

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: 2001.04.11	(73) Titular(es): LABORATORIOS LETI S.L. SOCIEDAD UNIPERSONAL GRAN VIA CORTS CATALANES 184 7A PLANTA 08038 BARCELONA ES
(30) Prioridade(s): 2000.04.17 ES 200000999	
(43) Data de publicação do pedido: 2003.01.29	
(45) Data e BPI da concessão: 2015.07.08 251/2015	(72) Inventor(es): MANUEL SOTO ALVAREZ ES CARLOS ALONSO BEDATE ES JOSÉ MARIA REQUENA ROLANIA ES
	(74) Mandatário: CÁTIA CRISTIANA JORGE RIBEIRO AVENIDA LUÍSA TODI Nº. 33 - 1º B 2900-460 SETÚBAL PT

(54) Epígrafe: **COMPOSIÇÃO CONTENDO LEISHMÂNIA LIP2A**

(57) Resumo:

A COMPOSIÇÃO É UM MÉTODO PARA A ESTIMULAÇÃO DE UMA RESPOSTA IMUNITÁRIA CONTRA UM ANTIGÉNIO EM INDIVÍDUOS IMUNIZADOS OU EM GRUPOS DE CÉLULAS. A COMPOSIÇÃO COMPREENDE UMA PROTEÍNA CHAMADA LIP2A LEISHMANIA FORMADA POR UMA SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS CODIFICADOS POR UMA SEQUÊNCIA DE ADN QUE COMPREENDE OS NUCLEÓTIDOS: 1-1 DA NOS. 778 A 1231 DE SEQ. ID. NO!1-2 OU FORMADO POR UMA SEQUÊNCIA DE NUCLEÓTIDOS CAPAZES DE HIBRIDAR COM A SEQUÊNCIA DESCRITA EM 1-1 SOB CONDIÇÕES MODERADAMENTE RIGOROSAS DE HIBRIDAÇÃO E, PORTANTO, QUE CODIFICAM PARA UMA PROTEÍNA SEMELHANTE À LIP2A. O MÉTODO COMPREENDE A INCUBAÇÃO DAS REFERIDAS CÉLULAS COM A REFERIDA PROTEÍNA LIP2A NA PRESENÇA OU NÃO DE UM ANTIGÉNIO ESPECÍFICO DE UMA DOENÇA OU INFECÇÃO.

Descrição

Composição contendo Leishmânia Lip2a

Esta invenção refere-se em geral a polipeptídeos, proteínas ou ácidos nucleicos que contem pelo menos uma parte de um ácido de proteína de ribossômica chamado de Leishmânia infantil Lip2a ou uma variação deste, úteis para modificar a resposta imunitária em pessoas imunizados ou em grupos de células. A invenção refere-se especificamente para composições baseadas em compostos de Leishmânia infantil que são homólogos aos ácidos de ribossomal, os quais são referidos para um Lip2a daqui por diante, para respostas estimulantes imunitárias e para uso como vacinas ou como produtos terapêuticos.

As composições da invenção são usadas para promover uma resposta humoral ou celular no individual que é inoculado com as ditas composições. Assim, as composições da invenção podem ser usada para o tratamento ou profilaxia de doenças. Especificamente, entre outras aplicações, as composições da invenção que usam o Lip2a proteico podem ser usadas como um adjuvante ou como uma subunidade numa vacina para a prevenção de Leishmânia ou tratamento de outras doenças.

Antecedentes da invenção

As vacinas podem induzir imunidade protetora contra uma infecção ou enfermidade mediante a geração de uma resposta imunitária apropriada num individual ou doente que está num sofrimento de tal enfermidade. Atualmente, avanços têm sido feitos no desenvolvimento de vacina contra agentes infecciosos

e mesmo contra certas doenças, supondo que, são muitas as técnicas apropriadas para a identificação de antigénios que têm o potencial para serem usados como agentes capazes de induzir respostas específicas para combater a batalha o mais comum das infeções e doenças tais como virais, bacteriano e infeções de protozo, ou mesmo câncer.

Na maioria dos casos, a resposta imunitária induzida pelo imunogénico é débil e consequentemente a resposta imunitária gerada, embora dirigido contra o antigénio presente no patogénico, não é suficiente para conferir proteção. Em tais casos, é necessário usar um agente capaz de atuar como um adjuvante.

Os adjuvantes são substâncias que aumentam a resposta específica contra uma substância quando eles são injetados Um- antes que a substância B- de acordo com a substância ou Gato o mesmo sítio como que a substância ou em diferentes lugares. Em geral, pode ser dito que os adjuvantes contribuem para um aumento na resposta imunitária em diferentes formas:

1- Elas podem ajudar o antigénio a ser libertado lentamente por/para o sistema imunitário; 2- mediante a estimulação e migração de antigénio que apresenta células ao sítio de injeção; 3- mediante a estimulação e proliferação de linfócitos; e 4- para melhorar a dispersão do antigénio através de todo o corpo do doente.

Esta invenção refere-se a uma composição para estimular uma resposta imunitária em pessoas imunizados individuais ou em grupos de células, caracterizadas pelo facto de que as ditas composições consistirem numa solução salina que compreende

proteína de Lip2a de Leishmânia representada por SEQ ID NO:2 ou um polipéptido o qual distingue-se apenas por substituições conservadas de aminoácidos de bilhete de sequência SEQ ID NO:2 cujos grupos de aminoácido representam mudanças conservadas são (1) ala, pro, gly, glu, asp, gin, asn, ser, thr; (2) cys, ser, tyr, thr; (3) val, ile, leu, met, ala, phe; (4) lys, arg, his; e (5) phe, tyr, trp, his, ou compreende uma codificação de ácido nucleico do Lip2a Leishmânia proteica como acima identificado, ou sendo representado por SEQ ID NO:1. Preferencialmente a referida composição é para uso em vacinas ou como produtos terapêuticos.

As composições da invenção são usadas para promover uma resposta humorística ou celular individual que é inoculada com as ditas composições. Assim, as composições da invenção podem ser usadas para tratamento ou profilaxia de doenças. Especificamente, entre outras aplicações, as composições da invenção que usam o Lip2a proteico podem ser usadas como um adjuvante ou como uma subunidade numa vacina para a prevenção de Leishmânia ou tratamento de outras doenças.

Antecedentes da invenção

As vacinas podem induzir imunidade protetora contra uma infecção ou enfermidade mediante a geração de uma resposta imunitária apropriada num individual ou doente que está sofrendo de tal enfermidade. Atualmente, estão a ser feitos avanços no desenvolvimento de vacinas contra agentes infecciosos e mesmo contra certas doenças, uma vez que existem muitas técnicas adequadas para a identificação de antigénios que têm o potencial para serem usados como agentes capazes de

induzir respostas específicas para o combate às mais comuns infecções e doenças tais como virais, bacterias e infecções de protozo, ou também câncer.

Na maioria dos casos, a resposta imunitária induzida pelo imunogénico é débil e consequentemente a resposta imunitária gerada, embora dirigida contra o antigénio presente no patógeno, não é suficiente para conferir a proteção. Nestes casos, é necessário usar um agente capaz de atuar como um adjuvante.

Os adjuvantes são substâncias que aumentam a resposta específica contra uma substância quando eles são injetados A- antes que substância B- ou em relação com a substância C- no mesmo sítio da substância ou em lugares diferentes. Em geral, pode ser dito que os adjuvantes contribuem para um aumento na resposta imunitária em formas diferentes: 1- Eles podem ajudar o antigénio a ser libertado lentamente por/para o sistema imunitário; 2-por meios da estimulação e migração de antigénio presente nas células ao sítio da injeção; 3- mediante a estimulação e proliferação de linfócitos; e 4- para melhorar a dispersão do antigénio em toda a parte do corpo do doente.

Azeites, polímeros, sais minerais e bactérias têm sido usados e são habitualmente usados como adjuvantes. Imunoestimulantes são substâncias que induzem em geral ou temporal uma resposta imunitária quando administradas com o antigénio ou em separadamente. Imunoestimulantes são típicos, por exemplo, o Freund adjuvante (AC/IF), BCG (umas espécies atenuadas de Microbactéria de tuberculose) ou uma forma não-possível de *Corynebacterium parvum*, entre outros. Os adjuvantes ou os

Imunoestimulantes atuam para aumentar a resposta imunitária específica por via não-específica.

Uma desvantagem grave com a maioria dos adjuvantes mais potentes em uso até presente é a sua elevada toxicidade. Supondo que o mecanismo de ação dos adjuvantes podem ser muito variados e é um requisito para a resposta imunitária contra a proteína associada serem dirigidos contra uma parte ou outra do sistema imunitário, é de importância máxima para identificar compostos que são capazes de atuar: A- com carácter de adjuvante (aumento na resposta imunitária ambos do tipo humorístico no nível de imunoglobina, e das citocinas do tipo celular específico, preferencialmente CD4+ ou CD8+ ou CTLs). B- que elas têm baixo ou não têm toxicidade. C- que elas são formadas de uma substância que é tão pura quanto possível, preferencialmente uma proteínas que embora não tendo carácter imunogénico não conduz a problemas de auto-imunidade e a uma potencial sombra que afete o imunogénico com o qual é administrado.

A patente ES 2133236 refere-se a um gene quimérico que compreende Lip2a. A proteína quimérica resultante é usada para a deteção de leishmanioses. Além disso, a proteína Lip2a tem sido explorada como verificador antigénico (Manuel Soto et al., *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 268, No.29, p. 21835-21843, 1993), mas nenhuma atividade imunogénica da proteína com ou sem um adjuvante é relatado.

A presente invenção descreve pela primeira vez a atividade imunogénica da proteína do Lip2a sem o uso de adjuvante.

Resumo da invenção

A presente invenção refere-se a composições para estimular uma resposta imunitária em pessoas imunizados ou em grupos de célula, caracterizado pelo facto de que a dita composição consiste numa solução salina que compreende uma proteína de Lip2a de Leishmânia representada por: SEQ ID No:2 ou polipéptido que difere apenas por substituições conservadas de aminoácidos de No:2 de que os grupos de aminoácidos que representam conservadas mudanças são (1) ala, pro, gly, glu, asp, gin, asn, ser, thr; (2) cys, ser, tyr, thr; (3) val, ile, leu, met, ala, phe; (4) lys, arg, his; e (5) phe, tyr, trp, his, ou compreende uma codificação de ácido nucleico do Lip2a Leishmânia proteica como identificado acima, ou sendo representado por SEQ ID No:1. A presente invenção também se refere a capacidade do Lip2a de proteína para induzir uma resposta imunitária específica do Th1 tipo quando administrado a um individual e para estimular o tipo Th1 resposta *in vivo* e/ou em células mononucleares em indivíduos imunizados com a referida proteína.

A presente invenção também fornece um método para produzir respostas imunitárias específicas em amostras de célula mononuclear mediante a incubação de células com a proteína chamada Lip2a em pessoas não-imunizadas com a referida proteína.

Uma alternativa de acordo com a invenção é o uso da proteína Lip2a para produzir um Th1- a resposta tipo é o uso de vetores virais ou ácidos nucleicos que contêm o gene Lip2a e são capazes de expressões diretas da proteína de Lip2a em indivíduos ou células transfectadas com a composição de ácidos

nucleicos da sequência SEQ ID No 1.

Descrição da invenção

A presente invenção refere-se em geral a um aumento na resposta imunitária que pode ser do tipo humorístico ou mediado por células num indivíduo imunizado com Lip2a como definido na reivindicação 1 ou numa cultura celular com a mesma proteína, ambos em células de indivíduos imunizados ou em células mononucleares de indivíduos saudáveis.

Dentro do contexto da invenção, é referido que Lip2a como é definido na reivindicação 1 é um composto imunoestimulante (um imunógeno contra o qual uma resposta imunitária é induzida) e cujas ações podem ser iniciadas por si sem a necessidade de adjuvantes. Geralmente, a resposta imunitária contra um antigénio pode ser iniciada ou aumentada pela administração à pessoa imunizada de uma proteína ou adjuvante. Antigénios e agentes imunoestimulantes são geralmente moléculas proteicas que procedem de vírus, bactéria, parasitas e tumores. Imunoestimulantes são moléculas que dão resposta direta ao sistema imunitário numa direção ou noutra em relação a Th1 ou Th2-tipo citocinas ou mediadas por CD4+ ou CD8+ células.

Neste sentido, e no contexto desta invenção, a capacidade de Lip2a para ser usada para tratamento nestas doenças que requerem um aumento sistemático de interferon- γ podem também ser incluídas. Dentro do contexto desta invenção, é compreendido também a iniciação de ou imunoestimulante contra um antigénio dum vírus, bactéria, agente antigénico infeccioso ou tumoral, mediante a administração do dito antigénio com a

proteína Lip2a ou seus derivados.

O Lip2a proteico pertence a um grupo de moléculas de peso molecular pequeno de carácter ácido que interage com a ribossoma durante a tradução. Isto é um processo comum para organismos dos três reinos: eubactéria, arqueobactérias e eucariotas. A função de estas proteínas é a de facilitar a interação entre a ribossoma e alguns fatores de tradução solúvel (Sanchez-Madrid and co-workers, 1979; Möller and co-workers, 1983). As proteínas ácidas enlaçam com a subunidade grande dos complexos de formação de ribossoma de dois dímeros mediante a interação com outro proteico que comparte certas características com estes dímeros. Estas proteínas são denominadas ribossomal proteico P0 em eucariotas e L10 em bactéria e arqueobactéria. Em organismos destes dois últimos reinos, os dímeros de proteínas ácidas são formados pelo mesmo polipéptido, embora a bactéria de uma das cópias sofre modificações pós tradução de acetilação (Terhorst and co-workers, 1972). Em eucariotas, as proteínas ácidas, chamadas também P proteínas tais como fosforilada na sua forma ativa (Wool, 1979; Hasler and co-workers, 1991) dividir-se em dois grupos, P1 e P2, dependendo das sequências similares e da presença de características de domínio de cada uma destas. Assim as eucariotas, o complexo formado pela união da ribossoma é composta por dois dímeros que por sua vez é composto por um polipéptido de cada grupo. Em mais eucariotas, existe apenas uma cópia dos genes codificadores das proteínas ácidas de cada grupo, embora In *Saccharomyces cerevisiae* (Newton and co-workers, 1990) and *Schizosaccharomyces pombe* (Beltrame e Bianchi, 1990), duas proteínas ácidas diferentes têm sido descritas dentro de cada grupo, cada um destes é codificado por genes diferentes.

A proteína Lip2a de *Leishmânia infantum* é composta de 106 aminoácidos com um peso molecular de 10,57 kDa (ver SEQ ID No.2). A análise da sequência de aminoácido deduzido da sequência de cDNA L22 indica que a proteína Lip2a possui características comuns iguais aos do ácido ribossomal de proteínas do grupo P2 de eucariotas, tais como as sequências altamente conservadas, uma área central rico em pralinas e alaninas, e um amino-término com uma sequência mais variável (Soto and co-workers,1993).

As composições de acordo com esta invenção compreendem um polipéptido que estimula uma resposta humorística forte em animais imunizados com o que, mesmo com ausência de adjuvantes e um tipo-Th1 a resposta imunitária em esplenéticos de pessoas que tenham ou não sido imunizadas com Lip2a. Este polipéptido induzido pode compreender todos ou parte da proteína completa de *Leishmânia infantum* chamado Lip2a ou um total ou homólogos parciais de proteína de ribossomal de outro organismo que tem atividade estimuladora similar.

Os polipeptídeos de acordo com a presente invenção incluem variantes de Lip2a como definido na reivindicação 1 capazes de produzir um Th1 que responde em pessoas imunizadas ou em células mononucleares criadas em cultivo dada a similitude entre as proteínas deste grupo. Tais variantes incluem formas estruturais diferentes da proteína nativa ambas em forma de um sal e em forma ácida ou induzidas por modificação de aminoácidos, por exemplo, através de glicosilação. Os polipeptídeos Lip2a expressados em *E.Coli* não são glicosídeos enquanto os mesmos produzidos em fermento ou em células de mamífero são idênticos para estes produzidos em *E.Coli*, mas

eles podem diferir estruturalmente e na sua capacidade imunológica que tem devido à glicosilação. Os lugares de glicosilação são Asn-N-Pro (oSer). N pode ser qualquer aminoácido exceto Pro.

Os polipeptídeos de acordo com esta divulgação compreendem sequências de aminoácidos que não diferem substancialmente de Lip2a, em que é compreendido por tais modificações de conceito de aminoácidos que são codificados para por sequências de ADN capazes de formar híbridos com as sequências de ADN do gene nativo de Lip2a em condições não muito rigorosas. Nestas variações a sequência de aminoácidos não diferem de Lip2a, podem ser mostrados facilmente pela sua capacidade para estimular esplenócitos de uma forma similar ou como faz o nativo Lip2a. Em geral, estas sequências, que substancialmente não diferem do nativo Lip2a, são formadas a partir de substituições de aminoácidos conservadas ou formadas por pequenas substituições de modificações, se mutagénese singular for alcançada. Em geral, os grupos de aminoácido que representam as mudanças conservadas são (1) ala, pro, gly, glu, asp, gln, asn, ser, thr; (2) cys, ser, tyr, thr, (3) val, ile, leu, met, ala, phe; (4) lys, arg, his; e (5) phe, tyr, trp, his. Dentro do âmbito desta divulgação são incluídas variantes de polipéptido de Up2a geradas por união covalente ou através da construção de proteínas de fusão com outros grupos químicos ou biológicos tais como proteínas usando procedimentos químicos ou biológicos entre os quais estão incluídos os métodos de ADN recombinante, por exemplo, para uma melhor e mais fácil purificação, estabilidade superior, ou formação de complexos que contem diferentes, totais ou parciais, de Lip2a de proteínas.

A proteína Lip2a pode ser expressada em E.Coli ou outras células eucarióticas ou procarióticas depois da transformação destas células com a sequência genômica do gene de Lip2a ou um de um clone total ou parcial de ADNc de Lip2a. A sequência de nucleótidos de ADN dos genes de Lip2a de aminoácidos da codificada proteína é mostrada no anexo à SEQ ID No 1 e No 2. O Lip2a do gene pode ser isolado do ADN de Leishmânia infantum ou outras espécies de Leishmânia ou outro organismo mediante identificação de clones de ADNc de uma biblioteca de expressão genética que expressa proteínas do organismo mediante soros animais reativos altamente infectado com Leishmânia infantum ou por técnicas de PCR usando oligonucleotidos específicos.

Para a obtenção do gene de Lip2a, um ADNc da biblioteca de expressão genética de Leishmânia infantum foi encontrada com soro de cão infectado naturalmente com Leishmânia. A análise da sequência de três destes clones isolados indicavam a existência de homologia na sequência com genes de codificação para o tipo ácido P2 de proteínas de ribossomal. Enquanto os genes mostrou uma total relojoaria da sequência na zona de codificação, sem traduzir 3'regiões eram completamente divergentes. São pelo menos dois Lip2a genes no genoma de Leishmânia infantum. Estes genes podem ser encontrados e agrupados nos genes do cromossoma XIX. Variantes do Lip2a proteico podem ser isolados para pesquisa em bancos de expressão genética, outra de ADNc, ou outra espécie de Leishmânia.

A proteína Lip2a pode ser purificada a partir da cultura de células bacterianas que se expressam o gene de Lip2a. A proteína pode ser purificado a partir dos extratos ou dos

sobrenadantes dependendo do vetor de expressão usado ambos como uma proteína de por sim ou como uma proteína de fusão ou com outra proteína. Os métodos variam embora a cromatografia de afinidade, crie anticorpos específicos contra Lip2a ou partículas de resinas adaptadas à proteína sintetizada, pela presença de um certo objetivo que permite a sua união à resina, é este o método preferido. Especificamente, o gene de Lip2a tenha sido subclonado numa variante dos vetores de expressão pMAL e dos vetores de expressão pQE31 e o sintetizado Up2a da proteína tenha sido purificado no limite do feixe MBP da proteína em colunas de maltose, ou no limite de uma cadeia de aminoácido de histidina com o objetivo de identificação da sua produção e purificação em colunas de NT Ni. De forma semelhante, anticorpos policlonados monoclonais ou específicos de mono podem ser usados para a sua purificação. Polipeptídeos parciais que formam a proteína Lip2a e que formam parte desta invenção podem ser sintetizados a partir da construção de clones parciais de Lip2a, conhecido por todos estes bem versados nas técnicas da biologia molecular.

Um método alternativo para a apresentação de Lip2a proteico como definido na reivindicação 1 para indivíduos serem imunizados ou para células de cultivo é a administração da proteína em forma de ácidos nucleicos cujo código para Lip2a ou uma parte da proteína em forma de plasmídeos, vírus, incluído nas lipossomas ou têm feixe para polímeros, ou outra via de introdução da proteína em células alvo. Os vetores mais usados para a administração do gene como um imunógeno em forma de ADN são os chamados pcDNA3 e pRc/CMV debaixo do controlo de promotores específicos principalmente do tipo eucariótico. É extensivamente documentado na literatura que

este tipo de imunização induz preferencialmente numa resposta do tipo Th1.

A proteína Lip2a como definida na reivindicação 1 pode ser administrada conjuntamente com o antígeno ou separadamente, ao mesmo tempo ou em diferentes vezes (por exemplo, dia ou de dois em dois dias antes da administração do antígeno apropriado), no mesmo lugar ou em lugares diferentes do animal. Neste sentido, Lip2a como definido na reivindicação 1 poderia ser usado para induzir como resposta humorística ou como um adjuvante em preparações de vacina com antígenos heterólogos para aqueles de Leishmânia.

Supondo que a resposta ao Lip2a proteico pode variar de individuo para individuo dependendo se o individuo é infectado com Leishmânia ou não e se conseqüentemente tenha sido exposto ao Lip2a proteico ou a administração do proteico pode ter um efeito imunológico diferente. Em termos gerais, a Lip2a proteína ou os polipeptídeos derivados como definido na reivindicação 1 são administrados em formulações farmacológicas como uma única substância numa solução salina ou em combinação com excipientes fisiológicos apropriados, incluindo lipossomas catiónicos e aniônicos ou outros agentes tais como BCG, peruses Bordatella, ou 3'purina de ADN de oligonucleotidos - 5'pirimidina. Os excipientes deveriam ser substâncias não-tóxicas. A literatura no uso de adjuvantes ou excipientes é extensiva e o mais apropriado deveriam ser escolhidos para a rota de administração desejada. Por exemplo, por administração oral, um composto sólido deveria ser escolhido tais como celulose ou glicose. A imunização pode ser realizada com uma preparação de Lip2a com moléculas separadas ou feixe e em combinação com um ou mais antígenos

e mesmo citocinas que podem atuar como Imune estimuladores. Os itinerários e a frequência de administração podem variar extensivamente. Os itinerários mais usados são intramusculares ou subcutâneos, intranasal ou orais, com uma frequência de 3 doses cada 15 dias. A dose pode também variar extensamente dependendo do estado do indivíduo e a dimensão deste. A dose do Lip2a proteico como definido na reivindicação 1 como com qualquer outro tem imunógeno, que tem de ser ajustado de modo que uma quantidade significativa de gama de interferon ou outras citocinas sejam induzidas. Normalmente, a dose pode variar entre 10 microgramas e 100 microgramas por 100 gramas do hóspede.

Outro método alternativo de administração de Lip2a e indução de uma resposta imunitária pode ser a extração de células (preferencialmente células mononucleadas periféricas) de um indivíduo, estimulá-las in vitro com o Lip2a de proteína na presença ou não de um antigénio (específica para uma enfermidade ou infeção) para posteriormente reintroduzi-las no doente com o objetivo de interferir no processo patológico. Neste contexto o Lip2a proteico como definido na reivindicação 1 suas variantes de polipéptido pode ser usado como adjuvante ou imune estimulador de uma resposta. Estas características do Lip2a proteico sugerem que pode ter um papel para jogar num gerador imune a uma resposta protetora ou terapêutica em pacientes com doenças dependendo da presença de interferon- γ ou parasitas, por exemplo, leishmanioses. Neste sentido, a presente invenção descreve sistemas para aumento ou imunoestimulante da resposta humorística ou celular em pessoas ou em células isoladas, (macrófagos Monócitos, B células ou células dendríticas) de indivíduos que tenham sido imunizados ou não com o Lip2a de

proteína. A capacidade para estimular a produção de gama de interferon mostra o potencial que a Lip2a tem que ser extensamente usada em terapia numa margem de banho de aplicações que requeiram a indução de uma não resposta específica para esta citocina (não necessariamente leishmanioses).

Como será mostrado nas figuras, que são citadas por exemplo mais tarde, o Lip2a proteína é capaz de induzir uma resposta humorística forte em Balb/c ratos imunizados com 5 microgramas da proteína rLip2a em tampão salino por rota intraperitoneal e uma programação de administração de duas doses com três semanas de separação entre estas (21 dias). Os dados mostraram que altos títulos de imunoglobulinas G e M são produzidos. Depois da primeira dose, a resposta foi principalmente do tipo IgM conducente com uma maturação em direção a IgG depois de a segunda inoculação. Foi observado que o isótipo de IgG é mais abundante em ratos imunizados com a proteína rLip2a correspondente a imunoglobina IgG2a embora a IgG1 foi também produzida. Conclui-se que destes dados que a imunização com o Lip2a antígeno geram uma resposta de mistura Th1/Th2, ainda que Th1 predomine.

Supondo que a natureza desta proteína é conservada com outros a partir de outros organismos, a especificidade da resposta humorística foi analisada depois da imunização. O reconhecimento dos soros de ratos imunizados foi analisado contra uma reunião de proteínas sintéticas que compreendem Lip2a. Foi observado que os péptidos A4, A5 e A6 foram reconhecidos pelos soros. A região da proteína contida nos ditos péptidos é específica para as proteínas ácidas do tripanosomatides, sem atividade tendo sido detetados contra o

péptido A7, que contém o terminal de carboxilo conservado da proteína. Esta especificidade de resposta foi confirmada quando uma "análise Western Blot foi efetuada da reatividade do soro contra as proteínas de ácido de Leishmania, MBP Lip2a e MBP-Lip2b, humano MBP-P2 e MBP-P2 de T. cruzi. Houve apenas reconhecimento em direção às proteínas ácidas de parasitas, a reatividade sendo superior contra MBP-Lip2A, e em um não caso eram anticorpos gerados contra proteínas ácidas de organismos eucarióticos superiores testados (conservado com humano P2 usado no ensaio). Assim, foi confirmado que a proteína imunogénica ou imunoestimulante não fez induzir problemas de auto-imunidade no hospede. Além disso, um dos péptidos reconhecidos pelos soros de animais imunizados coincide com o péptido reconhecido pelos soros dos cães infetados com leishmânias viscerocutâneas. Isto significa que também em cães, a região da proteína é imunogénica na infeção natural com leishmânias.

A proteína Lip2a também induz proliferação de esplenócitos obtida a partir de ratos imunizados. Os resultados obtidos mostram que houve uma relação direta entre a concentração de antígeno e o nível de proliferação celular induzidos. Surpreendentemente, os mesmos resultados foram obtidos quando a proliferação de esplenócitos obtidos de ratos não-imunizados foi analisada. Para diretamente implicar a proteína em proliferação, eliminando a possibilidade que a bactéria contaminada pode provocar o dito fenómeno, a capacidade inibitória de um anti-Lip2a anticorpo gerado num coelho em diluições diferentes de proliferação celular foi analisada. Foi observado que enquanto uma diluição de soro de 1/100 induziu uma redução em proliferação ambos para cultivos com Concanavalin A e para cultivos com o Lip2a de

antigénio, ainda foi sempre superior no caso de cultivos induzidos para proliferar com Lip2a, em diluições mais altas (1/500 e 1/1000), a inibição foi apenas induzida em cultivos com este antigénio. Este facto mostra que a indução proliferativa foi ditada pela proteína Lip2a e não por um contaminante deste. O estudo da cinética de proliferação e os níveis da proteína em ratos imunizados com a proteína Lip2a e ratos não imunizados que a proteína Lip2a é capaz de induzir a mesma cinética de proliferação e alcançar os mesmos níveis indiferentemente de os animais terem sido imunizados ou não. Isto indica que ali deveria estar células que são capazes de responder ao Lip2a mesmo em animais não-estimulados que sugerindo que durante a sua vida os animais tenham sido expostos a proteínas que tenham características estruturais ou uma sequência similar ao Lip2a. No geral, pode afirmar-se que os dados obtidos que a proteínas rLip2a tem características mitogénicas e imunogénicas muito potentes.

Para caracterizar o tipo de resposta gerada durante as proliferações, a gama-INF de linfoquinas e IL-4 foram analisadas que são produzidas nos ensaios de proliferação, ambos de esplenócitos de ratos de controlo que não tenham sido imunizados bem como de ratos imunizados. Os resultados mostram que a proliferação provocada pelo antigénio gerou um aumento significativo na secreção de gama-INF em esplenócitos de ratos imunizados. De forma semelhante, um aumento ligeiro foi detetado nos níveis de IL-4 nos cultivos de esplenócitos que proliferam na presença do antigénio em relação a estes que proliferam no meio sem estímulo adicionado. Estes resultados indicam que a resposta gerada pelo antigénio provoca uma proliferação celular que gera um predomínio Th1 modelo de produção de linfócitos.

Com o objetivo de determinação do potencial protetor do carácter do Lip2a, a proteína foi administrada e posteriormente o Balb/c de ratos eram infetados com um parasita. Foi visto que houve um atraso na aparência da enfermidade e uma redução nas lesões do tipo pele gerada por infeções com leishmânias mais importantes. Um total ou parcial cDNA clone de Lip2a. A sequência de nucleótidos de DNA do gene de Lip2a e de aminoácidos da codificada proteína é mostrada no anexo SEQ ID No.1 e No.2. O Lip2a gene pode ser isolado do DNA de Leishmânias infantum ou outras espécies de Leishmânias ou outro organismo mediante identificação de cDNA clones a partir de uma expressão genética que expressa proteínas do organismo mediante soros animais reativos altamente infetado naturalmente com Leishmânias infantum ou por técnicas de PCR usando oligonucleotidos específicos.

Para obter o gene de Lip2a, um cDNA biblioteca de expressão genética de Leishmânia infantum foi encontrada com soro de cão infetado naturalmente com Leishmânia. A análise da sequência de três dos clones isolados indica a existência de homologia na sequência com genes de codificação para o tipo ácido P2 ribossomal de proteínas. Enquanto os genes mostraram uma homologia total da sequência na zona de codificação, sem traduzir 3' regiões eram completamente divergentes. São pelo menos dois genes de Lip2a no genoma de Leishmânia infantum. Estes genes podem ser encontrados em grupo no genoma XIX cromossoma. Variantes do Lip2a proteico podem ser isoladas para pesquisar bancos de expressão genética de cDNA de outras espécies de Leishmânia.

A proteína Lip2a pode ser purificada a partir de cultivos de células bacterianas que expressam o gene de Lip2a. A proteína

pode ser purificada a partir dos extratos ou dos sobrenadantes dependendo do vetor de expressão usado ambos como uma proteína de per si ou como uma proteína de fusão com outra proteína. Os métodos variam embora com alguma afinidade cromatográfica, se com específicos anticorpos contra Lip2a ou partículas de resinas adaptadas à proteína sintetizada, pela presença de um certo objetivo que permite a sua união à resina, é o método preferido. Especificamente, o gene Lip2a tenha sido subclonado numa variante dos vetores de expressão pMAL e da expressão dos vetores pQE31 e o sintetizado Lip2a de proteína tenha sido purificado no feixe da proteína de MBP em colunas de maltose, ou numa cadeia de aminoácido de histidina com o objetivo de identificação da sua produção e purificação em colunas de NT Ni. De forma semelhante, anticorpos policlonáveis monoclonais ou específicos podem ser usados para sua purificação. Polipeptídeos parciais que formam a proteína Lip2a e que formam parte desta invenção podem ser sintetizados da construção de clones parciais de Lip2a, conhecidos por todos estes bem entendidos nas técnicas da biologia molecular.

Um método alternativo para a apresentação da proteína de Lip2a para indivíduos imunizados ou para células de cultivo é a administrado da proteína em forma de ácidos nucleicos cujo código para Lip2a ou uma parte da proteína em forma de plasmídeos, vírus, incluindo lipossomas ou polímeros, ou outra via de introdução da proteína em células diana. Os vetores mais usados para a administração do gene como um imunógeno em forma de DNA são os denominados pcDNA3 e pRc/CMV sob o controlo dos promotores específicos principalmente de tipo eucariótico. É extensivamente documentado na literatura que este tipo de imunização preferencialmente induz uma

resposta do tipo Th1.

A proteína Lip2a pode ser administrada juntamente com o antígeno ou separadamente, ao mesmo tempo ou em diferentes vezes (por exemplo, um dia ou dois dias antes da administração do antígeno apropriado), ao mesmo tempo ou em diferentes tempos. Neste sentido, Lip2a podem ser usados para induzir uma resposta humorística ou como um adjuvante em preparações de vacina com antígenos heterólogos tais como Leishmânia.

Supondo que a resposta ao Lip2a proteico pode variar de indivíduo para indivíduo dependendo se o indivíduo é infectado com Leishmânia ou não e se tem conseqüentemente sido exposto ao Lip2a de proteína, a administração da proteína pode ter um efeito imunológico diferente. Em termos gerais, o Lip2a proteico ou os polipeptídeos derivados são administrados em formulações farmacológicas como uma única substância numa solução salina ou em combinação com excipientes fisiológicos apropriados, incluindo lipossomas catiónicos e aniônicos ou outros agentes tais como BCG, Bordetella estuda, ou 3'purina de DNA e oligonucleotídeos - 5'pirimidina. Os excipientes deverão ser não substâncias tóxicas. A literatura no uso de adjuvantes ou excipientes é extensiva e o mais apropriado deverá ser escolhido para a rota de administração desejada. Por exemplo, para administração oral, um composto sólido deveria ser escolhido tal como celulose ou glicose. A imunização pode ser realizada com uma preparação de Lip2a com moléculas separadas ou feixes em combinação com um ou mais antígenos e mesmo citocinas que podem atuar como imuno estimuladores. Os itinerários e frequência de administração podem variar extensivamente. Os itinerários mais usados são

intramusculares ou subcutâneos, intranasal ou orais, com uma frequência de 3 doses cada 15 dias. A dose pode também variar extensamente dependendo do estado do indivíduo e a dimensão deste. A dose da proteína Lip2a, tal como qualquer outro imunógeno, tem de ser ajustado de modo que uma quantidade significativa de gama de interferon ou outras citocinas são induzidas o que isto pode de forma potencial induzir. Normalmente, a dose pode variar entre 10 Microgramas e 100 microgramas por 100 gramas do hóspede.

Outro método alternativo de administração de Lip2a e indução de uma resposta imunitária pode ser a extração de células (preferencialmente células mononucleadas periféricas) dum indivíduo, estimula-las *in vitro* com a proteína Lip2a na presença ou não de um antigénio (específico de uma enfermidade ou infeção) para posteriormente reintroduzi-las no doente com o objetivo de interferência com o processo patológico. Neste contexto o Lip2a proteico ou suas variantes de polipéptido poderiam ser usados como adjuvante ou imune estimulador de uma resposta. Estas características do Lip2a proteico sugerem que pode ter um papel para jogar em gerador uma resposta imunitária protetora ou terapêutica em pacientes com doenças dependendo da presença de interferon- γ ou parasitas, por exemplo, leishmanioses. Neste sentido, a presente invenção descreve sistemas para aumento do imunoestimulante da resposta humorística ou celular em pessoas ou células isoladas, (micrófaga Monócitos, B células ou células dendríticas) de indivíduos que têm sido imunizados ou não com a proteína de Lip2a. A capacidade para estimular a produção de gama de interferon mostra o potencial que Lip2a tem que ser extensamente usado em terapias numa margem de banhado de aplicações que requerem a indução de uma não

resposta específica para esta citocina (não necessariamente leishmanioses).

Como será mostrado nas figuras, que são a frente citadas, o Lip2a proteína é capaz de induzir uma resposta humorística forte em Balb/c ratos imunizados com 5 microgramas da proteína rLip2a em tampão salino por rota intraperitoneal e uma programação de administração de duas doses com uma terceira semana de separação entre eles (21 dias). Os dados mostram que títulos altos de imunoglobulinas G e M são produzidos. Depois da primeira dose, a resposta foi principalmente do tipo IgM conducente a uma maturação em direção a IgG depois da segunda inoculação. Foi observado que o isótipo de IgG era mais abundante em ratos imunizados com a proteína rLip2a correspondendo a imunoglobina IgG2a embora IgG1 foi também produzido. Conclui-se destes dados que a imunização com o Lip2a antígeno gera uma mistura de resposta de Th1/Th2, embora Th1 predomina.

Supondo que a natureza destas proteínas é conservada com outros organismos, a especificidade da resposta humorística foi analisada e gerada depois da imunização. O reconhecimento dos soros de ratos imunizados foi analisado contra uma coleta de proteínas sintéticas que compreendem Lip2a. Foi observado que os péptidos A4, A5 e A6 foram reconhecidos pelos soros. A região da proteína contida nos ditos péptidos é específica para as proteínas ácidas do tripanosomatidos, sem atividade tendo sido detetados contra o péptido A7, o qual contém um terminal de carboxilo conservado a partir da proteína. Esta especificidade de resposta foi confirmada quando uma análise "Western Blot" foi realizada da reatividade dos soros contra as proteínas acídicas de Leishmânia, MBP-Lip2a e MBP-Lip2b,

humano MBP-P2 e MBP-P2 de *T. cruzi*. Houve apenas reconhecimento em direção às proteínas acídicas de parasitas, a reatividade foi superior e contra MBP-Lip2A, e em nenhum caso foram anticorpos gerados contra as proteínas acídicas dos organismos eucarióticos superiores testados (conservado com humano P2 usado no ensaio). Assim, foi confirmado que a proteína imunogénica ou o imunoestimulante não fez induzir problemas de auto-imunidade no hóspede. Além disso, um dos péptidos reconhecidos pelos soros de animais imunizados coincidindo com o péptido reconhecido pelos soros dos cães infectado com leishmanioses viscerocutâneas. Isto significa que também em cães, esta região da proteína é imunogénica na infecção natural com leishmanioses.

A proteína Lip2a também induz proliferação de esplenócitos obtidos de ratos imunizados. Os resultados obtidos mostram que houve uma relação direta entre a concentração de antígeno e o nível de proliferação celular induzidos. Surpreendentemente, os mesmos resultados eram obtidos quando a proliferação de esplenócitos obtidos de ratos não-imunizados foram analisados. Em ordem a implicar diretamente a proteína em proliferação, eliminando a possibilidade de contaminação, cujo fenómeno, a bactéria pode provocar, a capacidade inibitória de um anticorpo anti-Lip2a gerado num coelho em diferentes diluições foram analisados em proliferação celular. Foi observado que enquanto uma diluição de soro de 1/100 induz uma redução em proliferação ambos para cultivos com Concanavalin A e para cultivos com o Lip2a antígeno, embora, fosse sempre superior no caso de cultivos induzidos para proliferar com Lip2a, em diluições mais altas de (1/500 e 1/1000), a inibição foi apenas induzida em cultivos com este antígeno. Este feito mostrou que a indução

proliferativa foi ditado pela proteína Lip2a e não por um contaminante deste. O estudo da cinética de proliferação e os níveis das proteínas em ratos imunizados com a proteína Lip2a e ratos não indicados imunizados com proteína Lip2a são capazes de induzir a mesma cinética de proliferação e alcançar os mesmos níveis indiferentemente se os animais tenham sido imunizados ou não. Isto indica que deveriam ser células que são capazes de responder ao Lip2a mesmo em 25 animais não-estimulados que sugerindo que durante a sua vida os animais tenham expostos a proteínas que tenham características estruturais ou uma sequência similar ao Lip2a. Para além disso, pode ser afirmado dos dados obtidos que a proteína rLip2a tem características mitogénicas e imunogénicas muito potentes.

Para caracterizar o tipo de resposta gerada durante as proliferações, a gama de INF de linfoquinas e IL-4 foram analisadas, as que foram produzidas nos ensaios de proliferação, ambos os esplenócitos foram controlados que não tinham sido imunizados e de ratos imunizados. Os resultados mostram que a proliferação provocada pelo antigénio gera um aumento significativo na secreção de gama de INF em esplenócitos de ratos imunizados. De forma semelhante, um aumento ligeiro foi detetado nos níveis de IL-4 em culturas de esplenócitos proliferados na presença de antigénio os quais proliferam no meio sem estímulos adicionados. Estes resultados indicam que a resposta gerada pelo antigénio provoca uma proliferação celular que gera predominantemente Th1 modelo de produção de linfócitos.

Com o objetivo de determinação do potencial protetor do carácter do Lip2a, a proteína foi administrada e

posteriormente o Balb/c ratos eram infetados com o parasita. Foi visto que houve um atraso na aparência da enfermidade e uma redução nas lesões tipo pele gerada por infecções com Leishmânia mais importante.

Descrição das figuras

A invenção será agora descrita com referência as figuras em anexo, nas quais:

A Figura 1 descreve o sistema usado para isolar o Lip2a gene de Leishmânia infantum e em cujos genomas existem duas cópias deste gene.

A Figura 2 mostra a expressão (RNA) do gene do Lip2a proteína em Leishmânia infantum.

A Figura 3 mostra a expressão do Lip2a de proteína em cultivos bacterianos de E. coli transformado com o pMal vetor de expressão que contém a proteína de fusão MBP-Lip2a e sua purificação e reconhecimento do Lip2a proteína por soros de animais infetados naturalmente com Leishmânia.

A Figura 4 mostra a especificidade da resposta imunitária para Lip2a de soros de animais infetados naturalmente por Leishmânia.

A Figura 5 mostra a localização dentro da proteína dos antígenos de determinação reconhecidos pelos soros dos animais infetados naturalmente por Leishmânia infantum.

A Figura 6 mostra que o Lip2a da proteína é homólogo ao

acídico ribossomal de proteínas P2 de outros organismos eucarióticos.

A Figura 7 mostra que o Lip2a da proteína é capaz de induzir uma resposta humorística depois da inoculação de ratos.

A Figura 8 mostra a especificidade da resposta para péptidos de Lip2a de soros de Balb/c animais inoculados com Lip2a e a especificidade dos soros das proteínas contra ratos imunizados do P2 família.

A Figura 9 mostra que a proteína é capaz de induzir uma resposta proliferativa em esplenócitos de animais imunizados e não imunizados.

A Figura 10 mostra que o Lip2a da proteína confere um certo grau de proteção e demoras na aparência de sintomas de infecção maior de Leishmânia.

Com referência à figura 1, o cDNA expressão livreira de Leishmânia infantum foi pesquisada com o soro de um cão infectado naturalmente com Leishmânia. Para caracterizar as sequências de DNA contidos nos fagos isolados, as inserções de cDNA nele contidas foram clonadas e sequenciadas no plasmídeo pUC18. A análise da sequência de três dos clones isolados (L21, L22 e L23) indicaram a existência de homologia da sequência com dos genes codificados para o acídico eucariótico ribossomal de proteínas do P2 tipo. O cDNAs L21 e L22 têm uma sequência idêntica em toda parte do seu comprimento, com L22 (454 nt) a ser o maior em ambos os casos. Quando a sequência de clone L22 foi comparada com o clone L31, foram observadas diferenças notáveis: Enquanto a

homologia da sequência dos clones L22 e L31 foram completas na região de codificação, as regiões não codificantes 3' eram absolutamente divergentes. A proteína foi denominada Lip2a.

Em ordem a estudar a organização dos genes Lip2a, as análises de mancha de Southern foram realizadas. Na secção A da figura 1 foi mostrado o resultado da hibridação da inserção do clone L22 contra os filtros que continham DNA a partir de *L. infantum* digerido com enzimas de restrição diferentes (B = Bam H I; H = Hinf I; P = Pst I). O modelo obtido usando L22 como uma sonda indica que são pelo menos dois Lip2a genes, como duas bandas de hibridização que aparecem no Pst I pista, uma enzima que não apresenta uma sequência de corte em L22 cDNA. Estes genes são encontrados agrupados no genoma, com apenas uma banda de hibridização fosse obtida nos sondas de DNA digeridas com o suporte das enzimas de restrição usado. De facto, e como pode ser deduzido do modelo de hibridização obtido depois de hibridização a inserção do clone L22 para filtros que contem cromossomas de *Leishmânia* separados em campo pulsado, o Lip2a genes são localizados num único cromossoma (XIX banda cromossômica) (secções B-C).

Para definir com detalhe a sequência e organização dos genes codificados para a proteína acídica Lip2a de *Leishmânia*, a inserção do clone L22 foi usada para pesquisa numa biblioteca de genes genómicos deste parasita, construído no vetor de substituição EMBL-3. Um fago positivo foi isolado, denominado L22g. O mapa de restrição do fago (D), assim como os dados para a sequência que são detalhados mais a frente, mostram que eram dois genes codificados da proteína Lip2a, formada por duas unidades organizadas em série. A sequência do fragmento Sal I de 2.8 Kb do fago L22g que continha os genes

responsáveis de cDNA L22 é mostrada na SEQ ID No. 1 em anexo. A zona de codificação dos dois genes não mostra diferenças exceto duas transições que não conduzem a mudanças na sequência de aminoácidos da proteína codificada; pelo contrário, zonas 5' e 3' que não são traduzidas são completamente diferentes.

Estudos de hibridização em RNA de *Leishmânia* em filtros, usando a inserção do clone L22 como uma sonda, mostrou que a dimensão das transcrições do Lip2a genes foi 0,6 Kb (ver figura 2-A). Estes mensageiros RNAs são polidenilado. Como se mostra na figura 2 (painel A, sendas 1 e 2), houve mudanças na intensidade das bandas de hibridização obtidas, de acordo com o RNA que se obteve a partir de culturas de promastigotes na fase logarítmica crescente ou estacionário. A partir de aqui é deduzido que a expressão dos genes do ácido proteico Lip2a de *Leishmânia* é superior na fase logarítmica. Este tipo de regulação na expressão dos genes das proteínas acídicas tem também sido descrito em fermento (Newton and co-workers, 1990, Saenz-Robles, 1990). O tratamento de choque térmico, induzido em incubação de culturas de promastigotes em fase logarítmica durante 2 horas em 42° C é dirigido também a uma redução nos níveis de transcrições das proteínas acídicas do parasita (painel A, pista 4). Por outro lado, e como é mostrado na linha 2 (painel A), a hibridação obtida na linha de axenico amastigotes foi até 6 vezes baixa que na linha de RNA extraída de promastigotes. Os dados parecem indicar que o modo de expressão do Lip2a genes de *Leishmânia* é ligado ao estado metabólico celular (Soto and co-workers, 1993).

De acordo com figura 3, no painel A (linha 1), a expressão da proteína Lip2a é mostrada numa cultura bacteriana de *E. coli*

transformada com a expressão do vetor pMAI-cRI que contém o gene Lip2a e sua purificação (linha 2). O peso molecular da proteína purificada corresponde com uma proteína de fusão MBP-Lip2a. MBP significa a proteína de união de maltose de E. coli que é usada para formar a proteína de fusão com Lip2a. O Painel B mostra o reconhecimento da proteína do Lip2a por uma reunião de soros a partir de animais infectados naturalmente com Leishmânia.

De acordo com a figura 4, a especificidade da resposta humoral foi analisada contra as geradas Lip2a mediante medição da reatividade de soros obtidos a partir de cães infectados com Leishmânia contra proteínas homólogas de outras espécies. No caso da proteína de Lip2a acídica, a resposta de soros caninos positivos foi analisada contra outras proteínas acídicas de Leishmânia, Lip2b, as proteínas acídicas humanas de P1 e P2 e P2 de T. cruzi, todas expressadas como proteínas de fusão depois de clonagem no pMAL-cRI vetor. No painel A da figura, é mostrado o resultado da incubação de um conjunto de soros obtidos de cães infectados com Leishmânia contra as proteínas acídicas previamente descritas. Apenas as proteínas de fusão MBP-Lip2a e MBP-Lip2b (linhas 2 e 3) eram reconhecidas, indicando que os anticorpos produzidos contra as proteínas acídicas durante o processo de leishmanioses são dirigidos especificamente contra as proteínas acídicas de Leishmânia. No painel B da figura, é mostrado que o soro de um doente com lúpus sistêmico eritematoso reagindo às proteínas expressadas das três espécies. Este resultado indica que as proteínas acídicas de Leishmânia contêm o antigénico determinante contra a resposta humoral originada durante as Chagas da enfermidade e em processos de autoimunização de humanos, localizados em proteínas de

carboxilo terminais. No entanto, a falta de reatividade contra as proteínas acídicas de humanos ou para aqueles de *T. cruzi* em soros de cão infetado com *Leishmânia* mostram que são não anticorpos dirigidos contra o término-C destas proteínas em soros de animais com leishmanioses.

Para localizar os antigénicos determinantes de Lip2a, péptidos foram sintetizados que se sobrepõem por 5 aminoácidos a partir da sequência de aminoácidos da proteína do Lip2a. A Figura 5 mostra a sequência de péptidos e os valores de densidade ótica obtida quando estes péptidos são analisados em ensaios de FAST-ELISA contra soros de cães infetados. Apenas os valores positivos obtidos contra o péptido A6. A falta de reatividade obtida depois do exame dos soros de animais infetados com *Leishmânia* contra o peptídico A-7, que contém o término-C conservado em proteínas acídicas de eucariotas, confirmando que esta zona não causa qualquer resposta humoral durante a infeção com o parasita.

Com o objetivo de ser capaz de analisar o papel imunogénico ou imunoestimulante do potencial de Lip2a de *Leishmânia* uma inserção do clone L22 foi clonado no vetor de expressão eucariótico pQE-31. A indução de cultivos bacterianos tem transformado com a recombinação do plasma pQE-Lip2a produzido sobre expressão de uma proteína que corresponde a Lip2a expressada na forma recombinante, denominada rLip2a. A Figura 6 mostra o resultado da expressão e posterior purificação da proteína de 500 ml de cultura, induzido por IPTG, mediante colunas de cromatografia de afinidade em NT-Ni. As bactérias eram solubilizadas em 8 M ureia e ultrassónicas. Peso molecular e marcador de proteínas (linha M). Proteínas de *E. coli*, sem transformação pelo vetor de expressão pQE-31 (linha

1). Proteínas de *E. coli* transformadas com o vetor de expressão pQE-31 (linha 2). A proteína foi purificada a partir da fração solúvel (linha 3).

A proteína expressada no vetor pQE-31 inclui o Lip2a da proteína e os aminoácidos que foram incluídos durante o processo de clonagem. O Lip2a da proteína é composto de 106 aminoácidos e permanece entre aminoácido 39 e 144 (SEQ ID No.3) e tem um peso molecular de 10.57 kDa. (Ver SEQ ID No.3 daqui por diante).

A análise da sequência de aminoácidos deduzida da sequência do cDNA L22 indicava que o Lip2a da proteína tem características em comum com o ácido ribossomal das proteínas do grupo P2 de eucariotas. A comparação do Lip2a da proteína de *Leishmânia* deduzida da sequência de nucleótidos mostra uma identidade de 89.62% com o seu homólogo de *Leishmânia donovani* (RLA2 LEIDO), uma identidade de 81.13% com o seu homólogo de *Leishmânia brasilienses* (RLA2 LEIBRE), de 61.46% com o seu homólogo de *Trypanosoma cruzi* (RLA2 TRYCR), de 43.47% com o seu homólogo de seres humanos (RLA2 humano) e 51.87% com Lip2b de *Leishmânia infantum* (RLA2 LEIIN). A homologia superior é mostrada nos terminais de amino e carboxi. A proteína tem uma zona central muito flexível rica em prolínas e anilinas. Na figura de sequência (ver depois) são mostradas com um bar vertical de aminoácidos que são idênticos em quatro proteínas Lip2a, Lip2b de *Leishmânia*, TcP2 homólogo de *Tripanossoma cruzi* (RLA2 TRYCR) e HuP2 humano homólogo (RLA2 humano).

Um total de 12 BALB/c de ratos foram inoculados com 5 microgramas do rLip2a proteico solúveis num tampão salino. A

rota de inoculação foi intraperitoneal, e a programação de imunização foi de duas doses separadas entre estas por três semanas (21 dias). Sangue foi tomado de ratos nos dias 0,7 e 28 e os soros respectivos eram analisados. A Figura 7 (painel A) mostra os títulos de imunoglobulinas G e M presentes no soro de ratos nos dias 7 e 28, indicando que depois da primeira dose a resposta foi principalmente IgM, com uma maturação em direção a IgG depois de a segunda inoculação. Supondo que as citocinas estão relacionadas com uma resposta de Th1 e que produzem uma resposta principalmente de IgG2a e as citocinas segregadas pelas superpopulações de Th inobservados de linfócito estimulam uma resposta de IgG1, os títulos dos mais abundantes subtipos de IgG gerados depois das duas doses de antígeno eram analisados. A Figura 7B mostra que o isótipo de IgG mais abundante em ratos imunizados com a proteína de rLip2a correspondia ao IgG2 de imunoglobulina depois da primeira dose e que o Th2 aumenta depois da segunda dose. Conclui-se que a imunização deste antígeno gera uma mistura de resposta do Th1/Th2, embora a resposta seja principalmente Th1 nas primeiras semanas de imunização. As proteínas usadas neste estudo foram purificadas a partir de endotoxinas mediante colunas de polimixina.

Tomar em conta a natureza conservada desta proteína, um estudo foi necessário da especificidade da resposta humoral gerada depois da imunização. Com este objetivo, o reconhecimento dos soros de ratos imunizados foi analisado (soros obtidos no dia 28) contra peptídeos sintéticos. A figura 8-A ilustra os resultados obtidos, mostrando o reconhecimento dos soros de ratos imunizados em direção a três dos péptidos, A4-A6. A região da proteína contida

naqueles péptidos é específica para as proteínas acídicas do tripanosomatidos, sem reatividade sendo detetados contra o péptido A7, que contém o conservado carboxilo terminal da proteína. Esta especificidade de resposta foi confirmada quando a análise de "Western Blot" foi conduzida para analisar a reatividade dos soros contra proteínas acídicas de Leishmânia, MBP-Lip2a e MBP-Lip2b, humano MBP-P2 e MBP-P" de T. cruzi. O reconhecimento foi apenas obtido em direção às proteínas acídicas de parasitas, com a reatividade gerada ao máximo contra MBP-Lipsa (painel B, linha 2) e um não caso de anticorpos gerados contra as proteínas ácidas superiores de eucariotas (conservado com o humano P2 usado no ensaio). Por último, pode ser mencionado que um dos péptidos reconhecidos coincide com o péptido reconhecido pelo soro dos cães afetados por viscerocutaneas leishmanioses.

Os baços eram extraídos de ratos que tinham sido imunizados duas semanas depois da última imunização e a sua proliferação foi analisada contra concentrações diferentes de antigénio. Os resultados tabulados na figura 9-A mostram os valores (em cpm) de timidina tritiada incorporados pelos esplenócitos de ratos imunizados depois de 96 horas. Os valores obtidos mostram que houve uma relação direta entre a concentração de antigénio e a proliferação celular. Surpreendentemente, os mesmos resultados foram obtidos quando a proliferação de esplenócitos foi analisada que foram obtidos de ratos não-imunizados. Este resultado indica que o Lip2a de proteína tem características imunogénicas muito potentes.

Para implicar diretamente a proteína de proliferação, eliminando a possibilidade de que poluentes bacterianos poderiam ser provocantes do dito fenómeno, o efeito da

presença de um anti-Lip2a anticorpo gerado num coelho foi analisado. Painéis B e C da figura 9 mostram o efeito em proliferação das diferentes diluições de anticorpos. Assim, enquanto o 1/100 de diluição tem provocado uma redução na proliferação induzida ambos por um mitógeno (concanavalin A, -ConA) e pelo antigénio, embora tenha sido sempre superior no caso final último, altas diluições (1/500 e 1/1000) apenas se têm dirigido a uma redução na proliferação induzida pelo antigénio.

Para caracterizar o tipo de resposta gerada, a gama-INF de linfoquinas e IL-4 produzidas nos ensaios de proliferação eram analisadas, ambos para os esplenócitos de ratos de controlo e de ratos imunizados. Na tabela abaixo, são mostrados os resultados obtidos. Estes indicam que a proliferação provocada pelo antigénio gera um aumento significativo na secreção de INF-gama, especialmente em esplenócitos de ratos imunizados. De forma semelhante, um aumento ligeiro foi detetado nos níveis de IL-4 nas culturas de esplenócitos que proliferam na presença de antigénio em relação aqueles que proliferado no meio sem estímulo adicionado. Estes resultados indicam que a resposta tem gerado pelo antigénio uma proliferação celular que conduz à produção de um modelo de linfoquinas nas quais predomina o tipo Th1. Estes resultados sugerem que o Lip2a proteico pode ser usado como um adjuvante ou como uma subunidade numa vacina e assim poderia ser relevante para o tratamento e/ou prevenção de doenças presentes em animais e seres humanos.

		IL-4 (pg/ml)	INF-gama (ng/ml)
Imunizado	ConA	99	8.4
	Lip2a	80	5.8
	Meio	40	0.5
Controlos	ConA	98	6.1
	Lip2a	61	1.2
	Meio	13	0.4

Três doses de 5 microgramas de Lip2a foram administradas em PBS em intervalos de 15 dias a um grupo de quatro BALB/c ratos (5 microgramas por rato). Uma semana depois da última dose, eles foram infetados com 5×10^4 à promastigotes de uma estirpe infecciosa de L. prefeito na almofada de plantar da pata direita de ambos os ratos imunizados e os correspondentes aos controlos (os quais recebiam apenas PBS). A dimensão da lesão na pata foi medida semanalmente, obtendo-se os resultados que são mostrados na figura 10. Os resultados obtidos indicam que a imunização da proteína Lip2a levaram a um atraso no aparecimento de lesões de duas semanas, com a dimensão da lesão não crescente até 5 semanas nos ratos imunizados, enquanto que nos controlos não-imunizados, as lesões aparecem depois da terceira semana. Adicionalmente, o inchaço provocado pela infeção em ratos imunizados é menor que nos controlos, até que se torne a mesma a partir da semana 8 em diante.

Lisboa, 17 de Novembro de 2015

SEQ ID No:1 do fragmento Sal 1 - Sal 1 L22g. O nucleótido sequencial dos clones de cDNA L22 e L31 é mostrado em **negrito**.

SEQ ID NO 1

```

1                               70
gtcgacggcg acatggctag agcagtttgt gcagctcccg ctgagcgaca agaaacacga tctgccgcgt

71                               140
cgccacggag gtgtttctcc atgcctttgt ccagtgcac aatgagtcog ggatctttgt cgcaccacca

141                               210
gcaaaagagg agcagtgcc actcgcggcc ttaggaacgg caatgcgacc ttttgacag taccccgagg

211                               280
agacgatcgc ccaggcaaat gcgtttctgc atcaaggagg gcttcgcac gtcccgctcg cagctgaggg

281                               350
ggtaggagcag caggttatga atctccagcg gctgcattaa tcgcgcctg ccagacaccg gggaggctct

351                               420
ctgtttctgt ttttgcggtg tgcgtcttcc tctttatggt tgctccttg tgtctgtcgg ttaagagctc

421                               490
ctcccttgcc cagaaaacag gagtaaccga gtacgcgcga gcgcctgcgc cacacgttgt ccattggaacc

491                               560
cctccctccc tcgtcctccc cttctccact cctccttct gggtagctga tgtgtgtgtg catgtgtgtg

561                               630
taactttgac tcggtgtggc tggcacgctg cgcctccccc cccccccccc ccaaaaaaaaa aaaacagcat

631                               700
catcagtggg ctgacctgga tacatctcct cctctccttg tgttcccat cccctcttcg ctcttctctc

701                               770
atgcacctcg ccactgcgc gcatacgcga cgcacatcg cggctacgga acacgcgacc cccacccac

771                               840
atagggttttt tcaacgagaa atgcagtacc ttgccgcgta cgcctctctg gcgtgtgtg gcaagacgc
[L22]

841                               910
gtcgaaggcg gacgttcagg ctgtcctgaa ggccgcgggc gttgcctgg atgcctcccg cgtggatgcc

911                               980
gtcttccagg aggtggaggg caagagcttc gatgcgctgg tggccgaggg ccgcacgaag ctggtgggct

981                               1050
ctggctctgc cgtctctgct ggcgtgtct ccactgctgg tgcggcgct ggcgcggtgg ccgaggcgaa

1051                               1120
gaaggaggag cccgaggagg aggaggccga tgatgacatg ggcttcggtc tctttgacta agcagccccg

1121                               1190
cactgcgctg caggcgcctc tgccgaagat tctcagcgg gctgtctctc attgttgtga tgcacgttt

```

1191 1260
 ctttttttgc ttgtgaacttc ggttcgttctt ttgatttcga gtggaaagac totgcaaato gaacaaccgc
 L22}
 1261 1330
 tgcgagatga gctgggagcg taggcgaggt ggctgctcgc gaggtgttaa cgaaaaaaaaa aagacagcag
 1331 1400
 cggcgccctc ggcacaaaaca cagcgagccc tcccctcccc cgttcgttc ctcctcgaga agagagagac
 1401 1470
 aaagaatctc cacagacgct gtacgagagg caccggcctc gtcctcgaga gaagcaaccg cgttttcgtg
 1471 1540
 ccgtgaccgc ctgaccttcg ataaccgaga gaggggtgtct tctcttctca aagtgggttc attgcaagt
 1541 1610
 gctgctctac tgctccctct gctcgtcttc cccagttct cgtttcgtct cttttttgtt cgttcctatg
 1611 1680
 actttctctc atactgtttt tgctcttctg cgtacaagag gtgtatcaaa catgcagtac ctgcgcgcgt
 1681 1750
 acgcccctgt ggcgctgtct ggcaagagcg cgtcgaaggc ggacgttcag gctgtcctga aggcgcgcgcg
 1751 1820
 cgttgccgtg gatgcctccc gcgtggatgc cgtcttccag gaggtggagg gcaagagctt cgatgcgctg
 L31
 1821 1890
 gtggccgagg gtgcacgaa gctgggtggg tctggctctg cgcctcctgc tggcgctgtc tccactgctg
 1891 1960
 gtgcgcgcgc tggcgcggtg gccgaggcga agaaggagga gcccgaggag gaggaggccg atgatgacat
 1961 2030
 gggcttcggg ctctttgact aagcagcctc cgtgagtggt ctactgtcgt tactttttga cttgtttcat
 2031 2100
 ttgacttggt ttcttcccg aagcaaagaa cagagtaagg aagcatccat gcacgtcgaa gcgatgctac
 L31
 2101 2170
 gaaccggtct cctgctgcc catatccct cagcgacggc gaccctccct cctttccacg tgctgacctc
 2171 2240
 atctcctcca atctttcacc ttctcttctg tctctctct tgggttcct cttgaccgat cctgcacga
 2241 2310
 ccatgaccag gtaattgcta tggtcttcca agagaatagg gactcctaca aggtcaaagc tttttccttg
 2311 2380
 tccgagtttg tgcggcagtg ttccgactgc caccagctgt gctcgagaa gacggccgc gttgtggaaa
 2381 2450
 acagcagctg tgcgcgcgcg ggatgggaag cctattcaa ctccgttgcg gaggagcggc ggtctgagga

```

2451                                     2520
cttggacctc tgcgagtcgc gatgcgggta catgcaggcc acctgcccggt cacaggagaa ggtccagcag

2521                                     2590
tacgagcagg ctctcgccgc cgcgttactc aagccgaaaa agagcacgcc cccaaacccg tctgtcttgc

2591                                     2660
aagacgcttc ccggtgcggc acgcggtcga gggtttctctg aacgtctctgt tgcccggtggc gcacaaaccc

2661                                     2730
agaaggtatc cttcccaacc aaagacctga aacgggaggc acaccgacgc cggteccacg ccggacggcc

2731                                     2800
gacggaggcg accgaagggtg ctcgagggga ccaagacatg gacaacgata tttcgcgccg ctggagcaag

2801                                     2850
cttcgccaag agcgcttcgg ctcaaaggca gagcacgttg ctccgtcgac

```

SEQ ID No:2 Sequência de nucleótidos do gene Lip2a cujos
códigos para o Lip2a da proteína e sequência de aminoácidos
da proteína de Lip2a.

SEQ.ID. NO.2

```

1                                     60
ATG CAG TAC CTT GCC GCG TAC GCC CTC GTG GCG CTG TCT GGC AAG ACG CCG TCG AAG GCG
Met Gln Tyr Leu Ala Ala Tyr Ala Leu Val Ala Leu Ser Gly Lys Thr Pro Ser Lys Ala
5 10 15 20

61                                     120
GAC GTT CAG GCT GTC CTG AAG GCC GCC GGC GTT GCC GTG GAT GCC TCC CGC GTG GAT GCC
Asp Val Gln Ala Val Lys Lys Ala Ala Gly Val Ala Val Asp Ala Ser Arg Val Asp Ala
25 30 35 40

121                                     180
GTC TTC CAG GAG GTG GAG GGC AAG AGC TTC GAT GCG CTG GTG GCC GAG GGC CGC ACG AAG
Val Phe Gln Glu Val Glu Gly Lys Ser Phe Asp Ala Leu Val Ala Glu Gly Arg Thr Lys
45 50 55 60

181                                     240
CTG GTG GGC TCT GGC TCT GCC GCT CCT GCT GGC GCT GTC TCC ACT GCT GGT GCC GGC GCT
Leu Val Gly Ser Gly Ser Ala Ala Pro Ala Gly Ala Val Ser Thr Ala Gly Ala Gly Ala
65 70 75 80

241                                     300
GGC GCG GTG GCC GAG GCG AAG AAG GAG GAG CCC GAG GAG GAG GAG GCC GAT GAT GAC ATG
Gly Ala Val Ala Glu Ala Lys Lys Glu Glu Pro Glu Glu Glu Glu Ala Asp Asp Asp Met
85 90 95 100

301                                     321
GGC TTC GGT CTC TTT GAC TAA
Gly Phe Gly Leu Phe Asp *
106

```

SEQ ID N° 3

```

1
MRGSHHHHHH TDPHASSVPS SLVIEGRISE FAAAFQREMQ YLAAYALVAL 50

51
SGKTPSKADV QAVLKAAGVA VDASRVDAVF QEVEGKSFDA LVAEGRTKLV 100

101
GSGSAAPAGA VSTAGAGAGA VAEAKKEEPE EEEADDDMGF GLFD 144

```

Sequência de aminoácidos do Lip2a proteico (SEQ ID No.2) tem expresso no vetor PQE-31 (SEQ ID No.3)

```

Lip2a      MQYLAAYALVALSGKT.PSKADVQAVLKAAGVAVDASRVDAVFQEVEGK 48
           ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Lip2b      MSTKYLAAYALASLSKAS.PSQADVEAICKAVHIDVDQATLAFVMESVTGR 50
           ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
HuP2       MRYVASYLLAALGGNSSPSAKDIKKILDSVGIEADDDRLNKVISELNGK 49
           ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
TcP2       MKYLAAYALVGLSGGT.PSKSAVEAVLKAAGVPVDPERSVDALFAEFAGK 48

Lip2a      SFDALVAEGRTKL....VGSGSAAPAGAVSTAGAGAGAVAEAKK....E 89
           | | | | | | | | | | | | | | | | | |
Lip2b      DVATLIAEGAAKMSAMPAASSGAAAGVTASAAGDAAPAAAAAKK....D 95
           | | | | | | | | | | | | | | | | | |
HuP2       NIEDVIAQGIGKLASVPAGGAVAVSAAPGSAAPAAGSAPAAAEKKDEK 98
           | | | | | | | | | | | | | | | | | |
TcP2       DFDTVCTEGKSKLVGGVTRPNAATASAPTAAAAASSGAAAPAAA..... 92

Lip2a      EPEEEEEADDDMGFGLFD 106
           || ||||| ||||| |||||
Lip2b      EP.EEEADDDMGFGLFD 111
           || ||||| ||||| |||||
HuP2      KEESEESDDDDMGFGLFD 115
           || ||||| ||||| |||||
TcP2      ..AEEEEDDDDMGFGLFD 107

```

REFERÊNCIAS CITADAS NA DESCRIÇÃO

Esta lista de referências citadas pelo Titular tem como único objetivo ajudar o leitor e não forma parte do documento de patente europeia. Ainda que na sua elaboração se tenha tido o máximo cuidado, não se podem excluir erros ou omissões e a EPO não assume qualquer responsabilidade a este respeito.

Documentos de Pedidos de Patente citados na descrição

ES 2133236

Literatura que não é patente citada na descrição

MANUEL SOTO et. Al. The Journal of Biological Chemistry, 1993, vol. 268(29), 21835-21843

Reivindicações

1. Uma composição para estimular uma resposta imunitária em indivíduos imunizados ou em grupos de células, caracterizado pelo facto de que a dita composição consiste numa solução salina que:

- compreende Lip2a de proteína de Leishmânia representada por SEQ ID NO:2 ou um polipéptido que difere apenas por substituições conservadas dos aminoácidos de SEQ ID NO:2 dos quais os grupos de aminoácido representam mudanças conservadas são (1) ala, pro, gly, glu, asp, gln, asn, ser, thr; (2) cys, ser, tyr, thr; (3) val, ile, leu, met, ala, phe; (4) lys, arg, his; e (5) phe, tyr, trp, his, ou

- compreende uma codificação de ácido nucleico do Lip2a Leishmânia proteica como identificado acima, ou sendo representado por SEQ IS NO:1.

2. Uma composição de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por ser ainda mais compreendido um adjuvante tal como esférulas biodegradáveis, ISS (isto é sequências imunoestimulatórias), BCG, ou lipossomas.

3. Uma composição de acordo com as reivindicações 1 ou 2, caracterizado por compreender pelo menos um antigénio.

4. Um método para estimular in vitro uma resposta imunitária em células mononucleadas imunizadas ou não com a proteína Lip2a representadas por SEQ ID NO:2, caracterizado por

compreenderem uma incubação das ditas células mononucleadas com a composição de acordo com a reivindicação 1.

5. Um método de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo facto de que a dita incubação compreende pelo menos mais um antigénio.

6. Um método de acordo com a reivindicação 4 ou 5, caracterizado pelo facto de que as ditas células mononucleadas são células periféricas mononucleadas.

7. Uso da composição como definido com quaisquer uma das reivindicações 1 a 3, para a produção de um medicamento para estimular in vivo uma resposta imunitária contra um antigénio.

8. Uso de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo facto de que a dita composição é administrada para um indivíduo na presença de pelo menos um antigénio.

9. Uso da composição como definido na reivindicação 1, para a produção de um adjuvante numa vacina para a prevenção de Leishmanioses.

10. Uso da composição como definido em reivindicação 1, para a produção de uma vacina para a prevenção de Leishmanioses, caracterizado pelo facto de que a dita composição é usada como uma subunidade da dita vacina

Lisboa, 17 de Novembro de 2015

Resumo

A composição e um método para a estimulação de uma resposta imunitária contra um antigénio em indivíduos imunizados ou em grupos de células. A composição compreende uma proteína chamada Lip2a Leishmania formada por uma sequência de aminoácidos codificados por uma sequência de ADN que compreende os nucleótidos: 1-1 da nos. 778 a 1231 de SEQ. ID. NO!1-2 ou formado por uma sequência de nucleótidos capazes de hibridar com a sequência descrita em 1-1 sob condições moderadamente rigorosas de hibridação e, portanto, que codificam para uma proteína semelhante à Lip2a. O método compreende a incubação das referidas células com a referida proteína Lip2a na presença ou não de um antigénio específico de uma doença ou infecção.

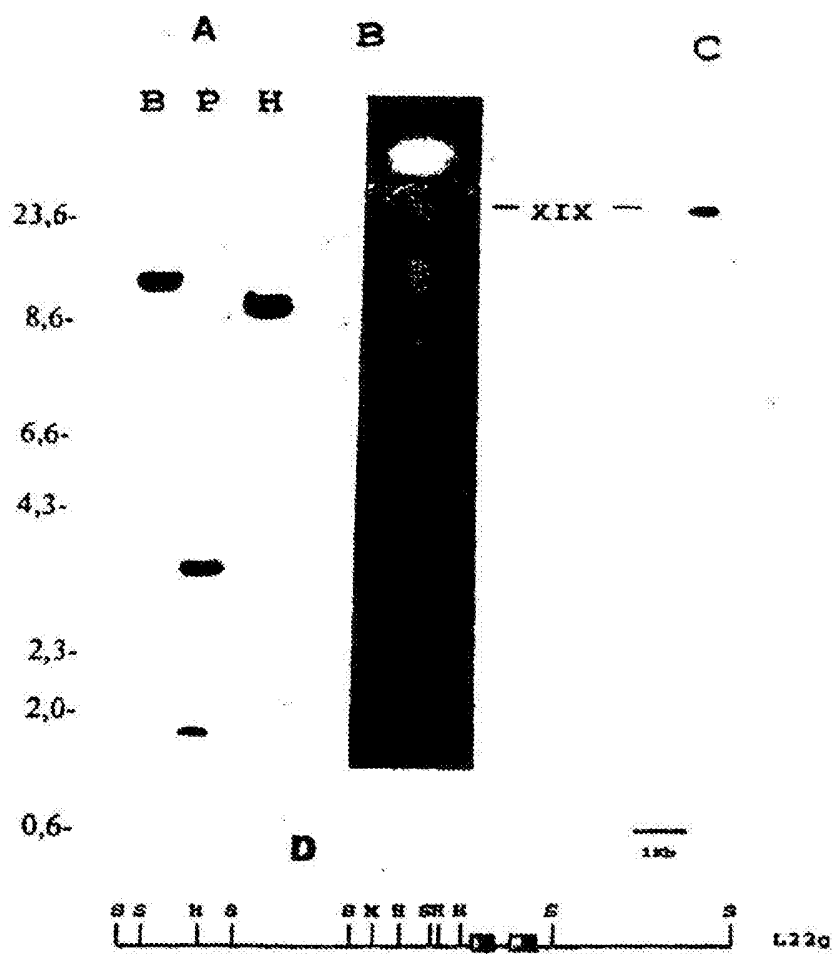


FIG. 1

A

1 2 3 4

FIG. 2



B



A

B

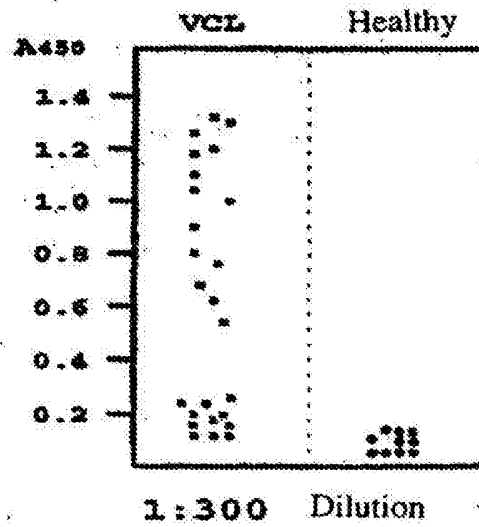
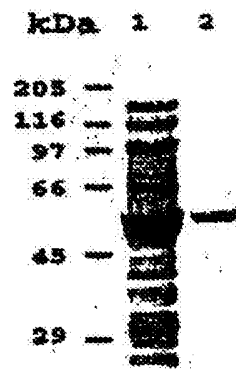


FIG. 3

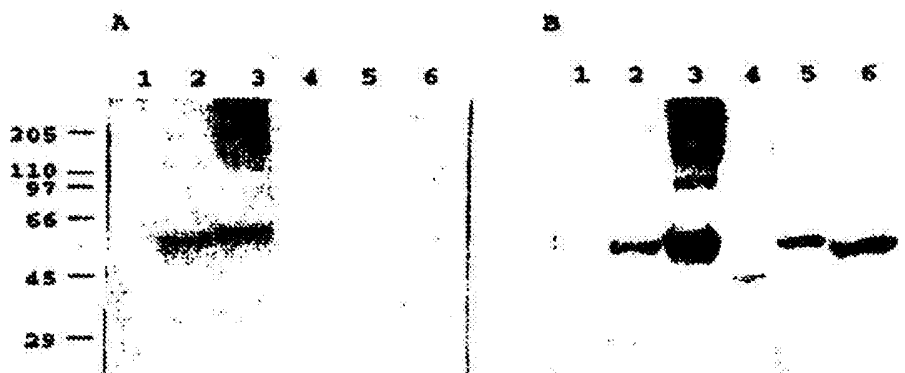


FIG. 4

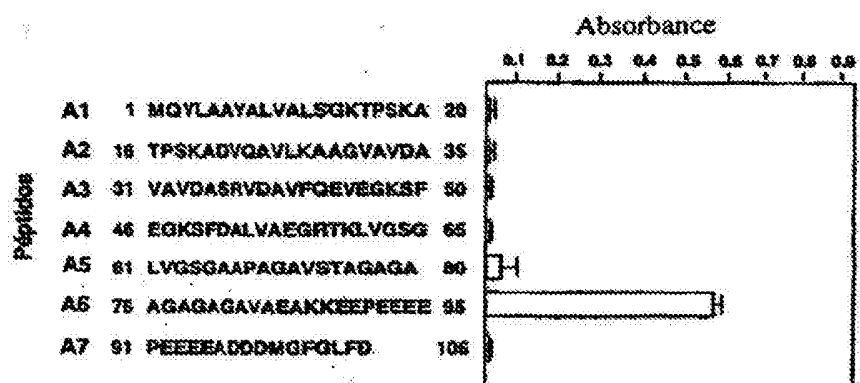


FIG. 5

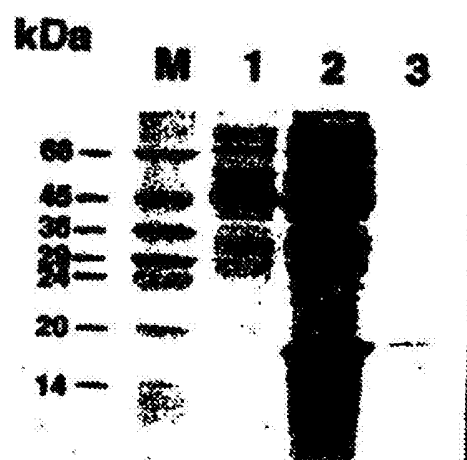


FIG. 6

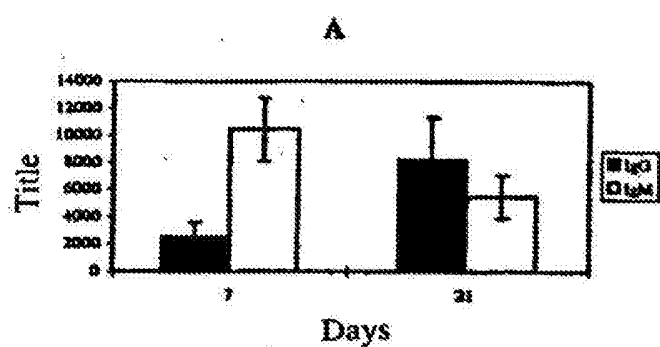
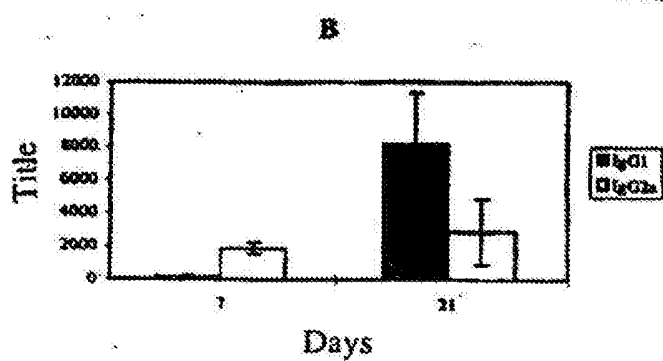


FIG. 7



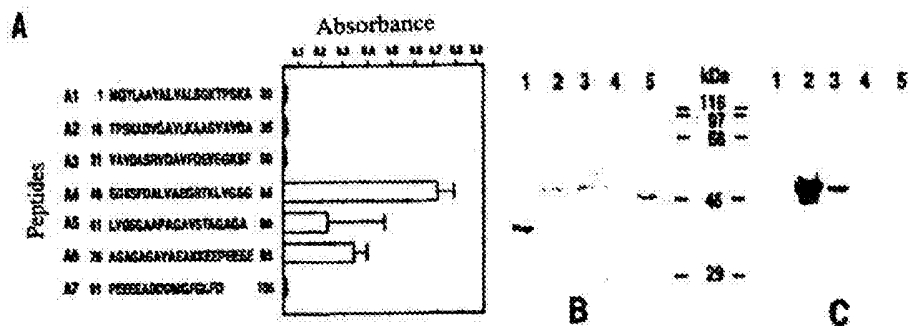


FIG. 8

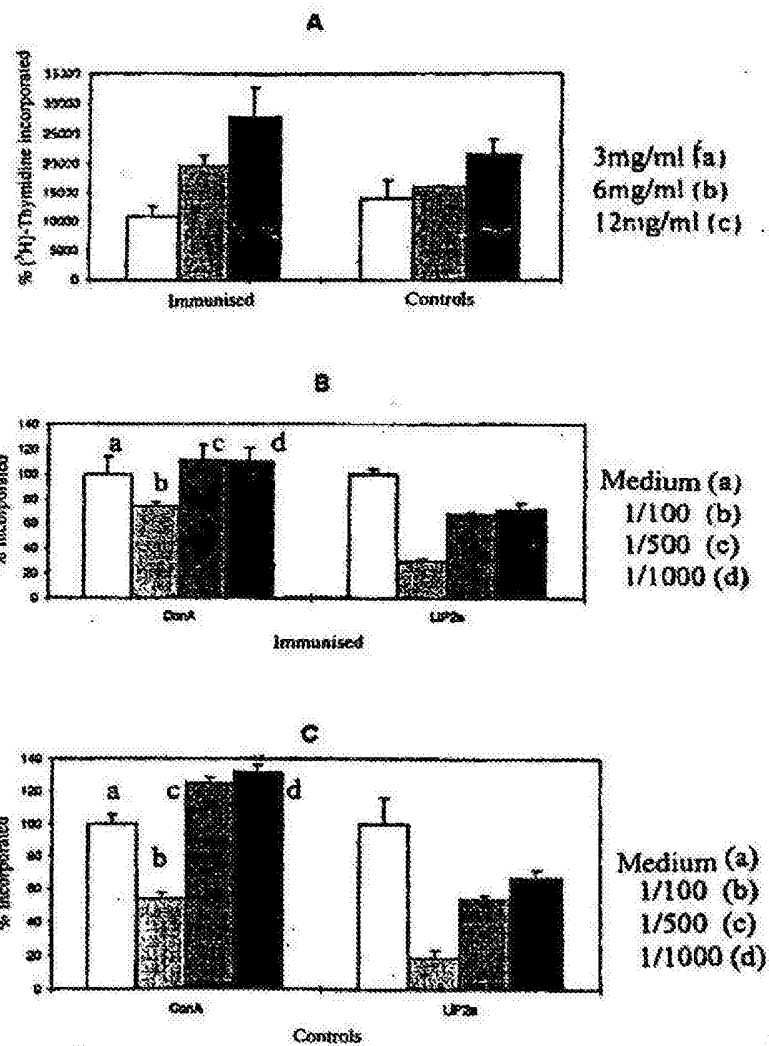


FIG. 9

FIG. 10

