



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 102020008111-0 A2



* B R 1 0 2 0 2 0 0 0 8 1 1 1 A 2 *

(22) Data do Depósito: 23/04/2020

(43) Data da Publicação Nacional: 07/12/2021

(54) Título: COMPOSIÇÃO VACINAL CONTRA LEISHMANIOSE VISCERAL E USO

(51) Int. Cl.: A61K 39/008; C07K 14/44; A61P 33/02.

(71) Depositante(es): UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS.

(72) Inventor(es): EDUARDO ANTONIO FERRAZ COELHO; JOÃO AUGUSTO OLIVEIRA DA SILVA; DANIELA PAGLIARA LAGE; GRASIELE DE SOUSA VIEIRA TAVARES; FERNANDA FONSECA RAMOS; AMANDA SANCHEZ MACHADO; DÉBORA VASCONCELOS COSTA MENDONÇA.

(57) Resumo: COMPOSIÇÃO VACINAL CONTRA LEISHMANIOSE VISCERAL E USO. A presente tecnologia trata de uma composição vacinal contendo a proteína piridoxal kinase de *Leishmania infantum*, encontrada conservada em diferentes espécies do gênero *Leishmania* e capaz de estimular resposta imune protetora do tipo Th1, com a produção de citocinas como interferon-gama e interleucina-12. A composição vacinal pode ser utilizada para a profilaxia contra a leishmaniose visceral no homem e no cão.

“COMPOSIÇÃO VACINAL CONTRA LEISHMANIOSE VISCERAL E USO”

[01] A presente tecnologia trata de uma composição vacinal contendo a proteína piridoxal kinase de *Leishmania infantum*, encontrada conservada em diferentes espécies do gênero *Leishmania* e capaz de estimular resposta imune protetora do tipo Th1, com a produção de citocinas como interferon-gama e interleucina-12. A composição vacinal pode ser utilizada para a profilaxia contra a leishmaniose visceral no homem e no cão.

[02] As leishmanioses são doenças infecto-parasitárias endêmicas em 98 países e três territórios distribuídos em regiões tropicais e subtropicais no mundo. Estima-se que 380 milhões de pessoas encontram-se expostas ao risco de contrair a doença e que haja uma incidência aproximada de 0,5 a 1,0 e 1,5 a 2,0 milhões de novos casos por ano de leishmaniose visceral (LV) e leishmaniose tegumentar (LT), respectivamente. No continente americano, calcula-se que o Brasil seja responsável por aproximadamente 95% dos casos de LV, o que torna a doença um importante problema de Saúde Pública e requer, dessa forma, uma atenção especial pelas autoridades competentes.

[03] A gravidade da doença no hospedeiro mamífero, no qual se enquadram o homem e o cão, alcança desde uma lesão cutânea única, no local da picada, até a forma visceral da doença, que pode ser fatal quando na forma aguda e não tratada. O cão é considerado o principal reservatório doméstico do parasita e é tido como uma importante fonte de transmissão entre o vetor flebotomíneo e o hospedeiro mamífero. Devido à ineficácia das medidas de controle utilizadas, à dificuldade para um diagnóstico correto e aos problemas de toxicidade relacionados aos tratamentos convencionais, o desenvolvimento de vacinas que sejam capazes de induzir imunidade protetora contra a doença torna-se desejável.

[04] Em modelos murinos, após a cura da leishmaniose causada pela espécie *Leishmania major*, os animais adquirem imunidade duradoura contra a reinfecção. Tal fato tem estimulado o desenvolvimento de pesquisas visando à obtenção de antígenos vacinais que possam ser utilizados como uma medida efetiva de controle da doença. Existem antígenos que vêm sendo avaliados e que preenchem, parcialmente, requisitos para serem empregados como candidatos à vacina. Preferencialmente, uma vacina efetiva deveria conter antígenos imunogênicos e conservados em diferentes espécies de *Leishmania*, além de apresentarem um custo acessível à população e seus governos.

[05] Em relação à resposta imune contra a infecção por *Leishmania infantum*, a resistência à infecção é relacionada com o desenvolvimento de uma resposta imune celular do tipo Th1, primada pela produção de interferon-gama (IFN- γ) por parte do hospedeiro mamífero. O mecanismo imunológico efetor responsável pelo controle dos parasitas parece ser decorrente da ativação de macrófagos, via produção de níveis elevados dessa citocina. Estudos que utilizam como base o modelo murino de infecção por *L. major* em camundongos BALB/c, proposto por Sacks & Noben-Trauth (2002), definiram o paradigma Th1/Th2 de resistência e susceptibilidade, respectivamente, à infecção e o papel de citocinas como o IFN- γ e a IL-4, respectivamente, no desenvolvimento de linhagens de células Th1 e Th2 (Sacks D & Noben-Trauth N. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. *Nat Rev Immunol.* 2;845-58, 2002). O desenvolvimento de uma resposta Th1 pode ser inibido pela produção de citocinas tais como a IL-10. Nesse sentido, IL-4 e IL-10 estão relacionadas à desativação de macrófagos e ao estabelecimento da doença, enquanto citocinas como IFN- γ e IL-12 estão relacionadas com o fenótipo de proteção contra a mesma.

[06] Pelo fato de não existir, até o momento, uma vacina comercial que seja protetora contra a LV no cão e no homem, e que seja de baixo custo, novos estudos fazem-se necessários. A utilização de ferramentas biotecnológicas modernas tem levado à identificação de novos alvos com potencial para o emprego no desenvolvimento de vacinas contra doenças.

[07] A enzima piridoxal kinase catalisa a reação de fosforilação do piridoxal, gerando piridoxal 5- fosfato utilizando uma molécula de Adenosina Trifosfato (ATP). A enzima de *Leishmania donovani* foi recentemente caracterizada (Are S, Gatreddi S, Jakkula P, Qureshi IA. Structural attributes and substrate specificity of pyridoxal kinase from *Leishmania donovani*. Int J Biol Macromol. 24;152:812-827, 2020). Além do mais, proteína piridoxal kinase recombinante foi utilizada como epítipo específico de linfócitos B, sendo indicada para o diagnóstico de leishmaniose visceral (Oliveira-da-Silva, JA et al. Evaluation of *Leishmania infantum* pyridoxal kinase protein for the diagnosis of human and canine visceral leishmaniasis. Immunol Lett. 220:11-20, 2020).

[08] Por meio da utilização da imunoproteômica, recentemente, proteínas de *Leishmania infantum* foram reconhecidas por anticorpos presentes nos soros de pacientes com LV (Lage DP, Ludolf F, Silveira PC, Machado AS, Ramos FF, Dias DS, Ribeiro PAF, Costa LE, Vale DL, Tavares GSV, Martins VT, Chávez-Fumagalli MA, Caligiorne RB, Chaves AT, Gonçalves DU, Rocha MOC, Duarte MC, Coelho EAF .Screening diagnostic candidates from *Leishmania infantum* proteins for human visceral leishmaniasis using an immunoproteomics approach. Parasitology 146:1467-1476, 2019).

[09] A presente invenção trata de uma composição vacinal contendo a proteína piridoxal kinase recombinante (rPK) usada como imunógeno associada à saponina como adjuvante de resposta imune. A combinação se mostrou eficaz na proteção contra a infecção causada pela espécie *L.*

infantum, causadora de LV. A proteína foi capaz de estimular a linfoproliferação e a maior produção de IFN- γ e menores níveis de IL-4 e IL-10 em células mononucleares de sangue periférico (PBMCs) de humanos saudáveis e de pacientes com LV antes e após seu tratamento, demonstrando também sua eficácia contra a doença nesse hospedeiro mamífero.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA TECNOLOGIA

[010] A presente tecnologia trata de uma composição vacinal contendo a proteína piridoxal kinase de *Leishmania infantum*. A composição vacinal pode ser utilizada para profilaxia contra leishmaniose visceral.

[011] Mais especificamente, a composição vacinal compreende proteína piridoxal kinase de *Leishmania*, ou seus epítomos correspondentes, e adjuvantes farmacêutica e farmacologicamente aceitáveis. A proteína piridoxal kinase de *Leishmania* pode ser definida pela SEQ ID N° 1.

[012] Os adjuvantes na composição vacinal proposta devem estimular resposta imune do tipo Th1 sendo, preferencialmente, saponina e moléculas de lipossomas compostos por 1,2-dipalmitoyl-sn-3-phosphocholine (DPPC) e colesterol.

[013] A composição vacinal pode ser administrada pelas vias oral, subcutânea, intradérmica, nasal, intramuscular, intravenosa, e/ou como dispositivo que possa ser implantado e/ou injetado.

[014] A composição vacinal pode ser utilizada para tratamento e/ou prevenção da leishmaniose visceral em cães e humanos.

[015] A presente tecnologia pode ser mais bem compreendida pelos exemplos que se seguem, não limitantes.

EXEMPLO 1. PRODUÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE

[016] O gene que codifica a proteína PK (XP_001466975.1) em *L. infantum* foi comercialmente sintetizado no vetor pET-28a (+)-TEV usando as enzimas BamHI e EcoRI (Genscript®, USA). O plasmídeo

recombinante pET-28a (+)-TEV/PK foi transformado em células *Escherichia coli* BL21 (Agilent Technologies, EUA) e a expressão da proteína foi realizada após a indução com isopropil β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG; 0,1 mM; Sigma-Aldrich, USA) por 3 h a 37°C e com agitação a 200 x g por minuto. As células foram rompidas por seis ciclos de ultrassom, com ciclos de 30 segundos cada (38 MHz), seguidos por cinco ciclos de congelamento e descongelamento. A proteína recombinante foi purificada em uma coluna de afinidade HisTrap HP (GE Healthcare Life Sciences, Nova Jersey, EUA) ligada a um sistema AKTA. As frações eluídas foram concentradas em filtros Amicon® ultra-15, com limite de peso molecular de 10.000 (NMWL, Millipore, Alemanha), e purificadas em coluna de filtração de gel Superdex™ 200 (GE Healthcare, EUA). A proteína foi passada através de uma coluna de polimixina-agarose (Sigma-Aldrich, USA), a fim de se remover qualquer conteúdo residual de endotoxina (Quantitative Chromogenic Limulus Amebocyte Assay QCL-1000, BioWhittaker, MD, USA).

EXEMPLO 2. AVALIAÇÃO DA LINFOPROLIFERAÇÃO E PRODUÇÃO DE CITOCINAS POR PBMCS HUMANOS

[017] Com o objetivo de avaliar a resposta linfoproliferativa de PBMCS humanos, as células de indivíduos saudáveis e de pacientes com LV antes e após o tratamento foram purificadas, quantificadas e estimuladas *in vitro* com a proteína rPK. Nos resultados, verificou-se que a população celular obtida proliferou em níveis mais elevados quando a proteína foi utilizada como estímulo, em comparação com os valores obtidos nas culturas não estimuladas ou estimuladas com SLA dos parasitas. Os níveis de proliferação celular de PBMCS de indivíduos saudáveis usando a proteína e o SLA de *L. infantum* foram de $8.78\% \pm 0.44\%$ e $2.35 \pm 0.12\%$, respectivamente, enquanto que usando células de pacientes com LV antes do tratamento foram de $4.33\% \pm 0.24\%$ e $1.02 \pm 0.22\%$, respectivamente, e

dos pacientes após o tratamento os valores foram de $6.23\% \pm 0.54\%$ e $1.55 \pm 0.20\%$, respectivamente. A produção de IFN- γ foi maior após estímulo com a proteína rPK, quando comparado ao estímulo usando SLA, conforme pode ser observado na Tabela 1.

[018] **Tabela 1. Níveis de produção das citocinas IFN- γ , IL-4 e IL-10 (em pg/mL) em PBMCs humanos. As citocinas foram quantificadas em sobrenadantes de cultura de PBMCs de pessoas saudas e pacientes com LV antes e após o tratamento, que foram coletadas e estimuladas *in vitro* com rPK ou SLA *L. infantum*. A média \pm desvio padrão dos grupos é mostrada.**

	Estímulo	Citocinas (pg/mL)		
		IFN-gama	IL-4	IL-10
PBMCs de pessoas saudas (pool)	Meio	40.6 \pm 5.4	33.2 \pm 4.6	28.5 \pm 5.2
	rPK	788.7 \pm 23.4	40.1 \pm 4.4	35.5 \pm 3.4
	SLA	212.3 \pm 32.2	55.6 \pm 6.5	65.5 \pm 5.6
PBMCs de pacientes antes do tratamento (pool)	Meio	34.5 \pm 2.6	34.5 \pm 2.6	31.2 \pm 3.0
	rPK	322.2 \pm 26.6	44.4 \pm 3.6	40.6 \pm 2.6
	SLA	113.3 \pm 15.5	155.5 \pm 23.3	266.6 \pm 42.2
PBMCs de pacientes após tratamento (pool)	Meio	38.8 \pm 3.6	37.7 \pm 2.7	28.8 \pm 4.2
	rPK	603.4 \pm 20.4	42.2 \pm 3.4	47.7 \pm 5.6
	SLA	155.4 \pm 13.3	100.3 \pm 12.2	125.5 \pm 10.2

EXEMPLO 3. AVALIAÇÃO DA IMUNOGENICIDADE ANTES DA INFECÇÃO

[019] A imunogenicidade da proteína rPK foi avaliada em camundongos BALB/c imunizados, por meio da dosagem das citocinas IFN- γ , IL-12, GM-CSF, IL-4 e IL-10 produzidas pelos esplenócitos dos animais, 30 dias após a administração da última dose da vacina. Após o estímulo *in vitro* com a proteína ou com o antígeno solúvel (SLA) de *L. infantum*, observou-se a produção de níveis significativamente elevados de IFN- γ , IL-12 e GM-CSF no grupo dos animais vacinados, em relação aos níveis produzidos pelos esplenócitos dos grupos controle, constituídos por animais que receberam

saponina ou salina (**Tabela 2**). Nenhum aumento na produção de IL-4 e IL-10 foi observado em qualquer grupo experimental.

[020] **Tabela 2. Níveis de produção das citocinas IFN- γ , IL-12 e GM-CSF (em pg/mL), antes da infecção desafio. As citocinas foram quantificadas em sobrenadantes de cultura de esplenócitos dos animais, que foram coletados 30 dias após a administração da última dose do imunógeno, e estimulados com rPK ou com SLA de *L. infantum*. A média \pm desvio padrão dos grupos é mostrada.**

	Estímulo	Citocinas (pg/mL)		
		IFN-gamma	IL-12	GM-CSF
Salina	Meio	35.6 \pm 3.3	26.7 \pm 3.4	30.5 \pm 2.5
	rPK	40.5 \pm 3.4	36.6 \pm 2.5	37.6 \pm 3.7
	SLA	32.2 \pm 2.6	30.2 \pm 2.5	26.6 \pm 3.2
Saponina	Meio	40.3 \pm 2.6	35.5 \pm 3.4	40.3 \pm 3.7
	rPK	56.6 \pm 3.4	47.7 \pm 3.6	50.4 \pm 5.0
	SLA	44.5 \pm 3.6	41.1 \pm 5.4	42.1 \pm 3.3
rPK	Meio	45.5 \pm 5.5	46.6 \pm 4.6	39.8 \pm 3.6
	rPK	455.4 \pm 22.3	133.2 \pm 15.4	112.8 \pm 13.2
	SLA	60.5 \pm 11.2	58.8 \pm 6.6	50.8 \pm 7.7
rPK/saponina	Meio	48.7 \pm 4.4	42.3 \pm 3.4	47.7 \pm 5.2
	rPK	1.099.0 \pm 64.5	232.2 \pm 20.3	177.8 \pm 12.3
	SLA	456.6 \pm 24.3	98.6 \pm 10.3	89.6 \pm 8.6

EXEMPLO 4. AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DA VACINA

[021] Quarenta e cinco dias após a infecção desafio, a carga parasitária dos grupos foi avaliada no fígado, baço, linfonodos drenantes e medula óssea dos animais infectados pela técnica de diluição limitante. Os resultados são mostrados na **Tabela 3**. Pode-se observar que os animais imunizados com rPK/saponina que mostraram reduções altamente significativas na carga parasitária, quando comparado aos demais grupos experimentais.

[022] **Tabela 3. Resultados da carga parasitária dos animais imunizados e infectados com *L. infantum*. A carga parasitária foi**

determinada por uma técnica de diluição limitante, 45 dias após a infecção desafio. A média \pm desvio padrão dos grupos é mostrada. Dados são provenientes de dois experimentos diferentes, que apresentaram resultados semelhantes.

	Carga parasitária (em log)			
	Baço	Fígado	Linfonodos	Medula óssea
Salina	4.5 \pm 0.4	3.8 \pm 0.3	5.6 \pm 0.5	2.8 \pm 0.2
Saponina	4.1 \pm 0.5	3.4 \pm 0.5	4.7 \pm 0.4	2.5 \pm 0.3
rPK	3.3 \pm 0.3	2.7 \pm 0.3	3.1 \pm 0.5	1.9 \pm 0.5
rPK/saponina	0.9 \pm 0.3	0.7 \pm 0.2	1.1 \pm 0.2	0.3 \pm 0.1

EXEMPLO 5. Avaliação da resposta imune celular após a infecção

[023] A resposta imune celular foi também avaliada após a infecção desafio. As culturas de esplenócitos dos animais imunizados e infectados foram estimuladas com rPK ou com SLA de *L. infantum*, e se procedeu à dosagem das citocinas IFN- γ , IL-12, GM-CSF, IL-4 e IL-10. Nos resultados, observou-se a produção de níveis significativamente maiores de IFN- γ , IL-12 e GM-CSF no grupo dos animais vacinados com rPK/saponina, quando comparado aos demais grupos (**Tabela 4**). Os animais dos grupos salina e saponina produziram níveis significativamente maiores de IL-4 e IL-10, principalmente, quando comparado ao grupo rPK/saponina (**Tabela 5**).

[024] **Tabela 4. Níveis de produção das citocinas IFN- γ , IL-12 e GM-CSF (em pg/mL), após a infecção desafio. As citocinas foram quantificadas em sobrenadantes de cultura de esplenócitos dos animais, que foram coletados 45 dias após a infecção com *L. infantum*. Resultados são mostrados pela soma dos valores encontrados nas duas condições experimentais após estímulo com rPK ou com SLA de *L. infantum*. A média \pm desvio padrão dos grupos é mostrada.**

Estímulo	Citocinas (pg/mL)		
	IFN-gama	IL-12	GM-CSF

Salina	Meio	32.2±2.6	30.2±2.7	25.6±3.1
	rPK	43.3±2.7	41.2±3.3	38.7±4.0
	SLA	35.5±4.0	35.5±2.6	34.5±4.5
Saponina	Meio	44.4±3.7	38.7±2.7	42.2±3.6
	rPK	59.7±4.3	49.7±4.2	53.4±3.2
	SLA	54.5±4.7	44.5±3.7	48.7±4.5
rPK	Meio	54.5±3.6	42.4±3.7	46.5±2.7
	rPK	544.3±26.6	145.5±23.2	144.4±18.8
	SLA	188.9±13.4	99.8±5.4	86.7±3.6
rPK/saponina	Meio	50.4±5.3	46.5±5.0	46.8±3.7
	rPK	1.655.4±102.2	299.8±15.6	213.2±25.6
	SLA	887.7±23.4	197.7±15.6	185.6±16.5

[025] Tabela 5. Níveis de produção das citocinas IL-4 e IL-10 (em pg/mL), após a infecção desafio. As citocinas foram quantificadas em sobrenadantes de cultura de esplenócitos dos animais, que foram coletados 45 dias após a infecção com *L. infantum*. Resultados são mostrados pela soma dos valores encontrados nas duas condições experimentais após estímulo com rPK ou com SLA de *L. infantum*. A média ± desvio padrão dos grupos é mostrada.

	Estímulo	Citocinas (pg/mL)	
		IL-4	IL-10
Salina	Meio	36.3±3.0	43.2±4.5
	rPK	44.5±3.5	50.4±2.3
	SLA	244.3±31.1	343.2±24.4
Saponina	Meio	35.5±4.0	37.7±2.3
	rPK	40.5±3.3	45.5±2.3
	SLA	212.2±15.5	288.7±17.7
rPK	Meio	27.7±1.3	33.4±3.3
	rPK	41.1±3.6	38.8±6.2
	SLA	102.2±9.8	144.5±13.3
rPK/saponina	Meio	40.3±3.5	36.6±5.4
	rPK	43.5±5.4	50.3±2.3
	SLA	55.6±6.3	59.8±4.5

REIVINDICAÇÕES

- 1. COMPOSIÇÃO VACINAL CONTRA LEISHMANIOSE VISCERAL, caracterizada por** compreender a proteína piridoxal kinase de *Leishmania* ou seus epítomos correspondentes e adjuvantes farmacêutica e farmacologicamente aceitáveis.
- 2. COMPOSIÇÃO VACINAL CONTRA LEISHMANIOSE VISCERAL, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pela** proteína piridoxal kinase ser definida pela SEQ ID N° 1.
- 3. COMPOSIÇÃO VACINAL CONTRA LEISHMANIOSE VISCERAL, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo** adjuvante ser uma molécula estimuladora do tipo Th1, preferencialmente saponina e moléculas de lipossomas compostos por 1,2-dipalmitoyl-sn-3-phosphocholine (DPPC) e colesterol.
- 4. COMPOSIÇÃO VACINAL CONTRA LEISHMANIOSE VISCERAL, de acordo com as reivindicações 1 a 3, caracterizada por** ser administrada pelas vias oral, subcutânea, intradérmica, nasal, intramuscular, intravenosa, e/ou como dispositivo que possa ser implantado e/ou injetado.
- 5. USO** da composição vacinal definida pelas reivindicações 1 a 4, caracterizado por ser para o tratamento e/ou prevenção da leishmaniose visceral em cães e humanos.

RESUMO

“COMPOSIÇÃO VACINAL CONTRA LEISHMANIOSE VISCERAL E USO”

A presente tecnologia trata de uma composição vacinal contendo a proteína piridoxal kinase de *Leishmania infantum*, encontrada conservada em diferentes espécies do gênero *Leishmania* e capaz de estimular resposta imune protetora do tipo Th1, com a produção de citocinas como interferon-gama e interleucina-12. A composição vacinal pode ser utilizada para a profilaxia contra a leishmaniose visceral no homem e no cão.

Este anexo apresenta o código de controle da listagem de sequências biológicas.

Código de Controle

Campo 1



Campo 2



Outras Informações:

- Nome do Arquivo: Untitled_ST25.txt
- Data de Geração do Código: 23/04/2020
- Hora de Geração do Código: 18:39:54
- Código de Controle:
 - Campo 1: D816CFAE06D7DCBE
 - Campo 2: 5B436B184F1FC030