SERRANO, 117
28006 MADRID, ES**

72 Inventor/es:
**PÉREZ JIMÉNEZ, Eva;
LARRAGA RODRÍGUEZ DE VERA, Vicente Emilio
y
ESTEBAN RODRÍGUEZ, Mariano**

74 Agente/Representante:
de Elzaburu Márquez, Alberto

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

ES 2 383 324 T3

DESCRIPCIÓN

Vectores recombinantes basados en el virus Vaccinia modificado de Ankara (MVA) como vacunas contra la leishmaniasis

Campo de la invención

La presente invención se refiere a virus recombinantes basados en el virus vaccinia modificado de Ankara (MVA). Más concretamente, la invención se refiere a virus recombinantes derivados del MVA que actúan como sistemas de expresión de la proteína LACK o de fragmentos inmunogénicos de la misma y a su uso en la vacunación frente a la leishmaniasis tanto de seres humanos como de otros mamíferos afectados, como los perros.

Estado de la Técnica

La leishmaniasis es una antroponosis que abarca un complejo grupo de cuadros clínicos producidos por protozoos del género *Leishmania*, los cuales parasitan células del sistema monocito-macrófago. *Leishmania* es un protozoo flagelado que pertenece al orden *Kinetoplastida* y a la familia *Trypanosomatidae*. La clasificación del género *Leishmania* en sus diferentes especies es compleja y en la actualidad se realiza mediante el análisis de los fragmentos de restricción del ADN del Kinetoplasto. Es la siguiente:

ORDEN: Kinetoplastida

FAMILIA: Trypanosomatidae

GÉNERO: Leishmania

SUBGÉNERO: Leishmania

Complejo: L. donovani

L. donovani; *L. infantum*; *L. chagasi*; *L. archibaldi*

Especies fuera del complejo L. donovani

L. tropica; *L. aethiopica*; *L. major*; *L. gerbilli*

Complejo: L. mexicana

L. mexicana; *L. amazonensis*; *L. venezuelensis*; *L. aristidesi*

SUBGÉNERO: Viannia

Complejo: L. braziliensis

L. braziliensis; *L. panamensis*; *L. guyanensis*; *L. peruviana*

El ciclo vital se desarrolla en dos huéspedes, uno vertebrado (mamífero) y un vector invertebrado (mosquito hembra de la familia *Phlebotomidae*, un díptero del género *Phlebotomus* en el Viejo Mundo y *Lutzomyia* en el Nuevo Mundo también conocido como beatilla de las arenas). En el huésped vertebrado, *Leishmania* es un parásito intracelular obligado que se encuentra en los macrófagos en forma de amastigote. Los amastigotes son formas redondeadas con unas dimensiones de 3-5 µm x 2-3 µm, con flagelos rudimentarios que no sobresalen del soma y que se reproducen por fisión binaria. Los amastigotes pasan al insecto, con la picadura al ingerir sangre de un mamífero parasitado. En la bolsa peritrofica del intestino medio del insecto, los amastigotes se transforman en promastigotes, forma móvil y alargada con un único flagelo en su polo anterior, que se multiplican activamente en el intestino medio del mosquito. Al cabo de 15-20 días de su ingestión comienzan a desprenderse de las cutículas intestinales invadiendo la hipofaringe. Por la picadura a un nuevo huésped, el insecto inocula los promastigotes, denominados metacíclicos, quienes una vez en el interior del huésped vertebrado serán fagocitados por las células del sistema monocito-macrófago, donde se transformarán y multiplicarán como amastigotes.

Las manifestaciones clínicas de la enfermedad varían dependiendo de la respuesta inmune del hospedador, la cepa y la virulencia del parásito, observándose desde lesiones cutáneas que curan espontáneamente, hasta una forma visceral de la enfermedad que puede conducir a la muerte en caso de no recibir tratamiento.

La leishmaniasis cutánea, típicamente, es causada por *Leishmania tropica*, *Leishmania major* y *Leishmania aethiopica* (especies del "Viejo Mundo") y por *Leishmania mexicana*, *Leishmania amazonensis*, *Leishmania braziliensis*, *Leishmania panamensis*, *Leishmania guyanensis*, *Leishmania peruviana*, *Leishmania chagasi* y otras especies en el Nuevo Mundo. Se presenta, con frecuencia, en forma de úlceras superficiales con bordes elevados, que surgen por lo común en zonas localizadas o expuestas de la cara y las extremidades y que pueden acompañarse de lesiones cutáneas y adenopatía regional. Las manifestaciones clínicas de la leishmaniasis cutánea en el Viejo y en el Nuevo Mundo son similares. Se necesita que transcurran años para la resolución espontánea de las lesiones y suele quedar una cicatriz plana atrófica.

La leishmaniasis visceral, conocida también como Kala-azar o fiebre Dum-Dum, es causada por las especies *L. donovani*, *L. chagasi* y *L. infantum*. Su sintomatología característica en humanos consiste en cefaleas, fiebre a

intervalos, astenia, diarrea, dolores abdominales, cólicos, adenopatías, hepatomegalia, esplenomegalia, anemia, leucopenia, trombocitopenia, lesiones oculares, crecimiento excesivo de uñas y pestañas así como la aparición de infecciones oportunistas. En España y Sudoeste de Europa la leishmaniasis es una zoonosis, siendo los perros su reservorio principal. Estudios epidemiológicos revelan que hasta el 80% de los perros en zonas endémicas están infectados (3, 31), de los cuales el 50% desarrolla la forma visceral de la enfermedad (3, 17).

La especie tradicionalmente conocida como causante de la leishmaniasis visceral en la zona mediterránea es *Leishmania infantum*. Sin embargo, su distribución se extiende hacia el este de Europa y países asiáticos. En la actualidad se considera como sinónimo de *Leishmania chagasi* (22), por lo que su distribución se ampliaría hasta América latina y posiblemente hasta la zona sur de Estados Unidos (10).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha estimado que la prevalencia mundial de la enfermedad en humanos alcanza los 12 millones de personas, con una incidencia anual de 1,5 a 2 millones de nuevos casos de leishmaniasis cutánea y 500000 nuevos casos de leishmaniasis visceral (WHO 2000). Existe además una elevada incidencia de la enfermedad en pacientes de SIDA, ya que la infección con HIV incrementa el riesgo de desarrollar leishmaniasis de 100 a 1000 veces (21), lo que provoca una elevada mortalidad. La OMS estima que entre el 2 y el 9% de todos los pacientes de SIDA en la zona sur de Europa desarrollarán leishmaniasis visceral (WHO 1995). Aunque existen fármacos que pueden utilizarse para tratar la enfermedad, las variantes del parásito en casos de leishmaniasis visceral y cutánea que son resistentes a esos fármacos son cada vez más comunes, por lo que es importante el desarrollo de estrategias alternativas para la lucha contra esta enfermedad como puedan ser el desarrollo de vacunas. El hecho de que pacientes que se han recuperado de una infección natural desarrollan una fuerte respuesta inmune frente a *Leishmania* sugiere la posibilidad del desarrollo de una vacuna contra este complejo parásito (19).

Diferentes antígenos han sido utilizados, confiriendo distintos grados de protección. Un estudio reciente en el que se comparan diferentes candidatos en forma de ADN ha demostrado que el gen de la proteína LACK es el más prometedor (1). El antígeno LACK (*Leishmania* homolog for receptors for Activated C Kinase) es una proteína de 36 kDa de peso molecular, altamente conservada entre las diferentes especies de *Leishmania*, y que se expresa tanto en el promastigote como en el amastigote. La proteína LACK es una diana preferencial de la respuesta temprana anti-parasitaria, de forma que dirige la expansión de células secretoras de IL-4 que conducen a la enfermedad. Los estudios indican que la administración de vectores de ADN desnudo que codifican el antígeno LACK es capaz de proporcionar protección frente a *L. major* aunque, a pesar de su alta inmunogenicidad, no logran proteger frente a la leishmaniasis visceral (VL) murina cuando son inoculados por vía intradérmica o intravenosa (36), lo que podría interpretarse como indicación de que LACK podría no ser un antígeno útil para vacuna general contra la leishmaniasis basada en vectores de ADN desnudo.

Sin embargo, el sistema utilizado para hacer llegar la secuencia codificante del antígeno y la posibilidad de la presencia de éste en la célula puede ser un elemento crítico que determina la eficacia antigénica, por lo que LACK puede ser un antígeno útil cuando su presencia en la célula viene determinada por la inclusión de su secuencia codificante en un vector que posibilite su expresión que no sea ADN desnudo. Los vectores basados en virus Vaccinia han demostrado ser un buen sistema de aporte de antígenos para el control de enfermedades infecciosas en estudios con modelos animales (37) y, en particular, han demostrado gran capacidad para aumentar la respuesta inmune celular específica cuando a los animales se les administra una primera dosis de inmunización (*priming*) que contiene diversos vectores recombinantes (ej. ADN desnudo, proteínas, seudopartículas, vectores virales distintos al virus vaccinia) seguida posteriormente de una segunda dosis de refuerzo (*booster*) con un Virus Vaccinia recombinante, expresando los vectores de la primera y de la segunda dosis el mismo antígeno (18, 35). Los protocolos que combinan los vectores Vaccinia recombinantes en la segunda dosis con la administración de vectores recombinantes de ADN desnudo en la primera dosis (5, 8, 12-15, 20, 28, 30, 33) están permitiendo lograr resultados esperanzadores en distintos modelos animales, obteniéndose protección que se correlaciona con la activación de una respuesta inmune celular, especialmente la activación de células T CD8+ secretoras de IFN- γ . La inmunización con ADN promueve la respuesta inmune tanto humoral como celular, confiriendo protección en modelos experimentales (34). Este método ofrece la posibilidad de manipular la respuesta inmune inducida con la coadministración de adyuvantes, como puedan ser citoquinas, para aumentar la eficacia de la vacunación (11, 16).

Un ejemplo de la utilización de estas estrategias en las que se combinan citoquinas con virus recombinantes derivados de Vaccinia lo constituye la solicitud de patente española ES2171360, en la que se describe la utilización de un virus recombinante derivado de la cepa de tipo salvaje Western Reserve (WR) de Vaccinia, que incorpora la secuencia codificante de la proteína LACK bajo el control del promotor p7.5 del virus, realizándose pruebas de administración a ratones tanto de distintas dosis de este vector como combinándolo con otro que contenía, además de la secuencia de LACK, la secuencia codificante de la citoquina IL-12 bajo el control del promotor pE/L. Por su parte, en la solicitud de adición a la patente española anterior, ES2172482, se describe la administración a perros del primero de los recombinantes, el que incorpora únicamente la secuencia codificante de LACK, en la segunda dosis de vacunación que forma parte de un protocolo de inmunización en el que se administra en la primera dosis un ADN desnudo recombinante que contiene igualmente la secuencia codificante de la proteína LACK. Tanto en la primera solicitud citada como en la adición a la misma, se propone la utilización de los vectores recombinantes derivados de la cepa virulenta (WR, Western Reserve) del virus Vaccinia tipo salvaje como vacunas para animales,

admitiendo la necesidad de desarrollar vectores más seguros para poder ser utilizados para la vacunación de seres humanos proponiendo al virus MVA como candidato para ser utilizado para la generación de vectores recombinantes de vacunación adecuados para la utilización en seres humanos. Hasta ahora, sin embargo, seguía sin haberse generado un vector recombinante análogo basado en MVA con capacidad para generar protección frente a *Leishmania* y cuya estabilidad permitieran plantearse su uso como vacuna frente a la leishmaniasis en seres humanos.

El MVA (*Modified Vaccinia Ankara Virus*) es una forma atenuada de Vaccinia derivada de la estirpe Ankara obtenida mediante más de 500 pases en fibroblastos embrionarios de pollo, que ha sido utilizada en unos 120000 individuos caucásicos sin efectos adversos (23). Durante la atenuación se ha delecionado el 15% del genoma parental (25), incluyendo genes implicados en la inmunorregulación (4) y el rango de hospedadores (2, 25). Este virus es incapaz de replicarse en líneas celulares y en cultivos primarios humanos (6). Sin embargo, no se produce alteración en los niveles de expresión de las proteínas virales o recombinantes (32). Su baja virulencia y su buena capacidad para desencadenar respuestas celulares (27) lo convierten en un buen candidato para ser utilizado para la generación de formas recombinantes que permitan la expresión de antígenos contra los cuales se quiera desencadenar una respuesta inmune.

Por ello, en la presente invención se decidió elegir este virus como base para conseguir crear un recombinante capaz de expresar una secuencia codificante de la proteína LACK de *L. infantum* o de un fragmento inmunogénico de la misma. Sin embargo, a diferencia de los vectores recombinantes basados en la cepa WR descritos en la solicitud ES2171360 y en la adición a la misma ES2172482, en la realización descrita de la invención se ha elegido para la inserción de la secuencia codificante de LACK el *locus* de hemaglutinina (HA) en lugar del *locus* de timidina quinasa (TK), pues la inactivación del gen de la hemaglutinina en el vector MVA facilita el proceso de fusión célula-célula (38), lo que aumenta la presentación antigénica después de una inoculación por vía intramuscular o intradérmica. Además, en dicha realización se ha elegido como promotor que regula la expresión de la secuencia el promotor sintético temprano/tardío pE/L (*early/late*) (39), en lugar del promotor p7.5 que se utiliza en los vectores descritos en las citadas solicitudes, lo que asegura la síntesis continuada del antígeno durante el proceso de infección y da lugar a altos niveles de producción del mismo, facilitándose la generación de una respuesta inmune contra dicho antígeno. También a diferencia de la anterior invención, la infección con MVA produce una menor destrucción celular que la infección con la cepa salvaje WR, aumentando la presentación antigénica. Con todo ello se ha conseguido un vector que da lugar a una mayor estimulación inmunológica, una buena protección frente a la leishmaniasis con respecto a los vectores conocidos en el estado de la técnica utilizados frente a dicha enfermedad. Es más, a diferencia de otros vectores basados en MVA conocidos en la técnica que se han intentado utilizar para la vacunación de seres humanos frente a otras enfermedades, el vector de la invención ha demostrado ser estable y mantener el inserto que contiene tras someterlo a sucesivos pases. Estas características y los resultados de respuesta inmune y protección frente a *Leishmania* obtenidos en las pruebas realizadas en el modelo murino demuestran que se ha conseguido un vector adecuado para ser considerado para la vacunación de seres humanos frente a *Leishmania*, en especial si se administra en la dosis de refuerzo de un protocolo de vacunación en el que se administra, en la primera dosis de desencadenamiento de la respuesta inmune un vector recombinante diferente, a partir del cual puede expresarse el mismo antígeno, como puede ser un ADN desnudo.

Descripción de la invención

La invención proporciona un vector recombinante del virus MVA que comprende una secuencia codificante de la proteína LACK, caracterizado porque la secuencia codificante de la proteína LACK está contenida en un fragmento de ADN que está insertado en el *locus* de hemaglutinina del genoma de MVA entre las regiones flanqueantes derecha e izquierda del gen de la hemaglutinina (HA), fragmento de ADN en el cual hay un promotor sintético temprano/tardío pE/L que está unido a la secuencia codificante de la proteína LACK de forma que el promotor dirige la expresión de dicha secuencia codificante para dar lugar a la proteína LACK.

La secuencia codificante de LACK presente en el vector recombinante de la invención puede codificar la proteína completa o un fragmento inmunogénico de la misma. Con el término "fragmento inmunogénico" se hace referencia a un fragmento de la proteína que comprende, al menos, un 20% o, preferentemente, al menos un 50% de la secuencia de aminoácidos de la proteína y que es capaz de desencadenar una respuesta inmune contra la misma. En la realización concreta de la invención cuya construcción se describe con detalle, la secuencia codificante presente en el vector recombinante de la invención codifica la proteína LACK completa de *Leishmania infantum*, cuya clonación y caracterización ha sido descrita por González-Aseguinolaza *et al.* (7). El gen de LACK fue cedido por el coordinador de dicho grupo, el Dr. Vicente Larraga del Centro de Investigaciones Biológicas de Madrid.

La invención se refiere también a composiciones que comprenden al menos un vector recombinante de la invención y, opcionalmente, al menos un adyuvante o vehículo farmacéuticamente aceptable. Los adyuvantes y vehículos farmacéuticamente aceptables que pueden utilizarse para formar parte de una composición que comprende al menos un vector recombinante de la invención son los adyuvantes y vehículos conocidos por los técnicos en la materia, que se elegirán de acuerdo con la vía de administración que se pretenda utilizar de forma que se obtenga una composición adecuada para ser suministrada por dicha vía. En realizaciones particulares de la invención, la vía de administración se elige entre la vía intraperitoneal, la vía intradérmica o la vía intramuscular, prefiriéndose

especialmente la vía intramuscular. En esos casos, se tiene preferencia por las composiciones en forma de solución o de suspensión acuosa, por lo que la composición contendría un diluyente farmacéuticamente aceptable tal como solución salina, solución salina tamponada con fosfato (PBS) o cualquier otro diluyente farmacéuticamente aceptable.

El vector de la invención es un vector seguro y estable, que da lugar a una potente respuesta inmune celular contra el antígeno LACK y que, como se muestra posteriormente en los Ejemplos, es capaz de inducir protección en el modelo murino frente a leishmaniasis. Es por ello que otro aspecto de la invención lo constituye el uso del vector de la invención para la fabricación de un medicamento destinado a proteger de la leishmaniasis a un mamífero susceptible de desarrollarla. Cuando se realizaron estudios para evaluar la protección generada frente a *Leishmania infantum*, la utilización del vector de la invención en protocolos de inmunización en los que se administra en la primera dosis un ADN desnudo recombinante que expresa también la proteína LACK, formando parte el vector de la invención de la segunda dosis de refuerzo, dio lugar a una protección similar a la que se observa cuando el virus que se utiliza en la dosis de refuerzo es un virus recombinante que expresa también la proteína LACK, derivado de la estirpe Western Reserve de Vaccinia, mientras que en los ensayos en los que se evalúa la protección generada frente a *Leishmania major* el vector de la invención da lugar a una protección superior en general a la generada por los virus recombinantes derivados de la estirpe Western Reserve y en particular superior a los virus recombinantes ya conocido en los que la secuencia codificante de LACK se encuentra inserta en el locus de TK. Es por ello que el medicamento puede utilizarse como protección frente a la leishmaniasis visceral o frente a la leishmaniasis cutánea. La seguridad del vector de la invención y los resultados de protección observados en el modelo murino, que se considera predictivo de las respuestas que pueden observarse al realizar pruebas en primates no humanos, hacen del vector de la invención un buen candidato para ser utilizado en seres humanos para la protección frente a la leishmaniasis, aunque es también una opción para ser administrado en combinación con o reemplazando a virus recombinantes derivados de la estirpe Western Reserve de Vaccinia que expresan también la proteína LACK, cuyo uso ha sido propuesto para la protección de otros animales como los perros.

La presente solicitud describe los métodos de vacunación en los que se administra el vector de la invención. Aunque la administración de una única dosis del vector de la invención permite observar una respuesta inmune celular, se tiene preferencia por los métodos en los que se administra más de una dosis, espaciadas en el tiempo. El hecho de que el virus de la invención, derivado de MVA, pueda inducir una baja respuesta frente a los antígenos propios de Vaccinia en comparación con virus recombinantes como los derivados de la estirpe Western Reserve, hace posible su utilización tanto en la primera dosis de iniciación de la respuesta inmune como en dosis posteriores de refuerzo. Se prefieren, sin embargo, los métodos de vacunación heterólogos en los que el virus de la invención se administra en la segunda y/o en dosis posteriores de refuerzo, mientras que en la primera dosis se administra otro vector recombinante diferente que, preferentemente, constituye también un sistema de expresión de la proteína LACK o de un fragmento inmunogénico de la misma. Se prefieren especialmente aquellos métodos de vacunación en los que el vector recombinante que se administra en la primera dosis es un ADN desnudo capaz de expresar la proteína LACK de *Leishmania infantum*, que han demostrado dar lugar a una buena protección en los ejemplos que se describen posteriormente. Un método de vacunación particularmente preferido es aquél en el que el vector de ADN recombinante utilizado es el plásmido al que se ha aludido en la memoria como DNA-LACK (pCI-neo-LACK), cuya combinación con el vector de la invención ha dado lugar a buenos resultados de protección frente a *Leishmania major* y frente a *Leishmania infantum*, aunque es posible la utilización de otros diversos plásmidos como, por ejemplo, pMOK. Otro posible método de vacunación es aquél en el que se añade, adicionalmente a los vectores de vacunación, un adyuvante, adyuvante que puede ser la proteína CD40L.

La invención se describirá ahora con más detalle a partir de las Figuras y Ejemplos que se describen a continuación.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 muestra un esquema de la construcción del vector pHLZ-LACK (parte inferior de la figura) a partir de los plásmidos pHLZ (parte superior izquierda) y pUC LACK (parte superior derecha).

La Figura 2 muestra, en su parte superior, un esquema del virus MVA-LACK y la localización de las zonas con las que se aparean los oligonucleótidos utilizados como cebadores en las PCR de análisis de los *locus* HA y TK (para identificación de los oligonucleótidos, ver Tabla 1). En la parte inferior se muestran fotografías de los geles obtenidos al realizar dicho análisis por PCR; la parte izquierda corresponde al análisis del *locus* HA y la parte derecha al análisis del *locus* TK. En ambos las calles corresponden a las siguientes muestras: +: pHLZ-LACK; 1: VV-LACK HA; 2: MVA-LACK; 3: VV-LACK TK; WR: estirpe Western Reserve.

La Figura 3 muestra las fotografías obtenidas tras la inmunotinción de placas generadas por infección de células CEF con el stock P4 de MVA-LACK, utilizando un anticuerpo policlonal anti-LACK (fotografía de la izquierda) o anti-WR (fotografía de la derecha).

La Figura 4 muestra el patrón de bandas obtenido al hacer reaccionar con un anticuerpo policlonal anti-LACK las bandas resultantes de fraccionar en un gel SDS-PAGE extractos celulares recogidos a los tiempos post-infección indicados sobre cada una de las calles. M: muestra tomada 48 horas después de haber simulado la infección. LACK-

HIS: muestra de control positivo obtenida a partir de una cepa de *E. coli* que expresa una proteína LACK que lleva una cola de histidina.

La Figura 5 muestra el número de células secretoras de IFN- γ detectados mediante ELISPOT por cada 10^6 esplenocitos de ratones Balb/c estimulados con los vectores indicados en abscisas, que son: VVp36: VV-LACK HA⁻; MVAp36: MVA-LACK; VVLuc: vector derivado de la cepa WR que contiene el gen de la luciferasa. P: primera dosis; B: dosis de refuerzo. La parte A corresponde a las células secretoras de IFN- γ específicas para la proteína LACK y la parte B a las células secretoras específicas para antígenos virales.

La Figura 6 muestra la concentración de IFN- γ , en ng/ml, detectada en el sobrenadante del cultivo de esplenocitos aislados de ratones inoculados con los vectores indicados en abscisas y reestimulados con la proteína LACK (primera barra, que aparece sombreada) o con un péptido inmunoestimulante de clase II (segunda barra, que aparece rellena en negro). Las denominaciones de los vectores corresponden a: VVp36: VV-LACK HA⁻; MVAp36: MVA-LACK; VVLuc: vector derivado de la cepa WR que contiene el gen de la luciferasa. P: primera dosis; B: dosis de refuerzo.

La Figura 7 muestra los valores de densidad óptica, medidos a 450 nm, obtenidos al realizar la detección de anticuerpos específicos para LACK en suero de ratones Balb/c diluidos 1/10, recogidos 8 días después de la segunda dosis de un protocolo de vacunación con dos dosis de inmunización, cada una de las cuales incluía los vectores que se indican en abscisas, indicando P el vector inoculado en la primera dosis y B el inoculado en la dosis de refuerzo. Las denominaciones de los vectores corresponden a: VVp36: VV-LACK HA⁻; MVAp36: MVA-LACK; VVLuc: vector derivado de la cepa WR que contiene el gen de la luciferasa. La primera barra de cada protocolo de vacunación, marcada con líneas inclinadas, corresponde a los anticuerpos del isotipo IgG1; la segunda barra, rellena en negro, a los anticuerpos del isotipo IgG2a.

La Figura 8 muestra la estructura del plásmido pCI-neo-LACK (DNA-LACK).

La Figura 9 muestra el número de células secretoras de IFN- γ detectadas mediante ELISPOT por cada 10^6 esplenocitos de ratones Balb/c estimulados con los vectores indicados en abscisas. P: primera dosis; B: dosis de refuerzo. La parte A corresponde a las células secretoras de IFN- γ específicas para la proteína LACK y la parte B a las células secretoras específicas para antígenos virales.

La Figura 10 muestra el patrón de citoquinas secretado tras la reestimulación de esplenocitos aislados de ratones Balb/c inmunizados con combinaciones de vectores recombinantes, en las que el primer vector citado se administró en la primera dosis y el segundo vector en la segunda dosis. Tanto en la Figura 10a como en la Figura 10b, los gráficos de la parte superior de la figura corresponden a resultados obtenidos al reestimar los esplenocitos con la proteína LACK, mientras que los gráficos de la parte inferior corresponden a la reestimulación con un péptido inmunodominante de clase II (PEPT-II). Las combinaciones de vectores con las que se inmunizaron a los ratones son las que se indican junto a las barras, en las que DNA-CTRL: DNA de control carente de inserto con secuencia codificante de LACK. En ambas figuras, los gráficos situados en la parte izquierda muestran la concentración de citoquinas asociadas a respuestas tipo Th2 (IL-4) en el caso de la Figura 10a y tanto IL-4 (barras con relleno; escala sobre cada gráfico) como IL-10 (barras sin relleno; escala bajo cada gráfico) en el caso de la Figura 10b; los gráficos situados en la parte derecha muestran la concentración de citoquinas asociadas a respuestas tipo Th1 detectada en cada uno de los casos (IFN- γ sólo en el caso de la Figura 10a y tanto IFN- γ (barras con relleno; escala sobre cada gráfico) como TNF- α (barras sin relleno; escala sobre cada gráfico) en el caso de la Figura 10b. Los datos obtenidos tras la reestimulación de esplenocitos obtenidos de ratones inmunizados con la combinación de vectores DNA-LACK/VV-LACK TK- están presentes sólo en la Figura 10a, no habiéndose incluido en la Figura 10b.

La Figura 11 corresponde a la evaluación de la protección frente a un desafío de *L. major* a ratones Balb/c inmunizados con distintos protocolos de vacunación. La parte A superior muestra un gráfico en el que, en ordenadas, se indica el tamaño de la lesión, expresada en milímetros, detectada transcurridas las semanas que se indican en abscisas tras el desafío con promastigotes de *L. major* a ratones Balb/c inmunizados con DNA-LACK (100 microgramos) en la primera dosis y, en la segunda dosis con 1×10^7 ufp/ratón de: (◆): VV-LACK TK-; (■): VV-LACK HA-; (▲): MVA-LACK. Los puntos marcados con el símbolo (●) corresponden a datos de ratones a los que se les administró un ADN de control en la primera dosis y VV Luc HA- en la segunda. En la parte B se muestra el logaritmo en base 10 de la carga parasitaria correspondiente al mismo experimento, detectada en los ganglios poplíteos de los ratones Balb/c. De izquierda a derecha, la barra 1, corresponde a la mezcla de bazos de 8 ratones inmunizados con DNA-LACK/VV-LACK TK-; barra 3, mezcla de bazos de 8 ratones inmunizados con DNA-LACK/VV-LACK HA-; barras 3 a 10, cada barra representa un bazo de un ratón inmunizado con DNA-LACK/MVA-LACK HA-; barra 11, mezcla de bazos de 7 ratones inmunizados con DNA-control (plásmido vacío)/VV-Luc HA-.

La Figura 12 muestra, en la parte A, un gráfico en el que, en ordenadas, se indica el tamaño de la lesión, expresada en milímetros, detectada transcurridas las semanas que se indican en abscisas tras el desafío con promastigotes de *L. major* a ratones Balb/c inmunizados con: pMOK en la primera y en la segunda dosis (datos indicados con un círculo, ●); MIDGE-NLS en la primera dosis y VV-Luc en la segunda dosis (datos indicados con el símbolo *);

pMOCK-LACK en la primera dosis y MVA-LACK en la segunda dosis (datos indicados con el símbolo $\times$). En la parte B de la Figura se indica la carga parasitaria, expresada en número de parásito/mg, detectada en los mismos animales; la barra 1 corresponde a la inmunización con pMOCK-LACK y MVA-LACK, la barra 2 a la inmunización con MIDGE-NLS y VV-Luc y la barra 3 a la inmunización con pMOK en la primera y en la segunda dosis.

La Figura 13 muestra un gráfico en el que se indican, en ordenadas, el número de células secretoras de IL-2, específicas para la proteína LACK, detectadas por cada 10^6 esplenocitos de ratones Balb/c inmunizados con: DNA-LACK en la primera dosis y 1×10^7 ufp/ratón de MVA-LACK en la segunda dosis (primera barra); DNA-LACK en la primera dosis y 5×10^7 ufp/ratón de MVA-LACK en la segunda dosis (segunda barra); DNA-LACK en la primera dosis y 5×10^7 ufp/ratón de VV-LACK en la segunda dosis (tercera barra); DNA Control en la primera dosis y 5×10^7 ufp/ratón de VV-Luc en la segunda (cuarta barra); PBS tanto en la primera como en la segunda dosis (quinta barra).

La Figura 14 muestra un gráfico en el que, en ordenadas, se indica el tamaño de la lesión, expresada en milímetros, detectada transcurridas las semanas que se indican en abscisas tras el desafío con promastigotes (5×10^4) de *L. major* a ratones Balb/c inmunizados con DNA-LACK en la primera dosis y, en la segunda dosis con: ($\blacklozenge$): 1×10^7 ufp/ratón de MVA-LACK; ($\blacksquare$): 5×10^7 ufp/ratón de MVA-LACK; ($\blacktriangle$): 5×10^7 ufp/ratón de VV-LACK; ($\times$): 5×10^7 ufp/ratón de VV-Luc. Los puntos marcados con el símbolo (*) corresponden a datos de ratones a los que se les administró PBS tanto en la primera como en la segunda dosis.

La Figura 15 muestra fotografías tomadas de ratones sometidos a distintos protocolos de inmunización, transcurridas 8 semanas del desafío con *Leishmania major*. Los signos "+" indican las patas en las que se inocularon los promastigotes (5×10^4), mientras que los signos "-" corresponden a las patas que sirven como control, donde no se inocularon promastigotes. Las inmunizaciones se realizaron con: Panel A: DNA-LACK en la primera dosis y 1×10^7 ufp/ratón de MVA-LACK en la segunda dosis; panel B: DNA-LACK en la primera dosis y 5×10^7 ufp/ratón de MVA-LACK en la segunda dosis; panel C: DNA-LACK en la primera dosis y 5×10^7 ufp/ratón de VV-LACK en la segunda dosis; panel D: ADN de control en la primera dosis y 5×10^7 ufp/ratón de VV-Luc en la segunda dosis; Panel E: PBS tanto en la primera como en la segunda dosis (grupo N: *naive*).

La Figura 16 muestra gráficos que representan la carga de parásitos detectada en distintos órganos de ratones Balb/c, inmunizados con distintos tratamientos, detectadas un mes después de un desafío intradérmico de 1×10^7 promastigotes metacíclicos con *L. infantum*. Gráfico A: carga detectada en bazo; gráfico B: carga detectada en hígado; gráfico C: carga detectada en nódulo linfático drenante. En cada uno de ellos, las barras corresponden a los siguientes protocolos de vacunación: primera barra (sombreada), DNA-LACK en primera dosis y 1×10^7 ufp/ratón de VV-LACK en la segunda dosis; segunda barra (con retícula), DNA-LACK en la primera dosis y 5×10^7 ufp/ratón de VV-LACK en la segunda dosis; tercera barra (con líneas inclinadas), DNA-LACK en la primera dosis y 1×10^7 ufp/ratón de MVA-LACK en la segunda dosis; cuarta barra, DNA-LACK en la primera dosis y 5×10^7 ufp/ratón de MVA-LACK en la segunda dosis; quinta barra (rellena en negro), plásmido pCI-neo en la primera dosis y 5×10^7 ufp/ratón VV-Luc en la segunda dosis; última barra (con líneas verticales), PBS en ambas dosis. Los asteriscos sobre las barras indican la existencia de diferencias significativas estadísticamente entre los datos: ***: $p < 0,001$; **: $p < 0,01$; *: $p < 0,05$.

La Figura 17 muestra gráficos que corresponden a la respuesta inmune detectada en esplenocitos de ratones Balb/c sometidos a distintos tratamientos de inmunización, ratones a los que no se les había inoculado *L. infantum*. El gráfico A corresponde a los niveles de IFN- γ , en ng/ml, detectados en el sobrenadante de cultivos de esplenocitos reestimulados con la proteína LACK. El gráfico B corresponde al número de células productoras de IFN- γ específicas para LACK, detectadas mediante ELISPOT, por cada 10^6 esplenocitos. El gráfico C corresponde a los niveles de TNF α /LT, en ng/ml, detectados en el sobrenadante de cultivos de esplenocitos reestimulados con la proteína LACK. En cada uno de los gráficos, las barras corresponden a los siguientes protocolos de vacunación: primera barra, DNA-LACK en primera dosis y 10^7 ufp/ratón de VV-LACK en la segunda dosis; segunda barra, DNA-LACK en la primera dosis y 5×10^7 ufp/ratón de VV-LACK en la segunda dosis; tercera barra, DNA-LACK en la primera dosis y 1×10^7 ufp/ratón de MVA-LACK en la segunda dosis; cuarta barra, DNA-LACK en la primera dosis y 5×10^7 ufp/ratón de MVA-LACK en la segunda dosis; quinta barra, plásmido pCI-neo en la primera dosis y VV-Luc en la segunda dosis; última barra, PBS en ambas dosis.

La Figura 18 muestra sendas gráficas, referidas a la eficiencia de crecimiento del virus recombinante MVA-LACK, gráficas en las que se representa, en ordenadas, el logaritmo de la concentración de virus MVA-LACK (datos representados por cuadrados rellenos: $\blacksquare$) y del virus de tipo silvestre MVA-WT (datos representados por rombos: $\blacklozenge$) detectados o asociados a las células (Intracel: intracelular; gráfico superior: A) o en el medio de crecimiento celular (Extracel: extracelular; gráfico inferior: B) mediante inmunotinciones realizadas en células BHK-21 transcurridos los tiempos (t) post-infección (p.i.) indicados en horas (h) en el eje de abscisas.

La Figura 19 muestra las lesiones desarrolladas por ratones a los que se les inocularon promastigotes de *L. major*, en función del tratamiento previo de inmunización. La parte superior de la Figura, A, muestra una gráfica en la que se representa en ordenadas el tamaño de la lesión (Lesn.), en milímetros (mm) observadas en ratones, tras haber transcurrido el tiempo, expresado en semanas, que se indica en abscisas, desde el momento de la inoculación a los ratones de promastigotes de *L. major*; las combinaciones de vectores de inmunización administrados a cada grupo

de ratones previamente a la inoculación de *L. major* se indican sobre el gráfico. En la parte inferior, B, se muestran fotografías de las patas de los ratones sometidos a distintos protocolos de inmunización, trascurridas 9 semanas desde el desafío con *Leishmania major*, fotografías con la letra "I" situadas sobre las mismas indican las patas en las que se inocularon los promastigotes (5×10^4), mientras que las letras "N/I" indican las patas que sirven como control, donde no se inocularon promastigotes. Las abreviaturas de los grupos de inmunización corresponden a: DNA-LACK/MVA-LACK 1_10⁷: DNA-LACK en la primera dosis y 1×10^7 ufp/ratón de MVA-LACK en la segunda dosis; DNA-LACK/MVA-LACK 5_10⁷: DNA-LACK en la primera dosis y 5×10^7 ufp/ratón de MVA-LACK en la segunda dosis; DNA-LACK/VV-LACK-HA: DNA-LACK en la primera dosis y 5×10^7 ufp/ratón de VV-LACK en la segunda dosis; DNA-Control/VV-LUC-HA: plásmido de control carente de inserto codificante de LACK en la primera dosis y 5×10^7 ufp/ratón de VV-Luc en la segunda dosis; PBS/PBS: PBS tanto en la primera como en la segunda dosis.

La Figura 20 corresponde al ensayo para estudiar el incremento de protección conferido por la administración de un adyuvante, CD40L, a ratones Balb/c sometidos a distintos tratamientos de inmunización y a un desafío con promastigotes de *L. major*. En la parte superior, A, se muestra una representación esquemática del protocolo de inmunización seguido. En la parte intermedia, B, se muestra una gráfica en la que se representa en ordenadas el tamaño de la lesión (Lesn.), en milímetros (mm) observadas en los ratones, tras haber transcurrido el tiempo, expresado en semanas, que se indica en abscisas, desde el momento de la inoculación a los ratones de promastigotes de *L. major*; las abreviaturas G1 a G7 sobre cada una de las líneas de datos indica el grupo de ensayo al que se refieren (Grupo 1 a Grupo 7), los signos † indican los momentos en los que se sacrificaron ratones y la flecha marcada como B2 indica el momento en el que recibieron la tercera dosis de vector de inmunización (2ª dosis de refuerzo, "booster 2") los ratones de los grupos 1, 3 y 4. En la parte inferior de la Figura, marcada como C, se representan los tamaños de las lesiones, en milímetros, observadas en cada uno de los ratones supervivientes de los grupos 1, 2, 3, 4, 5 y 7, trascurridas 27 semanas desde el desafío; cada círculo representa a un ratón, correspondiendo la altura en la que se localiza cada círculo al tamaño de la lesión observada en él, estando indicado el grupo al que pertenece por el número indicado en abscisas. Los signos † junto a un círculo de la parte C indican que el ratón fue sacrificado antes de las 27 semanas. Los grupos corresponden a las siguientes combinaciones en la inmunización: Grupo 1 (G1): DNA-LACK/MVA-LACK/MVA-LACK; Grupo 2 (G2): DNA-LACK + MegaCD40L(1µg)/MVA-LACK + MegaCD40L(1µg); Grupo 3 (G3): DNA-LACK + MegaCD40L(10µg)/MVA-LACK + MegaCD40L(10µg)/MVA-LACK; Grupo 4 (G4): DNA-LACK + MegaCD40L(20µg)/MVA-LACK + MegaCD40L (20µg)/MVA-LACK + MegaCD40L (20µg); Grupo 5 (G5): DNA-Control/MVA-WT; Grupo 6 (G6): PBS/PBS; Grupo 7 (G7): PBS + MegaCD40L (10µg)/PBS + MegaCD40L (10µg).

Los gráficos mostrados en la Figura 21 representan la evolución con el tiempo de la concentración de los anticuerpos anti-SLA (antígeno soluble de *Leishmania*) tipo IgG1 (parte superior, A) o tipo IgG2 (parte superior, B) en perros Beagle a los que se les había inoculado promastigotes de *Leishmania infantum*. Para ello, en cada gráfico se indica, en ordenadas, el valor de la absorbancia correspondiente a la transformación del sustrato OPD producida por muestras de plasma de los perros sometidos a ELISA, n, valor que se expresa como tanto por 1 con respecto al valor obtenido en el día -30; en abscisas se indica el día de toma de la muestra, correspondiendo el día 0 a la inoculación de los promastigotes. Cada curva corresponde a un grupo de inmunización previa diferente: cuadrados rellenos ■: Control negativo (C-); triángulos rellenos ▲: Control positivo (C+); rombos rellenos ◆: grupo inmunizado con DNA-LACK/rVV-LACK previamente al desafío con promastigotes; asteriscos de seis puntas, *: grupo inmunizado con DNA-LACK/MVA-LACK previamente al desafío con promastigotes.

Ejemplos

Ejemplo 1.- Construcción y caracterización del virus recombinante MVA-LACK

1.1.- Construcción del vector plasmídico pHLZ-LACK

Para la construcción de un virus MVA recombinante que contiene una secuencia codificante de la proteína LACK de *L. infantum*, fue necesario un paso intermedio de construcción de un plásmido, pHLZ-LACK, que permitió la inserción de la secuencia codificante de la proteína LACK en el locus HA del genoma de MVA. Este plásmido contiene las regiones flanqueantes derecha e izquierda del gen de la hemaglutinina (HA), y el gen de resistencia a ampicilina. Entre las dos regiones flanqueantes del gen HA se encuentran dos promotores de Vaccinia en orientación opuesta: el promotor viral p7.5 que dirige la expresión del gen de β -gal, y el promotor sintético temprano/tardío (pE/L), que dirige la expresión del gen de la proteína LACK de *L. infantum*. Para su construcción se utilizaron otros dos plásmidos:

- **pUC LACK**: plásmido derivado del vector pUC19 que contiene el gen codificante de la proteína LACK de *L. infantum* en el sitio de corte EcoRI, además de los elementos necesarios para la replicación y selección en *E. coli*. Este vector fue generado por la Dra. Gloria González-Aseguinolaza a partir de un molde de ADN genómico de *L. infantum* mediante PCR. El producto de PCR tiene una longitud de 942 pares de bases (pb) y la región codificante 312 aminoácidos (7).

- **pHLZ:** (7400 pb). Plásmido generado en el laboratorio de los inventores que permite la inserción de genes en el genoma de *Vaccinia* por recombinación homóloga en la región codificadora de la HA. Tras la adición del sustrato de la β -galactosidasa, X-gal, el desarrollo de placas azules permite la selección de virus recombinantes.

5 A partir de estos dos plásmidos se generó el vector pHLZ-LACK de la siguiente manera:

Un fragmento de ADN de 942 pb que contiene la secuencia codificante de la proteína LACK de *L. infantum* se purificó a partir del plásmido pUC LACK. Para ello, el vector pUC LACK se digirió con la enzima de restricción *EcoRI*, y el fragmento correspondiente al gen LACK se purificó en geles de agarosa. Los extremos de dicho fragmento se hicieron romos por tratamiento con *Klenow* y se clonó en el plásmido de inserción en *Vaccinia* pHLZ (previamente digerido con *Sma I*, y defosforilado mediante la incubación con Fosfatasa Alcalina (CIP)), generándose de este modo el vector de inserción pHLZ-LACK (8342 pb) La selección de plásmidos recombinantes se realizó mediante análisis de la actividad β -gal.

15 La construcción de este vector de inserción pHLZ-LACK aparece esquematizada en la Figura 1.

1.2. Construcción del virus recombinante MVA-LACK

Células primarias procedentes de embriones de pollo (CEF: chicken embryo fibroblast) obtenidas de huevos SPF de 11 días de edad (INTERVET), fueron infectadas con MVA (concretamente con MVA-F6, pase 586, proporcionado por Gerd Sutter) a una multiplicidad de infección de 0,05 ufp/célula. Tras una hora de adsorción, se transfectaron las células con 5 μ g de ADN del plásmido pHLZ-LACK utilizando lipofectamina de acuerdo con las instrucciones del fabricante (INVITROGEN). 72 horas post-infección las células se recogieron en 1 ml de medio, se realizaron tres rondas de congelación/descongelación, se sonicó y se utilizó para la selección de virus recombinantes.

Los virus recombinantes que contenían el gen LACK de *L. infantum* y el gen β -gal fueron seleccionados mediante pases de purificación consecutivos en células CEF y tinción con 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -galactosidasa (300 μ g/ml). Tras 6 rondas de purificación se obtuvo el virus recombinante purificado, sin contaminación de virus MVA salvaje. El recombinante, llamado 3.111.2.1.1.2 (MVA pase 592) fue utilizado para preparar un segundo stock, P2, con título 3×10^7 ufp/ml. El stock P3 se preparó a partir de células CEF infectadas a una multiplicidad 0,05 ufp/célula y se purificó a través de dos colchones de sacarosa al 36%. El título de este stock es $0,975 \times 10^9$ ufp/ml. La secuenciación del inserto presente en su genoma dio lugar a la secuencia de nucleótidos que se muestra en SEQ ID NO:6.

1.3. Caracterización del virus MVA LACK

Para confirmar la homogeneidad y la integridad de los genes incluidos en el virus recombinante MVA-LACK se llevó a cabo un análisis por PCR. El ADN viral fue purificado a partir de células CEF infectadas con el virus MVA LACK (stock P2) a una multiplicidad de infección de 5 ufp/célula. Tras comprobar la integridad del ADN mediante análisis en gel de agarosa, se llevaron a cabo análisis de PCR para los *locus* de hemaglutinina y timidina quinasa, utilizando como cebadores los oligonucleótidos que se indican en la Tabla 1, cuya localización respecto a los *locus* de hemaglutinina y timidina quinasa se muestra en la parte superior de la Figura 2.

Tabla 1.- Cebadores de las PCR de análisis de los *locus* HA y TK

Oligonucleótidos	Secuencia
TK-L	5' TGATTAGTTTGATGCGATTC 3' (SEQ ID NO:1)
TK-R	5' TGTCTTGATACGGCAG 3' (SEQ ID NO:2)
HA-1	5' GTCACGTGTTACCACGCA 3' (SEQ ID NO:3)
HA-2	5' GATCCGCATCATCGGTGG 3' (SEQ ID NO:4)
HA-MVA	5' TGACACGATTACCAATAC 3' (SEQ ID NO:5)

Para realizar el análisis, con fines comparativos, se utilizó como control negativo el ADN extraído de células CEF infectadas con la estirpe salvaje de Western Reserve (WR) y como control positivo el plásmido pHLZ-LACK. Se incluyó también en el análisis el virus recombinante VV-LACK HA', que fue preparado de forma análoga al MVA-LACK y que contiene la misma secuencia codificante de LACK insertada igualmente en el *locus* HA aunque, a diferencia del MVA-LACK, se utilizó para su construcción la estirpe Western Reserve, competente para replicación, de *Vaccinia*. A lo largo de la presente memoria, siempre que se habla del virus VV-LACK se hará referencia a este virus recombinante, denominándole VV-LACK HA' en aquellos casos en los que se le quiera distinguir del virus VV-LACK TK, en el que la secuencia de LACK está insertada en el *locus* de timidina quinasa. En éste y en los restantes Ejemplos, así como en las leyendas de las Figuras y en la descripción de las mismas, la utilización del guión medio o del guión bajo en las denominaciones de los vectores no supone ninguna diferencia alguna, de manera que las denominaciones "MVA-LACK" y "MVA_LACK" corresponden a un mismo vector. Lo mismo sucede con las parejas "VV_LACK HA" / "VV-LACK HA'", "VV_LACK TK" / "VV-LACK TK'" y "VV_LACK" / "VV-LACK'". La ausencia o presencia de guión entre las abreviaturas que componen el nombre de un vector no debe interpretarse tampoco

como indicativo de diferencia alguna; así, el VV-Luc y VV-Luc aluden a un mismo vector, al que también se denomina algunos puntos de la memoria, de forma más informativa, VV-Luc HA-.

Las fotografías de los geles obtenidos se muestran en la parte inferior de la Figura 2. En la parte izquierda de esta misma Figura, que corresponde a la PCR de análisis del *locus* de hemaglutinina, se observa que tanto el MVA-LACK (calle 2) como el virus recombinante VV-LACK HA⁻, dan lugar a bandas que se localizan a la altura del control positivo pHLZ-LACK, lo que es compatible con la presencia del inserto completo integrado en el sitio HA. En la parte de la derecha, correspondiente a las PCR de análisis del *locus* TK, se comprueba que tanto MVA-LACK (calle 2) como VV-LACK HA⁻ (calle 1) dan lugar a bandas de tamaño idéntico a las generadas a partir del ADN extraído de células infectadas con la estirpe salvaje WR, mientras que el vector VV-LACK TK⁻ (calle 3), que contiene la misma secuencia pero insertada en el *locus* TK, da lugar a una banda mucho mayor.

- Ejemplo 2.- Estabilidad de MVA-LACK

Para verificar que MVA LACK puede ser amplificado sin la pérdida de la expresión del gen exógeno, se llevó a cabo un test de estabilidad. El virus recombinante fue amplificado desde el stock P2 al P4 en células CEF a una multiplicidad de infección de 0,05 ufp/célula. Las placas generadas con el stock P4 fueron analizadas por inmunomarcaje con un anticuerpo policlonal anti-WR y anti-LACK. Los resultados, mostrados en la Figura 3, demuestran que el 100% de las placas reconocidas por el anticuerpo anti-WR son también positivas para LACK. El gen LACK, por tanto, se mantiene de forma estable en el virus recombinante MVA-LACK.

- Ejemplo 3.- Cinética de expresión de la proteína LACK

Para evaluar la expresión de la proteína LACK en el tiempo, monocapas de células BHK-21 se infectaron con 5 ufp/célula de MVA-LACK. Los extractos celulares se recogieron a diferentes tiempos post-infección, se fraccionaron en geles SDS-PAGE, se transfirieron a membranas de nitrocelulosa y se hicieron reaccionar con un anticuerpo policlonal anti-LACK (generado en el laboratorio de los inventores inmunizando conejos con la proteína LACK purificada)- Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 4. En esta Figura puede apreciarse que se detectan altos niveles del antígeno LACK a partir de las 4 horas después de la infección, acumulándose su producción con el tiempo hasta las 48 horas.

- Ejemplo 4.- Inmunogenicidad de MVA-LACK

Para evaluar la respuesta inmune inducida por MVA-LACK en comparación con la inducida por VV-LACK, se inmunizaron ratones hembra de la especie susceptible Balb/C (n=4) con una (1×10^7 ufp/ratón) o dos (5×10^7 ufp/ratón) dosis de VV-LACK HA⁻, MVA-LACK o VV-Luc como control. 8 días después de la segunda inmunización, los animales fueron sacrificados y los bazo fueron procesados mediante la técnica de ELISPOT. Se realizaron dos ensayos utilizando la técnica de ELISPOT, (que se ha descrito previamente (33), para evaluar el número de células secretoras de IFN- γ : en el primero, mostrado en la parte A de la Figura 5, se detectó el número de células secretoras de IFN- γ específicas para LACK; en el segundo, mostrado en la parte B de la Figura 5, se detectó el número de células CD8⁺ secretoras de IFN- γ específicas para los antígenos virales de los propios vectores MVA y VV. Adicionalmente se realizó un estudio en el que los esplenocitos aislados de los animales inoculados fueron cultivados y reestimulados con la proteína LACK, detectándose más tarde, mediante ELISA, la cantidad de IFN- γ secretada por los esplenocitos presente en los sobrenadantes de los cultivos. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 6.

Los resultados del ELISPOT muestran que el número de células CD8⁺ secretoras de IFN- γ específicas para LACK es 3,15 veces menor en los animales inoculados con MVA-LACK en comparación con los que recibieron VV-LACK cuando recibieron una única dosis. En consonancia con ello, la cantidad de IFN- γ secretada por los esplenocitos reestimulados con la proteína fue 5 veces menor. Sin embargo, el número de células CD8⁺ secretoras de IFN- γ específicas para los antígenos virales fue aproximadamente 5 veces mayor en los animales inoculados con VV-LACK. El hecho de que la respuesta inmune inducida frente al vector en el caso de MVA permite un efecto de refuerzo (*booster*) después de una segunda dosis de inmunización. Dos dosis de VV-LACK disminuyen dramáticamente el número de células CD8⁺ secretoras de IFN- γ ; sin embargo, cuando los animales recibieron en la primera dosis MVA-LACK y MVA-LACK o VV-LACK en la segunda dosis de refuerzo, tanto el uno como el otro vector recombinante fueron capaces de amplificar la respuesta inmune. Aunque el número de células CD8⁺ secretoras de IFN- γ fue similar en ambos casos, la cantidad de IFN- γ secretado y medido por ELISA fue 70 veces mayor cuando la dosis de refuerzo se realizó con MVA-LACK, y 86 veces mayor que cuando se recibió una única dosis de MVA-LACK.

A continuación se evaluó el patrón de anticuerpos generado tras la inmunización. Diferentes isotipos de IgGs se consideran indicadores de la respuesta frente a *L. infantum*. IgG2a está asociado con condiciones asintomáticas mientras que el isotipo IgG1 se relaciona con enfermedad. 8 días después de la segunda inmunización se recogió el suero de los animales y se evaluó la presencia de anticuerpos específicos para LACK y sus isotipos. En la Figura 7

se muestran los resultados obtenidos en una dilución 1/10 de los sueros. En ellos puede apreciarse que los niveles más altos de IgG2a (asociado a una respuesta de tipo Th1) se encontraron tras dos dosis con MVA-LACK. Tomados en conjunto, los resultados obtenidos demuestran que dos dosis de MVA-LACK inducen una fuerte respuesta de tipo Th1 frente al antígeno LACK.

5 - Ejemplo 5.- Respuesta inmune generada en protocolos de inmunización heterólogos con ADN desnudo en la primera dosis y MVA-LACK en la dosis de refuerzo

Se evaluó también la respuesta inmune generada por el virus MVA-LACK en un protocolo de inmunización heterólogo basado en una primera dosis de inmunización con un vector recombinante de ADN desnudo que permite la expresión de la proteína LACK en células de mamífero y una segunda dosis con virus recombinantes derivados de Vaccinia. Para ello, se utilizó en las primeras inmunizaciones el plásmido pCI-neo-LACK, al que en adelante se hará referencia como DNA-LACK, que es un vector de expresión en células de mamífero que, al igual que el MVA-LACK, expresa la proteína LACK de *L. infantum*. Este plásmido fue generado por inserción del gen LACK en el sitio SmaI de pCI-neo, y difiere del patentado por el Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) como vector DNA-LACK en el sitio de inserción de LACK, pues el vector del CSIC fue clonado en el sitio EcoRI/XbaI de pCI-neo. Contiene el promotor de citomegalovirus y los genes de resistencia a ampicilina y neomicina, dispuestos según se muestra en la Figura 8.

Hembras de ratones Balb/c de 6 a 8 semanas de edad fueron inoculadas por vía intradérmica con el vector plasmídico de ADN, DNA-LACK. 15 días después se realizó una segunda inoculación con 1×10^7 ufp/ratón por vía intraperitoneal de MVA-LACK (stock P3). Como controles se inocularon VV-LACK TK⁻ (previamente utilizado y generado en el laboratorio) y que ha demostrado conferir cierto grado de protección cuando se usa a una dosis de 5×10^7 ufp/ratón (9), VV-LACK HA⁻ y VV Luc. Tres semanas después de la última inmunización, los animales fueron sacrificados y los bazo fueron procesados mediante la técnica de ELISPOT. Se realizó un ELISPOT para evaluar tanto el número de células secretoras de IFN- γ específicas para la proteína LACK como el de las específicas para antígenos de Vaccinia.

Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 9. En la parte A de esta Figura puede apreciarse que el grupo inmunizado con MVA-LACK en la segunda dosis (tercera barra de cada uno de los gráficos) demostró desarrollar una respuesta inmune celular frente a LACK mayor que los virus basados en la estirpe salvaje WR. La parte B de la Figura muestra que la respuesta anti-viral fue mucho menor en ese mismo grupo inmunizado con MVA-LACK, como era de esperar al tratarse de un vector atenuado.

Al ser el balance de la respuesta inmune entre los tipos Th1 (asociado con protección) y Th2 (asociado con susceptibilidad) crítico para el control de la leishmaniasis, se evaluó el tipo de respuesta celular inducida tras la inmunización descrita más arriba. Para ello, los esplenocitos aislados de los ratones inmunizados fueron reestimulados con la proteína LACK (parte superior de la Figura 10a) o con un péptido inmunodominante de clase II de la misma (parte inferior de la Figura 10a). Tras 72 horas de reestimulación, los sobrenadantes se recogieron y se determinó la presencia de citoquinas de tipo Th1 (IFN- γ) o Th2 (IL-4) en estos sobrenadantes mediante ELISA. Los gráficos de la Figura 10a muestran que los esplenocitos de los ratones inmunizados con DNA-LACK en la primera dosis y MVA-LACK en la segunda produjeron más IFN- γ e IL-4 que los demás grupos. A pesar de los niveles más altos de IL-4, el balance Th1/Th2, medido indirectamente como la cantidad de IFN- γ /IL-4, fue mayor en el grupo que recibió MVA-LACK en la segunda dosis (IFN- γ /IL-4 = 1641 en el caso de la reestimulación con la proteína LACK e IFN- γ /IL-4 = 1163 en el caso del péptido de clase II), indicando un desarrollo de una respuesta inmune de tipo Th1.

Estos resultados se confirman cuando se realiza una representación de estos mismos resultados, en la que se añaden los datos referentes al TNF- α (asociado a respuestas de tipo Th1 como el IFN- γ) y los referentes a la IL-10 (asociada a respuestas tipo Th2 como la IL-4), tal como se representan en la Figura 10b. Es en los ratones en los que se detectan los niveles más altos de IFN- γ (los grupos de los ratones inmunizados con DNA-LACK en la primera dosis y MVA-LACK en la segunda) en los que se detectan también los niveles más altos de TNF- α (35,9 pg/ml cuando se reestiman con LACK y 63,3 pg/ml cuando se reestiman con el péptido), datos claramente más elevados que los correspondientes a los grupos inmunizados con DNA-LACK/VV-LACK-HA⁻ (donde se detectan 18 pg/ml si se reestiman con LACK y 25 pg/ml si se reestiman con el péptido) y a los grupos control (donde se detectan 9 pg/ml y 18 pg/ml, respectivamente). Con respecto a las citoquinas de tipo Th2, la inclusión de los datos referentes a la IL-10 corrobora que los niveles más elevados se detectan en los grupos inmunizados con DNA-LACK/MVA-LACK. Independientemente de los niveles de IL-4 e IL-10, la relación Th1:Th2 correspondía a los grupos que recibieron MVA-LACK en la segunda dosis, lo que confirma una clara tendencia de la respuesta inmune hacia la respuesta de tipo Th1 en este grupo.

El siguiente paso fue determinar qué población de células T (CD4⁺ o CD8⁺) estaba implicada en la secreción de citoquinas de tipo Th1 (IFN- γ y TNF- α). Con este propósito se inmunizaron animales con regímenes de inmunización análogos a los utilizados para obtener los resultados representados en la Figura 8, es decir, una primera dosis de iniciación de la respuesta con DNA-LACK y una segunda dosis de refuerzo de la respuesta con MVA-LACK (dosis de 1×10^7 ufp o de 5×10^7 ufp) o VV-LACK-HA⁻ (dosis de 1×10^7 ufp o de 5×10^7 ufp), mientras que los animales

utilizados como controles recibieron DNA-CONTROL (el vector plasmídico pCl-neo, sin secuencia de LACK) en la primera dosis de iniciación de la respuesta y VV-LUC-HA- en la segunda dosis, de refuerzo de la respuesta. 14 días después de la administración de la dosis de refuerzo, se recogieron los bazo y los esplenocitos fueron reestimulados con proteína LACK o con RPMI como control. Durante las últimas 5 horas de reestimulación se añadió nuevo estímulo junto con Brefeldina A. Posteriormente se llevó a cabo una tinción de citoquinas intracelulares y se realizó un análisis por citometría de flujo. Los resultados se muestran a continuación en la Tabla 2.

Tabla 2.- Tipos celulares detectados por citometría de flujo tras tinción de citoquinas celulares según el protocolo de inmunización

DOSIS INICIAL	DOSIS DE REFUERZO	CD8+ PRODUCTORAS DE IFN γ	CD8+ PRODUCTORAS DE TNF α	CD4+ PRODUCTORAS DE IFN γ	CD4+ PRODUCTORAS DE TNF α
DNA-LACK	VV-LACK 1 X 10 ⁷	10,1	10,4	1,8	1,6
DNA-LACK	VV-LACK 5 X 10 ⁷	8,3	7,5	1,9	1,9
DNA-LACK	MVA-LACK 1 X 10 ⁷	23,4	15,7	2,9	1,9
DNA-LACK	MVA-LACK 5 X 10 ⁷	12,7	11,2	2,5	1,9
DNA-CONTROL	VV-Luc 5 X 10 ⁷	1,7	1,5	0,7	1,0
PBS	PBS	1,5	1,2	0,3	0,4

Los datos de la Tabla 2 demuestran que la respuesta inmune celular es debida principalmente a la población CD8+. Como conclusión, la inmunización basada en DNA LACK/MVA-LACK confiere mayores porcentajes de células específicas CD4+ y CD8+ secretoras de IFN- γ y TNF- α .

- Ejemplo 6.- Ensayos de protección frente a *Leishmania major*

6.1. Comparación de la protección generada por inoculación en la dosis de refuerzo de distintos vectores recombinantes derivados de Vaccinia que expresan LACK

Habiendo establecido que la inmunización con MVA-LACK es una potente inductora de una respuesta inmune celular y estando ésta relacionada con protección frente a la leishmaniasis, se realizó a continuación un ensayo de protección frente a *Leishmania major*, utilizando un régimen de inmunización heterólogo basado en DNA-LACK/MVA-LACK. Hembras de ratones Balb/c de 6 semanas de edad fueron inoculadas por vía intradérmica con 100 μ g del vector plasmídico de ADN que expresa la proteína LACK, DNA-LACK, o con un ADN vacío (sin inserto) como control. 15 días después, se realizó una segunda inoculación con 1 x 10⁷ ufp/ratón por vía intraperitoneal de MVA-LACK, VV-LACK TK-, VV-LACK HA- o VV-Luc. Tres semanas después de la última inmunización los animales fueron desafiados con 5 x 10⁴ promastigotes de *L. major* por vía subcutánea en la almohadilla plantar. Como parámetros de protección se consideraron las lesiones en el lugar de inoculación y la carga parasitaria en el ganglio que drena la almohadilla plantar (ganglio poplíteo) medida 7 semanas después del desafío.

Los resultados obtenidos al representar la evolución del tamaño de la lesión con el tiempo se muestran en la parte superior de la Figura 11. En ella puede observarse que el grupo inmunizado con DNA-LACK/MVA-LACK presentó una reducción del 20% comparado con los grupos inmunizados con DNA-LACK y uno de los vectores VV-LACK.

Para confirmar que la reducción en el tamaño de la lesión se correlaciona con protección, y no únicamente con inflamación, se midió la carga parasitaria en los ganglios poplíteos, obteniéndose los resultados que se representan en la parte inferior de la Figura 11. Los ratones que recibieron DNA-LACK/MVA-LACK presentaron una reducción en la carga parasitaria mayor (hasta 1000 veces) que los grupos inmunizados con DNA-LACK/VV-LACK.

6.2. Protección generada utilizando en la primera dosis un vector de ADN diferente

Se realizó otro experimento para evaluar protección frente a *L. major*. Los animales fueron inmunizados con un vector de ADN que expresa la proteína LACK distinto de DNA-LACK, pMOK-LACK, y como controles el vector minimalístico MIDGE (*minimalistic, immunologically defined gene expression*: expresión minimalística de genes inmunológicamente definida) MIDGE-NLS (MOLGEN®) o un vector vacío sin inserto pMOK. 15 días después, el grupo al que se había inoculado pMOK recibió una segunda dosis de pMOK, el grupo que había recibido el MIDGE-NLS recibió VV-LUC en la segunda dosis de refuerzo de la respuesta y el grupo que había recibido pMOK-LAK recibió MVA-LACK. Tres semanas después de la administración de la dosis de refuerzo los animales fueron desafiados con 5 x 10⁴ promastigotes de *L. major* por vía subcutánea en la almohadilla plantar. Como parámetros de protección se consideraron las lesiones en el lugar de inoculación y la carga parasitaria en el ganglio que drena la almohadilla plantar (ganglio poplíteo) medida 7 semanas después del desafío.

Los resultados obtenidos al representar la evolución del tamaño de la lesión con el tiempo se muestran en la Parte A de la Figura 12. Los correspondientes a la carga de parásitos detectada en los ganglios poplíteos de cada uno de los grupos, expresada como número de parásitos detectados por miligramo, se muestran en la parte B de dicha Figura.

- 5 Como se aprecia en dichas Figuras, el grupo inmunizado con pMOK-LACK/MVA LACK estuvo protegido frente a leishmaniasis producida por *L. major*, ya que los ratones que fueron inmunizados con dichos vectores no desarrollaron apenas lesión. Esta medida se correlaciona con una disminución en la carga parasitaria: presentaron 4 veces menos parásitos que los grupos controles.

10 6.3. Determinación de la dosis viral óptima de MVA-LACK en protocolos de inmunización heterólogos

Tras haber demostrado que la inmunización con MVA-LACK es una potente inductora de una respuesta inmune celular y que ésta se correlaciona con protección frente a la infección por *Leishmania major*, se llevó a cabo un experimento adicional para determinar la dosis viral óptima de MVA-LACK en un protocolo de inmunización heterólogo: una primera dosis de inmunización (*priming*) basada en ADN y una segunda dosis de refuerzo de la inmunización (*booster*) con virus recombinantes derivados de Vaccinia.

Como modelo animal se utilizaron de nuevo ratones BALB/c, al tratarse de una cepa altamente susceptible a la infección por *Leishmania*. Hembras de nueve semanas de edad fueron inoculadas por vía intradérmica con 100 µg del vector plasmídico de ADN que expresa la proteína DNA-LACK (pCINeo-DNA-LACK) o ADN Control. Quince días después recibieron la segunda dosis de inmunización, por vía intraperitoneal, con 1×10^7 ufp/ratón o 5×10^7 ufp/ratón de MVA-LACK, 5×10^7 ufp/ratón de VV-LACK o 5×10^7 ufp/ratón de VV-LUC, siendo suministrado este último al grupo que había recibido el ADN Control. Se incluyó un grupo control que recibió PBS tanto en la primera como en la segunda dosis de inmunización, al que se denominó N (*“naive”*, denominación habitual en Biología Molecular para designar a lo que no ha tenido contacto con algo). Los grupos de inmunización están representados en la Tabla 3.

Tabla 3.- Grupos de inmunización para la evaluación de la dosis óptima de MVA-LACK

	DOSIS INICIAL	DOSIS FINAL
GRUPO 1	DNA-LACK 100 µg	MVA-LACK 1×10^7 ufp
GRUPO 2	DNA-LACK 100 µg	MVA-LACK 5×10^7 ufp
GRUPO 3	DNA-LACK 100 µg	VV-LACK 5×10^7 ufp
GRUPO 4	DNA CONTROL 100 µg	VV-LUC 5×10^7 ufp
GRUPO N	PBS	PBS

30 Tres semanas después de la última inmunización, los animales fueron desafiados con 5×10^4 promastigotes de *L. major* por vía subcutánea en la almohadilla plantar. Para asegurar la infectividad de los promastigotes, estos fueron aislados utilizando aglutinina de cacahuete (β -D-galactosa-(1→3)-N-acetil-D-galactosamina, PNA). La PNA aglutina específicamente los promastigotes no infectivos, mientras que no aglutina a los promastigotes metacíclicos, que es la forma infectiva de *Leishmania*. Estos promastigotes infectivos se recogieron en el sobrenadante después de una centrifugación diferencial y fueron utilizados como dosis infectiva.

35 Cinco días después del desafío, se sacrificaron 3 animales de cada grupo para evaluar cómo era la respuesta inmune temprana frente a la infección por *L. major* en los animales inmunizados. Se realizó un ensayo de ELISPOT para evaluar el número de células secretoras de IL-2 por cada 10^5 esplenocitos específicos para la proteína LACK. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 13. En ella se aprecia que el único grupo que presentó cantidades significativas de IL-2 fue el grupo inmunizado con DNA-LACK y 1×10^7 ufp de MVA-LACK.

40 Como parámetro de protección se evaluó el desarrollo de lesión en el lugar de inoculación, obteniéndose el gráfico de evolución del tamaño de la lesión con respecto a las semanas transcurridas desde el desafío que se muestra en la Figura 14. Adicionalmente, se obtuvieron fotografías del estado de la lesión en la semana 8 posterior al desafío en los ratones inmunizados siguiendo cada uno de los distintos protocolos indicados.

45 Como se aprecia en el gráfico de la Figura 13, los grupos inmunizados con 1×10^7 ufp de MVA-LACK en la dosis de refuerzo no desarrollaron lesión. De los ratones inmunizados con 5×10^7 ufp de MVA-LACK, un ratón de cinco desarrolló una pequeña lesión en el lugar de inoculación a partir de la semana 7 posterior al desafío. Desde la cuarta semana posterior al desafío la lesión presentada es significativamente diferente en los grupos inmunizados con vectores recombinantes derivados de Vaccinia con respecto a los controles. El grupo inmunizado con 5×10^7 ufp de VV-LACK, presentó cierto grado de lesión, aunque ésta era significativamente diferente al grupo control a partir de la semana 8 posterior al desafío. La lesión en los grupos control siguió aumentando exponencialmente mientras que en el grupo inmunizado con DNA-LACK/VV-LACK la lesión comenzó a estabilizarse.

Los porcentajes de reducción en el tamaño de la lesión están representados en la Tabla 4.

Tabla 4. Reducción en el tamaño de la lesión ocho semanas después del desafío

DOSIS INICIAL	DOSIS DE REFUERZO	TAMAÑO DE LESIÓN	% REDUCCIÓN
DNA-LACK	MVA-LACK 1×10^7	$0,10 \pm 0,05$	97,4 %
DNA-LACK	MVA-LACK 5×10^7	$0,36 \pm 0,33$	90,3 %
DNA-LACK	VV-LACK 5×10^7	$2,17 \pm 1,64$	41,8 %
DNA CONTROL	VV-Luc 5×10^7	$3,73 \pm 0,23$	0 %

Las fotografías de la Figura 15 demuestran claramente que aquellos ratones inmunizados con MVA-LACK mostraron un alto grado de protección frente a leishmaniasis cutánea, mayor que los inmunizados con el vector VV-LACK. En la figura se observa el grado de lesión en la pata derecha, marcada con un signo "+" encima de la cada una de las fotografías para indicar dónde se inocularon los promastigotes, mientras que la pata izquierda, marcada con un signo "-", sirve como control, sin inocular promastigotes.

Como se observa en las fotografías de la Figura 15, los animales inmunizados con DNA-LACK en la primera dosis, de inicio de la respuesta, y 1×10^7 ufp de MVA-LACK en la segunda dosis de refuerzo de la respuesta, no presentaron lesiones 8 semanas después del desafío (panel A). Cuando se utilizaron 5×10^7 ufp de MVA-LACK en la dosis de refuerzo, solamente uno de los cinco ratones empezó a desarrollar lesión en la semana séptima después del desafío (panel B izquierda). En el grupo que recibió VV-LACK en el *booster* (refuerzo), el grado de protección fue menor y se observaron lesiones en el 75% de los animales, aunque significativamente menores que en los grupos control (panel C). Los grupos control presentaban lesión en el lugar de inoculación (paneles D y E).

Los animales de los grupos control fueron sacrificados por razones éticas 9 semanas después del desafío. Al mismo tiempo se sacrificaron los animales del grupo inmunizado con DNA-LACK y VV-LACK. Los animales de los grupos que recibieron MVA-LACK permanecieron sin lesiones durante al menos 11 semanas, y están bajo observación para analizar si la protección se mantiene en el tiempo.

Ejemplo 7.- Ensayos de protección frente a *Leishmania infantum*

También se llevaron a cabo ensayos para evaluar si la potente inducción de respuesta inmune celular provocada por MVA-LACK cuando se administra en la segunda dosis de refuerzo de la inmunización, tras haber sido los sujetos inmunizados en la primera dosis con un vector de ADN que expresa igualmente el antígeno LACK, se correlacionaba también con la generación de protección frente a *Leishmania infantum*, que causa mayoritariamente leishmaniasis visceral, utilizando de nuevo un régimen de inmunización heterólogo basado en DNA-LACK/MVA-LACK. Dado que estudios previos sobre la vacunación frente a la leishmaniasis han demostrado que el modelo murino puede ser utilizado para predecir los resultados que se podrían obtener en los ensayos de vacunación realizados con modelos de primates no humanos (40, 41, 42), se utilizó el modelo murino intradérmico para ensayar el potencial de los regímenes de vacunación heterólogos con vectores de ADN y virus recombinantes derivados de Vaccinia.

7.1. Evaluación de la carga parasitaria

Ratones Balb/c de 4 a 6 semanas de edad fueron inoculados por vía intradérmica con 100 µg del vector plasmídico de ADN que expresaba la proteína LACK, DNA-LACK (pCINeo-DNA-LACK) o ADN Control. Quince días después recibieron la segunda dosis de inmunización, por vía intraperitoneal, con 1×10^7 ufp/ratón o 5×10^7 ufp/ratón de MVA-LACK o del virus recombinante derivado de la estirpe salvaje Western Reserve que llevaba insertado igualmente el antígeno LACK en el *locus* de hemaglutinina (VV-LACK). Al grupo que había recibido el ADN Control se le administró 5×10^7 ufp/ratón de VV-Luc. Se incluyó un grupo control que recibió PBS tanto en la primera como en la segunda dosis de inmunización.

Tres semanas y media después de la administración de la dosis de refuerzo, los ratones fueron infectados por vía intradérmica en el pabellón auditivo utilizando 1×10^7 promastigotes metacíclicos de *L. infantum* tal como se ha descrito previamente (43). Un mes después de la infección, se evaluaron las cargas parasitarias mediante el análisis por dilución limitante en los grupos de ratones inmunizados y de control. Las evaluaciones se realizaron en el bazo, el hígado y el nódulo linfático drenante. Los resultados obtenidos, que se muestran en la Figura 16, en la que se representan los valores medios obtenidos a partir de al menos 4 ratones por grupo, demuestran que los ratones que fueron inmunizados siguiendo un régimen de vacunación con una primera dosis de iniciación de la respuesta y una segunda dosis de refuerzo utilizando vectores capaces de expresar el antígeno LACK resultaron protegidos de forma significativa frente a la infección. El nivel de protección en cada tejido era comparable entre los diversos grupos de ratones que habían recibido vectores capaces de expresar el antígeno y no diferían estadísticamente entre los ratones que recibieron VV-LACK o MVA-LACK. Sin embargo, sí se observaron variaciones en los niveles de protección entre los distintos órganos, observándose los niveles de protección más elevados en el nódulo linfático drenante (parte C de la Figura 16). El nivel de protección en este órgano oscilaba entre un factor de reducción de

144 a 244 veces en las cargas parasitarias en comparación con los ratones control. En el bazo (parte A de la Figura 15) y en el hígado (parte B de la Figura 16) se observaron niveles de protección más bajos, que oscilaban entre factores de reducción de 6 a 9 veces en las cargas parasitarias en el hígado y de 9 a 30 veces en el bazo. En el bazo se observó también un pequeño efecto protector en el caso de los ratones que recibieron el ADN control y el virus VV-Luc, que podría ser debido a la baja respuesta de IFN- γ observada en estos animales. Aún así, las diferencias entre las cargas parasitarias observadas en los ratones inmunizados con VV-Luc y los que recibieron VV-LACK o MVA-LACK fueron significativas ($p < 0,02-0,05$), lo que demuestra un efecto específico del antígeno LACK.

7. 2. Respuesta celular y producción de citoquinas

Dado que el IFN- γ y la relación TNF- α /LT parecen estar implicados en la resistencia a la infección en la leishmaniasis visceral murina (27,29,30,46), mientras que la IL-10 parece estar asociada a la susceptibilidad (26,33), se extrajeron bazos de ratones inmunizados y no inmunizados tanto antes de proceder al desafío con *L. infantum* como un mes después de haber realizado éste. Con ellos se procedió tanto a realizar un ensayo de ELISPOT para evaluar el número de células secretoras de IFN- γ específicas para LACK presentes por cada 10^6 esplenocitos, como a realizar ensayos de niveles de citoquinas producidas presentes en los sobrenadantes de cultivos de dichos esplenocitos aislados de ratones reestimulados con la proteína LACK durante su cultivo. Los resultados obtenidos con los esplenocitos extraídos antes de proceder al desafío se muestran en la Figura 17. La parte A, correspondiente a la concentración de IFN- γ , en ng/ml, detectada en los sobrenadantes de los cultivos de esplenocitos reestimulados, muestra que los ratones que recibieron 1×10^7 ufp de VV-LACK o 5×10^7 ufp de MVA-LACK parecen producir niveles algo más elevados de IFN- γ (100-113 ng/ml), comparados con los ratones que recibieron 5×10^7 ufp de VV-LACK o 1×10^7 ufp de MVA-LACK (55-67 ng/ml). La evaluación de las células productoras de IFN- γ específicas para LACK realizada mediante el ELISPOT, que aparece representada en la parte B de la Figura 17, indica que el número de células secretoras de IFN- γ se correlaciona con los niveles de IFN- γ detectados por ELISA, oscilando la frecuencia de células productoras de IFN- γ entre 380 y 640 células/ 10^6 esplenocitos. Además, se observaron niveles significativos de TNF- α /LT (58 y 134 pg/ml, respectivamente) en los ratones que habían recibido VV-LACK, mientras que los niveles de TNF- α /LT producidos en respuesta al antígeno LACK por los ratones que habían recibido MVA-LACK eran más bajos (27 pg/ml y 8 pg/ml, respectivamente). Estas diferencias en la inducción de TNF- α pueden reflejar, en parte, la diferente capacidad del WR y el MVA para inducir respuestas inflamatorias y activación de NF- κ B, lo que da como resultado perfiles de citoquinas diferentes: MVA potencia la activación de NF- κ B mientras que WR parece inhibirlo. Las cantidades de IL-10 producidas por los esplenocitos aislados antes del desafío, representadas en la parte D de la Figura 17, también variaban según el protocolo de inmunización utilizado, oscilando entre 0,1 ng/ml en los ratones que habían recibido 5×10^7 ufp de VV-LACK en la dosis de refuerzo y 0,7 ng/ml en los que habían recibido 1×10^7 ufp de VV-LACK o MVA-LACK.

Las respuestas de citoquinas detectadas en esplenocitos aislados un mes después de ser sometidos ratones a un desafío con *L. infantum* mostraban variaciones entre las muestras paralelas a las encontradas antes del desafío, aunque eran algo superiores.

También se produjeron niveles significativos de IL-10 y TNF- α /LT. Las concentraciones de IFN- γ detectadas por ELISA en los sobrenadantes de los esplenocitos sometidos a reestimulación, la relación IFN- γ /IL-10 y los factores de reducción en la carga de parásitos en los tejidos analizados, evaluado todo ello un mes después del desafío con *L. infantum*, se representan a continuación en la Tabla 5, donde se puede observar que tanto el nivel de IFN- γ como la relación IFN- γ /IL-10 parecen correlacionarse con la protección encontrada.

Tabla 5.- Niveles de citoquinas y factores de reducción de la carga de parásitos detectados un mes después del desafío con *L. infantum*

Grupo Experimental	Relación IFN- γ /IL-10	IFN- γ (ng/ml)	Factor de reducción de la carga de parásitos		
			Bazo	Hígado	Nódulo linfático
DNA-LACK + 5×10^7 MVA-LACK	4633	204	31	9	244
DNA-LACK + 1×10^7 VV-LACK	720	153	18	6,5	244
DNA-LACK + 1×10^7 MVA-LACK	271	147	12,8	6,7	203
DNA-LACK + 5×10^7 VV-LACK	92	20	9,2	6	144

Adicionalmente, se examinó la inducción de NO/nítrico un mes después del desafío, pues se ha demostrado que el óxido nítrico es crítico para la actividad leishmanicida de los macrófagos murinos (44, 45, 46). Se observó que, en

los ratones que habían recibido vectores capaces de expresar LACK, se detectaban cantidades en los grupos control los niveles de NO/nitrito eran mucho más reducidos, oscilando entre 0,5 μM y 1 μM . Por tanto, los ratones vacunados, en consonancia con los niveles de IFN- γ detectados, presentaban niveles más elevados de inducción de producción de óxido nítrico y mayor actividad potencial leishmanicida. Estos resultados son consistentes con la protección hallada en los ratones vacunados con DNA-LACK y VV-LACK o MVA-LACK.

Por tanto, los ensayos descritos en este ejemplo demuestran que la administración de virus recombinantes derivados de Vaccinia capaces de expresar el antígeno LACK como parte de protocolos de inmunización en los que se suministran en la segunda dosis de refuerzo, mientras que en la primera dosis se suministra un vector de ADN que expresa el mismo antígeno, es altamente inmunogénica y confiere protección frente a la infección de *L. infantum* en ratones, mientras que el efecto protector no se consigue con vacunaciones con vectores de ADN en las dos dosis. El vector derivado de la estirpe altamente atenuada MVA y el derivado de la estirpe virulenta de Vaccinia competente para replicación Western Reserve dieron lugar a niveles comparables de protección. Sin embargo, el hecho de que la estirpe altamente atenuada MVA garantiza mayor seguridad para su uso en seres humanos convierte a este vector en un buen candidato para ser utilizado para la protección de seres humanos frente a la leishmaniasis visceral.

- Ejemplo 8.- Eficiencia de crecimiento de MVA-LACK

Se realizó un ensayo adicional para determinar la eficiencia de crecimiento del virus recombinante MVA-LACK. Para ello, se infectaron células permisivas (BHK-21) a una multiplicidad de infección de 0,01, bien con el virus recombinante MVA-LACK o con el virus parental que carece de insertos, MVA-WT. A diferentes tiempos post-infección (1, 24, 48 y 72 horas), se tituló el virus presente en el medio de cultivo (extracelular) y el virus asociado a células (intracelular) mediante la inmunotinción del virus.

La Figura 18 muestra gráficas en las que se representan los resultados obtenidos en función del tiempo. Tanto en la gráfica que se refiere al virus intracelular (A) como en la gráfica que se refiere al virus extracelular (B), puede apreciarse que no se produce inhibición del crecimiento de los virus recombinantes MVA-LACK en comparación con el virus parental.

- Ejemplo 9.- Duración de la protección inducida por la administración de DNA-LACK y MVA-LACK

Para comprobar que el protocolo de inmunización basado en la administración de DNA-LACK y MVA-LACK es reproducible y que la protección inducida por su administración es duradera, se llevó a cabo otro experimento con ratones Balb/c, a los que se les administró una primera dosis inicial, de desencadenamiento de la respuesta inmune, que contenía el vector plasmídico DNA-LACK (pCI-neo_LACK, 100 μg /ratón) y en los que se reforzó la respuesta inmune mediante la administración, 14 días más tarde, del vector MVA-LACK (10^7 ó 5×10^7 ufp/ratón) o del vector VV-LACK (5×10^7 ufp/ratón). En el ensayo se incluyeron dos controles negativos: en uno de ellos, el DNA-LACK se sustituyó por un plásmido “vacío”, carente de inserto con secuencias codificantes de LACK (DNA-Control), y los virus recombinantes con secuencias de LACK se sustituyeron por el virus VV-LUC, un virus derivado de Vaccinia que contiene el gen de la luciferasa insertado en el sitio de la hemaglutinina pero que carece de inserto con secuencias codificantes de LACK; en el segundo control negativo, los animales no fueron estimulados con ningún vector (“naive”), sino que recibieron PBS en las dos dosis de inmunización.

En total se formaron 5 grupos de 5 ratones cada uno. Los distintos grupos de inmunización y los tratamientos recibidos se resumen a continuación en la Tabla 6:

Tabla 6: Grupos de inmunización del ensayo de duración de la protección

	DOSIS INICIAL	DOSIS DE REFUERZO
GRUPO 1	DNA-LACK 100 μg	MVA-LACK 1×10^7 ufp
GRUPO 2	DNA-LACK 100 μg	MVA-LACK 5×10^7 ufp
GRUPO 3	DNA-LACK 100 μg	VV-LACK 5×10^7 ufp
GRUPO 4	DNA-CONTROL 100 μg	VV-LUC 5×10^7 ufp
GRUPO 5	PBS	PBS

Tres semanas después de la administración de la dosis de refuerzo, se produjo el desafío de la respuesta inmune mediante la inoculación de 5×10^4 promastigotes metacíclicos de *Leishmania major*, aislados de cultivos estacionarios de *Leishmania* tras la incubación con aglutinina de cacahuete. Los promastigotes se inocularon por vía subcutánea en la almohadilla plantar de la pata trasera derecha. Como parámetro para evaluar la protección, se realizó un seguimiento del desarrollo de lesiones en la almohadilla plantar en la que se había producido la inoculación, tomando medidas semanalmente. A diferencia de los ensayos descritos previamente en la presente

memoria, el ensayo se prolongó durante 30 semanas tras el desafío, para comprobar si la protección conferida por la inmunización se prolongaba en el tiempo.

La parte superior (A) de la Figura 19 muestra un gráfico en el que se representa la evolución del tamaño de las lesiones con el tiempo transcurrido tras el desafío. Corroborando los resultados obtenidos en los experimentos análogos realizados, todos los animales de los grupos de control, el Grupo 4 (DNA-control/VV-LUC) y el Grupo 5 (PBS/PBS) desarrollaron lesiones severas, como puede observarse en las fotografías mostradas en la parte B de la Figura 19, tomadas 8 semanas tras el desafío. En la semana 9, los animales de los grupos de control tuvieron que ser sacrificados por razones éticas. En cuanto a los animales que recibieron vectores que contenían insertos de LACK, los ratones inmunizados con MVA-LACK mostraron, de nuevo, un grado de protección más elevado que los ratones inmunizados con VV-LACK (VV-LACK-HA- en la Figura 19). Ninguno de los animales inmunizados con DNA-LACK seguido de MVA-LACK había desarrollado lesiones 8 semanas después del desafío y sólo un ratón del grupo inmunizado con MVA-LACK a una dosis de 1×10^7 ufp/ratón comenzó a desarrollar una lesión (3 mm) transcurridas 15 semanas desde el desafío.

- Ejemplo 10.- Aumento de la protección mediante el uso de adyuvantes

Para comprobar si la protección lograda con el vector de la invención podía mejorarse mediante la adición de adyuvantes durante el protocolo de inmunización, se llevó a cabo un experimento en el que se inmunizaron ratones con una primera dosis de DNA-LACK y una dosis posterior de MVA-LACK, inoculando a los animales, un día después de cada una de las dosis de vectores de vacunación, diferentes cantidades de un adyuvante, concretamente la proteína CD40L (Mega CD40L: m-ACRP30 m-CD40L, de APOXIS).

Los animales, ratones Balb/c, fueron inmunizados intradérmicamente, en el día 0, con 100 µg del plásmido DNA-LACK o del plásmido DNA-Control, carente de inserto de LACK, y un día más tarde los animales recibieron el adyuvante por la misma ruta (1, 10 ó 20 µg de Mega CD40L, según el grupo). Quince días más tarde, los ratones recibieron la dosis de refuerzo con 1×10^7 ufp/ratón de MVA-LACK o MVA-WT intraperitonealmente, y un día más tarde se les inocularon por la misma ruta diferentes cantidades de adyuvante (1, 10 ó 20 µg de Mega CD40L, según el grupo). Se incluyeron dos grupos de control adicionales: a un grupo se le administró sólo PBS, y al otro se le administró PBS junto con el adyuvante, para descartar cualquier posible efecto debido al adyuvante mismo. Los diferentes grupos de inmunización, compuestos cada uno de ellos de 4 ratones por grupo, y los tratamientos recibidos se resumen a continuación en la Tabla 7:

Tabla 7: Grupos de inmunización del ensayo con adyuvante

	DOSIS INICIAL (Semana 0)	DOSIS DE REFUERZO (Semana 2)	2º DOSIS DE REFUERZO (Semana 15)
GRUPO 1	DNA-LACK (100 µg)	MVA-LACK (1×10^7 ufp)	MVA-LACK (5×10^7 ufp)
GRUPO 2	DNA-LACK (100 µg) Mega CD40L (1 µg)	MVA-LACK (1×10^7 ufp) Mega CD40L (1 µg)	-
GRUPO 3	DNA-LACK (100 µg) Mega CD40L (10 µg)	MVA-LACK (1×10^7 ufp) Mega CD40L (10 µg)	MVA-LACK (5×10^7 ufp)
GRUPO 4	DNA-LACK (100 µg) Mega CD40L (20 µg)	MVA-LACK (1×10^7 ufp) Mega CD40L (20 µg)	MVA-LACK (5×10^7 ufp) Mega CD40L (20 µg)
GRUPO 5	DNA-CONTROL (100 µg) Mega CD40L (10 µg)	MVA-WT (1×10^7 ufp) Mega CD40L (10 µg)	-
GRUPO 6	PBS	PBS	-
GRUPO 7	PBS Mega CD40L (10 µg)	PBS Mega CD40L (10 µg)	-

Tres semanas después de recibir la primera dosis de refuerzo, se inocularon a los ratones 5×10^4 promastigotes metacíclicos de *L. major*. Tal como se refleja en la Tabla 7, diez semanas después del desafío (15 semanas después de haber sido administrada la dosis inicial), los ratones de los grupos 1, 3 y 4 recibieron una segunda dosis de refuerzo con 5×10^7 ufp de MVA-LACK; en el caso del grupo 4, junto con esa segunda dosis de refuerzo, los ratones recibieron también 20 µg del adyuvante, igualmente por vía intraperitoneal. La parte superior A de la Figura 20 muestra una representación esquemática del protocolo de inmunización seguido. El tamaño de las lesiones se monitorizó semanalmente, obteniéndose los resultados que se representan en la gráfica que aparece en la parte

intermedia de la Figura 20, marcada como "B". La gráfica de la parte inferior de la Figura 20, marcada como "C", muestra el tamaño de las lesiones medidas en cada uno de los ratones supervivientes de los grupos 1, 2, 3, 4, 5 y 7, trascurridas 27 semanas desde el desafío. Los ratones del grupo 6, que habían recibido sólo PBS previamente al desafío, tuvieron que ser sacrificados 12 semanas después del desafío, al igual que ocurrió con un ratón del grupo 2 transcurrido el mismo período de tiempo, y también con un ratón del grupo 5 una semana después.

Ambas gráficas muestran que el desarrollo de lesiones en los ratones inmunizados con DNA-LACK y MVA-LACK fue menor que en los grupos de control, excepto en el caso del grupo inmunizado con 1 µg de Mega-CDL40 junto con los vectores de vacunación DNA-LACK y MVA-LACK (grupo 2), grupo en el que todos los ratones desarrollaron lesiones, cuyo tamaño era comparable al observado en los grupos de control. La adición de 10 µg de Mega-CD40L tras las inmunizaciones con los vectores DNA-LACK y MVA-LACK (grupo 3) parece no tener ningún efecto sobre la protección, pues da lugar a resultados similares a los obtenidos en el grupo 1: un único ratón de los 4 que componían el grupo 3 desarrolló una lesión, cuyo tamaño 27 semanas después del desafío era de aproximadamente 6,5 mm. La adición de 20 µg de Mega-CD40L tras las inmunizaciones con los vectores DNA-LACK y MVA-LACK (grupo 4), sin embargo, sí pareció mejorar los resultados obtenidos al inmunizar con DNA-LACK y MVA-LACK sin adyuvante, pues en el grupo 4 sólo un ratón desarrolló una pequeña lesión, de aproximadamente 2 mm de tamaño, 27 semanas después del desafío. En los grupos de control, por su parte (grupos 5 y 7), el tamaño medio de las lesiones observadas a las 27 semanas del desafío era de aproximadamente 3 mm, aunque uno de los ratones había desarrollado una lesión menor, de aproximadamente 1 mm..

En los grupos inmunizados con DNA-LACK y MVA-LACK sin adyuvante (grupos 1 y 3), sólo 1 ratón de cada grupo desarrolló lesión; en el grupo 3, el gran tamaño de la lesión hizo que el ratón hubiera de ser sacrificado antes de transcurrir el período de 27 semanas posteriores al desafío. En los ratones de estos dos grupos que no desarrollaron lesión (75%), estaba controlado el crecimiento del parásito, como demuestra el hecho de que no desarrollaron lesiones tras haber transcurrido 27 semanas desde el desafío y también porque no presentaban inflamación del nódulo linfático drenante. En el grupo 1, al cual no se le administró adyuvante, la administración de la segunda dosis de refuerzo semanas después del desafío facilitó el control de la replicación del parásito.

Los datos obtenidos parecen indicar tanto que la administración de una segunda dosis de refuerzo es positiva con respecto a aumentar la inmunidad ya generada gracias a las dosis anteriores, como que la administración de vectores de vacunación que expresan la proteína LACK es compatible con la administración de adyuvantes, aunque es preferible hacerlo .

- **Ejemplo 11: Ensayo de vacunación de perros**

Con el propósito de comprobar la efectividad como vacunas de los vectores de la invención, administrándolos a perros, que constituyen un reservorio natural de la enfermedad, se efectuó un ensayo en el que se comprobó la protección frente a *Leishmania infantum* conferida por la vacunación del vector de la invención MVA-LACK, en combinación con una dosis inicial del plásmido DNA-LACK, comparando su eficacia con la del virus recombinante derivado de vaccinia rVV-LACK que lleva insertada la secuencia correspondiente a LACK en los locus de timidina quinasa, TK (en otras palabras, éste se corresponde con el vector que se ha denominado VV-LACK TK- anteriormente en la presente memoria) .

11.1 Animales

Para los experimentos descritos en este ensayo se utilizaron cuatro grupos de perros. Se seleccionaron un total de 16 animales de una colonia de perros de la raza Beagle, procedentes de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad de Zaragoza y mantenidos allí en condiciones diseñadas para excluir cualquier posible infección contaminante con *Leishmania*. Los perros eran de edades comprendidas entre los 18 meses y los 4,5 años, estaban bien alimentados, y habían sido mantenidos en vigilancia continua por veterinarios para controlar la aparición de problemas de salud y habían recibido todas las vacunaciones rutinarias contra leptospirosis, moquillo, adenovirus-2, hepatitis, parainfluenza y parvovirus (Hipradog 7, Hipra, Amer, España). Los perros fueron tratados también con fármacos antihelmínticos (Dontal Plus, Bayer, Alemania). Todos ellos eran negativos respecto a la presencia de anticuerpos contra *Leishmania* según las pruebas realizadas por inmunofluorescencia indirecta (IFI), ensayos de aglutinación directa (DAT) y ELISA.

Los perros se dividieron en cuatro grupos de vacunación:

- El primer grupo, que se utilizó como control negativo, no recibió ni vacunación ni inoculación de *L. infantum*. Los perros de este grupo recibieron en el día 0 0,5 ml de solución salina por vía intravenosa (47,48).
- El segundo grupo se utilizó como control positivo. Los perros no recibieron vacunación, aunque sí se les inoculó *L. infantum*.
- El tercer grupo fue vacunado con dos dosis del gen codificante de LACK, una en el día -30 con el plásmido DNA-LACK (100 µg) y la segunda en el día -15 con el virus recombinante derivado de vaccinia rVV-LACK (10⁸ ufp/perro).

- Al cuarto grupo se le inoculó una dosis del plásmido DNA-LACK (100 µg) en el día -30 y una segunda dosis del gen codificante de LACK mediante el virus MVA-LACK (10⁸ ufp/perro).

A los perros de todos los grupos, excepto los del Grupo 1 (control negativo), se les inocularon por vía intravenosa, en 0,5 ml de solución salina, 10⁸ promastigotes de *Leishmania infantum*, obtenidos tal como se especifica en el apartado 11.2. El día de la inoculación de los parásitos se consideró el día 0 del experimento. En la Tabla 8 se muestra un resumen de las inoculaciones recibidas por cada grupo

Tabla 8: Grupos del ensayo de vacunación de perros

	DOSIS INICIAL (Día -30))	DOSIS DE REFUERZO (Día -15)	DESAFÍO (Día 0)
GRUPO 1 (5 perros)	-	-	0,5 ml solución salina
GRUPO 2 (3 perros)	-	-	<i>L. infantum</i> (1 x 10 ⁸ ufp)
GRUPO 3 (4 perros)	DNA-LACK (100 µg)	rVV-LACK (1 x 10 ⁸ ufp)	<i>L. infantum</i> (1 x 10 ⁸ ufp)
GRUPO 4 (4 perros)	DNA-LACK (100 µg)	MVA-LACK (1 x 10 ⁸ ufp)	<i>L. infantum</i> (1 x 10 ⁸ ufp)

11.2. Aislamiento de parásitos para infección experimental, ensayos de aglutinación directa y ELISA

Los promastigotes de *L. infantum* utilizados para desencadenar la infección experimental se obtuvieron de un perro de la zona de Zaragoza, infectado de forma natural con *L. infantum* y que no había recibido tratamiento (MON 1/MCAN/ES/01/LLM 996, Servicio de Referencia de Parasitología, Majadahonda, España). Los parásitos se obtuvieron por aspiración de la médula ósea y los ganglios poplíteos, se cultivaron en medio NNN (Novy-Nicolle-McNeal), medio en el que se realizaron dos pases, y a continuación se multiplicaron en RPMI (Sigma, Reino Unido) suplementado con glutamina 2 mM, 100 µg/ml de estreptomycin y 100 U/ml de penicilina y que contenía suero bovino fetal (FCS) inactivado por calor (Sigma, Reino Unido) al 10%. Los promastigotes estacionarios se recuperaron mediante centrifugación, se resuspendieron en PBS, se ajustó su concentración a (1 x 10⁸ ufp)/0,5 ml y se les inyectaron a los perros por vía intravenosa (49,50).

También se cultivaron promastigotes de *L. infantum* en medio RPMI que contenía suero fetal de ternera al 10%, a 26°C, para utilizarse en el ensayo de aglutinación directa y en el inmunofluorescencia. Los promastigotes se recolectaron a 3600 x g durante 10 minutos a 4°C. Después de cinco lavados, se añadieron al sedimento 20 volúmenes de tripsina (0,4% p/v, de Difco), se incubó la mezcla a 37°C durante 45 minutos y posteriormente se lavó cinco veces más en solución de Locke fría (NaCl 154 mM, KCl 6 mM, NaHCO₃ 2 mM pH 7,7). Se contaron las células y se resuspendieron hasta alcanzar una concentración final de 1 x 10⁸ células/ml.

Para la preparación del antígeno soluble de *Leishmania*, los promastigotes fueron cultivados en medio RPMI 1640 (Gibco) suplementado con FCS inactivado por calor al 10%, 100 µg/ml de estreptomycin y 100 U/ml de penicilina (Gibco). Los parásitos se recolectaron al final de la fase logarítmica, se lavaron con PBS y se fragmentaron mediante tres ciclos de congelación-descongelación. Después los parásitos se sonicaron y se centrifugaron a 16000 x g durante 3 minutos a 4°C, recogiendo el sobrenadante. A continuación, se determinó la concentración de proteínas utilizando el método de Bradford con el kit para ensayo de proteínas de BioRad (Bio-Rad Protein Assay, BioRad Laboratories).

11.3. Evaluación de la susceptibilidad o resistencia a la infección

Se comprobó regularmente en los perros la aparición de signos de la infección parasitaria y el desarrollo de la enfermedad realizando en dichos animales los exámenes rutinarios en busca de signos clínicos clásicos tales como lesiones cutáneas, alopecia, presencia de linfadenopatías poplíteas, pérdida de peso, ulceración de la piel y palidez en las mucosas. Durante los primeros seis meses del experimento, se tomaron muestras de sangre de los animales cada dos semanas para realizar determinaciones bioquímicas, serológicas y de ARNm de citoquinas. A partir de ese momento y hasta el final del experimento, las extracciones de sangre se llevaron a cabo mensualmente. La presencia de parásitos y el posible desarrollo de la enfermedad se detectó mediante un ensayo de aglutinación directa (DAT), según se describe en el apartado 11.4. (51,52,53), así como mediante un ensayo serológico de inmunofluorescencia indirecta (IFI) con anticuerpos específicos anti-*Leishmania*, tal como se describe en el mismo apartado.

La carga de parásitos en el hígado y el bazo se cuantificó siguiendo el método de Baumann (54). Brevemente, cada grupo de muestras de tejido se pesó antes de contar en muestras finas de tejido observadas al microscopio el número de parásitos correspondiente a 500 núcleos celulares. La carga total de parásitos por órgano se determinó según la fórmula

$$\text{Carga total de parásitos} = n^{\circ} \text{ amastigotes/núcleo} \times \text{peso del órgano (mg)} \times 2 \times 10^5$$

y es la media de tres determinaciones independientes. La presencia o ausencia de parásito confirma si ha habido infección o no.

Adicionalmente al examen de biopsias, la presencia de parásitos se intentó determinar también mediante el método de "aislamiento", que consiste en cultivar tejido linfático de ganglio linfático en medio NNN para intentar que crezca el parásito y aislarlo. Sin embargo, las dificultades para obtener éxito con este método son considerables y, por eso, no en todos los casos en los que se detecta el parásito por biopsia se consigue el aislamiento. Por ello, la presencia de parásitos obtenida por biopsia se consideró suficiente para hacer el diagnóstico.

11.4. Ensayos serológicos de presencia de parásitos: DAT e IFI

Para realizar el ensayo de DAT, a una suspensión de promastigotes de *L. infantum* (1×10^8 células/ml, preparadas para el ensayo de aglutinación según se describe en el apartado 11.2) se le añadió un volumen igual de solución de formaldehído y se incubó la mezcla durante toda la noche a temperatura ambiente (RT). La suspensión se centrifugó (3600 x g, 10 minutos) para retirar el formaldehído y se resuspendió en una solución con citrato sódico (NaCl 150 mM, citrato sódico 50 mM pH 7,4) que contenía 0,1% (p/v) de azul de Coomassie. Tras 90 minutos de incubación a RT, se retiró el exceso de colorante por centrifugación en la misma solución con citrato (3600 x g, 10 minutos) y se resuspendió finalmente en solución con citrato que contenía 0,4% de formaldehído. Las muestras se almacenaron en oscuridad a 4°C, listas para utilizarse.

El ensayo se llevó a cabo en una placa de microtitulación de 96 pocillos con forma de V (Costar, EE.UU). Se añadieron un total de 50 µl de la suspensión de parásitos a cada uno de los pocillos, en los que previamente se habían cargado diluciones seriadas de los sueros de los perros, partiendo de la dilución 1:100. Las placas se agitaron suavemente durante 1 minuto y a continuación se incubaron a RT durante toda la noche en una cámara húmeda. Se detectó la presencia de agregados azules mediante observación directa (dos medidas independientes), lo que se correlacionó con las diluciones de los sueros. Los valores superiores a 1:800 se consideraron positivos.

En cuanto al ensayo de inmunofluorescencia, el suero del perro que se desea analizar se hace reaccionar con una preparación de *Leishmania* sobre un portaobjetos, se incuba a 4°C durante 30-45 minutos y a continuación se incuba la preparación con un suero anti-perro conjugado con fluoresceína, durante al menos 1 hora, de manera que, si en el suero del perro existe un anticuerpo específico capaz de reconocer el parásito *Leishmania*, éste se marcará en verde. Se consideran positivos aquellos sueros con un valor igual o superior a 1/80 (55,56).

Los resultados obtenidos con cada uno de los perros se resumen en la Tabla 9, junto a los correspondientes a la presencia de parásitos y el desarrollo o no de infección. En dicha tabla, las celdas correspondientes a los ensayos serológicos y ensayos de presencia de parásitos en los que aparecen datos, corresponden a perros en los que se obtuvieron resultados positivos. Los números indicados entre paréntesis corresponden al día de estabilización de los datos correspondientes.

Tabla 9.- Resultados de presencia de parásitos y desarrollo de la enfermedad en perros según el grupo de inmunización

Grupo	Perro	Serología		Presencia de parásitos		Infección/ Enfermedad
		DAT	IFI	Aislamiento	Biopsia*	
Control Positivo (2)	I8	1/6400 (406)	1/1280(406)	(426)	(406)	Sí
	D9	1/1600 (320)	1/5120 (320)	(436)	(330)	Sí
	O1	1/800 (260)	1/5120 (260)	(436)	(290)	Sí
	O2	1/6400 (289)	1/640 (320)	(426)	(426)	Sí
	O3	1/3200 (320)	1/1240(320)	(436)	(426)	Sí
Control Negativo (1)	O4	-	-	-	-	No
	O5	-	-	-	-	No
	O6	-	-	-	-	No
DNA-LACK/ rVV-LACK (3)	I9	1/1600 (410)	1/160 (350)	(-)	(436)	Sí
	D4	-	-	-	-	No
	D5	-	-	-	-	No
	D7	-	-	-	-	No
DNA-LACK/ MVA-LACK (4)	I2	-	-	-	-	No
	I3	-	-	-	-	No
	I7	-	-	-	-	No
	D3	1/1600 (320)	1/640 (320)	-	(436)	Sí

5 11.5. Determinación de IgG1 e IgG2

Adicionalmente, se llevó a cabo una determinación de IgG1 e IgG2 en las muestras de plasma obtenidas de las muestras de sangre extraídas a lo largo del período de ensayo. En concreto, se realizó una determinación mediante ELISA de los anticuerpos específicos contra el antígeno soluble de *Leishmania* (SLA), obtenido según se describe en el apartado 11.2. Brevemente, las placas de ELISA se recubrieron con 10 µg/ml de SLA bloqueado con PBS que contenía 1% de BSA, y luego se incubaron con 100 µl de suero de perro diluido 1:100. Después de lavar tres veces, se añadieron 100 µl/pocillo de los anticuerpos conjugados con HRP siguientes: un anticuerpo de cabra anti-IgG1 de perro (1:15000) o un anticuerpo de oveja anti-IgG1 de perro (1:20000), ambos de Bethyl Laboratories (Montgomery, TX, EE.UU.). Los anticuerpos se incubaron con el sustrato OPD (Zymed Laboratories, Invitrogen Immunodetection). La absorbancia se leyó a 450 nm, asignando arbitrariamente en cada grupo el valor 1 al valor medio correspondiente a las muestras obtenidas en el día -30 del experimento y calculando para el resto de las muestras el valor n, correspondiente al tanto por 1 de incremento en la absorbancia con respecto al valor obtenido en el día -30.

Los resultados obtenidos se representan en la Figura 21. Tal como puede observarse en ella, la producción de IgG1 e IgG2 es similar en los dos grupos de perros vacunados, aunque ligeramente más elevada en los perros vacunados con el vector derivado de la cepa Western Reserve de Vaccinia, (rVV-LACK). La activación del sistema Th1/Th2 es similar en ambos casos. En el caso de las IgG1, al cabo de seis meses los valores se acercan a los del control, mientras que en el caso de las IgG2, que se relacionan con la respuesta protectora, los niveles se mantienen altos y por encima de los controles (positivo y negativo) hasta el final del experimento, tanto en los perros inmunizados con el vector rVV-LACK como en los inmunizados con MVA-LACK. Esto sugiere que la vacunación con DNA-LACK/MVA-LACK induce una respuesta Th1 protectora frente a la infección como sucede con la vacunación con DNA-LACK/rVV-LACK.

Tomados en conjunto, los resultados indican que la vacunación con DNA-LACK y MVA-LACK confiere, a los perros a los que se les administra, una protección frente al desarrollo de la enfermedad similar a la conferida por la vacunación con DNA-LACK y rVV-LACK, obteniéndose en ambos casos una protección experimental de al menos el 75% con respecto a los controles positivos, los cuales mostraron la infección y signos clínicos claros de enfermedad en el 100% de los casos. El ensayo confirma la validez del MVA-LACK, como alternativa a los vectores recombinantes derivados de cepas virulentas de Vaccinia, (como es el caso de rVV-LACK) para la vacunación de

animales mamíferos susceptibles de ser infectados por *Leishmania* y en particular de perros. Frente a esos vectores, además, el MVA-LACK representa una alternativa mucho más segura, al tratarse de un virus atenuado.

Referencias

1. Ahmed, S. B., C. Bahloul, C. Robbana, S. Askri, and K. Dellagi. 2004. A comparative evaluation of different DNA vaccine candidates against experimental murine leishmaniasis due to *L. major*. *Vaccine* 22:1631-9.
2. Altenburger, W., C. P. Suter, and J. Altenburger. 1989. Partial deletion of the human host range gene in the attenuated vaccinia virus MVA. *Arch Virol* 105:15-27.
3. Berrahal, F., C. Mary, M. Roze, A. Berenger, K. Escoffier, D. Lamouroux, and S. Dunan. 1996. Canine leishmaniasis: identification of asymptomatic carriers by polymerase chain reaction and immunoblotting. *Am J Trop Med Hyg* 55:273-7.
4. Blanchard, T. J., A. Alcamí, P. Andrea, and G. L. Smith. 1998. Modified vaccinia virus Ankara undergoes limited replication in human cells and lacks several immunomodulatory proteins: implications for use as a human vaccine. *J Gen Virol* 79 (Pt 5):1159-67.
5. Caver, T. E., T. D. Lockey, R. V. Srinivas, R. G. Webster, and J. L. Hurwitz. 1999. A novel vaccine regimen utilizing DNA, vaccinia virus and protein immunizations for HIV-1 envelope presentation. *Vaccine* 17:1567-72.
6. Drexler, I., K. Heller, B. Wahren, V. Erfle, and G. Sutter. 1998. Highly attenuated modified vaccinia virus Ankara replicates in baby hamster kidney cells, a potential host for virus propagation, but not in various human transformed and primary cells. *J Gen Virol* 79 (Pt 2):347-52.
7. Gonzalez-Aseguinolaza, G., S. Taladriz, A. Marquet, and V. Larraga. 1999. Molecular cloning, cell localization and binding affinity to DNA replication proteins of the p36/LACK protective antigen from *Leishmania infantum*. *Eur J Biochem* 259:909-16.
8. Gonzalo, R. M., G. del Real, J. R. Rodriguez, D. Rodriguez, R. Heljasvaara, P. Lucas, V. Larraga, and M. Esteban. 2002. A heterologous prime-boost regime using DNA and recombinant vaccinia virus expressing the *Leishmania infantum* P36/LACK antigen protects BALB/c mice from cutaneous leishmaniasis. *Vaccine* 20:1226-31.
9. Gonzalo, R. M., J. R. Rodriguez, D. Rodriguez, G. Gonzalez-Aseguinolaza, V. Larraga, and M. Esteban. 2001. Protective immune response against cutaneous leishmaniasis by prime/booster immunization regimens with vaccinia virus recombinants expressing *Leishmania infantum* p36/LACK and IL-12 in combination with purified p36. *Microbes Infect* 3:701-11.
10. Gradoni, L. 2001. An update on antileishmanial vaccine candidates and prospects for a canine *Leishmania* vaccine. *Vet Parasitol* 100:87-103.
11. Gurunathan, S., D. L. Sacks, D. R. Brown, S. L. Reiner, H. Charest, N. Glaichenhaus, and R. A. Seder. 1997. Vaccination with DNA encoding the immunodominant LACK parasite antigen confers protective immunity to mice infected with *Leishmania major*. *J Exp Med* 186:1137-47.
12. Hanke, T., T. J. Blanchard, J. Schneider, C. M. Hannan, M. Becker, S. C. Gilbert, A. V. Hill, G. L. Smith, and A. McMichael. 1998. Enhancement of MHC class I-restricted peptide-specific T cell induction by a DNA prime/MVA boost vaccination regime. *Vaccine* 16:439-45.
13. Hanke, T., and A. McMichael. 1999. Pre-clinical development of a multi-CTL epitope-based DNA prime MVA boost vaccine for AIDS. *Immunol Lett* 66:177-81.
14. Hanke, T., V. C. Neumann, T. J. Blanchard, P. Sweeney, A. V. Hill, G. L. Smith, and A. McMichael. 1999. Effective induction of HIV-specific CTL by multi-epitope using gene gun in a combined vaccination regime. *Vaccine* 17:589-96.
15. Kent, S. J., A. Zhao, S. J. Best, J. D. Chandler, D. B. Boyle, and I. A. Ramshaw. 1998. Enhanced T-cell immunogenicity and protective efficacy of a human immunodeficiency virus type 1 vaccine regimen consisting of consecutive priming with DNA and boosting with recombinant fowlpox virus. *J Virol* 72:10180-8.
16. Kim, J. J., M. L. Bagarazzi, N. Trivedi, Y. Hu, K. Kazahaya, D. M. Wilson, R. Ciccarelli, M. A. Chattergoon, K. Dang, S. Mahalingam, A. A. Chalian, M. G. Agadjanyan, J. D. Boyer, B. Wang, and D. B. Weiner. 1997. Engineering of in vivo immune responses to DNA immunization via codelivery of costimulatory molecule genes. *Nat Biotechnol* 15:641-6.
17. Lanotte, G., J. A. Rioux, J. Perieres, and Y. Vollhardt. 1979. [Ecology of leishmaniasis in the south of France. 10. Developmental stages and clinical characterization of canine leishmaniasis in relation to epidemiology. (author's transl)]. *Ann Parasitol Hum Comp* 54:277-95.
18. Li, S., M. Rodrigues, D. Rodriguez, J. R. Rodriguez, M. Esteban, P. Palese, R. S. Nussenzweig, and F. Zavala. 1993. Priming with recombinant influenza virus followed by administration of recombinant vaccinia virus induces CD8+ T-cell-mediated protective immunity against malaria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:5214-8.
19. Liew, F. Y., and C. A. O'Donnell. 1993. Immunology of leishmaniasis. *Adv Parasitol* 32:161-259.
20. Lopez-Fuertes, L., E. Perez-Jimenez, A. J. Vila-Coro, F. Sack, S. Moreno, S. A. Konig, C. Junghans, B. Wittig, M. Timon, and M. Esteban. 2002. DNA vaccination with linear minimalistic (MIDGE) vectors confers protection against *Leishmania major* infection in mice. *Vaccine* 21:247-57.
21. Lopez-Velez, R., J. A. Perez-Molina, A. Guerrero, F. Baquero, J. Villarrubia, L. Escribano, C. Bellas, F. Perez-Corral, and J. Alvar. 1998. Clinicoepidemiologic characteristics, prognostic factors, and survival analysis of patients coinfecting with human immunodeficiency virus and *Leishmania* in an area of Madrid, Spain. *Am J Trop Med Hyg* 58:436-43.

22. Mauricio, I. L., J. R. Stothard, and M. A. Miles. 2000. The strange case of *Leishmania chagasi*. *Parasitol Today* 16:188-9.
23. Mayr, A., H. Stickl, H. K. Muller, K. Danner, and H. Singer. 1978. [The smallpox vaccination strain MVA: marker, genetic structure, experience gained with the parenteral vaccination and behavior in organisms with a debilitated defence mechanism (author's transl)]. *Zentralbl Bakteriol [B]* 167:375-90.
- 5 24. McMahon-Pratt, D., D. Rodriguez, J. R. Rodriguez, Y. Zhang, K. Manson, C. Bergman, L. Rivas, J. F. Rodriguez, K. L. Lohman, N. H. Ruddle, and et al. 1993. Recombinant vaccinia viruses expressing GP46/M-2 protect against *Leishmania* infection. *Infect Immun* 61:3351-9.
- 10 25. Meyer, H., G. Sutter, and A. Mayr. 1991. Mapping of deletions in the genome of the highly attenuated vaccinia virus MVA and their influence on virulence. *J Gen Virol* 72 (Pt 5):1031-8.
26. Paoletti, E. 1996. Applications of pox virus vectors to vaccination: an update. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:11349-53.
27. Ramirez, J. C., M. M. Gherardi, and M. Esteban. 2000. Biology of attenuated modified vaccinia virus Ankara recombinant vector in mice: virus fate and activation of B- and T-cell immune responses in comparison with the Western Reserve strain and advantages as a vaccine. *J Virol* 74:923-33.
- 15 28. Robinson, H. L., D. C. Montefiori, R. P. Johnson, K. H. Manson, M. L. Kalish, J. D. Lifson, T. A. Rizvi, S. Lu, S. L. Hu, G. P. Mazzara, D. L. Panicali, J. G. Herndon, R. Glickman, M. A. Candido, S. L. Lydy, M. S. Wyand, and H. M. McClure. 1999. Neutralizing antibody-independent containment of immunodeficiency virus challenges by DNA priming and recombinant pox virus booster immunizations. *Nat Med* 5:526-34.
- 20 29. Sacks, D., and N. Noben-Trauth. 2002. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. *Nat Rev Immunol* 2:845-58.
30. Sedegah, M., T. R. Jones, M. Kaur, R. Hedstrom, P. Hobart, J. A. Tine, and S. L. Hoffman. 1998. Boosting with recombinant vaccinia increases immunogenicity and protective efficacy of malaria DNA vaccine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:7648-53.
- 25 31. Solano-Gallego, L., J. Llull, G. Ramos, C. Riera, M. Arboix, J. Alberola, and L. Ferrer. 2000. The Ibizian hound presents a predominantly cellular immune response against natural *Leishmania* infection. *Vet Parasitol* 90:37-45.
32. Sutter, G., and B. Moss. 1992. Nonreplicating vaccinia vector efficiently expresses recombinant genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:10847-51.
33. Tapia, E., E. Perez-Jimenez, L. Lopez-Fuertes, R. Gonzalo, M. M. Gherardi, and M. Esteban. 2003. The combination of DNA vectors expressing IL-12 + IL-18 elicits high protective immune response against cutaneous leishmaniasis after priming with DNA-p36/LACK and the cytokines, followed by a booster with a vaccinia virus recombinant expressing p36/LACK. *Microbes Infect* 5:73-84.
- 30 34. Xu, D., and F. Y. Liew. 1994. Genetic vaccination against leishmaniasis. *Vaccine* 12:1534-6.
- 35 35. Zavala, F., M. Rodrigues, D. Rodriguez, J. R. Rodriguez, R. S. Nussenzweig, and M. Esteban. 2001. A striking property of recombinant poxviruses: efficient inducers of in vivo expansion of primed CD8(+) T cells. *Virology* 280:155-9.
36. Melby, P.C., J. Yang, W. Zhao, L.E. Pérez y J. Cheng. 2001. *Leishmania donovani* p36(LACK) DNA vaccine is highly immunogenic but not protective against experimental visceral leishmaniasis. *Infect Immun* 69:4719-4725.
37. Moss, B. 1996. Genetically engineered poxviruses for recombinant gene expression, vaccination, and safety. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 93:11341-11348.
- 40 38. Seki, M., M. Oie, Y. Ichihashi, y H. Shida. 1990. Hemadsorption and fusion inhibition activities of hemagglutinin analyzed by vaccinia virus mutants. *Virology* 175, 372-384.
39. Chakrabarti, S, J.R. Sisler , B. Moss. 1997. Compact, synthetic, vaccina virus early/late promoter for protein expression. *BioTechniques* 23:1094-1097.
- 45 40. Belli, S., A. Formenton, T. Noll, A. Ivens, R. Jacquet, C. Desponds, D. Hofer, y N. Fasel. 1999. *Leishmania major*: histone H1 gene expression from the sw3 locus. *Exp. Parasitol* 91:151-160.
41. Campos-Neto, A., R. Porozzi, K. Greeson, R.M. Coler, J.R. Webb, Y.A. Seiky, S.G. Reed, y G. Grimaldi, Jr. 2001. Protection against cutaneous leishmaniasis induced by recombinant antigens in murine and nonhuman primate models of the human disease. *Infect. Immun.* 69:4103-4108.
- 50 42. Masina, S., M.G.M., S.O. Demotz, y N.J. Fasel. 2003. Protection against cutaneous leishmaniasis in outbred brevet monkeys using a recombinat histone H1 antigen. *J. Infect. Dis.* 188:1250-1257.
43. Ahmed, S., M. Colmenares, L. Soong, K. Goldsmith-Pestana, L. Munstermann, R. Molina y D. McMahon-Pratt. 2003. Intradermal infection model for patogénesis and vaccine studies of murine visceral leishmaniasis. *Infect Immun* 71:401-10.
- 55 44. Bhakuni, V., U.K. Singha, G.P. Dutta, H.B. Levy , y R.K. Maheshawari. 1996. Killing of *Leishmania donovani* amastigotes by poly ICLC in hamsters. *J. Interferon Cytokine Res.* 16:321-325.
45. Green, S.J., M.S. Meltzer, J.B. Hibbs, Jr., y C.A. Nacy. 1990. Activated macrophages destroy intracellular *Leishmania major* amastigotes by and L-arginine-dependent killing mechanism. *J. Immunol* 144:278-283.
46. Liew, F., Y.S. Millot, C. Parkinson, R.M. Palmer, y S. Moncada. 1990. Macropage killing of *Leishmania* parasite in vivo is mediated by nitric oxide from L-arginine. *J. Immunol.* 144:4791-4797.
- 60 47. Martinez-Moreno, A, Martinez-Cruz MS, Blanco A, Hernandez-Rodriguez S. 1993. Immunological histological study of T-and B-lymphocyte activity in canine visceral leishmaniasis. *Vet Parasitol* 51:49-59.
48. Riera, C, Valladares JE, Gállego M, et al. 1999. Serological and parasitological follow-up in dogs experimentally infected with *Leishmania infantum* and treated with meglumine antimoniate. *Vet Parasitol* 84:33-47.
- 65 49. Evans D. 1989. Handbook on isolation characterization and cryopreservation of *Leishmania*. En: UNDP/world Bank/WHO special program for research and training in tropical diseases.

50. WHO Manual on visceral leishmaniasis control. WHO/LEISH/96.40. Ginebra (Suiza):1996; p. 51–70.
51. Boelaert M, El Safi S, Mousa H, et al. 1999. Multi-centre evaluation of repeatability and reproducibility of the direct agglutination test for visceral leishmaniasis. Trop Med Int Health 4(1):31–7.
52. Boelaert M, El Safi S, Jacquet D, Van der Stuyf P, Le Ray D, De Muynck D. 1999. Operational validation of the direct agglutination test for diagnosis of visceral leishmaniasis. Am J Trop Med Hyg 4(1):129–34.
53. Boelaert M, El Safi S, Goetghebeur E, Gomes-Pereira S, Le Ray D, van der Stuyf P. 1999. Latent class analysis permits unbiased estimates of the validity of DAT for the diagnosis of visceral leishmaniasis. Trop Med Int Health 4(5):395–401.
54. Baumann RJ, Hanson WL, McCaen PP, Sjodersma A, Bitonti AJ. 1990. Suppression of both antimony-susceptible and antimony-resistant Leishmania donovani by a bis(benzyl)polyamine analogue. Antimicrob Agents Chemother 34:722–7.
55. Tesouro MA *et al* 1992. Información Veterinaria 127:34–40.
56. Ashford DA *et al*. 1995. Am. J. Trop. Med. Hyg. 53:251–255.

Listado de secuencias

<110> CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

<120> VECTORES RECOMBINANTES BASADOS EN EL VIRUS VACCINIA MODIFICADO DE ANKARA (MVA) COMO VACUNAS CONTRA LA LEISHMANIASIS

<130> PCT-278

<160> 6

<210> 1

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> Cebador

<223> TK-L

<400> 1

tgattagttt gatgcgattc

20

<210> 2

<211> 17

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> Cebador

<223> TK-R

<400> 2

tgtccttgat acggcag

17

<210> 3

<211> 18

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> Cebador

<223> HA-1

<400> 3

gtcacgtgtt accacgca

18

<210> 4

<211> 18

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

ES 2 383 324 T3

	<221> Cebador	
	<223> HA-2	
	<400> 4	
5	gatccgcatac atcgggtgg	18
	<210> 5	
	<211> 18	
10	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<221> Cebador	
	<223> HA-2	
15	<400> 5	
	tgacacgatt accaatac	18
20	<210> 6	
	<211> 939	
	<212> ADN	
	<213> Leishmania infantum	
	<220>	
25	<221> Inserto del MVA-LACK	
	<223> LACK	
	<400> 6	
30	atgaactacg aggggtcacct gaaggggccac cgcggatggg tcacctccct ggccctgcccg 60	
	cagcaggcgg ggtcgtacat caaggtggtg tcgacgtcgc gcgatggcac ggccatctcg 120	
	tggaaagcca accccgaccg ccacagcgtg gacagcgact acggtctgcc gagccaccgc 180	
	ctcgagggcc acaccggctt cgtgtcgtgt gtgtcgtctgg cccacgccac cgactacgcg 240	
	ctgaccgcgt cctgggaccg ctccatccgc atgtgggacc tgcgcaatgg ccagtgccag 300	
	cgcaagttcc tgaagcacac caaggacgtg ctgcgcgtcg ccttctcgcc ggacgaccgc 360	
35	ctgatcgtgt ccgcggggccg cgacaacgtg atccgcgtgt ggaacgtggc gggcgagtgc 420	
	atgcacgagt tcctgcgcga cggccacgag gactgggtga gcagcatctg tttctcgccg 480	
	tcgctggagc atccgatcgt ggtgtccggc agctgggaca acaccatcaa ggtatggaac 540	
	gtgaacgggg gcaagtgtga gcgcacgctc aagggccaca gcaactacgt gtccacggtg 600	
	acggtgtcgc cagacgggtc gctgtgcgcg tccggcggca aggacggcgc ggcgctgctg 660	
40	tgggacctga gcaccggcga gcagctgttc aagatcaacg tggagtcgcc catcaaccag 720	
	atcgccttct cgcccaaccg cttctggatg tgcgtcgcga cggagaggtc tctgtccgtg 780	
	tacgacctgg agagcaaggc tgtgattgcg gagctgacgc cggacggcgc gaagccgtcc 840	
	gagtgcattc ccattgcctg gtccgcgcgac ggcaacactc tgtactccgg tcacaaggac 900	
45	aacctgatcc gcgtgtggtc catctccgac gccgagtaa	939

REIVINDICACIONES

1. Un vector recombinante del virus MVA que comprende una secuencia codificante de la proteína LACK, caracterizado porque la secuencia codificante de la proteína LACK está contenida en un fragmento de ADN que está insertado en el *locus* de hemaglutinina del genoma de MVA entre las regiones flanqueantes derecha e izquierda del gen de la hemaglutinina (HA), fragmento de ADN en el cual hay un promotor sintético temprano/tardío pE/L que está unido a la secuencia codificante de la proteína LACK de forma que el promotor dirige la expresión de dicha secuencia codificante para dar lugar a la proteína LACK.
2. Un vector recombinante del virus MVA según la reivindicación 1, en el que la secuencia codificante de la proteína LACK es la de la especie *Leishmania infantum*.
3. Un vector recombinante del virus MVA según la reivindicación 2, en el que la secuencia codificante de la proteína LACK da lugar a la expresión de una forma de la proteína LACK que contiene la totalidad de sus aminoácidos.
4. Un vector recombinante del virus MVA según la reivindicación 1, que comprende la secuencia codificante de la proteína LACK de *Leishmania infantum*, caracterizado porque la secuencia codificante de la proteína LACK está contenida en un fragmento de ADN que está insertado en el *locus* de hemaglutinina del genoma de MVA entre las regiones flanqueantes derecha e izquierda del gen de la hemaglutinina (HA), fragmento de ADN en el cual hay dos promotores de Vaccinia colocados en dirección opuesta y localizados en una parte del fragmento de ADN alejada de sus extremos, promotores que son un promotor de Vaccinia p7.5 al que está unido un gen de β -gal de forma que el promotor p7.5 dirige su expresión, y el promotor sintético temprano/tardío pE/L al que está unida la secuencia codificante de la proteína LACK de forma que el promotor dirige la expresión de dicha secuencia codificante para dar lugar a la proteína LACK.
5. Una composición que comprende un vector recombinante del virus MVA según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 y, opcionalmente, al menos un adyuvante o vehículo farmacéuticamente aceptable.
6. Una composición según la reivindicación 5, en la que está presente la proteína CD40L.
7. Uso de un vector recombinante del virus MVA según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para la fabricación de un medicamento destinado a ser administrado a un mamífero susceptible de ser infectado por una especie del género *Leishmania*, para la prevención o el tratamiento en dicho mamífero de una enfermedad causada por una especie del género *Leishmania*.
8. Uso según la reivindicación 7, en el que la enfermedad se corresponde con la leishmaniasis visceral.
9. Uso según la reivindicación 8, en el que la leishmaniasis visceral está causada por *Leishmania infantum*.
10. Uso según la reivindicación 9, en el que el mamífero susceptible de ser infectado por dicha especie del género *Leishmania* al que está destinado el medicamento es un ser humano.
11. Uso según la reivindicación 7, en el que la enfermedad se corresponde con la leishmaniasis cutánea.
12. Uso según la reivindicación 11, en el que la leishmaniasis cutánea está causada por *Leishmania major*.
13. Uso según la reivindicación 12, en el que el mamífero susceptible de ser infectado por dicha especie del género *Leishmania* al que está destinado el medicamento es un ser humano.
14. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 13, en el que el medicamento está destinado a ser administrado en una única dosis de vacunación.
15. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 13, en el que el medicamento está destinado a ser administrado en al menos una de las dosis de vacunación que constituyen un protocolo de vacunación constituido por al menos dos dosis de vacunación, cada una de las cuales se administra espaciadas en el tiempo.
16. Uso según la reivindicación 15, en el que el medicamento está destinado a ser administrado tanto en la primera dosis de vacunación que desencadena la respuesta inmune como en al menos una de las dosis de vacunación posteriores a la primera.
17. Uso según la reivindicación 15, en el que el medicamento está destinado a ser administrado solamente en la primera dosis de vacunación que desencadena la respuesta inmune, estando ausente de las dosis de vacunación posteriores a la primera.

18. Uso según la reivindicación 17, en el que el medicamento está destinado a ser administrado solamente en la primera dosis de vacunación que desencadena la respuesta inmune, conteniendo al menos una de las dosis de vacunación posteriores a la primera de las que está ausente el medicamento un vector recombinante diferente que es también un sistema de expresión de la proteína LACK o de un fragmento inmunogénico de la misma.
- 5 19. Uso según la reivindicación 15, en el que el medicamento está destinado a ser administrado en al menos una de las dosis de vacunación posteriores a la primera, estando ausente de la primera dosis de vacunación.
- 10 20. Uso según la reivindicación 19, en el que el medicamento está destinado a ser administrado en al menos una de las dosis de vacunación posteriores a la primera, conteniendo la primera dosis de vacunación de la que está ausente el medicamento un vector recombinante diferente que es también un sistema de expresión de la proteína LACK o de un fragmento inmunogénico de la misma.
- 15 21. Uso según la reivindicación 20, en el que el medicamento está destinado a ser administrado en al menos una de las dosis de vacunación posteriores a la primera, conteniendo la primera dosis de vacunación de la que está ausente el medicamento un ADN desnudo que es también un sistema de expresión de la proteína LACK o de un fragmento inmunogénico de la misma.
- 20 22. Uso según la reivindicación 7, en el que el mamífero susceptible de ser infectado por una especie del género *Leishmania* al que está destinado el medicamento es un perro.
23. Uso según la reivindicación 22, en el que la leishmaniasis está causada por *Leishmania infantum*.

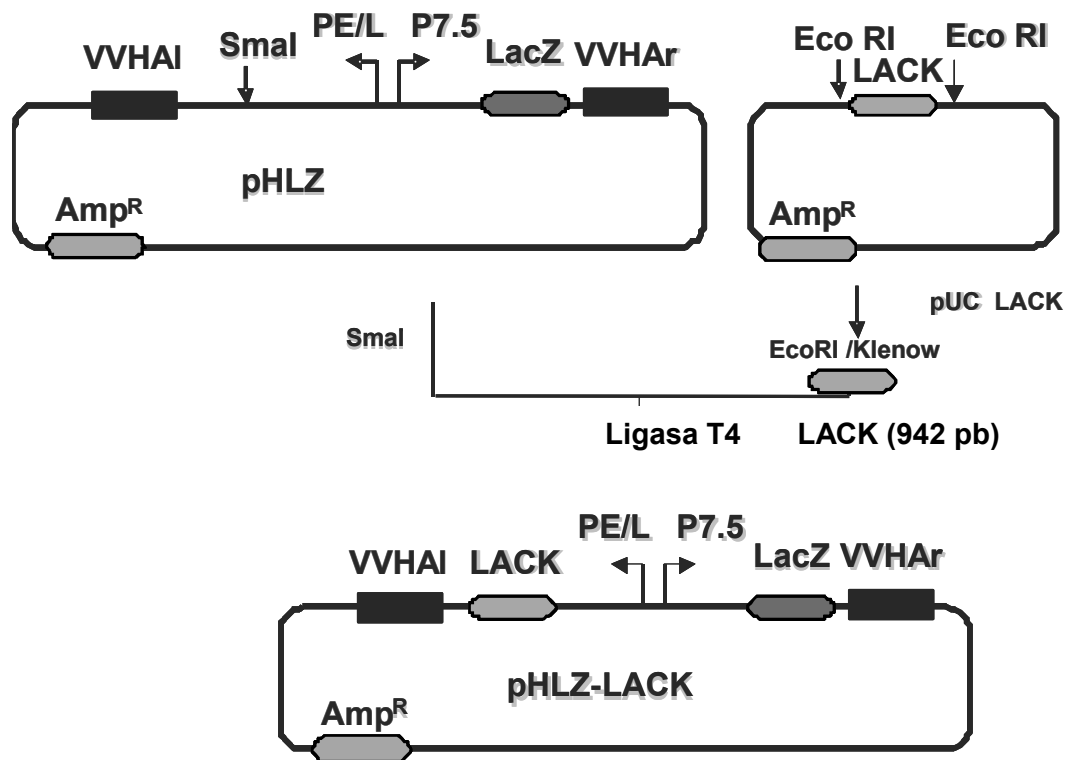
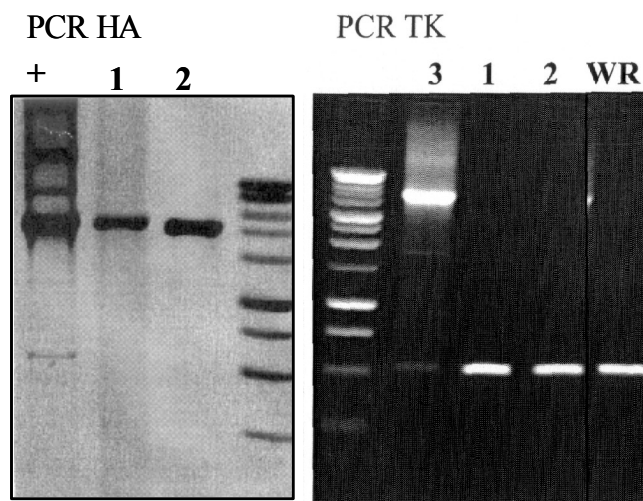
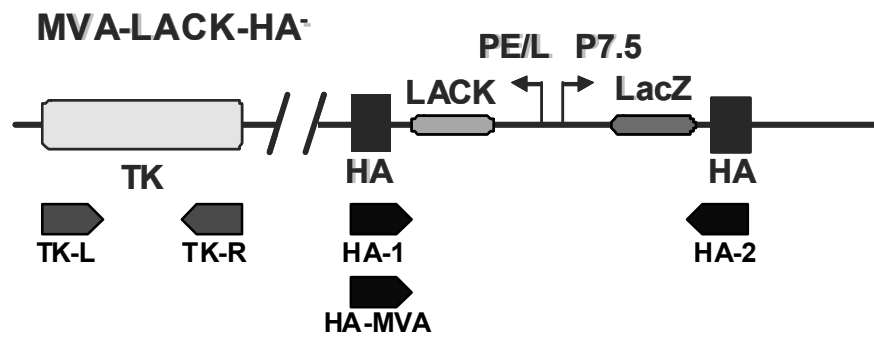


Figura 1



+: pHLZ-LACK
1: VV-LACK HA-
2: MVA-LACK
3: VV-LACK TK-

Figura 2

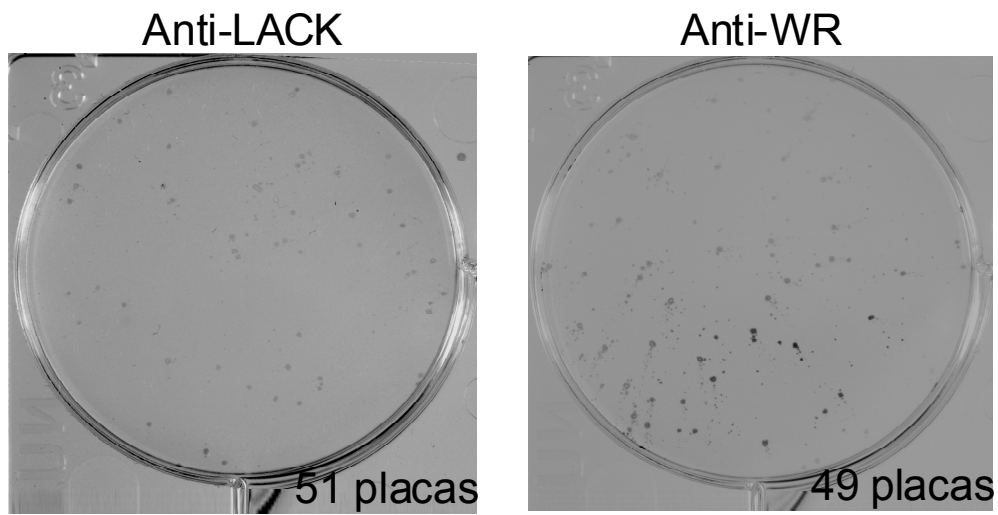


Figura 3

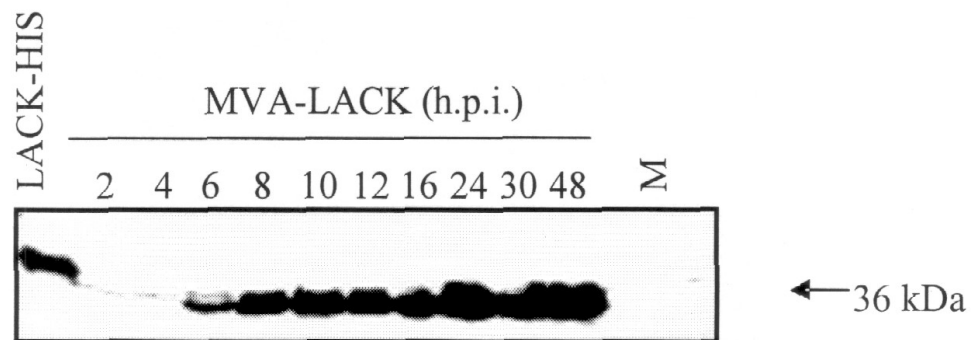
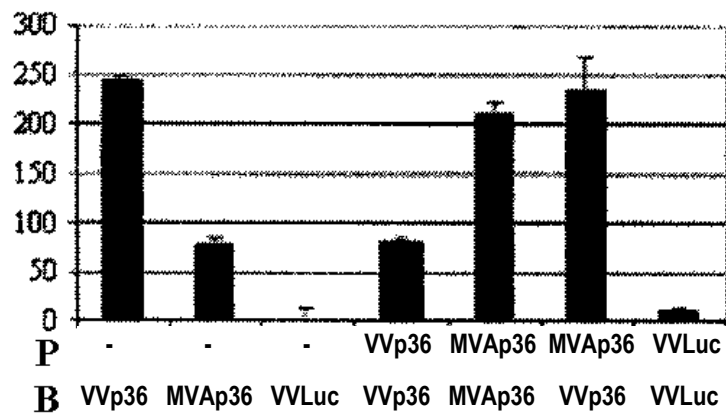


Figura 4

A



B

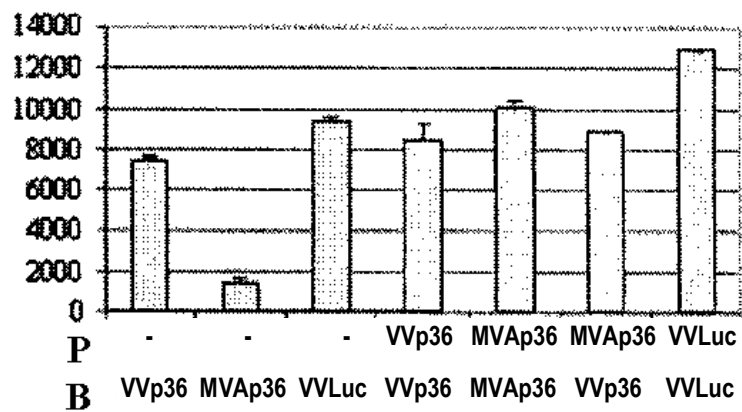


Figura 5

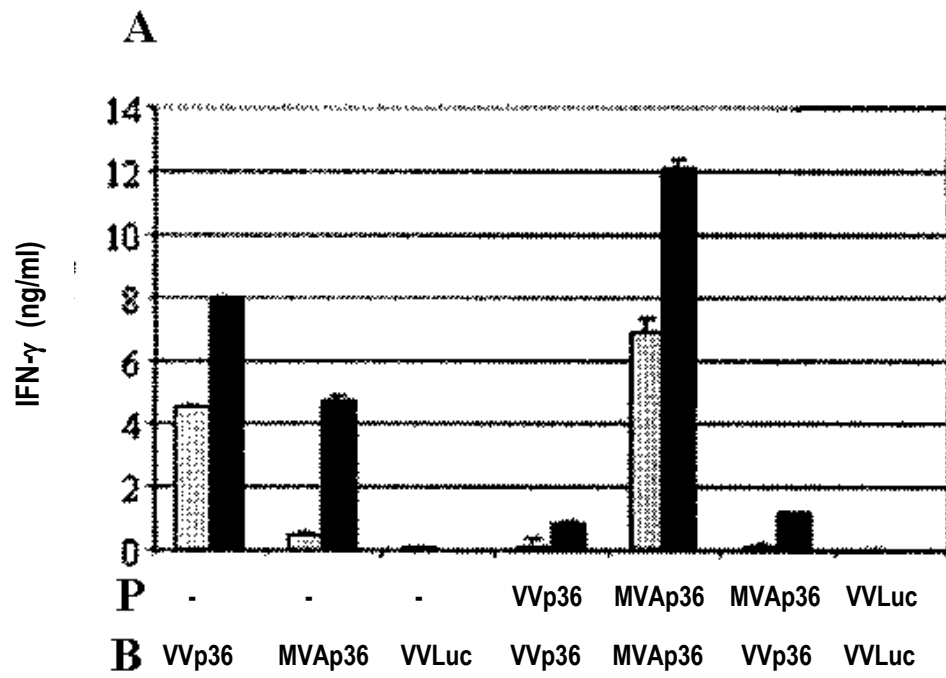


Figura 6

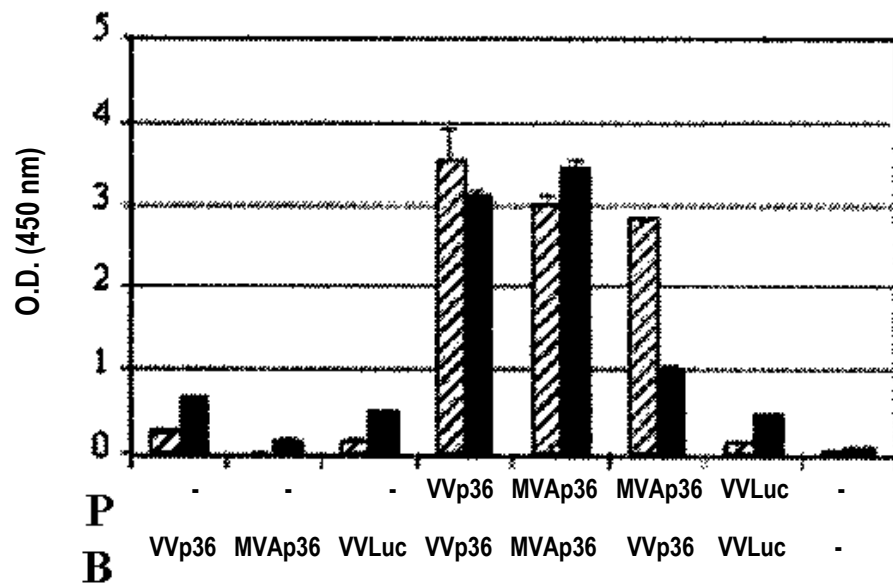


Figura 7

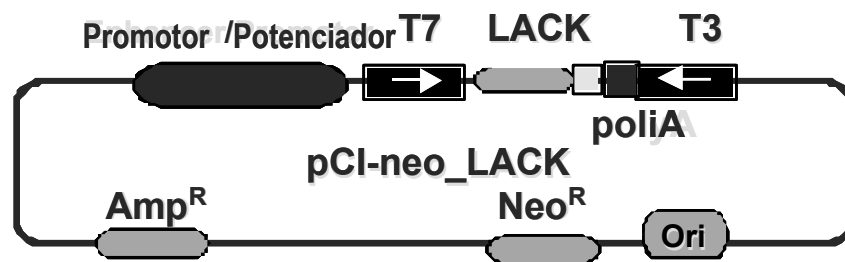
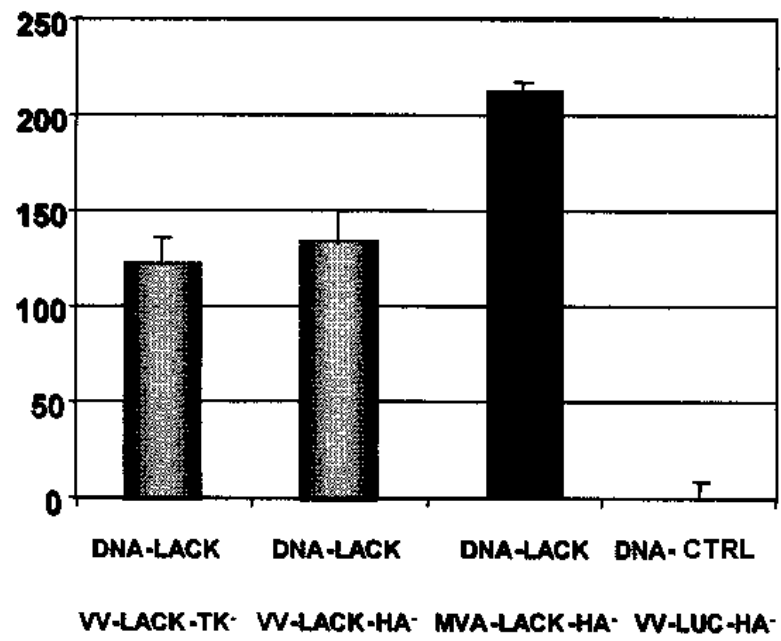


Figura 8

A



B

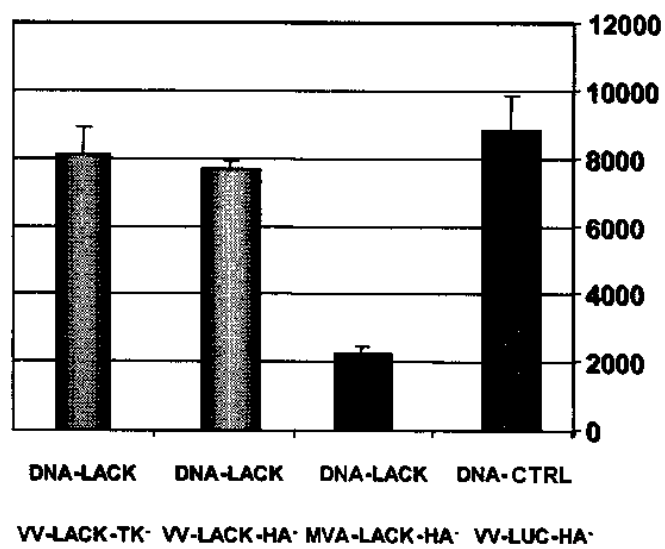
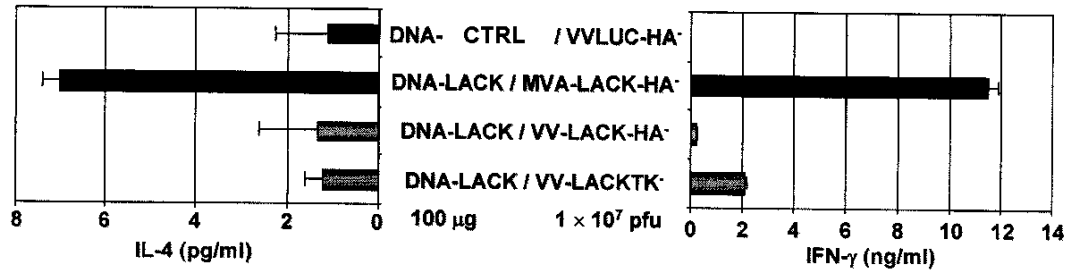


Figura 9

● LACK



● PEPT-II

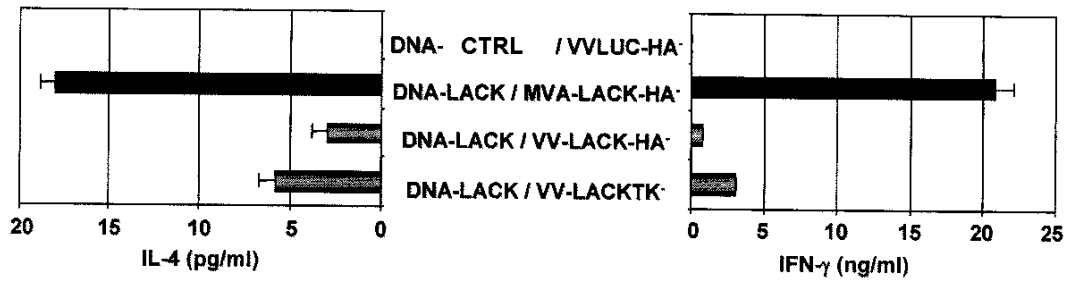
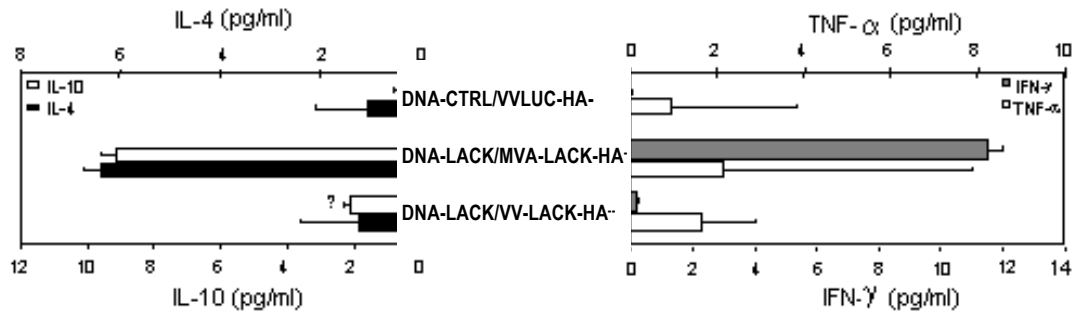


Figura 10a

● LACK



● PEPT-II

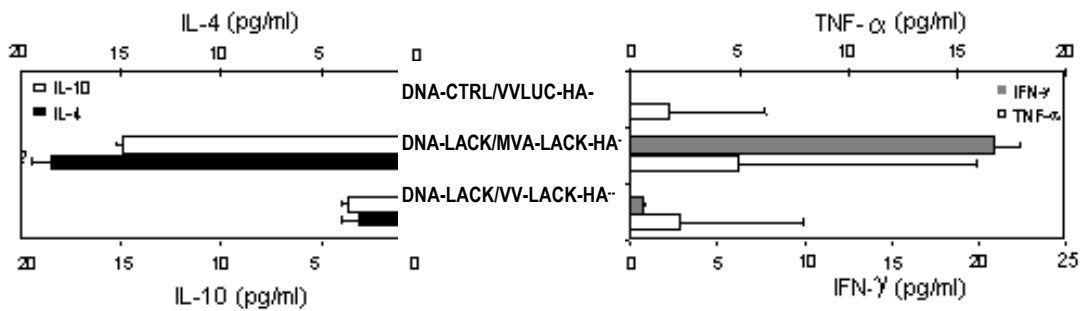


Figura 10b

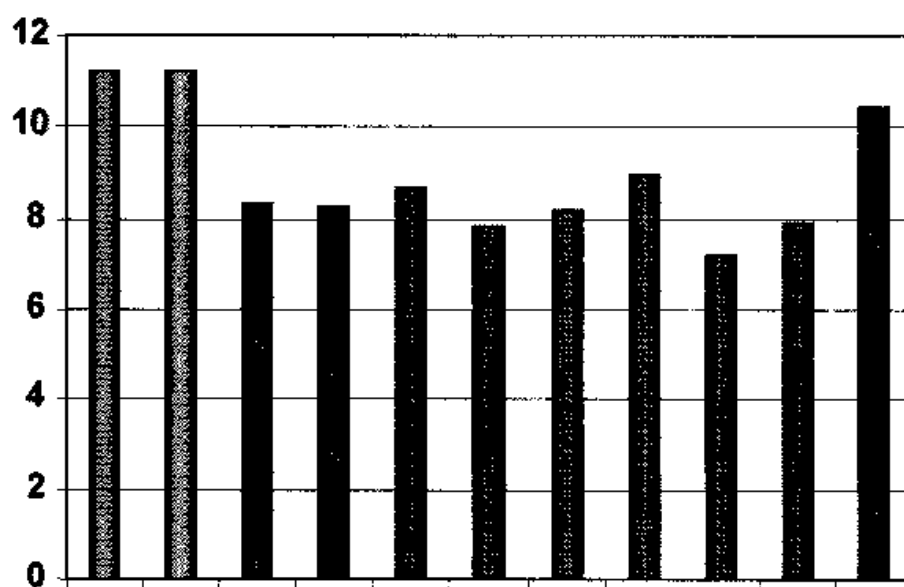
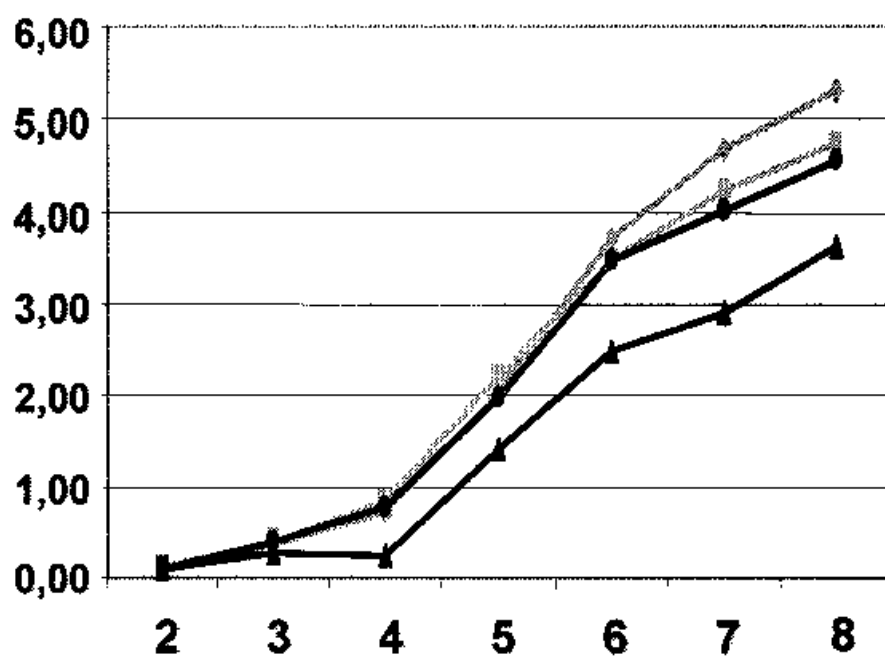
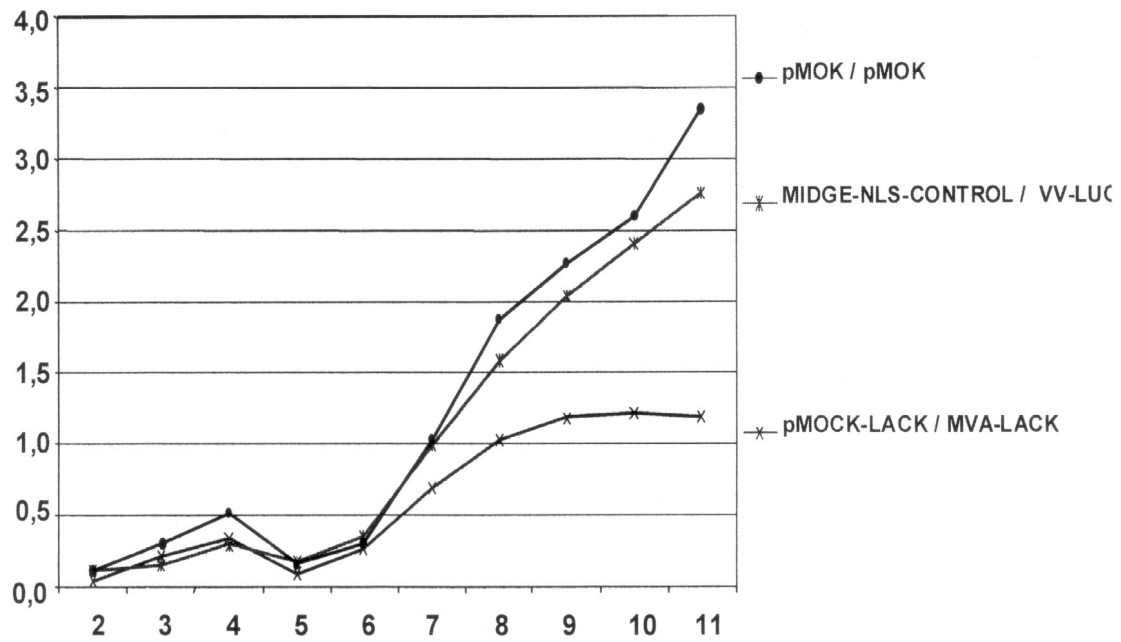


Figura 11

A



B

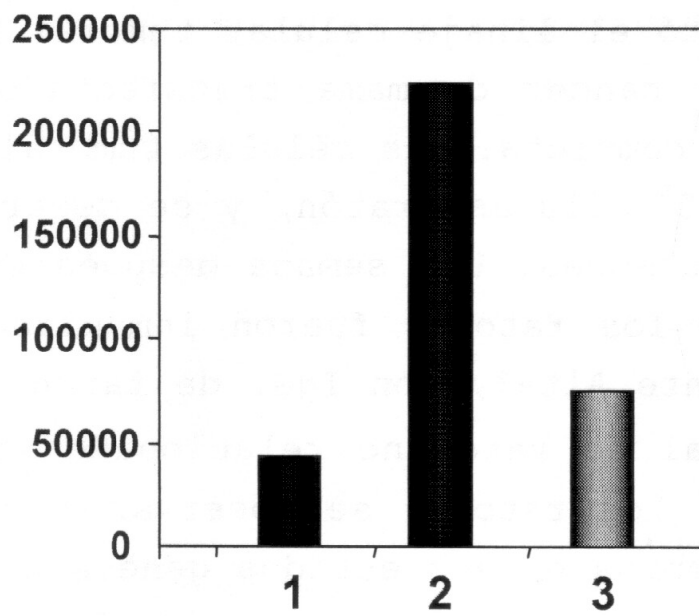


Figura 12

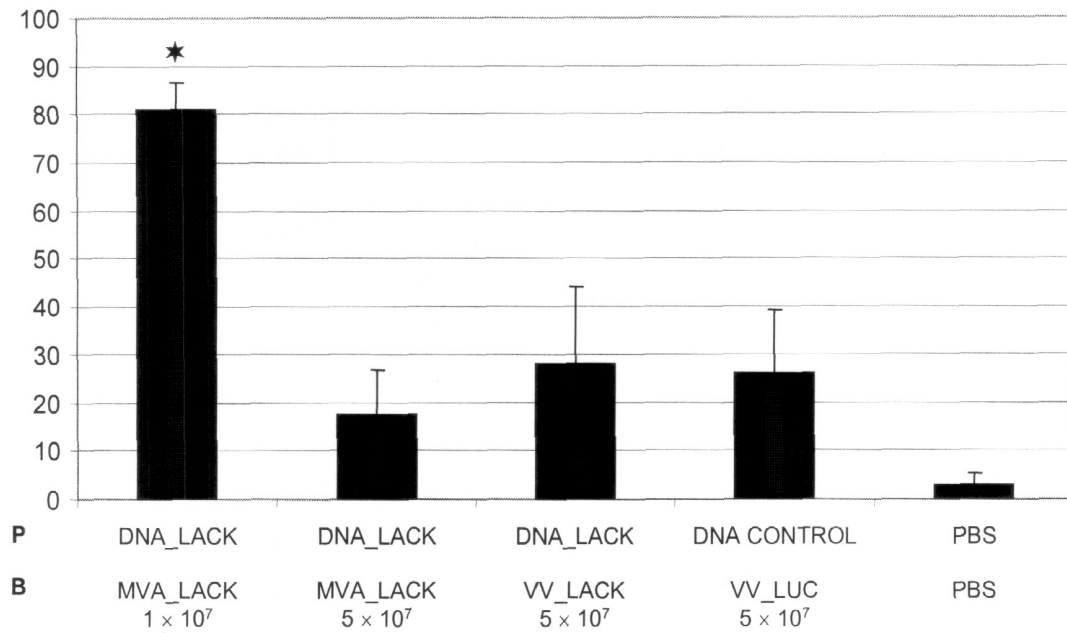


Figura 13

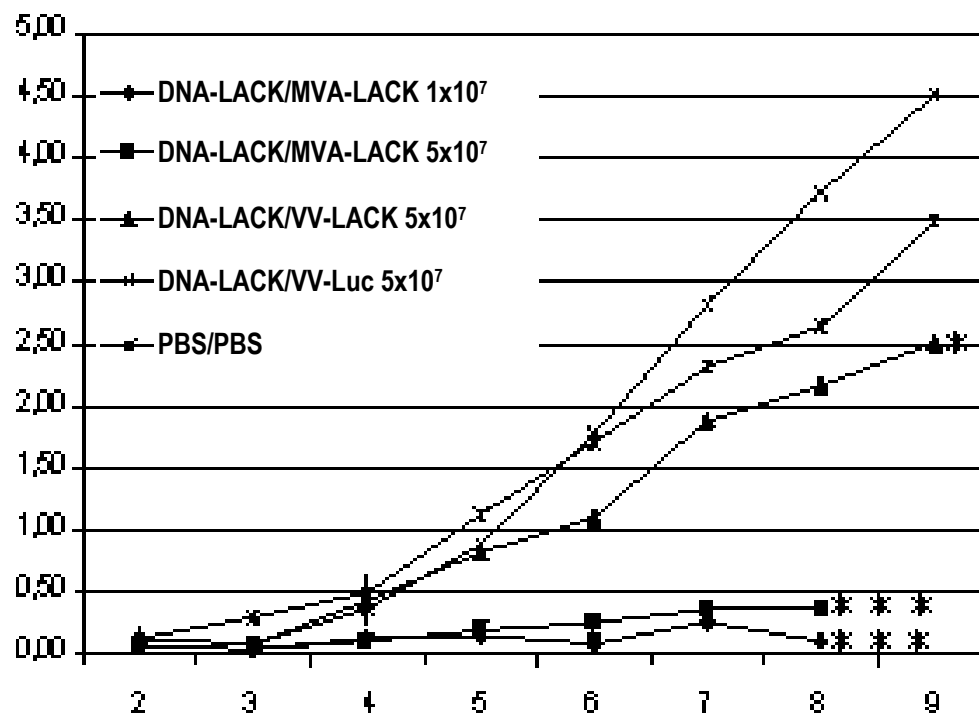


Figura 14

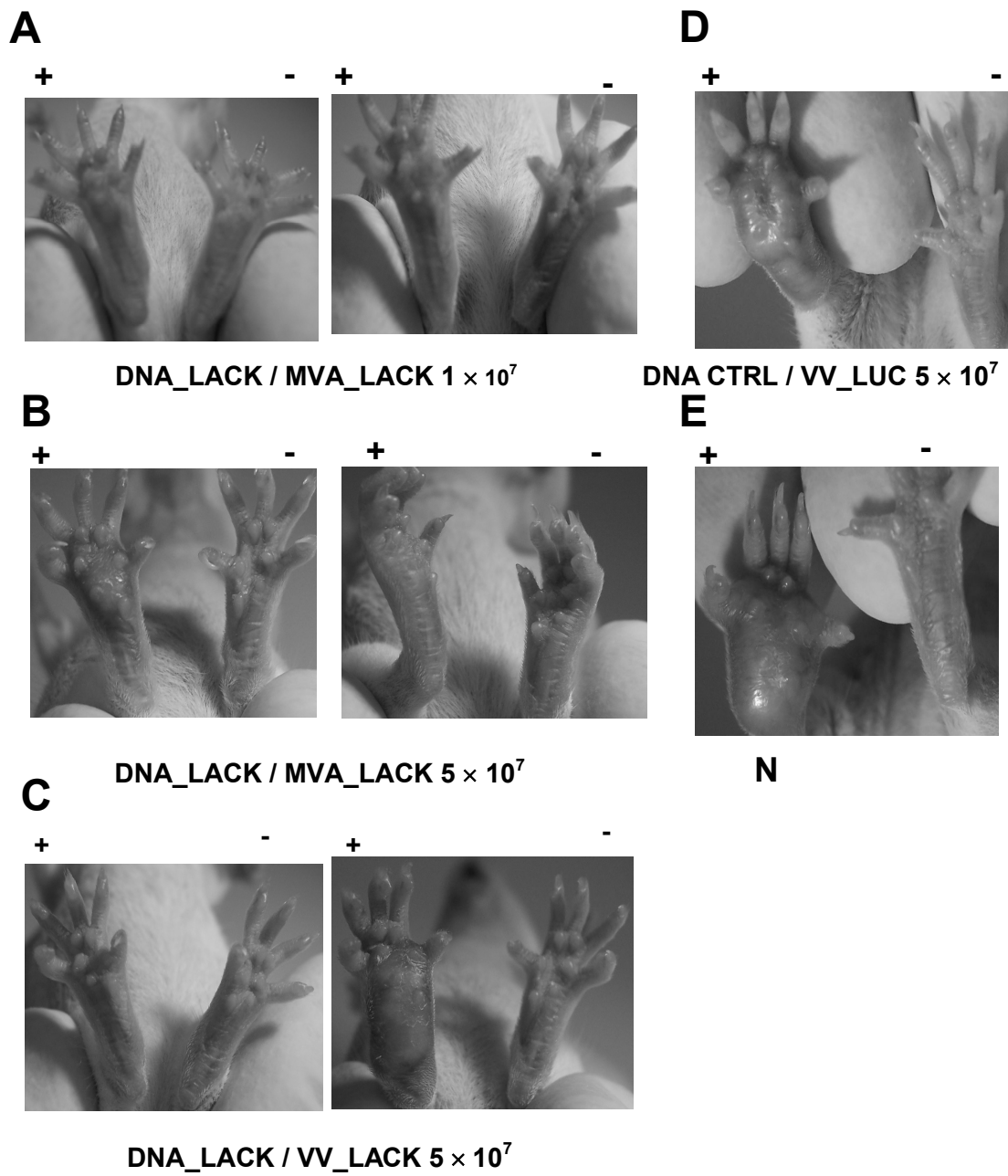


Figura 15

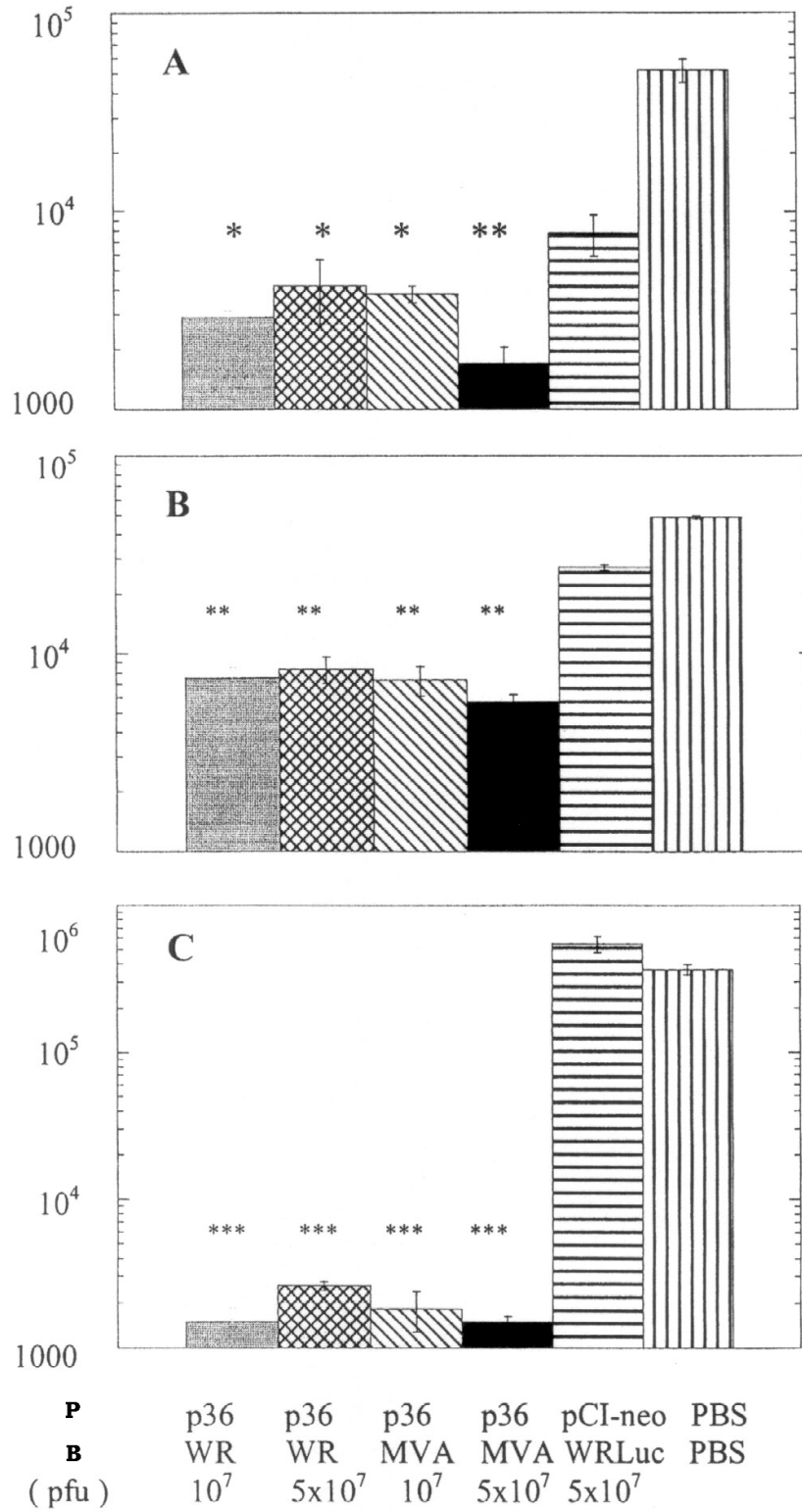


Figura 16

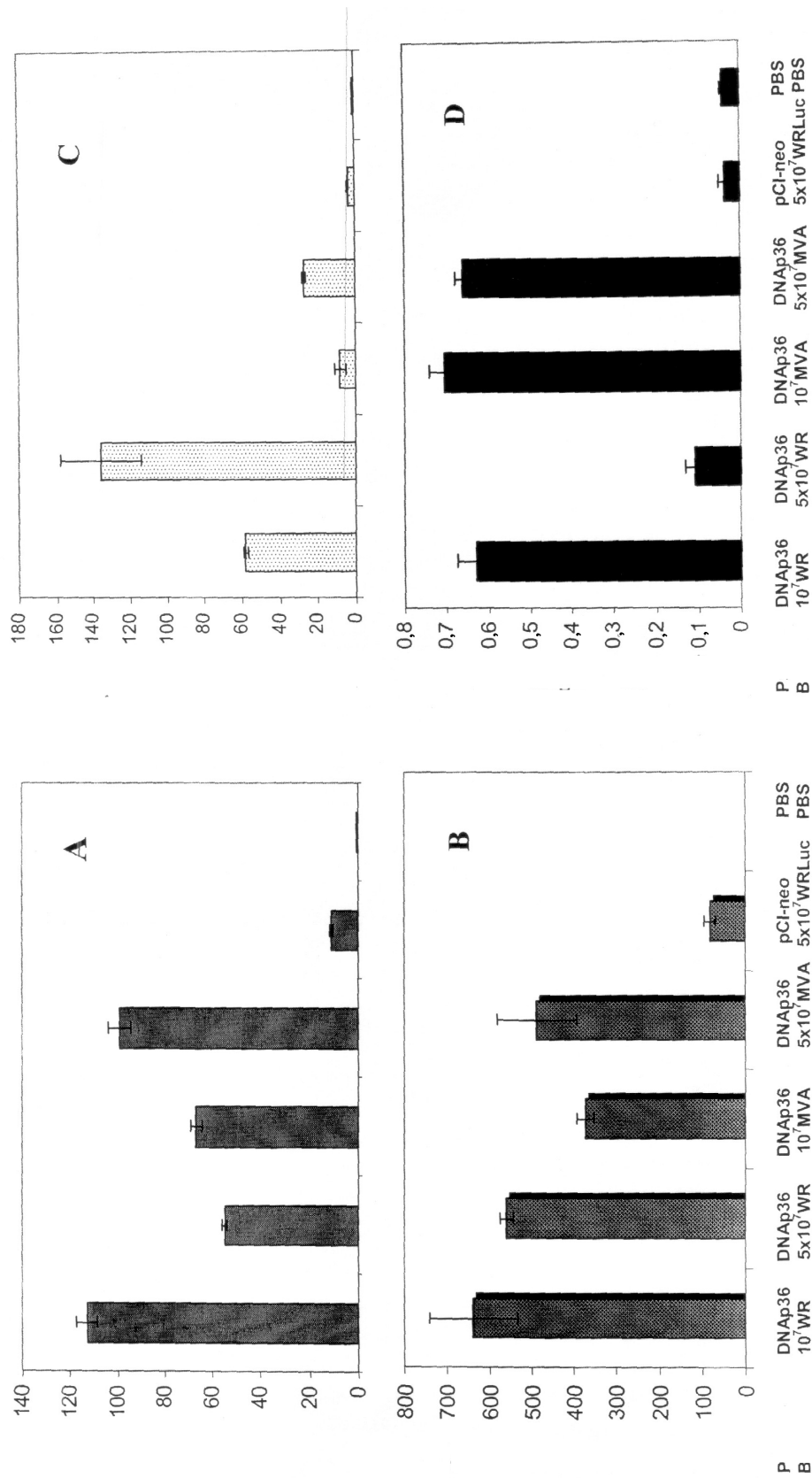
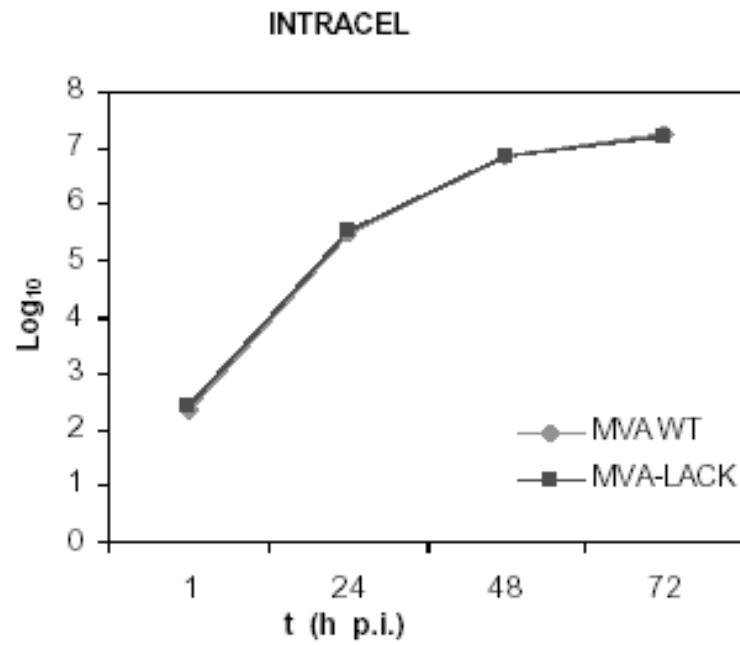


Figura 17

A



B

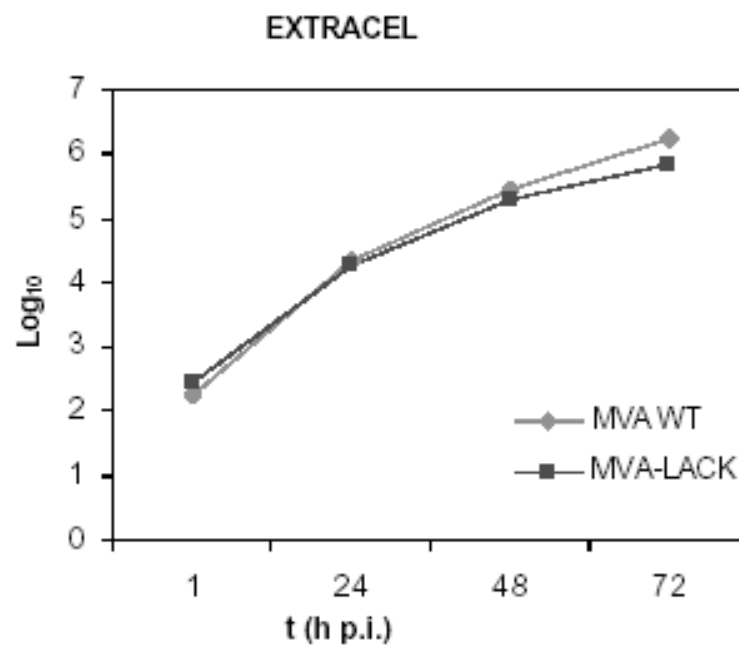


Figura 18

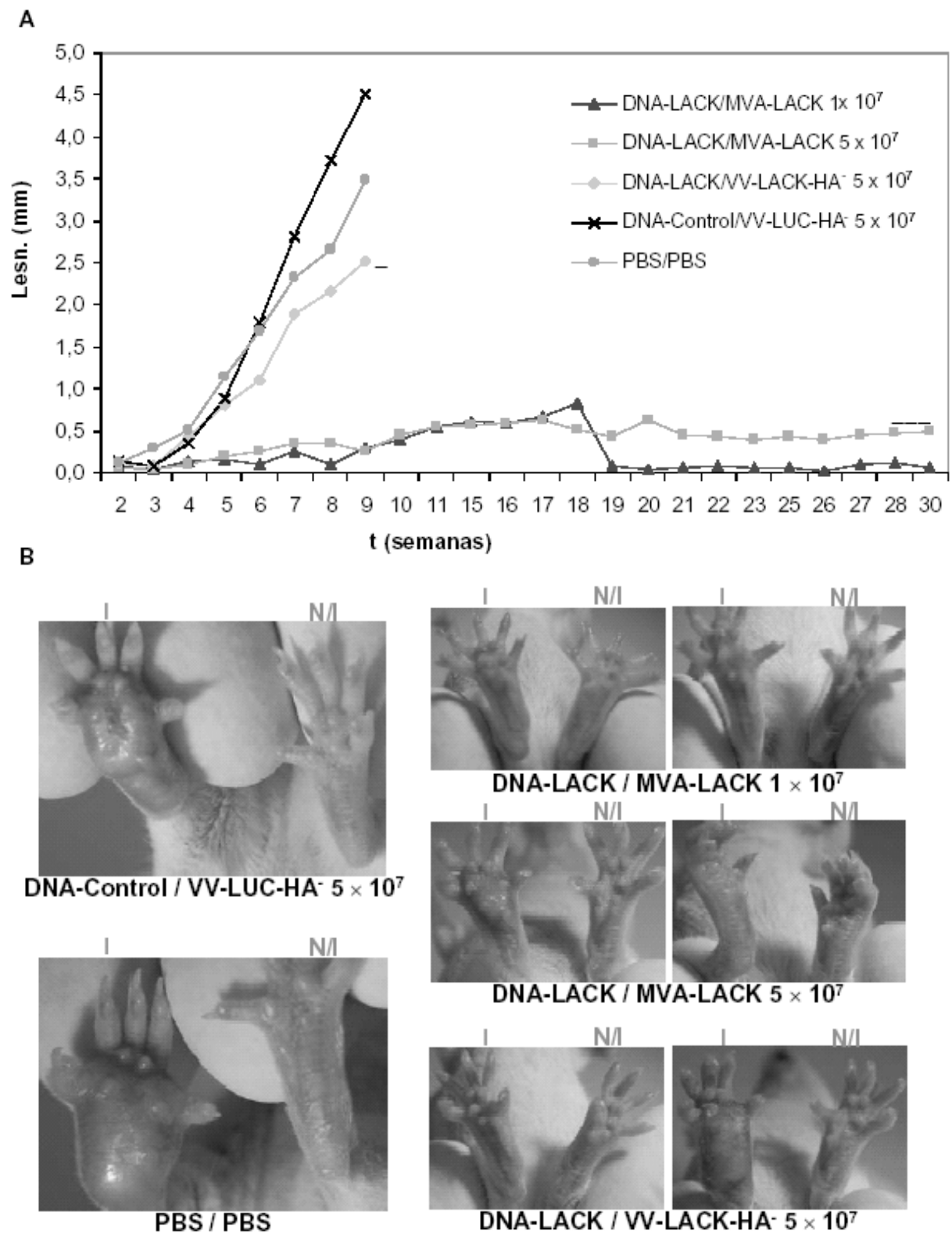
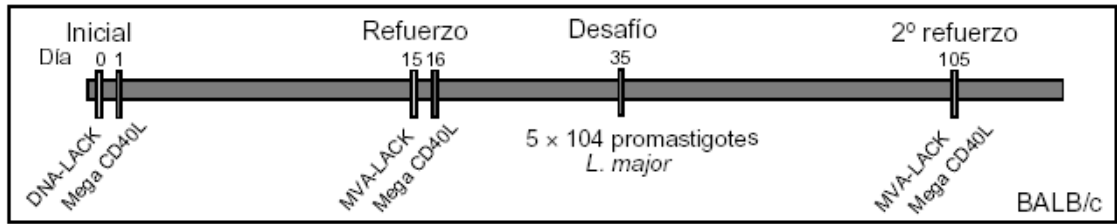
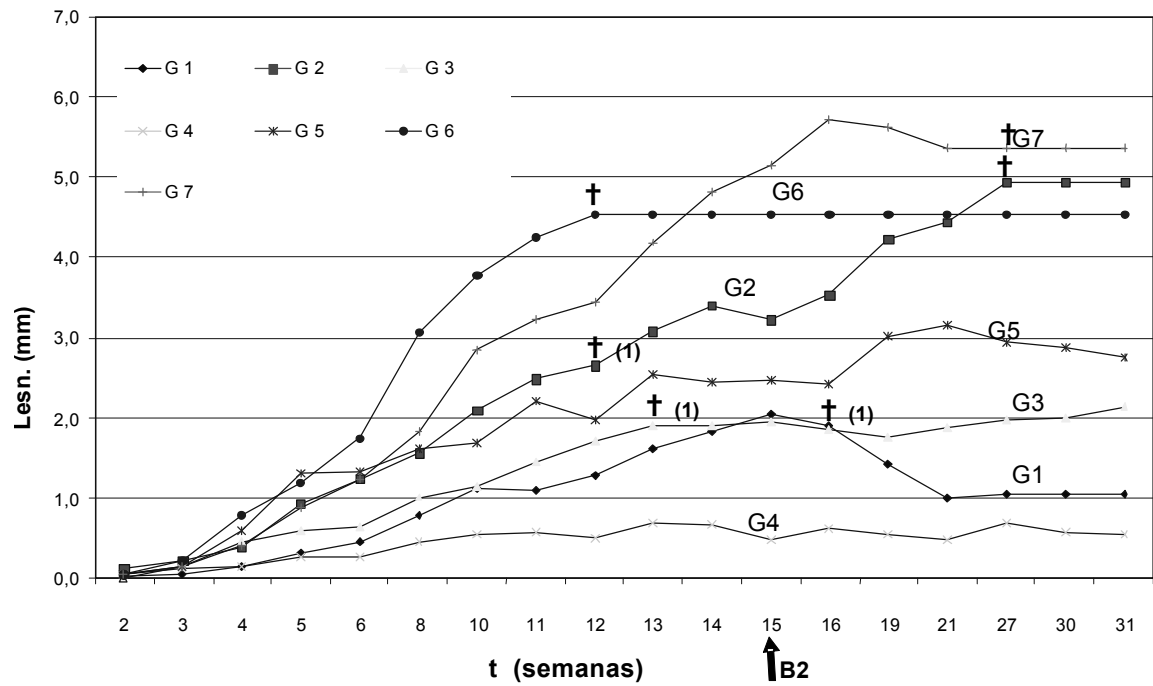


Figura 19

A



B



C

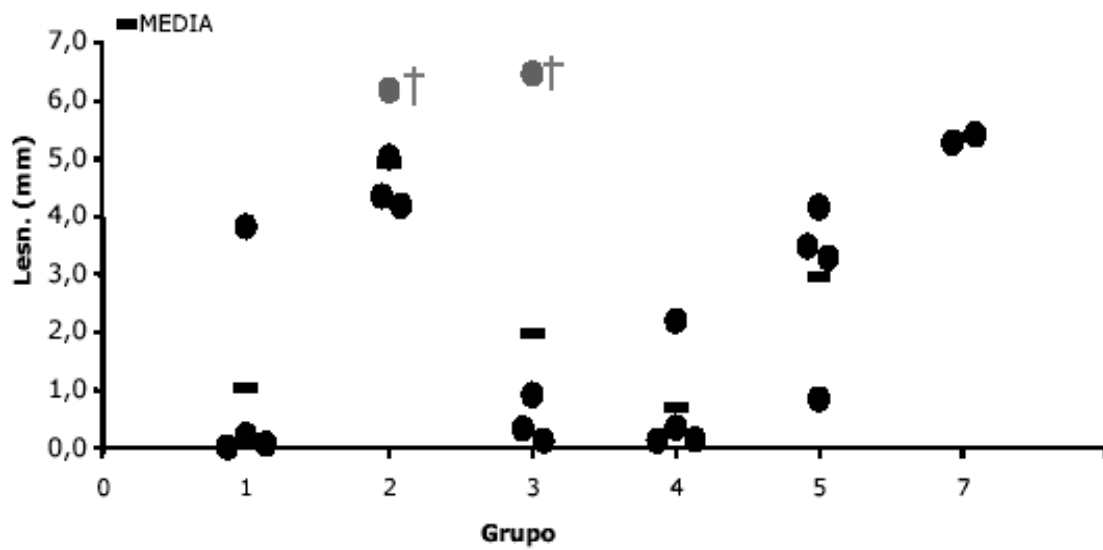


Figura 20

