República Federativa do Brasil
Ministério da Indústria, Comércio Exterior
e Serviços
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) **PI 0603490-0 B1**

(22) Data do Depósito: 21/07/2006

(45) Data de Concessão: 24/04/2018

(54) Título: VACINA RECOMBINANTE CONTRA A LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA

(51) Int.Cl.: A61K 39/008; C12N 15/09

(73) Titular(es): UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

(72) Inventor(es): ANA PAULA SALLES MOURA FERNANDES; CHRISTIANE DE FREITAS ABRANTES; EDUARDO ANTONIO FERRAZ COELHO; RICARDO TOSTES GAZZINELLI; CARLOS ALBERTO PEREIRA TAVARES

VACINA RECOMBINANTE CONTRA A LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA

A presente invenção refere-se à vacina recombinante contra a leishmaniose visceral canina contendo a proteína recombinante A2 e saponina, como adjuvante, e que permite a distinção entre animais vacinados e infectados por meio de testes de ELISA ou imunofluorescência convencionais que empregam antígenos de formas promastigotas de *Leishmania*.

As leishmanioses constituem um grupo de doenças parasitárias que se apresentam clinicamente como lesões cutâneas, mucocutâneas ou sob a forma de infecção visceral e ocorrem devido à infecção por uma variedade de espécies de protozoários pertencentes ao gênero *Leishmania* (World Health Organization. Program for the surveillance and control of leishmaniasis. http://who.int/emc/diseases/leish/index.html. 2005). As leishmanioses são endêmicas em cerca de 88 países. Destes, 72 são países em desenvolvimento e, neste grupo, estão incluídos 13 países com a menor taxa de desenvolvimento mundial. A forma visceral ocorre devido a infecções causadas pelas espécies *Leishmania (Leishmania) donovani* e *L. (L.) infantum* em países da Europa, Ásia, África e Oriente Médio e por *L. (L.) chagasi*, em países da América Latina (DESJEUX, P. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis*.: 27, 2004). Alterações nas funções do baço, fígado e da medula óssea são observadas nos pacientes infectados, sendo que a infecção pode tornar-se crônica e causar febre irregular de longa duração, hepatoesplenomegalia, linfadenopatia, anemia, leucopenia, edema, debilidade progressiva e emagrecimento, podendo levar à morte na ausência de tratamento. Indivíduos infectados podem também permanecer assintomáticos, embora cerca de 20% dos indivíduos em regiões endêmicas desenvolvam a forma clássica da doença. Os sintomas são progressivos e as complicações decorrentes da evolução da infecção são responsáveis pela maioria dos óbitos (SUNDAR, S. & RAI, M. *Clin.Diagn. Lab. Immunol*., 9: 2002).

A *L. (L.) chagasi* possui ampla distribuição geográfica nas Américas, sendo encontrada no Brasil, na Argentina, Colômbia, Bolívia, El Salvador, Guatemala, Honduras, México, Paraguai e Venezuela. Espécies como marsupiais e gambás são conhecidos reservatórios silvestres do parasita. Em ambientes domésticos, o cão é considerado o principal reservatório no ciclo de transmissão doméstico da leishmaniose visceral (LV) devido à elevada prevalência da infecção canina, quando

PI0603490

comparada à infecção humana. Cães infectados, mesmo assintomáticos, apresentam grande quantidade de parasitos na pele o que favorece a infecção do inseto vetor, a partir deste reservatório e, conseqüentemente, a transmissão para o homem (TESH, R. *Am. J. Med. Hyg.*: 52, 1995).

O tratamento da LV canina, independente do fármaco utilizado, não é viável como medida de controle da doença, pois têm custo elevado e, freqüentemente, cães tratados e clinicamente curados sofrem recaídas, permanecendo como fontes de infecção para o vetor, além de aumentar o risco de seleção de linhagens resistentes a tais fármacos, com sérias implicações para o tratamento do homem (GRAMICCIA, M. & GRADONI, L. *Int. J. Parasitol.* 35: 2005).

Este fato, associado à letalidade da LV humana na ausência do tratamento, levou a Organização Mundial de Saúde (OMS) a preconizar a eliminação de cães quando soropositivos para antígenos de *Leishmania,* como medida de controle da infecção por órgãos de Saúde Pública. O Ministério da Saúde do Brasil, desta forma, passou a adotar tal procedimento. Assim, uma das ações mais utilizadas no controle da LV é a eliminação dos cães infectados, os quais são detectados por meio do diagnóstico sorológico ou pela presença de sintomas clínicos. No entanto, tais procedimentos acarretam profunda tristeza e indignação aos seus donos que, por vezes, preferem omitir a doença aos órgãos competentes, até a proximidade da morte dos animais quando, nesses casos, já se tornaram importantes transmissores do parasita (TESH, R. *Am. J. Med. Hyg.*: 52, 1995).

A maioria das pesquisas focando o desenvolvimento de vacinas baseia-se na identificação de moléculas do parasita e em protocolos de imunização que tenham a capacidade de induzir resposta imune celular Th1, requisito essencial para indução de proteção à doença. Em cães, a resistência ou susceptibilidade à doença é também, provavelmente, associada à dicotomia da resposta Th1/Th2. A resistência é associada com a elevada resposta linfoproliferativa específica e com a reação de hipersensibilidade tardia (DTH) positiva, além de baixos títulos de anticorpos específicos ao parasita. A resistência à infecção e proteção, em cães, estaria relacionada a uma elevada produção de interferon-gama (IFN-γ), de óxido nítrico (NO) e pela atividade leishmanicida dos macrófagos parasitados ou seja, a um perfil de resposta imune Th1. Níveis elevados de anticorpos IgG1 estariam associados à susceptibilidade, enquanto níveis elevados de IgG2a estariam associados à resistência (Moreno, J. & Alvar, J. *Trends Parasitol.*: 18, 2002; Molano, I. et al., *Vet. Immunol. Parasitol.:* 92, 2003). Portanto, em estudos de avaliação de eficácia vacinal

PI0603490

contra a infecção por *Leishmania,* IFN-γ e anticorpos IgG2 (cães) ou IgG2a (camundongos) são utilizados como marcadores da resposta Th1 e de indução de resitência. Interleucina-4, interleucina-10 e anticorpos IgG1, ao contrário, são utilizados como marcadores de resposta Th2 e de susceptibilidade.

Vacinas contra Leishmaniose canina são de difícil desenvolvimento e, por isso, ainda raras. Uma vacina canina encontra-se disponível, a Leishmune®. Esta utiliza como ativo vacinal um complexo antigênico purificado, incluindo proteínas, que corresponde ao complexo Fucose-Manose Ligante (FML), presente na superfície do parasita, de acordo com o pedido de patente nacional no. PI 9302386-3 (Composição contendo frações de células de leishmania, denominadas antígeno fml "fucose mannose ligand" ou " ligante de f ucose-manose", uso do antígeno f ml e de suas subfrações e componentes para as aplicações em imunodiagnóstico específico da leishmaniose visceral humana e animal, para aplicações em vacinação, tratamento ou imunoterapia contra a leishmaniose visceral humana e canina).

A Leishmune® tem como característica primária a indução de resposta humoral. O cão vacinado desenvolve rapidamente resposta por meio da produção de anticorpos específicos contra o parasita. Diversos testes, apresentados pela inventora e parceiros da referida vacina, demonstram que a vacina protege cerca de 86% dos animais vacinados, quando inseridos em áreas endêmicas. Os dados destes estudos foram questionados pela comunidade científica, bem como pela indústria, uma vez que os animais controle se localizavam em cidade distinta da que alocou os animais vacinados. Outra importante falha do teste citado foi a presença de cães, nos dois grupos, utilizando coleiras impregnadas com repelentes de insetos. O parasita é transmitido pela picada de um inseto, e se o contato entre inseto vetor é impedido pelo uso de coleiras repelentes, o cão não está realmente exposto ao desafio natural preconizado. Com base nos dados acima é questionável o percentual de proteção descrito. Desta forma, outros estudos foram executados e alguns estão em execução, a pedido do órgão regulador em saúde pública.

Em particular, no que tange a saúde pública, é sabido que por regulamentação da OMS, animais soropositivos devem ser sacrificados. Ainda, esta medida é adotada pelo Ministério da Saúde do Brasil. Uma vez vacinado com o produto em questão o animal desenvolverá pesada resposta por anticorpos específicos contra parasita, tornando-se soropositivo. O diagnóstico preconizado pelos órgãos p úblicos é o s orológico, p or s er bar ato e de f ácil e xecução p odendo s er

PI0603490

aplicado a todas as regiões do país sem maior ônus. Os cães vacinados deverão ser sacrificados.

A não diferenciação, por métodos tradicionais, de animais infectados daqueles vacinados apenas gera um grande problema para a saúde pública. Os donos de animais vacinados apresentam a carteira de vacinação e impedem que este seja sacrificado. Levando-se em conta que em cada cem animais vacinados cerca de 14 podem vir a se tornar infectados, causando o aumento de possíveis reservatórios domésticos para a leishmaniose. Outra questão importante está relacionada a inquéritos epidemiológicos realizados pelo Ministério da Saúde, que são importante forma de identificação da evolução da doença em diferentes regiões. Este inquérito se baseia, em parte, nos resultados sorológicos de cães. Com o advento da vacinação pela Leishmune® os resultados obtidos não são reais, pois animais s oropositivos podem ter sido apenas vacinados e não infectados. Por meio de exames que detectam a presença do parasita, tais como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) ou imunocitoquímica é possível diferenciar os cães soropositivos devido a vacinação ou infecção. No entanto, a execução destes exames exige técnicas aprimoradas, equipamento e reagentes de elevado custo, além de técnicos capacitados, para garantir fidelidade de resultados. A PCR é realizada em clínicas particulares, seu uso em saúde pública é de difícil implantação e de elevado custo financeiro.

Adicionalmente, a Leishmune® apresenta elevado custo de produção, chegando ao mercado a preços que impossibilitam o acesso de toda a população ao produto. O Brasil, sabidamente, possui uma larga faixa de sua população com baixa renda e este público não tem acesso ao produto citado. Sendo uma doença em expansão em diversas regiões do País, torna-se cada vez mais importante adotar medidas que impeçam a continuidade da transmissão do parasita, principalmente a infecção de cães, que habitam domicílios e peri domicílios. O possível uso deste produto em campanhas de saúde pública terá elevado custo, além dos problemas já citados. A Leishmune® tem características imunológicas interessantes, mas contrasta com as medidas de controle adotadas para a epidemia vigente impedindo o sacrifício de cães soropositivos, interferindo nos inquéritos epidemiológicos e ainda, sendo de elevado custo para uso na saúde pública.

O antígeno A2 foi identificado, inicialmente, na espécie *L. (L.) donovani*, por Charest & Matlashewski (*Mol. Cell. Biol.*: 14, 1994) a partir de uma biblioteca de cDNA de formas amastigotas de *L. (L.) donovani*. Cópias múltiplas do gene A2 estão

PI0603490

agrupadas no cromossomo 22 (850 kb) de *L. (L.) donovani*, sendo que esses genes são conservados nas espécies *L. (L.) donovani, L. (L.) infantum, L. (L.) chagasi, L. (L.) amazonensis e L. (L.) mexicana* (Ghedin et al., *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*: 4, 1997).

Em buscas conduzidas previamente em bancos de patentes, foram encontrados pedidos de patentes r elacionados à utilização do antígeno A2 como reagente para vacinação contra a leishmaniose, confome descrito a seguir. A patente de número US5733778 relata a seqüência de nucleotídeos do gene A2 e reinvidica a proteção de sua expressão em hospedeiros microbianos. A seqüência do gene A2 de *L. (L.) donovani* cepa LV9, encontra-se depositada no Genebank, conforme descrito a seguir:

LOCUS S69693 2817 bp mRNA linear INV 26-MAR-2002
ACCESSION S69693
VERSION S69693.1 GI:546453
ORGANISM Leishmania (donovani) infantum
Eukaryota; Euglenozoa; Kinetoplastida; Trypanosomatidae;
Leishmania.
REMARK GenBank staff at the National Library of Medicine created this
FEATURES Location/Qualifiers
source 1..2817
/organism="Leishmania donovani infantum"
/mol_type="mRNA"
/strain="Ethiopian LV9"
/sub_species="infantum"
/db_xref="taxon:5662"
/dev_stage="amastigote"
gene 1..2817
/gene="A2"
CDS 72..782
/gene="A2"
/note="Plasmodium falciparum S antigen homolog; This
sequence comes from Fig. 5A"
/codon_start=1
/product="stage-specific S antigen homolog"
/protein_id="AAB30592.1"

PI0603490

/db_xref="GI:546454"

ORIGIN

1 gagctccccc agcgaccctc tcggcaacgc gagcgcccca gtccccccac gcacaacttt
61 gaccgagcac aatgaagatc cgcagcgtgc gtccgcttgt ggtgttgctg gtgtgcgtcg
121 cggcggtgct cgcactcagc gcctccgctg agccgcacaa ggcggccgtt gacgtcggcc
181 cgctctccgt tggcccgcag tccgtcggcc cgctctctgt tggcccgcag gctgttggcc
241 cgctctccgt tggcccgcag tccgtcggcc cgctctctgt tggcccgcag gctgttggcc
301 cgctctctgt tggcccgcag tccgttggcc cgctctccgt tggcccgctc tccgttggcc
361 cgcagtctgt tggcccgctc tccgttggct cgcagtccgt cggcccgctc tctgttggtc
421 cgcagtccgt cggcccgctc tccgttggcc cgcaggctgt tggcccgctc tccgttggcc
481 cgcagtccgt cggcccgctc tctgttggcc cgcaggctgt tggcccgctc tctgttggcc
541 cgcagtccgt tggcccgctc tccgttggcc cgcagtctgt tggcccgctc tccgttggct
601 cgcagtccgt cggcccgctc tctgttggtc cgcagtccgt cggcccgctc tccgttggcc
661 cgcagtctgt cggcccgctc tccgttggcc cgcagtccgt cggcccgctc tccgttggtc
721 cgcagtccgt tggcccgctc tccgttggcc cgcagtccgt tgacgtttct ccggtgtctt
781 aaggctcggc gtccgctttc cggtgtgcgt aaagtatatg ccatgaggca tggtgacgag
841 gcaaaccttg tcagcaatgt ggcattatcg tacccgtgca agagcaacag cagagctgag
901 tgttcaggtg gccacagcac cacgctcctg tgacactccg tggggtgtgt gtgaccttgg
961 ctgctgttgc caggcggatg aactgcgagg gccacagcag cgcaagtgcc gcttccaacc
1021 ttgcgacttt cacgccacag acgcatagca gcgccctgcc tgtcgcggcg catgcgggca
1081 agccatctag atgcgcctct ccacgacatg gccggaggcg gcagatgaag gcagcgaccc
1141 cttttccccg gccacgacgc cgcgctgagg cgggccccac agcgcagaac tgcgagcgcg
1201 gtgcgcgggc gctgtgacgc acagccggca cgcagcgtac cgcacgcaga cagtgcatgg
1261 ggaggccgga ggagcaagag cggtggacgg gaacggcgcg aagcatgcgg cacgccctcg
1321 atgtgcctgt gtgggctgat gaggcgcgga tgccggaagc gtggcgaggg catcccgagt
1381 tgcaccgtcg agtcctccag gcccgaatgt ggcgagcctg cggggagcag attatgggat
1441 gcggctgctc gaagcgaccg agggcgctga ccggaaggtg gcccacttcc tcctcgggcc
1501 tgtgcggcat ccgccctcga tcgggagccc gaatggtggc cgcgcgggtg aaggcgtgcc
1561 gcccacccgc gtctccgtgt ggcgccgctg ggggcaggtg cgctgtggct gtgtatgtgc
1621 gctgatgtgc tgacttgttc gtggtgggct atgggcacgg tgaggggcga cgttggccct
1681 tgctgacttc ctctgctttc ttattattct cagtgccccc gctggattgg gctgcatcgg
1741 cggtctgtat cgcgcttgtc tctctcattt gacggctgcg cgcctcccgc ccctcccact
1801 cgtgctgtgg gatggaggca cggccgggct ctgtgttgtg tgcaccgcgt gcaagaattc
1861 agatgaggga ctgccgagcg agcagacaaa gcagcagcag caacaggaag gcaggcctga

PI0603490

1921 gcacgttttc ttttctctct tgagactgcg gactacggga atcagagacg tcgtcagaga
1981 cgcgcatccg cacccgcgcg ctatgcttcc tcgttctctc tcccgcccca ttctgtgcgc
2041 ctgcctgtct gcgtgtcgcg agcgccgttg ccggcggtct ctctcccctc ccttcgcttc
2101 tctcttgcaa gcgcttcctt tttcacagcc gaacgttgct gctcgcctgg aggccgttcc
2161 ccctcttatc atctctgcat ttatttttac acgtgctttt gctttggctt cctgacgatg
2221 ccggccacct caccgcggtg tcagggccca gcgcccactc tttgtgggca ggccaagtag
2281 cctgcagcct gcccatgagc acggctgtgg actcttggtg ccagcggaca ggtgtgggct
2341 ggcgctgtgc cggtgacacc aacggtcatg atgacgcttg gaccagctca ctgcggatca
2401 tgccgacgat tcaacgaatg cgcgcatcca cctactgcct ttctgccttt gctgcgctgc
2461 ggtggtgctg agcgtggtcc cggggcctag cctgcgctgt acgcagcggc attgcggtgg
2521 gctgagcggc gccaggcggt gctggccggc cctgctgctt ggcatagccg tggcgtgcag
2581 cagatgcgga tgggctgtgg ctgcgcatgc gtgtgtgcgt tgacttgttc gtggtgggcg
2641 ggcacgtaaa cggcaaaatg cgctttggcg ttccggcgcc acgctccggc gctggtgcgg
2701 tattcgaata cgcgcctgaa gaggtggcga ggaaaatggc acgaggcgca gagggaaaaa
2761 acgaaaagtg caaagtgcgc aaaccgcgca gaaaatgcgg gaaaaacgaa aagtgca

Os pedidos de patente US570591, WO9506729, EP0716697 e MXPA03008832 relatam a seqüência de aminoácidos da proteína A2. A2 é composta por uma seqüência de dez aminoácidos, repetida de 40 a 90 vezes, dependendo do gene da "família A2" que a codifica (Charest & Matlashewski. *Mol. Cell. Biol.*: 14, 1994; Zhang *et al., Mol. Bioch. Parasitol.*:78, 1996), como indicado a seguir:

MKIRSVRPLVVLLVCVAAVLALSASAEPHKAAVDVGPLSVGPQSVGPLSVGPQ
AVGPLSVGPQSVGPLSVGPQAVGPLSVGPQSVGPLSVGPLSVGPQSVGPLSVGSQS
VGPLSVGPQSVGPLSVGPQAVGPLSVGPQSVGPLSVGPQAVGPLSVGPQSVGPLSV
GPQSVGPLSVGSQSVGPLSVGPQSVGPLSVGPQSVGPLSVGPQSVGPLSVGPQSV
GPLSVGPQSVDVSPVS.

O pedido de patente US5780591, além de descrever a proteína nativa A2, ou seja, como ela é encontrada no parasita, reinvidica a sua possível utilização como antígeno vacinal ou de diagnóstico. O pedido de patente US5733778 descreve a seqüência de DNA do gene A2 e sua expressão em bactérias. O pedido de patente US6133017 relata a obtenção de parasitas atenuados (*Leishmania donovani*) pela deleção do gene A2, bem como a sua utilização como vacinas atenuadas. Já as

PI0603490

patentes WO9506729, EP0716697 ou MXPA03008832 são relacionadas entre si e reinvindicam a utilização do antígeno A2 sob a forma de proteína recombinante, DNA ou parasitas atenuados como vacina. No Brasil, foi registrado no INPI o pedido de patente PI0208532 (PCT número CA0200437), sob o título genérico de "vacina contra leishmania" e que relata a invenção de uma vacina de DNA cujo componente antigênico é o antígeno A2, assim como dos processos para administrar esta vacina de DNA, a qual induz resposta imune no hospedeiro em que é administrada, contra a infecção por *Leishmania.*

As evidências experimentais que subsidiaram os pedidos de proteção das vacinas acima, no entanto, consistem, essencialmente, em dois estudos de vacinação (Ghosh et al. *Vaccine*: 19, 2001; Ghosh et al., *Vaccine:* 20, 2002), em que modelos experimentais (camundongos) foram avaliados, empregando o antígeno A2, sob a proteína recombinante associada ao *Corynebacterium parvum*, como adjuvante, ou sob a forma de DNA com o plasmídeo pCDNA3/E6. De acordo com estes estudos, animais imunizados com antígeno A2 e desafiados com *L. donovani* apresentaram redução significativa da carga parasitária no fígado, e uma produção elevada de IFN-γ e de anticorpos IgG2a específicos à proteína A2. Apesar da vacinação com DNA A2 ter conferido proteção, esta foi mais significativa quando este foi associado ao plasmídeo pCDNA3/E6. Embora necessária para a validação da eficácia de uma formulação vacinal, a etapa de avaliação em modelos experimentais não pode ser considerada conclusiva mesmo que apresente resultados positivos.

O desenvolvimento de uma vacina que seja eficaz em proteger o cão e, conseqüentemente, diminuir as taxas de transmissão para o homem seria de grande relevância para o controle da leishmaniose. No Brasil, os Ministérios da Saúde e da Agricultura, conforme portaria que se encontra em consulta pública (www.mapa.gov.br), preconizam que esta vacina, uma vez aplicada nos cães, seja capaz de induzir uma resposta imunológica eficaz em reduzir o parasitismo tecidual e a transmissão do parasita ao inseto vetor, o que pode ser evidenciado por meio de xenodiagnóstico, reação em cadeia da polimerase (PCR) ou imunohistoquimica. Adicionalmente, esta vacina deve ser capaz de permitir a distinção sorológica dos cães vacinados daqueles infectados, empregando métodos laboratoriais de baixo custo, disponíveis na rede pública e que não onerem o sistema de saúde do País. Portanto, a adoção de uma vacina como nova medida de controle não deve interferir nas medidas de controle vigentes.

PI0603490

A presente invenção propõe como solução para estes aspectos relacionados ao desenvolvimento de uma vacina aplicável ao contexto epidemiológico da leishmaniose, especialmente no Brasil, o emprego do antígeno amastigota específico A2 em preparações vacinais. Por se tratar de um antígeno específico do estágio amastigota de várias espécies de *Leishmania*, anticorpos gerados nos cães pelo processo de vacinação com este antígeno, não são reativos nos testes de diagnóstico sorológico da infecção, uma vez que na rotina laboratorial disponível na rede pública de saúde brasileira, estes testes utilizam antígenos provenientes da forma promastigota do parasita, cuja obtenção tem custo mais baixo.

Após sucessivas avaliações e comprovação da eficácia do antígeno A2 em induzir proteção contra a infecção por *L. chagasi* e *L. amazonensis*, principais espécies de *Leishmania* que causam LV no Brasil, e de caracterizar a resposta imune induzida pela imunização com o antígeno A2 em camundongos, foi desenvolvida a formulação vacinal descrita a seguir, a ser aplicada em cães. Esta formulação foi então avaliada em cães quanto à capacidade de induzir resposta imune humoral e celular adequada ao seu emprego como vacina contra a LV no contexto epidemiológico desta doença em regiões em que o sacrifício de animais soropositivos é adotado como medida de controle. Atualmente, os testes de diagnóstico adotados na rede pública de saúde, não permitem a distinção sorológica entre animais infectados e aqueles que receberam vacinas constituídas de antígenos provenientes de formas promastigotas do parasita. A formulação objeto do presente pedido, por ser constituída de um antígeno proveniente de formas amastigotas do parasita, possibilita tal distinção, evitando o sacrifício de animais saudáveis e que, portanto, não contraíram a infecção.

A invenção aqui descrita apresenta, portanto, uma nova formulação vacinal composta p ela p roteína r ecombinante A2 , as sociada à adj uvantes, a ex emplo de saponina, não limitante, e que apresenta comprovada eficácia em induzir proteção e resposta imune adequadas, não só em modelos experimentais, mas também em cães.

A formulação se constitui no antígeno A2 de ***Leishmania***, produzido em ***Escherichia coli***, sob a forma de proteína (ou antígeno) recombinante.

As fórmulas qualitativa e quantitativa **apresentam:**

Proteína recombinante A2-HIS (rA2).....	50 a 200,00 µg/mL
Saponina.....	0,125 a 0,500 mg/mL
Solução salina tamponada ..*q.s.p*.....	1,00 mL
Thimerosol	0,01 mL

PI0603490

Para a produção da proteína A2 recombinante, a seqüência codificante deste antígeno foi clonada no vetor de expressão de proteínas pET. A cepa BL21 de *Escherichia coli* foi transformada e, dessa forma, a proteína A2 foi expressa com cauda de 6 aminoácidos Histidina que permite a purificação da proteína recombinante por meio de cromatografia de afinidade com níquel. Testes de eletroforese em sistema de SDS-PAGE, de Western-Blot e o seqüenciamento de DNA confirmaram a identidade da proteína A2 clonada em *E. coli*. A expressão da proteína recombinante A2 (rA2) foi obtida após a indução da cultura de bactérias com 1,0 mM de IPTG (isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo). A proteína rA2 foi purificada por cromatografia de afinidade em coluna contendo íons Níquel. Após a purificação, a integridade e pureza da proteína foram avaliadas por meio da técnica de Imuno Blot. O ajuste da concentração da proteína por mL é realizado com a utilização de solução salina tamponada, contendo 0,5 mg de saponina e thimerosol.

A principal inovação desta formulação vacinal é a sua capacidade de induzir em cães resposta imune celular, caracterizada pela indução de níveis elevados de IFN-γ. e humoral, caracterizada pela produção de anticorpos específicos contra o antígeno vacinal, porém, que não reagem com o extrato bruto ou solúvel das formas promastigotas de *Leishmania* nos testes de ELISA ou na reação de imunofluorescência.

Desta forma, cães vacinados com esta formulação vacinal permanecem soronegativos após cada uma das doses de vacina necessárias ao processo de imunização sendo, portanto, possível a diferenciação sorológica entre os animais apenas vacinados com A2 daqueles infectados, os quais são soropositivos nos testes de ELISA, em reação com o extrato bruto ou solúvel dos parasitas.

Os resultados acima descritos podem ser demonstrados pelos seguintes exemplos:

Exemplo 1: níveis de proteção induzidos contra a infecção por *L. amazonensis* em camundongos BALB/c imunizados com o antígeno A2

A imunização com o antígeno A2, sob a forma da proteína recombinante A2 (rA2) associada à rIL-12, como adjuvante, ou sob a forma do DNA A2, foi eficaz em conferir proteção, em camundongos BALB/c, contra a infecção desafio com *L. (L.) amazonensis*. Na avaliação dos animais imunizados e desafiados, observou-se uma

PT106490

redução significativa no tamanho médio das lesões e na carga parasitária nas patas infectadas (Figuras 1 e 2).

A Figura 1 apresenta a avaliação do tamanho médio das lesões nas patas infectadas de camundongos BALB/c imunizados com a proteína recombinante A2 (rA2), associada ou não à rIL-12, com rIL-12, DNA A2 ou DNA pCDNA3 e desafiados com *L. amazonensis*. Grupos de camundongos BALB/c (n=6, por grupo) foram imunizados com o DNA A2, no músculo tibial esquerdo, em intervalo de 21 dias. Grupos controle receberam apenas PBS ou foram imunizados com o plasmídeo vazio (DNA pCDNA3). Camundongos foram também imunizados, subcutaneamente, com a proteína rA2, em associação ou não à rIL-12 ou somente com rIL-12, como controle de adjuvante. Os camundongos foram desafiados com $1x10^6$ promastigotas em fase estacionária de crescimento de *L. (L.) amazonensis*, no coxim plantar direito. A evolução do tamanho das lesões foi monitorada através das medidas semanais da espessura da pata infectada e da pata não infectada. Cada ponto representa a média acrescida ou subtraída do desvio padrão (em mm), obtida pela diferença de espessura entre a pata infectada e a pata não infectada.

A Figura 2 mostra a Avaliação da carga parasitária nas patas infectadas de camundongos BALB/c imunizados com a proteína recombinante A2 (rA2), associada ou não à rIL-12, com rIL-12, DNA A2 ou DNA pCDNA3 e desafiados com *L. amazonensis*. Grupos de camundongos BALB/c (n=6, por grupo) foram imunizados com 2 doses de 100 μg de DNA A2, no músculo tibial esquerdo, em intervalo de 21 dias. Grupos controle receberam apenas PBS ou foram imunizados com o plasmídeo vazio (DNA pCDNA3) (100 μg/dose). Camundongos foram também imunizados, subcutaneamente, com a proteína rA2, associada ou não à rIL-12 ou com rIL-12, como controle de adjuvante. 28 dias após a última dose, os camundongos foram desafiados com $1x10^6$ promastigotas em fase estacionária de crescimento de *L. (L.) amazonensis*, no coxim plantar direito. Cerca de oito semanas após a infecção desafio, a carga parasitária nos animais (n=4, por grupo) foi determinada pela técnica de diluição limitante, conforme descrito na Seção de Material e Métodos. Cada barra representa a média acrescida ou subtraída do desvio padrão, referentes ao logarítmo do número de parasitas obtidos por miligrama de tecido. Diferenças entre as médias foram verificadas pelo teste *t* de Student, sendo consideradas significativas quando p inferior a 0,05.

PI0613491

Exemplo 2: resposta imune celular e humoral em camundongos BALB/c imunizados com o antígeno A2 e desafiados com *L. amazonensis*

Animais imunizados com DNA A2 ou com rA2/rIL-12 e desafiados com *L. (L.) amazonensis* apresentaram uma produção significativa de IFN-γ, após o estímulo *in vitro* dos esplenócitos com a proteína rA2 ou com o extrato total de promastigotas (SLA) de *L. (L.) amazonensis* (Figura 3). Adicionalmente, baixos níveis de IL-4 e IL-10 foram observados nestes grupos, em comparação aos grupos controle, após o estímulo das células com a proteína rA2 ou com o SLA de *L. (L.) amazonensis* (Figura 4 e Figura 5).

A Figura 3 é um gráfico que representa a produção de IFN-γ por esplenócitos de camundongos BALB/c imunizados com a proteína recombinante A2 (rA2), associada ou não à rIL-12, com rIL-12, DNA A2 ou DNA pCDNA3 e desafiados com *L. amazonensis*. Células do baço de camundongos BALB/c foram coletadas antes da infecção desafio ou cerca de 8 a 9 semanas após o desafio com imunizados com *L. (L.) amazonensis*. As células foram cultivadas (1 x 10^6/mL) em 1 mL de meio DMEM completo e estimuladas com a proteína rA2 (10 μg/mL) e com o SLA de *L. (L.) amazonensis* (50 μg/mL). Como controles, foram avaliadas as células não estimuladas ou estimuladas com concanavalina A (5 μg/mL), para avaliar a viabilidade celular. Os cultivos foram incubados por 48 horas em estufa a 37°C, com presença de 5% de CO_2. Após, o sobrenadante foi coletado e a produção de IFN-γ foi determinada por ELISA de captura. No eixo das abscissas, encontra-se indicado o estímulo utilizado no cultivo celular, além do momento em que as células foram coletadas: antes ou após a infecção desafio. No eixo das ordenadas, a concentração, em pg/mL, de IFN-γ. Cada barra representa a média da produção de IFN-γ acrescido ou subtraído do desvio padrão de cada grupo.

Na Figura 4 está representada a produção de IL-4 por esplenócitos de camundongos BALB/c imunizados com a proteína recombinante A2 (rA2), associada ou não à rIL-12, com rIL-12, DNA A2 ou DNA pCDNA3 e desafiados com *L. amazonensis*. Células do baço de camundongos BALB/c foram coletadas antes da infecção desafio ou cerca de 8 a 9 semanas após o desafio com imunizados com *L. (L.) amazonensis*. As células foram cultivadas (1 x 10^6/mL) em 1 mL de meio DMEM completo e estimuladas com a proteína rA2 (10 μg/mL) e com o SLA de *L. (L.) amazonensis* (50 μg/mL). Como controles, foram avaliadas as células não estimuladas ou estimuladas com concanavalina A (5 μg/mL), para avaliar a viabilidade celular. Os

PI0603490

cultivos foram incubados por 48 horas em estufa a 37°C, com presença de 5% de CO_2. Após, o sobrenadante foi coletado e a produção de IL-4 foi determinada por ELISA de captura. No eixo das abscissas, encontra-se indicado o estímulo utilizado no cultivo celular, além do momento em que as células foram coletadas: antes ou após a infecção desafio. No eixo das ordenadas, a concentração, em pg/mL, de IL-4. Cada barra representa a média da produção de IL-4 e o desvio padrão de cada grupo.

Na Figura 5 encontra-se o gráfico demonstrativo da produção de IL-10 por esplenócitos de camundongos BALB/c imunizados com a proteína recombinante A2 (rA2), associada ou não à rIL-12, com rIL-12, DNA A2 ou DNA pCDNA3 e desafiados com *L. amazonensis*. Células do baço de camundongos BALB/c foram coletadas antes da infecção desafio ou cerca de 8 a 9 semanas após o desafio com imunizados com *L. amazonensis*. As células foram cultivadas (1 x 10^6/mL) em 1 mL de meio DMEM completo e estimuladas com a proteína rA2 (10 μg/mL) e com o SLA de *L. amazonensis* (50 μg/mL). Como controles, foram avaliadas as células não estimuladas ou estimuladas com concanavalina A (5 μg/mL), para avaliar a viabilidade celular. Os cultivos foram incubados por 48 horas em estufa a 37°C, com presença de 5% de CO_2. Após, o sobrenadante foi coletado e a produção de IL-10 foi determinada por ELISA de captura. No eixo das abscissas, encontra-se indicado o estímulo utilizado no cultivo celular, além do momento em que as células foram coletadas: antes ou após a infecção desafio. No eixo das ordenadas, a concentração, em pg/mL, de IL-10. Cada barra representa a média da produção de IL-10 acrescido ou subtraído do desvio padrão de cada grupo.

Na avaliação da resposta imune humoral (Figura 6), amostras de soro coletadas dos animais imunizados com rA2/rIL-12 ou com DNA A2 e desafiados com *L. amazonensis* mostraram uma produção elevada de anticorpos IgG2a específicos à proteína rA2 (anti-rA2) e uma baixa produção de anticorpos específicos ao parasita (anti-SLA), contrariamente ao observado nos grupos controle (COELHO et al. ***Infect. Immun.***: 71, 2003; COELHO. TESE, Doutorado em Imunologia. Belo Horizonte: Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, 2004)

A Figura 6 mostra a produção de IgG total em amostras de soro de camundongos BALB/c imunizados com a proteína recombinante A2 (rA2), associada ou não à rIL-12, com rIL-12, DNA A2 ou DNA pCDNA3 e desafiados com *L. amazonensis*. Amostras de soro de camundongos BALB/c foram coletadas antes ou 8 a 9 semanas após a infecção desafio com *L. amazonensis*. As placas foram sensibilizadas com a proteína rA2 (250 ng/well) ou com o SLA de *L. amazonensis*. A produção de IgG total foi

PI0603491

24

determinada por ELISA direta. No eixo das abscissas encontra-se a indicação da classe IgG total específica à proteína rA2 ou ao SLA de *L. amazonensis*, além do momento em que as amostras foram coletadas: antes ou após a infecção desafio. No eixo das ordenadas, a absorbância em comprimento de onda de 492 nm. Cada barra representa a média da produção de IgG total adicionado ou subtraído o desvio padrão de cada grupo.

Na avaliação da produção das sub-classes IgG1 e IgG2a específicos à proteína rA2 ou a antígenos do parasita (SLA), observa-se (Figura 7), que amostras de soro coletadas dos animais imunizados com rA2/rIL-12 ou com DNA A2 e desafiados com *L. amazonensis* mostraram um predomínio na produção de anticorpos IgG2a específicos à proteína rA2 (anti-rA2), em relação aos níveis obtidos de anticorpos IgG1 anti-rA2. Animais imunizados com A2 permaneceram, no entanto, soronegativos em testes utilizando-se antígenos de formas promastigotas de *Leishmania* (SLA) (Coelho *et al.*, 2003; Coelho, 2004).

A Figura 7 descreve a produção de IgG1 e IgG2a em amostras de soro de camundongos BALB/c imunizados com a proteína recombinante A2 (rA2), associada ou não a rIL-12, com rIL-12, DNA A2 ou DNA pCDNA3 e desafiados com *L. amazonensis*. Amostras de soro de camundongos BALB/c foram coletadas antes ou 8 a 9 semanas após a infecção desafio com *L. amazonensis*. As placas foram sensibilizadas com a proteína rA2 (250 ng/well) ou com o SLA de *L. amazonensis*. A produção de IgG1 e IgG2a foi determinada por ELISA indireta. No eixo das abscissas encontra-se a indicação das subclasses IgG1 ou IgG2a, específicas à proteína rA2 ou ao SLA de *L. amazonensis*, além do momento em que as amostras foram coletadas: antes ou após a infecção desafio. No eixo das ordenadas, a absorbância em comprimento de onda de 492 nm. Cada barra representa a média da produção de IgG1 ou IgG2a e o desvio padrão de cada grupo.

Exemplo 3: níveis de proteção induzidos contra a infecção por *L. chagasi* em camundongos BALB/c imunizados com o antígeno A2

O antígeno A2, quando administrado sob a forma de DNA A2, mostrou-se também eficaz em conferir proteção em camundongos BALB/c, contra a infecção desafio com *L. chagasi*, o principal agente etiológico da Leishmaniose Visceral nos países da América do Sul. Os animais imunizados e desafiados apresentaram uma redução expressiva na carga parasitária no fígado (Figura 8) e no baço (Figura 9).

PI0603490

25

Figura 8: Avaliação da carga parasitária no fígado de camundongos BALB/c imunizados com o DNA A2 e desafiados com *L. chagasi*. Grupos de camundongos BALB/c (n=6, por grupo), após os protocolos de imunização, foram desafiados com $1x10^7$ promastigotas em fase estacionária de crescimento de *L. chagasi*, por via endovenosa, conforme descrito na Seção de Material e Métodos. 35 dias após o desafio, os animais (n=4, por grupo) foram sacrificados e o fígado foi recuperado, para a determinação da carga parasitária. As barras representam a média do log do número de parasitas por órgão acrescido ou subtraído do desvio padrão de cada grupo. A média do log do número total de parasitas por órgão foi comparada através do teste *t* de Student. Diferenças estatísticas foram consideradas significativas quando p é menor do que 0,05. Houve redução significativa na carga parasitária hepática dos animais do grupo DNA A2 em relação aos grupos PBS (p é menor do que 0,0005) e DNA pCI (p é menor do que 0,005).

A Figura 9 é o resultado da avaliação da carga parasitária no baço de camundongos BALB/c imunizados com o DNA A2 e desafiados com *L. chagasi*. Grupos de camundongos BALB/c (n=6, por grupo), após os protocolos de imunização, foram desafiados com $1x10^7$ promastigotas em fase estacionária de crescimento de *L. chagasi*, por via endovenosa, 35 dias após o desafio, os animais (n=4, por grupo) foram sacrificados e o baço foi recuperado, para a determinação da carga parasitária. As barras representam a média do log do número de parasitas por órgão acrescido ou subtraído do desvio padrão de cada grupo. A média do log do número total de parasitas por órgão foi comparada através do teste *t* de Student. Diferenças estatísticas foram consideradas significativas quando p é menor do que 0,05. Houve redução significativa na carga parasitária esplênica nos animais do grupo DNA A2, em relação aos animais dos grupos PBS e DNA pCI (p é menor do que 0,005 e p é menor do que 0,05, respectivamente).

Exemplo 4: resposta imune celular em camundongos BALB/c imunizados com o antígeno A2 e desafiados com *L. amazonensis*

Camundongos BALB/c imunizados com o antígeno A2, sob a forma de DNA, e desafiados com *L. chagasi* produziram níveis significativamente maiores de I FN-γ (Figura 10) e menores de IL-10 (Figura 11), após o estímulo dos esplenócitos com a proteína rA2 ou com o extrato total de proteínas (LcPA) de *L. chagasi*, em relação aos animais dos grupos controle.

PI0601490

Figura 10: gráfico da produção de IFN-γ por esplenócitos de camundongos BALB/c imunizados com DNA A2 antes e após desafio com *L. chagasi*. Células esplênicas de camundongos BALB/c imunizados foram coletadas 4 semanas após a imunização ou cerca de 9 semanas após a infecção desafio com *L. chagasi*. As células ($2x10^5$ células por mL) foram cultivadas em DMEM completo e estimuladas com as proteínas recombinantes rNH, rA2 ou rLACK (concentrações de 10 μg/mL) ou com o extrato de proteínas de *L. chagasi* (50 μg/mL). Os sobrenadantes foram coletados 48 horas após o cultivo e a estimulação das células. A produção de IFN-γ foi determinada por ELISA de captura. No eixo das abscissas, estão indicados os estímulos utilizados no cultivo celular e no eixo das ordenadas a concentração de IFN-γ (pg/mL). Cada barra representa a média acrescida ou subtraída do erro padrão da produção de IFN-γ de cada grupo. A produção de IFN-γ basal corresponde a 428,0 acrescido ou subtraído de 66,45 pg/mL. (*) indica diferença significativa em relação aos grupos PBS e DNA controle, avaliados pelo teste *t* de Student, considerados significativos os valores em que p é menor do que 0,05.

A figura 11 demonstra Produção de IL-10 por esplenócitos de camundongos BALB/c imunizados com plasmídeos de DNA NH, DNA A2, DNA LACK ou de suas associações, antes e após o desafio com *L. chagasi*. Grupos de camundongos BALB/c (n=6, por grupo), após os protocolos de imunização, foram desafiados com $1x10^7$ promastigotas em fase estacionária de crescimento de *L. chagasi*, por via endovenosa, conforme descrito na Seção de Material e Métodos. 28 dias após a imunização ou 35 dias após a infecção desafio, as células esplênicas foram cultivadas em meio DMEM completo e estimuladas com as proteínas recombinantes rNH, rA2 ou rLACK (10 μg/mL) ou com o extrato solúvel de *L. chagasi* (LcPA, 50 μg/mL). Os sobrenadantes foram coletados 48 horas após o cultivo e a produção de IL-10 foi determinada por ELISA de captura. No eixo das abscissas, estão indicados os estímulos utilizados no cultivo celular e, no eixo das ordenadas, a concentração de IL-10 (pg/mL). Cada barra representa a média da produção de IL-10 adicionado ou subtraído o erro padrão de cada grupo. A produção de IL-10 basal corresponde a 653,5 acrescido ou subtraído de 59,6 pg/mL. (*) indica diferença significativa em relação ao grupo PBS e (**) indica diferença significativa em relação aos grupos PBS e DNA pCI. Análise estatística pelo teste *t* de Student, sendo as diferenças consideradas significativas quando p é menor do que 0,05.

PI0603491

27

Exemplo 5: resposta imune celular e humoral induzida pela imunização com o antígeno A2 em cães da raça Beagle

Cães da raça Beagle foram distribuídos em grupos e imunizados com três doses da formulação vacinal antígeno A2/saponina, em intervalos de 21 dias, pela via subcutânea, conforme protocolo de imunização descrito a seguir. Como controles, grupos de animais foram imunizados com adjuvante (saponina) ou receberam apenas com PBS.

GRUPOS	ESQUEMA DE IMUNIZAÇÃO
GRUPO 1 (n=17)	Antigeno A2/saponina
GRUPO 2 (n=7)	Saponina
GRUPO 3 (controle) (n=7)	Tampão salina fosfato (PBS)

Após cada dose administrada, foi avaliada a reposta humoral através da determinação pelo método de ELISA dos níveis de anticorpos IgG total, e dos isotipos IgG1 e IgG2, que se constituem em marcadores indiretos da indução de resposta celular do tipo Th2 e Th1, respectivamente. Foram avaliados os níveis de anticorpos, produzidos contra o antígeno vacinal e contra o extrato total de antígenos de formas promastigotas totais (método de diagnóstico clássico da LV).

Como pode ser observado nas Figuras 12 e 13, animais vacinados com a formulação vacinal apresentam reação sorológica contra o antígeno vacinal, mas permanecem soronegativos na reação com extrato total de parasitas, sendo possível, portanto, a diferenciação sorológica entre os animais apenas vacinados com A2 daqueles infectados, os quais são soropositivos nos testes de ELISA, em reação com o extrato bruto ou solúvel dos parasitas.

Desta forma, a principal inovação desta formulação vacinal é a sua capacidade de induzir resposta imune humoral em cães caracterizada pela produção de anticorpos específicos contra o antígeno vacinal, porém, que não reagem com o extrato bruto ou solúvel das formas promastigotas de *Leishmania* nos testes de ELISA ou na reação de imunofluorescência. (dados não apresentados).

A figura 12 apresenta um gráfico com os níveis de anticorpos IgG total, IgG1 e IgG2 em amostras de soro de cães antes e após cada dose das imunizações e após a infecção desafio com *L. chagasi*. As placas de ELISA foram sensibilizadas com a proteína recombinante A2 (250 ng) ou com LcPA de *L. chagasi* (1μg/well). A

PI0603491

produção de IgG total foi determinada por ELISA direta e a de IgG1 e IgG2 por ELISA indireta. O eixo das ordenadas representa a absorbância, em comprimento de onda de 492nm. No eixo das abscissas, cada barra indica a média da produção de IgG total e das subclasses IgG1 e IgG2 acrescido ou subtraído do desvio padrão de cada grupo.

A parte da invenção aqui descrita refere-se à produção de IFÑ□ em resposta ao antígeno vacinal. A resposta imune celular foi avaliada por meio da dosagem de IFN-γ, por ELISA de captura, após a coleta e o cultivo de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) *in vitro* e seu estímulo com a proteína recombinante A2-HIS ou com o extrato solúvel de *L. chagasi* (LcPA). As células também foram estimuladas com concanavalina A (ConA), como controle da viabilidade celular. Adicionalmente, foi feito um controle basal, no qual as células não foram estimuladas.

Conforme observado na figura 13, os animais imunizados com a formulação vacinal antígeno A2/saponina, produziram níveis significativamente maiores de IFN-γ, em cultivos de células estimuladas com a proteína recombinante A2, em relação aos grupos "Controle" (p = 0,003926799) e "Adjuvante" (p=0,018896129), sob o mesmo estímulo. Comparando a produção de IFN-γ entre os grupos de cães avaliados nos cultivos de células sem estímulo, estimuladas com LcPA e com ConA não foram encontradas diferenças estatísticas significativas. Adicionalmente, a produção de IFN-γ, foi significativamente maior nas células estimuladas com a proteína A2-HIS, quando comparadas àquelas sem estímulo (p = 0,001374901), estimuladas com ConA (p=0,00199055) ou com LcPa (p = 0,015277637), avaliando-se o grupo imunizado com a formulação vacinal antígeno A2/saponina. Diferenças estatísticas significativas não foram encontradas dentro dos grupos "Adjuvante" e "Controle" sob os diferentes estímulos (Figura 13).

Os animais do grupo "Vacinado" apresentaram uma produção significativamente maior de IgG2, específico à rA2, quando comparado à IgG1, antes e após a infecção desafio com *L. chagasi* (p=0,0000000004 e p=0,0000000615, respectivamente). Isto também foi observado no grupo "Controle", após a infecção desafio (p=0,0341668528). Cães do grupo "Vacinado", antes e após a infecção desafio, apresentaram a razão IgG1/IgG2 menor que 1, que é um indicativo de resposta T_H1 (0,12224007 e 0,1085985, respectivamente) (Tabela 1). Já os cães do grupo "Adjuvante" e "Controle", produziram quantidades muito baixas desses anticorpos (Figura 12) e as razões IgG1/IgG2, antes e após a infecção desafio, são

PI0603490

29

2,1096344 e 0,52443, no grupo "Adjuvante" e são 0,9171905 e 0,4106352, no grupo "Controle" (Tabela 1).

	Antígeno Sensibilizador	
	Proteína A2-HIS	
Grupos avaliados	*Antes do desafio*	*Após o desafio*
Vacinado	0,122241	0,108599
Adjuvante	2,109744	0,52443
Controle	0,917787	0,410635

Tabela 1: Razão entre as sub-classes IgG1:IgG2 em amostras de soros de cães imunizados com a proteína rA2 (Vacinado) e nos grupos Adjuvante e Controle (PBS), antes e após a infecção desafio (período referente a 1 m ês) com *L. chagasi*. As placas foram sensibilizadas com a proteína recombinante A2-HIS (250ng) ou com o LcPA de *L chagasi* (1μg/well). A produção das subclasses IgG1 e IgG2 foi determinada por ELISA indireta.

Estes resultados indicam que a formulação vacinal induz o desenvolvimento de uma resposta T_H1, que se correlaciona com perfil observado em cães assintomáticos ou resistentes a infecção (Pinelli *et al.*, 1994; Quinnell *et al.*, 2001; Santos-Gomes *et al.*, 2002).

A Figura 13 traz um gráfico representando a produção de IFN-γ por células mononucleadas do sangue periférico (PBMC) de cães da raça Beagle imunizados com formulação vacinal antígeno A2/saponina, antes da infecção desafio por *L. chagasi*. As células foram cultivadas (1 x 10^6/mL) em 1mL de meio DEMEM completo e estimuladas com a proteína recombinante A2 (10 μg/mL) e com o LcPA de *L. chagasi*, na concentração de 50 μg/mL. Como controles, foram avaliadas as células não estimuladas (Meio). Também foi utilizado como controle a concanavalina A (2,5 μg/mL), um mitógeno, para avaliar a viabilidade celular. Os cultivos foram incubados em estufa, a 37°C com 5% de gás carbônico. Após 48 horas, o sobrenadante foi coletado e a produção de IFN-γ foi determinada por ELISA de captura. No eixo das ordenadas está representado a concentração, em pg/mL, de IFN-γ. No eixo das abscissas, estão os grupos de cães, sendo que "Vacinado" corresponde ao grupo de cães que receberam a formulação vacinal antígeno A2/saponina, "Adjuvante" corresponde ao grupo que recebeu apenas adjuvante e " Controle" a o g rupo que

PI0603490

30

recebeu PBS. Cada barra representa a média da produção de IFN-γ juntamente com o desvio padrão de cada grupo. * indica diferença significativa entre os grupos Vacinado e Adjuvante (A2-HIS) p= 0,018896129. ** indica diferença significativa entre os grupos Vacinado e Controle (A2-HIS) p= 0,003926799; teste t de Student (Excel).

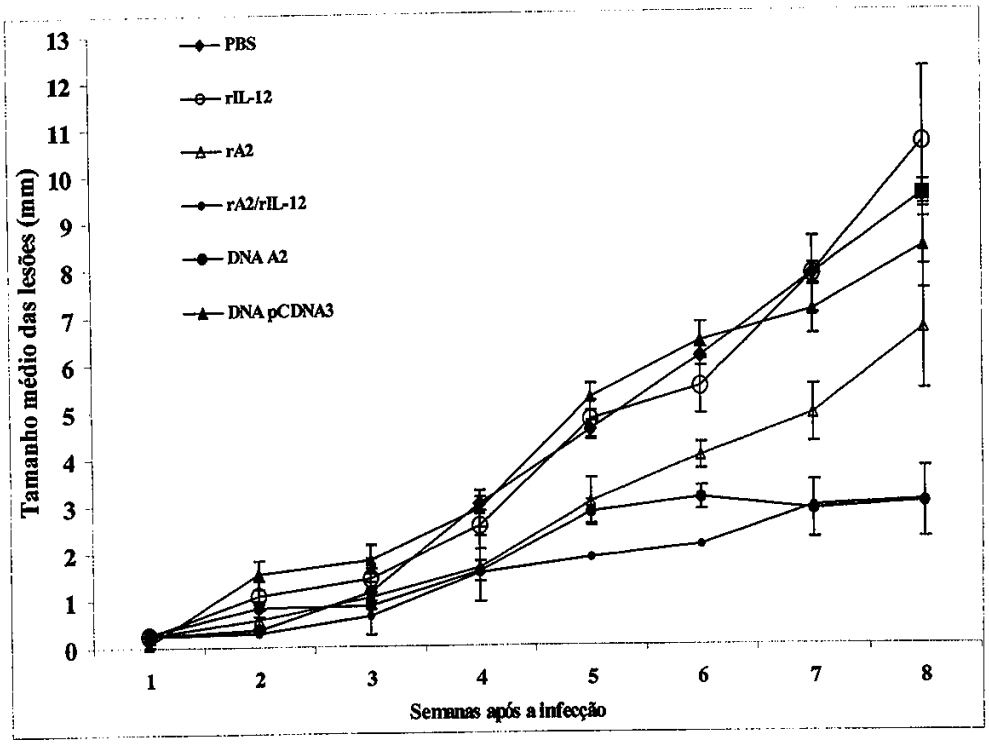
REIVINDICAÇÕES

1. **VACINA RECOMBINANTE CONTRA A LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA caracterizada por** compreender a proteína recombinante com sequência de aminoácidos definida pela SEQ ID N°1 em concentração de 50 a 200,00 mg/ml; saponina 0,125 a 0,500 mg/ml; solução salina tamponada q.s.p 1,00 ml e Thimerosol 0,01 ml.
2. **VACINA RECOMBINANTE CONTRA A LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA, de acordo com a reivindicação 1,** caracterizada por compreender adjuvantes farmacêutica e farmacologicamente aceitáveis a fim de potencializar o desenvolvimento de uma resposta imune celular Th1 e humoral.

PI0603490

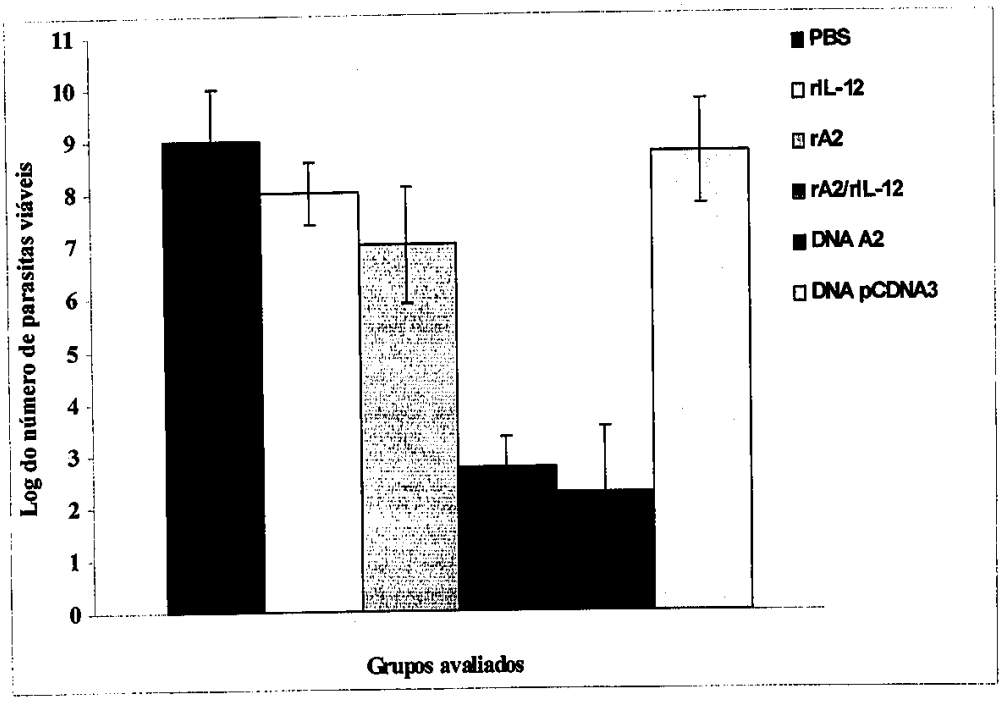
33

Figura 1



PI0613490

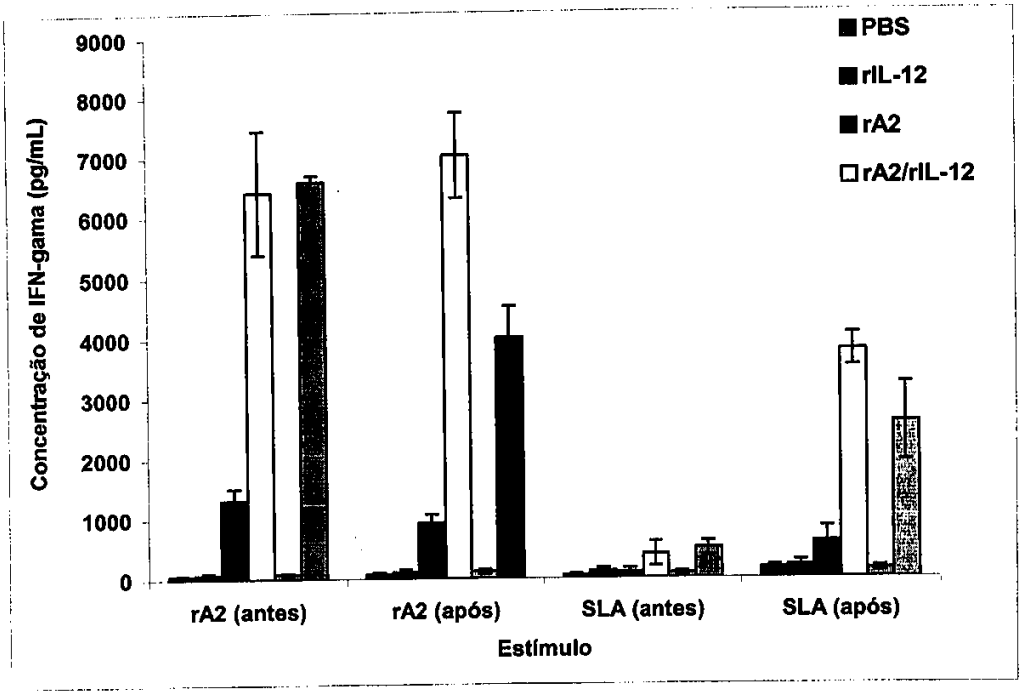
Figura 2



PI0803490

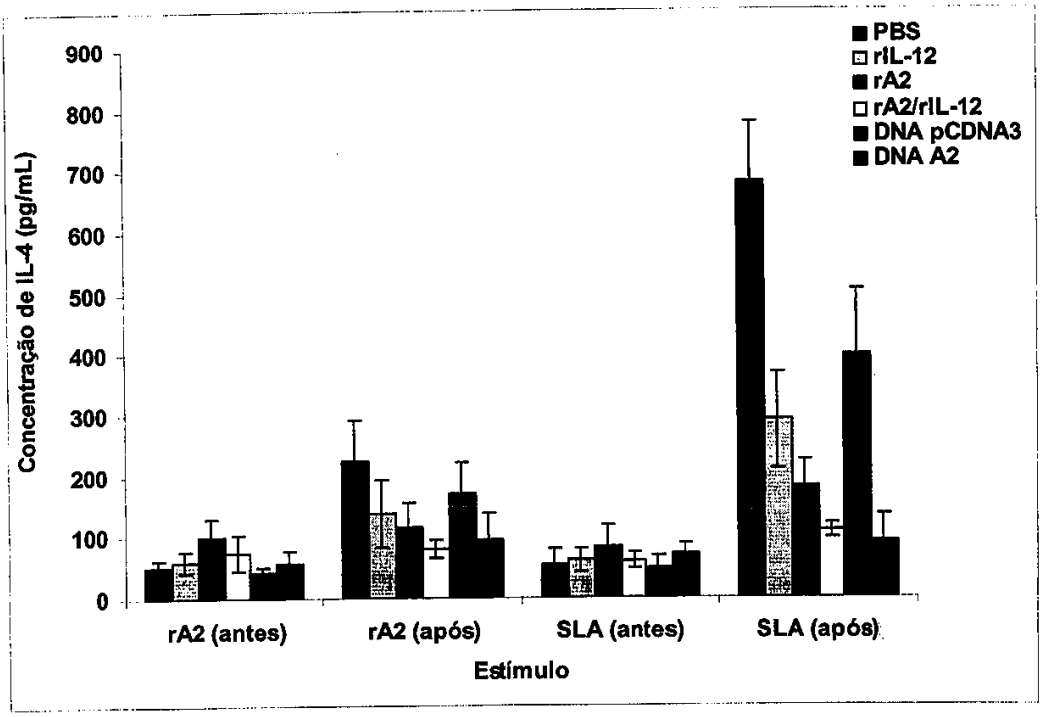
35

Figura 3



PI0603490

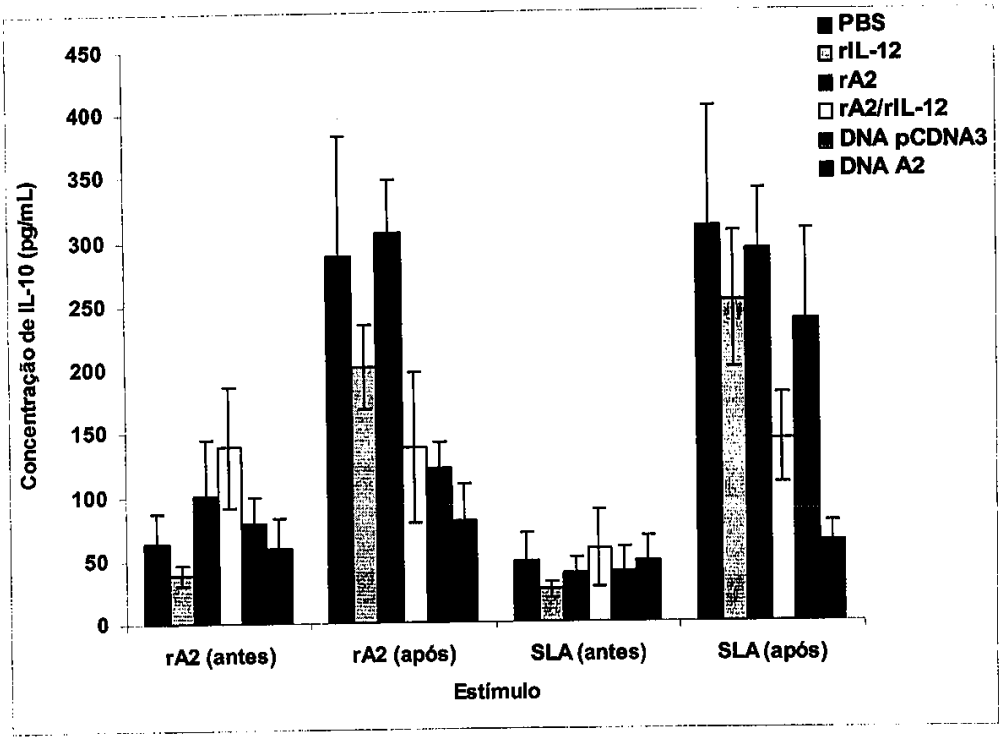
Figura 4



PI0603490

37

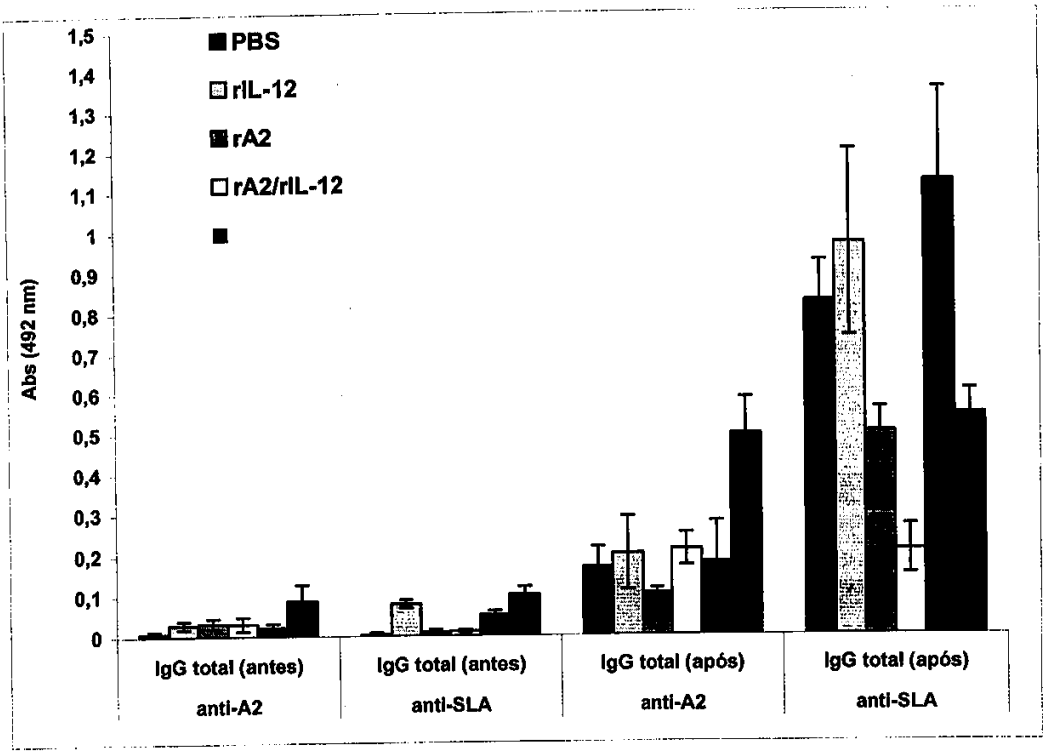
Figura 5



PI0603490

38

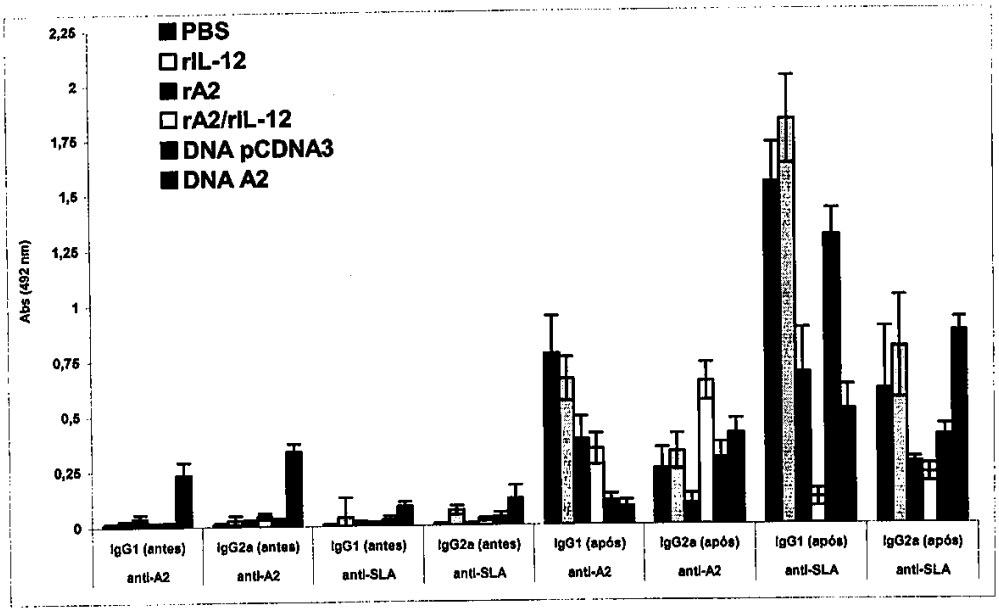
Figura 6



PI0613490

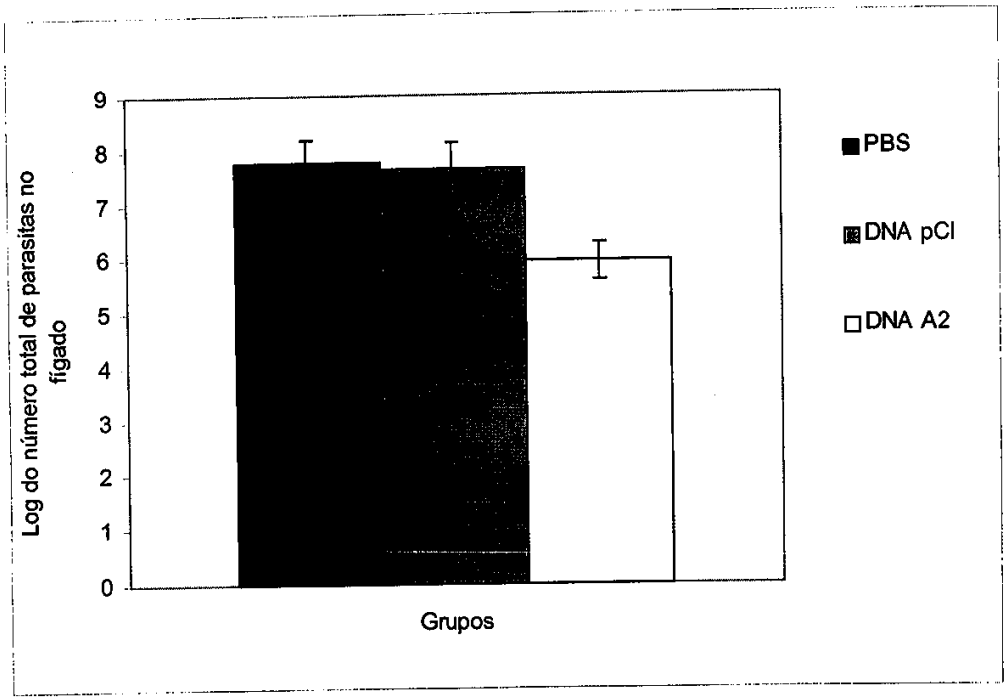
39

Figura 7



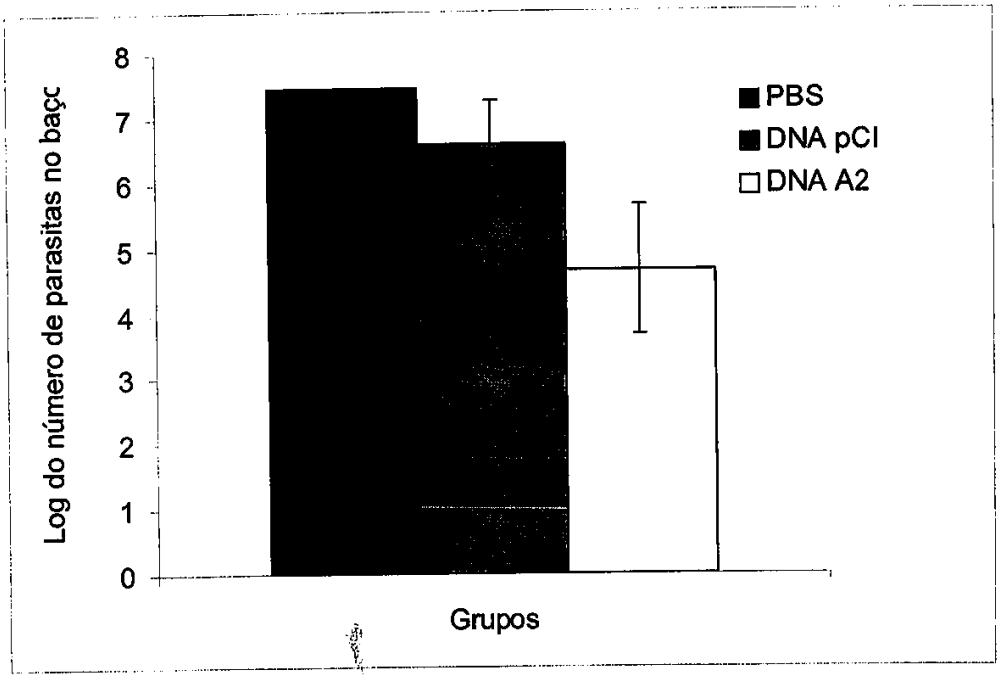
PI0603490

Figura 8



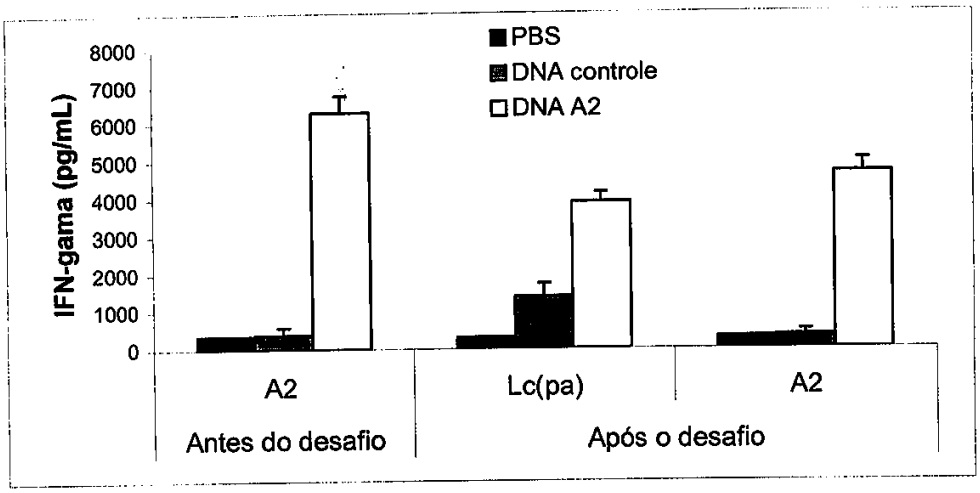
PI0603490

Figura 9



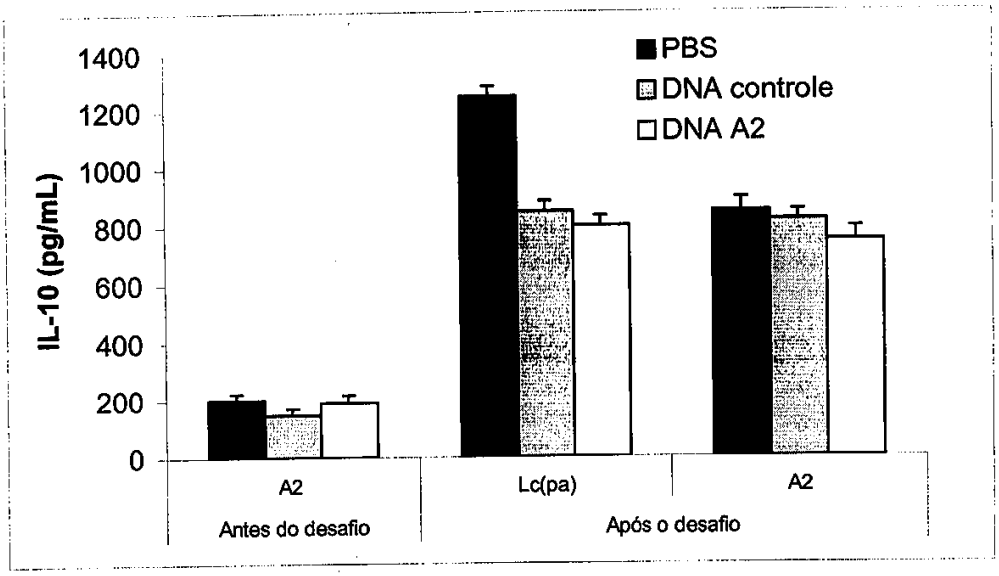
PI0603490

Figura 10



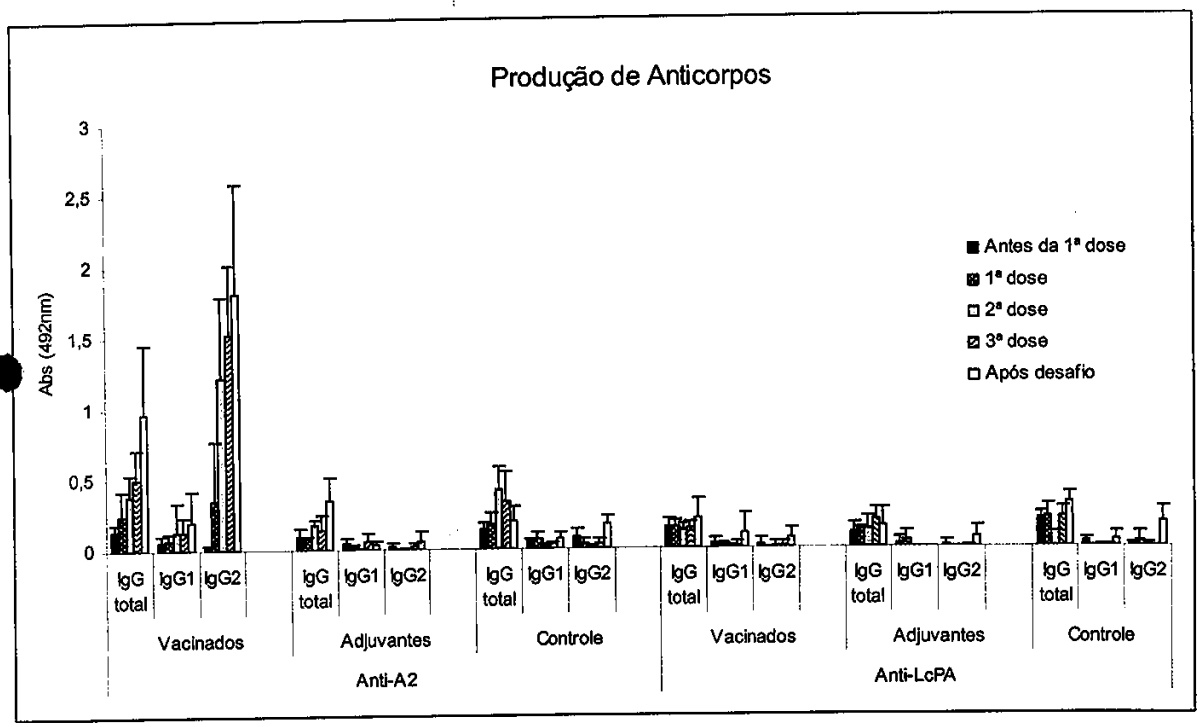
PI0613490

Figura 11



PI0603490

Figura 12



PI0603490

Figura 13

